

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-515486
(P2025-515486A)

(43)公表日 令和7年5月15日(2025.5.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40		4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全136頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-563574(P2024-563574)			(71)出願人	522055544
(86)(22)出願日	令和5年4月14日(2023.4.14)				ピュリノミア バイオテック, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年11月22日(2024.11.22)				アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1, ウォーバン, ギル ストリート 2, スイート イー
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065762			(74)代理人	110001173
(87)国際公開番号	WO2023/212483				弁理士法人川口国際特許事務所
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)			(72)発明者	シャン, ヤン・ウー
(31)優先権主張番号	63/336,418				アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 8 6 4、ノース・レディング、パーク・ストリート・4 3 5
(32)優先日	令和4年4月29日(2022.4.29)			(72)発明者	ジャオ, ハイタオ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				中華人民共和国、1 0 0 0 8 2、ページン、ワンフーーチン、シュワイーフー
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				最終頁に続く
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 好酸球駆動性疾患及び障害を治療するための方法及び組成物

(57)【要約】

本開示は、部分的に、好酸球の細胞もしくは機能を低減させるための方法及び／または望まれない好酸球活性に関連する疾患もしくは状態を治療するための方法に使用するための抗C D 3 9抗体を含む組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における好酸球細胞または好酸球の機能を低減させる方法であって、前記対象に、抗CD39抗体またはその抗原結合断片を投与することを含み、前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 前記抗CD39抗体が、安定した免疫複合体を形成するように、ある部位で、エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ-1 (CD39) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインと、

(ii) FcγRIIIa受容体に結合し、a) CD39+細胞に対する抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び／または抗体依存性細胞食作用(ADCP)活性を前記抗CD39抗体に付与するFcγRIIIa結合部分と、を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記好酸球細胞が、CD39+好酸球細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記CD39+好酸球細胞が、

(i) CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受容体のαサブユニット(IL-5RαまたはCD125)、IL-3受容体のαサブユニット(IL-3RαまたはCD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-セレクトリン、EMR1、CCR3(CD193)、及びCRTb2(CD294)からなる群から選択される細胞表面マーカーのうちの1つ以上を共発現し；

20

(ii) CD45+CD11b+好酸球細胞であり；及び／または、

(iii) CD45+CD11b+Siglec-8+好酸球細胞である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 24時間後の免疫複合体の30%未満の喪失を特徴とする、HCC1739BL細胞とインキュベートした場合の安定した免疫複合体形成(任意選択で、前記免疫複合体形成は、蛍光標識二次抗体を使用して、蛍光強度によって検出される)；

(ii) CD39+好酸球の枯渇；

30

(iii) 図30に列挙されたCD39アミノ酸エピトープ配列の群から選択された配列を有するCD39エピトープへの結合；及び／または

(v) CD39に結合するモノクローナル抗体クローンA1と非競合的または一部のみ競合する様式でのCD39への結合、

を促進する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、ADCC媒介性殺傷及び／またはADCP媒介性殺傷を介してCD39+好酸球の枯渇を促進する、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、前記CD39+好酸球によって取り込まれ、前記CD39+好酸球に対して毒性を有する抗体-薬物コンジュゲートの形態で、CD39+好酸球の枯渇を促進する、請求項4に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記FcγRIIIa結合部分が、Fcドメイン、FcγRIIIaに結合する抗体またはその断片、及びFcγRIIIa結合ペプチドからなる群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗原結合ドメインが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvまたは一本鎖Fv(scFv)、Fav、dsFv、sc(Fv)₂、Fde、sdFv、単ドメイン抗体(dAb)、及びダイアボディ断片からなる群から選択され、任意選択で、前記抗原結合

50

ドメインが、配列番号 40 の配列を含む s c F V である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗 C D 3 9 抗体または抗原結合断片がモノクローナルである、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得るアミノ酸配列を有する V H ドメインと、ストリンジェントな条件下で配列番号 3 の核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得るアミノ酸配列を有する V L ドメインと、を有する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または 54 の C D R と少なくとも 60 % 同一である C D R を有する重鎖と、配列番号 4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または 56 の C D R と少なくとも 60 % 同一である C D R を有する軽鎖と、を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または 54 と少なくとも 60 % 同一である可変重鎖（V H）と、配列番号 4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または 56 と少なくとも 60 % 同一である可変軽鎖（V L）と、を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、
（i）配列番号 29 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する相補性決定領域（C D R）H 1、配列番号 30 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R H 2、及び配列番号 31 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変ドメインと、
（i i）配列番号 32 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 33 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R L 2、及び配列番号 34 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、
（i）配列番号 29 の配列を有する C D R H 1、配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R H 2、及び配列番号 31 の配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変ドメインと、
（i i）配列番号 32 の配列を有する C D R L 1、配列番号 33 の配列を有する C D R L 2、及び配列番号 34 の配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、
（i）配列番号 2 の配列を含む重鎖可変ドメインと；
（i i）配列番号 4 の配列を含む軽鎖可変ドメインと、
を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、
（i）配列番号 36 の配列を含む重鎖と；
（i i）配列番号 38 の配列を含む軽鎖と、
を含む、請求項 15 に記載の方法。

50

【請求項 17】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、配列番号6、10、14、18、22、26、42、46、50、及び54のCDRからなる群から選択されるCDRを有する重鎖と、配列番号8、12、16、20、24、28、44、48、52、または56のCDRからなる群から選択されるCDRを有する軽鎖と、ヒトフレームワーク配列とを含み、ヒトCD39に特異的に結合できる抗原結合部位を有するヒト化重鎖及び軽鎖を形成する、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、IgG1またはIgG3アイソタイプのFcドメインを含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記Fcドメインがヒトである、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、低フコシル化または脱フコシル化されている、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、ヒトまたはヒト化である、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、好酸球抗原に対する少なくとも1つの追加の抗原結合部位を含む二重特異性である、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記追加の抗原結合部位が、Siglec-8、IL-5R α (CD125)、IL-3R α (CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2 (IL-33R)、PIRA、PIRB、L-セレクトリン、EMR1、CCR3 (CD193)、及びCRTh2 (CD294) からなる群から選択される標的の1つ以上に結合する、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記追加の抗原結合部位が、活性化好酸球で上方制御される抗原に結合する、請求項22に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記追加の抗原結合部位が、CD3、CD4、 $\gamma\delta$ TCR、CD9、CD28、CD29、CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63 (リソソーム結合膜タンパク質3)、CD66b (CEACAM8)、CD66e (CEACAM5)、CD67、CD69、CD80、CD86、C5 α R (CD88)、CD101、CD122、CD137 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9、リンパ球活性化によって誘導される、4-1BB)、CD274 (プログラム死リガンド1)、 α ITbインテグリン (CD41)、 α 2インテグリン (CD49b)、 α 4インテグリン (CD49d)、 α Lインテグリン (CD11a)、 α Mインテグリン (CD11b)、 α Xインテグリン (CD11c)、 α Dインテグリン、 β 2インテグリン (CD18)、アミノペプチダーゼN (CD13)、Fc α RI (CD89)、Fc γ RIII (CD16)、Fc γ RII (CD32)、Fc ϵ RII (CD23)、顆粒球単球コロニー刺激因子R α (CD116)、HLA-DR、細胞間接着分子-1 (CD54)、インターロイキン (IL)-2R α (CD25)、IL-17RA、IL-17RB、ガレクチン-3、ニューロペプチドS受容体、P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1 (CD162)、セマフォリン7A (CD108)、胸腺間質性リンパ球新生因子タンパク質受容体 (TSLPR)、活性化 α Mインテグリン、活性化 β 1インテグリン (CD29)、活性化 β 2インテグリン、活性化Fc γ RII、または活性化CRTh2 (CD294) に結合する、請求項22に記載の方法。

40

50

【請求項 26】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、好酸球を低減させる、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、CD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球を減少させ、任意選択で、前記CD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球が、i) 喘息、血管炎、皮膚炎、または副鼻腔炎などの病態で提示され；及び／またはii) 血液、骨髓、病変、及び／またはそれらの組み合わせからなる群から選択される空間内に位置している、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗CD39抗体による治療に適した好酸球関連疾患は、血液、骨髓、病変、及び／またはそれらの組み合わせからなる群から選択される空間におけるCD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球の存在によって判定される、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 29】

前記対象が、望まれない好酸球活性を伴う疾患または状態を有する、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 30】

前記望まれない好酸球活性が、好酸球の異常な活性化または過剰によって引き起こされる、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記疾患または状態が、炎症性障害または自己免疫疾患である、請求項29または30に記載の方法。

【請求項 32】

前記炎症性障害が、胃腸炎症性障害である、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記胃腸炎症性障害が、好酸球性食道炎及び／またはクローン病である、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

前記方法が、グルココルチコステロイド、ロイコトリエンアンタゴニスト、マスト細胞安定剤、免疫調節剤、及びプロトンポンプ阻害剤（PPI）からなる群から選択される1つ以上の薬剤を前記対象に投与することをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記炎症性障害が、慢性炎症状態である、請求項31に記載の方法。

【請求項 36】

前記慢性炎症状態が、関節リウマチ（RA）、自己免疫状態、炎症性腸疾患、非治癒性創傷、多発性硬化症、がん、アテローム性動脈硬化症、血管炎、シェーグレン病、糖尿病、紅斑性ループス、喘息、線維性疾患、UVによる損傷、及び乾癬からなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

前記線維症が、肺線維症、肝線維症、心臓疾患、関節線維症、デュピュイトラン拘縮、ケロイド線維症、縦隔線維症、骨髓線維症、腎原性全身線維症、後腹膜線維症、及び強皮症からなる群から選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

前記肺線維症が、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、または進行性塊状線維症である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

前記肝線維症が、肝線維症、肝硬変、または原発性胆道肝硬変である、請求項37に記載の方法。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

前記心疾患が、心房線維症、心筋内線維症、または陳腐化心筋梗塞である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

前記炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

前記疾患または状態が、炎症性または閉塞性の気道疾患である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 43】

前記炎症性または閉塞性の気道疾患が、喘息、急性肺損傷（ALI）、成人／急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、慢性閉塞性肺、気道または肺の疾患（COPD、COADまたはCOLD）、肺活腫、他の薬物療法に起因する気道過反応性の増悪、気管支炎、及び肺炎症からなる群から選択される、請求項 42 に記載の方法。

10

【請求項 44】

前記疾患または状態が、皮膚の炎症状態またはアレルギー状態である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 45】

前記皮膚の炎症状態またはアレルギー状態が、乾癬、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、多形紅斑、疱疹性皮膚炎、強皮症、白斑、過敏性血管炎、蕁麻疹、水疱性天疱瘡、紅斑性ループス、全身性紅斑性ループス、尋常性天疱瘡、葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、後天性表皮水疱症、及び尋常性座瘡からなる群から選択される、請求項 44 に記載の方法。

20

【請求項 46】

前記疾患または状態が、肺炎症性疾患、体軸性脊椎関節症、原発性胆汁性胆管炎、アレルギー性鼻炎、慢性肺疾患、アレルギー、または好酸球増多症である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 47】

前記疾患または状態が、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）治療及び／または抗マラリア剤（例えば、ピリメタミン及びダブソン）、ペニシリン、グリコペプチド、セファロリン、スルホンアミド、テトラサイクリン（特にミノサイクリン）、ニトロフラントイン、抗結核療法、ACE 阻害剤、トリプトファン、抗けいれん剤（例えば、フェニトイン、カルバマゼピン、及びフェノバルビトン）、NSAID、金、H₂ 受容体拮抗薬、プロトンポンプ阻害剤、アミノサリチル酸塩、及びクロルプロパミドを含むがこれらに限定されない他の薬物に続発する好酸球性喘息及び過好酸球性障害などの薬物誘発性好酸球増多症である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

30

【請求項 48】

前記疾患または状態が、呼吸器系、消化器系、心血管系、内分泌系、外皮系、骨格筋系、もしくは神経系に関連するか、または非腫瘍性血液疾患である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 49】

前記疾患または状態が、組織移植片拒絶である、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 50】

前記組織移植片は、自家または同種異系である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 1～50 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 52】

前記哺乳動物が、ヒトまたはげっ歯動物である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤

50

、緩衝液、または溶液とともに前記対象に投与される、請求項 1～52 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 54】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、前記対象に対して、0.01～10 mg/kg の用量で投与され、任意選択で前記投与は、最適な ADCC 媒介性及び／または ADCP 媒介性の好酸球細胞枯渇有効性のために、抗体媒介性標的サイトーシス（または抗原調節もしくは抗原シェーピング）を回避／制限するための持続性徐放送達プラットフォームによって提供される、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 55】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、前記対象に、1 日 1 回以上、1 週間に 3 回、1 週間に 2 回、1 週間に 1 回、2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回、または 4 週間ごとに 1 回投与され、任意選択で、前記投与は 1 週間に 1 回である、請求項 1～54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 56】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、前記対象に対して、少なくとも 2～6 回の治療サイクルの期間投与されるか、または生涯使用のために前記対象に毎月投与される、請求項 1～55 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、非経口投与、粘膜下ヒドロゲル投与、経肺、または局所適用を介して前記対象に投与され、前記非経口投与は、皮下投与、静脈内投与、または筋肉内投与による、請求項 1～56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 58】

対象における望まれない好酸球活性に関連する疾患または状態を治療する方法であって、前記対象に、抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片を投与することを含み、前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片は、

(i) 前記抗 CD39 抗体が、安定した免疫複合体を形成するように、ある部位で、エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ 1 (CD39) に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、

(ii) FcγRIIIa 受容体に結合し、a) CD39+細胞に対する抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 及び／または抗体依存性細胞食作用 (ADCP) 活性を前記抗 CD39 抗体に付与する FcγRIIIa 結合部分と、を含む、前記方法。

【請求項 59】

前記望まれない好酸球活性に関連する前記疾患または状態が、1) 異常活性化もしくは好酸球増多症、2) 炎症性障害、及び／または 3) 薬物誘発性好酸球増多症により引き起こされる、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記好酸球活性が、CD39+好酸球細胞に由来し、任意選択で、前記 CD39+好酸球細胞が、

(i) CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5 受容体の α サブユニット (IL-5Rα または CD125)、IL-3 受容体の α サブユニット (IL-3Rα または CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2 (IL-33R)、PIRA、PIRB、L-セレクチン、EMR1、CCR3 (CD193)、及び CCR2 (CD294) からなる群から選択される細胞表面マーカーのうちの 1 つ以上を共発現し；

(ii) CD45+CD11b+好酸球細胞であり；及び／または、

(iii) CD45+CD11b+Siglec-8+好酸球細胞である、

請求項 58 または 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 24 時間後の免疫複合体の 30% 未満の喪失を特徴とする、HCC1739BL 細

10

20

30

40

50

胞とインキュベートした場合の安定した免疫複合体形成（任意選択で、前記免疫複合体形成は、蛍光標識二次抗体を使用して、蛍光強度によって検出される）；

（i i） C D 3 9 + 好酸球の枯渇；

（i i i）図 3 0 に列挙された C D 3 9 アミノ酸エピトープ配列の群から選択された配列を有する C D 3 9 エピトープへの結合；及び／または

（v i）C D 3 9 に結合するモノクローナル抗体クローン A 1 と非競合的または一部のみに競合する様式での C D 3 9 への結合、

を促進する、請求項 5 8 ～ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、A D C C 媒介性殺傷及び／または A D C P 媒介性殺傷を介して C D 3 9 + 好酸球の枯渇を促進する、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、前記 C D 3 9 + 好酸球によって取り込まれ、前記 C D 3 9 + 好酸球に対して毒性を有する抗体-薬物コンジュゲートの形態で、C D 3 9 + 好酸球の枯渇を促進する、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 F c γ R I I I a 結合部分が、F c ドメイン、F c γ R I I I a に結合する抗体またはその断片、及び F c γ R I I I a 結合ペプチドからなる群から選択される、請求項 5 8 ～ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記抗原結合ドメインが、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v または一本鎖 F v (s c F v)、F a v、d s F v、s c (F v)₂、F d e、s d F v、単一ドメイン抗体 (d A b)、及びダイアボディ断片からなる群から選択され、任意選択で、前記抗原結合ドメインが、配列番号 4 0 の配列を含む s c F V である、請求項 5 8 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記抗 C D 3 9 抗体または抗原結合断片がモノクローナルである、請求項 5 8 ～ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得るアミノ酸配列を有する V H ドメインと、ストリンジェントな条件下で配列番号 3 の核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得るアミノ酸配列を有する V L ドメインと、を有する、請求項 5 8 ～ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2、6、1 0、1 4、1 8、2 2、2 6、4 2、4 6、5 0、または 5 4 と少なくとも 6 0 % 同一である C D R を有する重鎖と、配列番号 4、8、1 2、1 6、2 0、2 4、2 8、4 4、4 8、5 2、または 5 6 と少なくとも 6 0 % 同一である C D R を有する軽鎖と、を含む、請求項 5 8 ～ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2、6、1 0、1 4、1 8、2 2、2 6、4 2、4 6、5 0、または 5 4 と少なくとも 6 0 % 同一である可変重鎖 (V H) と、配列番号 4、8、1 2、1 6、2 0、2 4、2 8、4 4、4 8、5 2、または 5 6 と少なくとも 6 0 % 同一である可変軽鎖 (V L) と、を含む、請求項 5 8 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、

（i）配列番号 2 9 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する相補性決定領域 (C D R) H 1、配列番号 3 0 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D

10

20

30

40

50

R H 2、及び配列番号 3 1 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変ドメインと、

(i i) 配列番号 3 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 3 3 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R L 2、及び配列番号 3 4 と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項 5 8 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 配列番号 2 9 の配列を有する C D R H 1、配列番号 3 0 のアミノ酸配列を有する C D R H 2、及び配列番号 3 1 の配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変ドメインと、

(i i) 配列番号 3 2 の配列を有する C D R L 1、配列番号 3 3 の配列を有する C D R L 2、及び配列番号 3 4 の配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 配列番号 2 の配列を含む重鎖可変ドメインと；

(i i) 配列番号 4 の配列を含む軽鎖可変ドメインと、を含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 配列番号 3 6 の配列を含む重鎖と；

(i i) 配列番号 3 8 の配列を含む軽鎖と、を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 6、1 0、1 4、1 8、2 2、2 6、4 2、4 6、5 0、及び 5 4 の C D R からなる群から選択される C D R を有する重鎖と、配列番号 8、1 2、1 6、2 0、2 4、2 8、4 4、4 8、5 2、または 5 6 の C D R からなる群から選択される C D R を有する軽鎖と、ヒトフレームワーク配列とを含み、ヒト C D 3 9 に特異的に結合できる抗原結合部位を有するヒト化重鎖及び軽鎖を形成する、請求項 5 8 ～ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、I g G 1 または I g G 3 アイソタイプの F c ドメインを含む、請求項 5 8 ～ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記 F c ドメインがヒトである、請求項 5 8 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、低フコシル化または脱フコシル化されている、請求項 5 8 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、ヒトまたはヒト化である、請求項 5 8 ～ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片が、好酸球抗原に対する少なくとも 1 つの追加の抗原結合部位を含む二重特異性である、請求項 5 8 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記追加の抗原結合部位が、S i g l e c - 8、I L - 5 R α (C D 1 2 5)、I L - 3 R α (C D 1 2 3)、I L - 4 R、I L - 9 R、I L - 1 3 R、I L - 1 4 R、S T 2 (I L - 3 3 R)、P I R A、P I R B、L - セレクチン、E M R 1、C C R 3 (C D 1 9 3)、及び C R T h 2 (C D 2 9 4) からなる群から選択される標的の 1 つ以上に結合

10

20

30

40

50

する、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記追加の抗原結合部位が、活性化好酸球で上方制御される抗原に結合する、請求項 79 または 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記追加の抗原結合部位が、CD3、CD4、 $\gamma\delta$ TCR、CD9、CD28、CD29、CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63（リソソーム結合膜タンパク質3）、CD66b（CEACAM8）、CD66e（CEACAM5）、CD67、CD69、CD80、CD86、C5 α R（CD88）、CD101、CD122、CD137（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9、リンパ球活性化によって誘導される、4-1BB）、CD274（プログラム死リガンド1）、 α ITb インテグリン（CD41）、 α 2 インテグリン（CD49b）、 α 4 インテグリン（CD49d）、 α L インテグリン（CD11a）、 α M インテグリン（CD11b）、 α X インテグリン（CD11c）、 α D インテグリン、 β 2 インテグリン（CD18）、アミノペプチダーゼN（CD13）、Fc α RI（CD89）、Fc γ RIII（CD16）、Fc γ RII（CD32）、Fc ϵ RII（CD23）、顆粒球単球コロニー刺激因子R α （CD116）、HLA-DR、細胞間接着分子-1（CD54）、インターロイキン（IL）-2R α （CD25）、IL-17RA、IL-17RB、ガレクチン-3、ニューロペプチドS受容体、P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1（CD162）、セマフォリン7A（CD108）、胸腺間質性リンパ球新生因子タンパク質受容体（TSLPR）、活性化 α M インテグリン、活性化 β 1 インテグリン（CD29）、活性化 β 2 インテグリン、活性化Fc γ RII、または活性化CRTh2（CD294）に結合する、請求項 79～81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、好酸球を低減させる、請求項 58～82 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 84】

前記抗CD39抗体またはその抗原結合断片が、CD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球を減少させ、任意選択で、前記CD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球が、i) 喘息、血管炎、皮膚炎、または副鼻腔炎などの病態で提示され；及び／またはii) 血液、骨髄、病変、及び／またはそれらの組み合わせからなる群から選択される空間内に位置している、請求項 58～83 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 85】

前記抗CD39抗体による治療に適した好酸球関連疾患は、血液、骨髄、病変、及び／またはそれらの組み合わせからなる群から選択される空間におけるCD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球の存在によって判定される、請求項 58～84 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 86】

前記炎症性障害が、胃腸炎症性障害である、請求項 59～85 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 87】

前記胃腸炎症性障害が、好酸球性食道炎及び／またはクローン病である、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記方法が、グルココルチコステロイド、ロイコトリエンアンタゴニスト、マスト細胞安定剤、免疫調節剤、及びプロトンポンプ阻害剤（PPI）からなる群から選択される1つ以上の薬剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

前記炎症性障害が、慢性炎症状態である、請求項 59～85 のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 0】

前記慢性炎症状態が、関節リウマチ（R A）、自己免疫状態、炎症性腸疾患、非治癒性創傷、多発性硬化症、がん、アテローム性動脈硬化症、血管炎、シェーグレン病、糖尿病、紅斑性ループス、喘息、線維性疾患、U Vによる損傷、及び乾癬からなる群から選択される、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記線維症が、肺線維症、肝線維症、心臓疾患、関節線維症、デュピュイトラン拘縮、ケロイド線維症、縦隔線維症、骨髄線維症、腎原性全身線維症、後腹膜線維症、及び強皮症からなる群から選択される、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記肺線維症が、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、または進行性塊状線維症である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記肝線維症が、肝線維症、肝硬変、または原発性胆道肝硬変である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記心疾患が、心房線維症、心筋内線維症、または陳腐化心筋梗塞である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記炎症性障害が、炎症性または閉塞性の気道疾患である、請求項 5 9 ～ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記炎症性または閉塞性の気道疾患が、喘息、急性肺損傷（A L I）、成人／急性呼吸窮迫症候群（A R D S）、慢性閉塞性肺、気道または肺の疾患（C O P D、C O A DまたはC O L D）、肺活腫、他の薬物療法に起因する気道過反応性の増悪、気管支炎、及び肺炎からなる群から選択される、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記炎症性障害が、皮膚の炎症状態またはアレルギー状態である、請求項 5 9 ～ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記皮膚の炎症状態またはアレルギー状態が、乾癬、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、多形紅斑、疱疹性皮膚炎、強皮症、白斑、過敏性血管炎、蕁麻疹、水疱性天疱瘡、紅斑性ループス、全身性紅斑性ループス、尋常性天疱瘡、葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、後天性表皮水疱症、及び尋常性座瘡からなる群から選択される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記炎症性障害が、急性及び慢性痛風、慢性痛風性関節炎、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、若年性リウマチ性関節炎、全身性若年性特発性関節炎（S J I A）、クリオピリン関連周期性症候群（C A P S）、または骨関節炎である、請求項 5 9 ～ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記疾患または状態が、免疫チェックポイント阻害剤（I C I）治療及び／または抗マラリア剤（例えば、ピリメタミン及びダブソン）、ペニシリン、グリコペプチド、セファロポリン、スルホンアミド、テトラサイクリン（特にミノサイクリン）、ニトロフラントイン、抗結核療法、A C E 阻害剤、トリプトファン、抗けいれん剤（例えば、フェニトイン、カルバマゼピン、及びフェノバルビトン）、N S A I D、金、H₂受容体拮抗薬、プロトンポンプ阻害剤、アミノサリチル酸塩、及びクロルプロパミドを含むがこれらに限定

10

20

30

40

50

されない他の薬物に続発する好酸球性喘息及び過好酸球性障害などの薬物誘発性好酸球増多症である、請求項 58～85 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 102】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 58～101 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 103】

前記哺乳動物が、ヒトまたはげっ歯動物である、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤、緩衝液、または溶液とともに前記対象に投与される、請求項 58～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 105】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、前記対象に対して、0.01～10 mg/kg の用量で投与され、任意選択で前記投与は、最適な ADCC 媒介性及び／または ADCP 媒介性の好酸球細胞枯渇有効性のために、抗体媒介性標的サイトーシス（または抗原調節もしくは抗原シェーピング）を回避／制限するための持続性徐放送達プラットフォームによって提供される、請求項 58～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、前記対象に、1 日 1 回以上、1 週間に 3 回、1 週間に 2 回、1 週間に 1 回、2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回、または 4 週間ごとに 1 回投与され、任意選択で、前記投与は 1 週間に 1 回である、請求項 58～105 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、前記対象に対して、少なくとも 2～6 回の治療サイクルの期間投与されるか、または長期使用のために前記対象に毎月投与される、請求項 58～106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片が、非経口投与または粘膜下ヒドロゲル投与、経肺、または局所適用を介して前記対象に投与され、前記非経口投与は、皮下投与、静脈内投与、または筋肉内投与による、請求項 58～107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記方法が、少なくとも 1 つの追加の治療剤を投与することを含む、請求項 58～108 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 110】

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、抗炎症剤であり、任意選択で前記抗炎症剤が、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）、コルチコステロイド、ロイコトリエン修飾剤、及びサイトカイン経路遮断剤からなる群から選択される、請求項 109 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 111】

前記追加の治療剤が、前記抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片の投与の前、同時、及び／または後に投与される、請求項 110 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 4 月 29 日に提出された米国仮出願第 63/336,418 号の優先権の利益を主張するものであり、この内容全体が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

明細書は、XML形式で電子提出された配列表を含む。この配列表のXMLは参照により本明細書に組み込まれる。2023年4月7日に作成された前記XMLファイルは、PNC-00325__SL.xmlという名称であり、サイズは86,881バイトである。

【背景技術】

【0003】

最近の研究では、好酸球は、代謝、組織リモデリング、及び発生、ニューロン調節、上皮及びマイクロバイオームの調節、ならびに免疫調節などのいくつかの恒常性プロセスにも関与していることが示されており、これらの細胞が健常者の代謝調節及び器官機能に重要な役割を果たし得ることが示されている。

【0004】

好酸球は、身体の免疫応答において恒常性の役割を果たす。これらの細胞は、一部の寄生虫感染、細菌感染、及びウイルス感染、ならびに、ある特定のがんと闘うことに関与し、喘息、副鼻腔炎、好酸球性胃腸障害、及び好酸球化症候群を含む炎症性の障害及び疾患において病理学的役割を有する。

【0005】

好酸球性疾患の治療は、従来、グルココルチコイドを使用して非特異的な好酸球の減弱化によって行われてきた。しかしながら、インターロイキン（IL）-5及びIL-5受容体またはIL-4／IL-13などの好酸球成熟因子を標的とするいくつかの新規な生物学的療法は、最近臨床使用が承認されている。生物学的療法の成功にもかかわらず、好酸球性炎症性疾患の一部の患者は適切な症状制御を実現しない可能性があり、進行中の疾患活動を促進する際の併存疾患及び他のプロセスなどの患者の特性の寄与をさらに調査する必要性が強調される。

【0006】

例えば、食道における好酸球の高レベル、及び基底帯肥厚を特徴とする疾患である好酸球性食道炎（EoE）などの食道炎症障害は、小児及び成人で診断されることが増えている。この疾患の多くの態様は、その病因、自然経過、及び最適な治療法を含めて不明なままである。EoEはすべての年齢層に発症するが、最も頻繁に20～50歳の個人が罹患する。EoEの症状は、胃食道逆流症（GERD）の症状と類似することが多く、嘔吐、嚥下障害、疼痛、及び食片圧入が挙げられる。この疾患は、疼痛を伴い、嚥下困難をもたらし、患者は他の合併症を起こしやすい。EoEはGERDと誤診断されることが多く、EoE患者の適切な治療の遅延の原因となる。現在、胃腸管の上部の炎症に関連する状態、特に、EoEなどの食道の炎症状態の治療に、局所投与される抗炎症薬は承認されていない。プレドニゾロンなどのコルチコステロイドによる全身治療は効果的であるが、これらの治療剤は、唾液中コルチゾールレベルに反映される視床下部－下垂体－副腎系（HPA）軸の抑制、免疫機能の全般的な抑制など、重大な副作用と関連しており、特に小児において長期全身曝露からの厄介な副作用には、成長遅延が含まれる。

【0007】

さらに、一部の薬物は好酸球増多、いわゆる「薬物誘発性好酸球増多症」を引き起こすことが報告されている。例えば、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）は、一部のがんにおける新しい標準治療である。しかしながら、ICIはまた、好酸球性喘息及び過好酸球性障害を含む、頻繁な、潜在的に臓器または生命を脅かす免疫関連の有害事象（irAE）と関連しており、これは一般に自己免疫または炎症状態を模倣する。重篤な反応を引き起こすことが報告されている薬物誘発性好酸球増多症に関連する他の薬物としては、抗マラリア薬（例えば、ピリメタミン及びダブソン）、ペニシリン、グリコペプチド、セファロsporin、スルホンアミド、テトラサイクリン（特にミノサイクリン）、ニトロフラントイン、抗結核療法、ACE阻害剤、トリプトファン、抗けいれん剤（例えば、フェニトイン、カルバマゼピン、及びフェノバルビトン）、NSAID、金、H₂受容体拮抗薬、プロトンポンプ阻害剤、アミノサリチル酸塩、及びクロロプロパミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【発明の概要】

【0008】

好酸球は、局所の免疫応答及び炎症応答を調節することができ、血液及び組織におけるその蓄積は、いくつかの炎症性疾患及び感染性疾患に関連している。したがって、好酸球を標的とする治療は、喘息及びアレルギーなどのアトピー性障害、ならびに自己免疫及び悪性腫瘍などの好酸球に主に関連しない疾患を含む多様な疾患の制御に有用であり得る。本発明は、好酸球を標的とする治療剤に関する。

【0009】

本発明は、好酸球がCD39を発現し、全身的もしくは局所的（またはその両方）のいずれかで好酸球及び／または好酸球機能のレベルを低下させるためのADCC（抗体依存性細胞傷害）コンピテント及び／またはADCP（抗体依存性細胞食作用）コンピテントの抗CD39抗体またはCD39標的化細胞傷害性薬物コンジュゲートなどのCD39標的化好酸球枯渇剤によって標的化され得るという観察に基づく。したがって、これらのCD39標的化好酸球枯渇剤は、例えば、炎症性疾患または自己免疫性疾患及び全身性または局所性の好酸球増多症または薬物誘発性好酸球増多症を含む好酸球の異常な活性化または過剰が病態の一部である疾患の治療の一部としての使用に及ぶ有用性を有する。組織移植片（自家または同種異系）の拒絶反応を防ぐための治療手段の一部としての使用も企図される。

【0010】

本明細書に記載のPEO22抗体を例外として、抗CD39抗体の現在の臨床使用は、CD39のエクトヌクレオチダーゼ活性を阻害することに重点を置いており、すなわち、そのタンパク質に関連する酵素活性の腫瘍内レベルの減少を生じさせることを目的としており、そうすることにより、免疫抑制剤であるアデノシンの腫瘍内レベルを低下させる。これらの抗体は、いずれのCD39依存性細胞枯渇活性も有しないように選択されている、すなわち、これらの抗体は、ADCC及び／またはADCP機能を含まないように意図的に選択されている。この場合も、これらの先行技術の抗体の目的は、CD39の酵素活性を阻害してCD39を発現する細胞を殺傷しないことにあり、これらの抗体が使用されるフォーマットでは、本発明の方法及び製剤での使用が企図される抗体の好酸球レベルの枯渇は有しない。

【0011】

しかしながら、本発明に関連して、ADCC及び／またはADCPの機能を保持する抗CD39抗体を利用する本発明の方法及び製剤のそれらのバージョンは、好酸球に結合した場合にADCC媒介性及び／またはADCP媒介性のそれらの細胞のクリアランスをもたらす。このような抗CD39抗体は、例示すると、CD39に対する一価または多価（二価を含む）であり得る。しかしながら、本発明はまた、1つ以上のCD39結合部分に加えて、好酸球によって発現される1つ以上の細胞表面エピトープに結合するさらなる結合部分を含む二重特異性抗体も提供する。

【0012】

本発明に包含される任意の態様に適用することができ、及び／または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態が提供される。例えば、一態様では、(i) 抗CD39抗体が安定した免疫複合体を形成するように、ある部位で、エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ-1 (CD39) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(ii) FcγRIIIa受容体に結合し、CD39+細胞に対するADCC及び／またはADSP活性を抗CD39抗体に付与するFcγRIIIa結合部分とを含む抗CD39抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0013】

本発明の態様に適用することができ、及び／または本明細書に記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、該好酸球細胞は、CD39+好酸球細胞である。いくつかの実施形態では、CD39+好酸球細胞は、(i) CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受容体のαサブユニット (IL-5RαまたはCD125)、IL-3受容体のαサブユニッ

10

20

30

40

50

ト (IL-3R α または CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2 (IL-33R)、対の免疫グロブリン様受容体 A (PIRA)、対の免疫グロブリン様受容体 B (PIRB)、L-セレクチン、ムチン様ホルモン受容体 (EMR) 1、CCR3 (CD193)、及び 2 型ヘルパー T 細胞に発現する化学物質誘因受容体類似分子 (CRTh2、または DP2、2 型プロスタグランジン D2 受容体、または CD294 と呼ばれる) からなる群から選択される細胞表面マーカーのうちの 1 つ以上を共発現し；(ii) CD45 + CD11b + 好酸球細胞であり；及び／または (iii) CD45 + CD11b + Siglec-8 + 好酸球細胞である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片は、(i) HCC1739BL 細胞とインキュベートしたときに、24 時間後に、免疫複合体の 40% 未満、または、24 時間後に 35% 未満、30% 未満、25% 未満、20% 未満、15% 未満、またはさらには 10% 未満の喪失を特徴とする安定した免疫複合体を形成し、任意選択で、免疫複合体の形成が、蛍光標識二次抗体を使用して、蛍光強度によって検出される (例えば、単に例示として、抗 CD39 抗体で形成された免疫複合体の安定性は、抗 CD39 モノクローナル抗体 (mAb) (例えば、2 μ g/ml 以上) を HCC1739BL 細胞と、異なる時間インキュベートし、次に、蛍光コンジュゲート二次抗体によって免疫複合体の存在を検出することによって決定することができる)；(ii) CD39 + 好酸球の枯渇；(iii) 図 30 に列挙される CD39 アミノ酸エピトープ配列の群から選択された配列を有する CD39 エピトープに結合する；及び／または (iv) CD39 に結合するモノクローナル抗体クローン A1 と非競合的または部分的にのみ競合する方法で CD39 に結合する。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片は、ADCC 媒介性殺傷及び／または ADCP 媒介性殺傷を介して CD39 + 好酸球の枯渇を促進する。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片は、CD39 + 好酸球によって取り込まれ、CD39 + 好酸球に対して毒性を有する抗体-薬物コンジュゲートの形態で、CD39 + 好酸球の枯渇を促進する。

10

20

30

40

50

【0014】

別の実施形態では、Fc γ RIIIa 結合部分は、Fc ドメイン、Fc γ RIIIa に結合する抗体またはその断片、及び Fc γ RIIIa 結合ペプチドからなる群から選択される。

【0015】

さらに別の実施形態では、抗原結合ドメインは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv または一本鎖 Fv (scFv)、Fav、dsFv、sc(Fv)₂、Fde、sdFv、単ドメイン抗体 (dAb)、及びダイアボディ断片からなる群から選択され、及び／または抗 CD39 抗体もしくは抗原結合断片は、モノクローナルである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 40 の配列を含む scFv である。

【0016】

別の実施形態では、抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 の核酸配列またはストリンジェントな条件下で配列番号 1 の核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得るアミノ酸配列を有する VH ドメインと、配列番号 3 の核酸配列またはストリンジェントな条件下で配列番号 3 の核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされ得るアミノ酸配列を有する VL ドメインと、を有する (45℃での 6 倍塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) 下でのハイブリダイゼーション、及び 0.2 倍 SSC/0.1% SDS で 50~65℃で洗浄するなど)。さらに別の実施形態では、抗 CD39 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または 54 の CDR と少なくとも 60% (例えば、少なくとも 65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上) 同一である CDR を有する重鎖と、配列番号 4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または 56 の CDR と少なくとも 60% (例えば、少なくとも 65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%

、 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 またはそれ以上) 同一である C D R を有する軽鎖と、を含む。さらに別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または 54 と少なくとも 60 % (例えば、少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % またはそれ以上) 同一である可変重鎖 (V H) と、配列番号 4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または 56 と少なくとも 60 % (例えば、少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である可変軽鎖 (V L) と、を含む。別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、(i) 配列番号 29 と少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 30 と少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 31 と少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖と、(i i) 配列番号 32 と少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 33 と少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 34 と少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはそれ以上) 同一である C D R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖と、を含む。さらに別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 6、10、14、18、22、26、42、46、50、及び 54 の C D R からなる群から選択される C D R を有する重鎖と、配列番号 8、12、16、20、24、28、44、48、52、または 56 の C D R からなる群から選択される C D R を有する軽鎖と、ヒトフレームワーク配列とを含み、ヒト C D 3 9 に特異的に結合できる抗原結合部位を有するヒト化重鎖及び軽鎖を形成する。さらに別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、(i) 配列番号 29 の配列を有する C D R H 1、配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R H 2、及び配列番号 31 の配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変ドメインと；(i i) 配列番号 32 の配列を有する C D R L 1、配列番号 33 の配列を有する C D R L 2、及び配列番号 34 の配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変ドメインとを含む。別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 6、10、14、18、22、26、42、46、50、及び 54 の C D R からなる群から選択される C D R を有する重鎖と、配列番号 8、12、16、20、24、28、44、48、52、または 56 の C D R からなる群から選択される C D R を有する軽鎖と、ヒトフレームワーク配列とを含み、ヒト C D 3 9 に特異的に結合できる抗原結合部位を有するヒト化重鎖及び軽鎖を形成する。

10

20

30

40

【 0 0 1 7 】

さらに別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、I g G 1 または

50

I g G 3 アイソタイプの F c ドメインを含み、任意選択で、F c ドメインは、ヒトである。別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、低フコシル化または脱フコシル化されている。

【0018】

さらに別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、ヒトであるかまたはヒト化されている。

【0019】

さらに別の実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、好酸球抗原に対する少なくとも1つの追加の抗原結合部位を含む二重特異性である。

【0020】

特定の実施形態では、本発明は、C D 3 9 と、S i g l e c - 8、I L - 5 受容体の α サブユニット (I L - 5 R α または C D 1 2 5)、I L - 3 受容体の α サブユニット (I L - 3 R α または C D 1 2 3)、I L - 4 R、I L - 9 R、I L - 1 3 R、I L - 1 4 R、S T 2 (I L - 3 3 R)、P I R A、P I R B、L - セレクチン、E M R 1、C C R 3 (C D 1 9 3)、及び C R T h 2 (C D 2 9 4) から選択される好酸球細胞表面マーカーとの両方に結合し、好ましくは、A D C C 媒介性殺傷及び／または A D C P 媒介性殺傷によって、または好酸球によって優先的に取り込まれ、好酸球に対して毒性がある抗体-薬物コンジュゲートの形態で、好酸球枯渇を引き起こす二重特異性抗体を提供する。

【0021】

他の実施形態では、二重特異性は、両方ともが好酸球上に発現して選択性をもたらす、異なる抗原 (C D 3 9 と第二の抗原) に対する二重特異性抗体の親和性を有する、活性化好酸球 (または病変に見出される好酸球) 上で上方制御される抗原に対する結合ドメインを用いて生成される。本発明の C D 3 9 バインダーを使用して二重特異性を生成するための例示的な抗原としては、C D 3、C D 4、 $\gamma \delta$ T C R、C D 9、C D 2 8、C D 2 9、C D 4 0、C D 4 4、C D 4 5、C D 4 5 R O、C D 4 8、C D 5 8、C D 6 3 (リソソーム結合膜タンパク質 3)、C D 6 6 b (C E A C A M 8)、C D 6 6 e (C E A C A M 5)、C D 6 7、C D 6 9、C D 8 0、C D 8 6、C 5 α R (C D 8 8)、C D 1 0 1、C D 1 2 2、C D 1 3 7 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 9、リンパ球活性化によって誘導される、4 - 1 B B)、C D 2 7 4 (プログラム死リガンド 1)、 α E I b インテグリン (C D 4 1)、 α 2 インテグリン (C D 4 9 b)、 α 4 インテグリン (C D 4 9 d)、 α L インテグリン (C D 1 1 a)、 α M インテグリン (C D 1 1 b)、 α X インテグリン (C D 1 1 c)、 α D インテグリン、 β 2 インテグリン (C D 1 8)、アミノペプチダーゼ N (C D 1 3)、F c α R I (C D 8 9)、F c γ R I I I (C D 1 6)、F c γ R I I (C D 3 2)、F c ϵ R I I (C D 2 3)、顆粒球単球コロニー刺激因子 R α (C D 1 1 6)、H L A - D R、細胞間接着分子 - 1 (C D 5 4)、インターロイキン (I L) - 2 R α (C D 2 5)、I L - 1 7 R A、I L - 1 7 R B、ガレクチン - 3、ニューロペプチド S 受容体、P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1 (C D 1 6 2)、セマフォリン 7 A (C D 1 0 8)、胸腺間質性リンパ球新生因子タンパク質受容体 (T S L P R)、活性化 α M インテグリン、活性化 β 1 インテグリン (C D 2 9)、活性化 β 2 インテグリン、活性化 F c γ R I I、及び活性化 C R T h 2 (C D 2 9 4) が挙げられる。このような二重特異性は、好酸球に結合し、好ましくは、A D C C 媒介性殺傷及び／または A D C P 媒介性殺傷によって、または好酸球によって優先的に取り込まれ、好酸球に対して毒性がある抗体-薬物コンジュゲートの形態で、好酸球枯渇を引き起こす。いくつかの実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、好酸球を低減させる。いくつかの実施形態では、抗 C D 3 9 抗体またはその抗原結合断片は、C D 3 9 ^{h i g h} 誘導性好酸球及び／または活性化好酸球を減少させ、任意選択で、C D 3 9 ^{h i g h} 誘導性好酸球及び／または活性化好酸球は、i) 喘息、血管炎、皮膚炎、または副鼻腔炎などの病態で提示され；及び／または i i) 血液、骨髄、病変、及び／またはそれらの組み合わせからなる群から選択される空間内に位置している。いくつかの実施形態では、抗 C D 3 9 抗体による治療に適した好酸球関連疾患は、血液、骨髄、病変、及び／またはそれ

10

20

30

40

50

らの組み合わせからなる群から選択される空間におけるCD39^{high}誘導性好酸球及び／または活性化好酸球の存在によって判定される。

【0022】

別の態様では、本明細書に記載の治療有効量の少なくとも1つの抗CD39抗体またはその抗原結合断片と、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、緩衝液または溶液を含む医薬製剤が提供される。例えば、医薬製剤は、有効量の抗CD39抗体またはその抗原結合断片と、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、緩衝液または溶液を含み、好酸球のレベル、活性、及び／または機能を低減するものであり得、かつ炎症状態または組織移植を受けた対象（単なる例示）への投与に適していてもよく、ここで、対象への抗CD39抗体の投与により、CD39＋好酸球細胞の数及び／または機能の減少をもたらす。

10

【0023】

さらに別の態様では、CD39＋好酸球細胞を枯渇させることにより疾患または病態における好酸球の関与の方法であって、望まれない好酸球の状態を有する対象に、有効量の本明細書に記載の抗CD39抗体またはその抗原結合断片の医薬組成物を投与することを含み、抗CD39抗体またはその抗原結合断片の投与によりCD39＋好酸球細胞の数及び／または機能が減少する、方法である。

【0024】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、進行性広範線維症などの肺線維症；肝硬変、原発性胆汁性肝硬変などの肝線維症；心房線維症、心内膜心筋線維症、陳旧性心筋梗塞などの心疾患；関節線維症；デュピュイトラン拘縮；ケロイド線維症；縦隔線維症；骨髄線維症；腎性全身線維症；後腹膜線維症；及び強皮症を含む線維症を特徴とする炎症性障害または自己免疫疾患に罹患している患者のための治療の一部として使用することができる。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、対象は、望まれない好酸球活性を伴う疾患または状態を有する。望まれない好酸球化活性は、好酸球の異常な活性化または過剰によって引き起こされ得る。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、炎症性障害または自己免疫疾患、例えば、胃腸炎症性障害、例えば、好酸球性食道炎及び／またはクローン病である。いくつかの実施形態では、本方法は、グルココルチコステロイド、ロイコトリエンアンタゴニスト、マスト細胞安定剤、免疫調節剤、及びプロトンポンプ阻害剤（PPI）からなる群から選択される1つ以上の薬剤を対象に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、炎症性障害は、慢性炎症性状態である。いくつかの実施形態では、慢性炎症状態は、関節リウマチ（RA）、自己免疫状態、炎症性腸疾患、非治癒性創傷、多発性硬化症、がん、アテローム性動脈硬化症、血管炎、シェーグレン病、糖尿病、紅斑性ループス、喘息、線維性疾患、UVによる損傷、及び乾癬からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、線維症は、肺線維症、肝線維症、心臓疾患、関節線維症、デュピュイトラン拘縮、ケロイド線維症、縦隔線維症、骨髄線維症、腎原性全身線維症、後腹膜線維症、及び強皮症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、肺線維症は、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、または進行性広範線維症である。いくつかの実施形態では、肝線維症は、肝線維症、肝硬変、または原発性胆汁性肝硬変である。いくつかの実施形態では、心疾患は、心房線維症、心筋内線維症、または陳旧性心筋梗塞である。いくつかの実施形態では、炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎またはクローン病である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、炎症性または閉塞性の気道疾患である。いくつかの実施形態では、炎症性または閉塞性の気道疾患は、喘息、急性肺損傷（ALI）、成人／急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、慢性閉塞性肺、気道または肺の疾患（COPD、COADまたはCOLD）、肺活腫、他の薬物療法に起因する気道過反応性の増悪、気管支炎、及び肺炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、皮膚の炎症性状態またはアレルギー性状態である。いくつかの実施形態では、皮膚の炎症状態またはアレルギー状態は、乾癬、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、多形紅斑、疱疹性皮膚炎、強皮症、白斑、過敏性血管炎、蕁麻疹、水疱性天疱瘡、紅斑性ループス、全身性紅

30

40

50

斑性ループス、尋常性天疱瘡、葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、後天性表皮水疱症、及び尋常性座瘡からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、肺炎炎症性疾患、体軸性脊椎関節症、原発性胆汁性胆管炎、アレルギー性鼻炎、慢性肺疾患、アレルギー、または好酸球増多症である。

【0026】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、ICI治療及び／または抗マリアリ剤（例えば、ピリメタミン及びダブソン）、ペニシリン、グリコペプチド、セファロリン、スルホンアミド、テトラサイクリン（特にミノサイクリン）、ニトロフラントイン、抗結核療法、ACE阻害剤、トリプトファン、抗けいれん剤（例えば、フェニトイン、カルバマゼピン、及びフェノバルビトン）、NSAID、金、H₂受容体拮抗薬、プロトンポンプ阻害剤、アミノサリチル酸塩、及びクロルプロパミドを含むがこれらに限定されない他の薬物に続発する好酸球性喘息及び過好酸球性障害などの薬物誘発性好酸球増多症に対する治療の一部として使用され得る。

10

【0027】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、潰瘍性大腸炎及びクローン病などの炎症性腸疾患に対する治療の一部として使用され得る。

【0028】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、アトピー性皮膚炎、血管炎、好酸球性食道炎、アレルギー性鼻炎（季節性鼻炎を含む）、喘息、慢性肺疾患（慢性閉塞性肺疾患を含む）、及びアレルギー（例えば、ピーナッツアレルギー）、特に喘息のための治療の一部として使用され得る。

20

【0029】

いくつかの実施形態では、疾患または状態は、呼吸器系、消化器系、心血管系、内分泌系、外皮系、骨格筋系、もしくは神経系に関連するか、または非腫瘍性血液疾患である。

いくつかの実施形態では、疾患または状態は、組織移植片拒絶である。

【0030】

いくつかの実施形態では、組織移植片は、自家または同種異系である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトまたはげっ歯動物類などの哺乳動物である。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、緩衝液、または溶液とともに対象に投与される。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、対象に対して、0.01~10mg/kgの用量で投与され、任意選択で投与は、最適なADCC媒介性及び／またはADCP媒介性の好酸球細胞枯渇有効性のために、抗体媒介性標的サイトーシス（または抗原調節もしくは抗原シェーピング）を回避／制限するための持続性徐放送達プラットフォームによって提供される。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、対象に、1日1回以上、1週間に3回、1週間に2回、1週間に1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、または4週間ごとに1回投与され、任意選択で、投与は1週間に1回である。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、対象に対して、少なくとも2~6回の治療サイクルの期間投与されるか、または生涯使用のために対象に毎月投与される。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、非経口投与、粘膜下ヒドロゲル投与、経肺、または局所適用を介して対象に投与され、非経口投与は、皮下投与、静脈内投与、または筋肉内投与による。

30

40

【0031】

出願ファイルの特許には、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面（複数可）を含む本特許または特許出願公開の複写は、請求及び必要な料金の支払いにより特許庁より提供される。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】フコシル化のPEONP22及びPEOAF22対応物が、それらの親の完全フコシル化クローンPEOWT22よりも、CD39^{high}HCC1739BL細胞に対

50

してより高いADCC活性（NK細胞傷害性）を示すことを示す。完全ヒト抗CD39モノクローナル抗体PEOWT22を使用して、化学修飾による2つの異なる脱フコシル化法を使用して、遺伝子修飾なしで、そのADCC増強対応物PEOAF22及びPEONP22を生成した。それらのADCCプロファイルを評価するために、標的細胞（CFSE標識HCC1739BL、エプスタイン・バーウイルス（EBV）形質転換ヒトBリンパ芽球様細胞株）を、5%CO₂中、37℃で30分間、段階希釈したヒトIgG1アイソタイプ対照抗体（KLH-hIgG1）またはPEOWT22、PEOAF22、またはPEONP22とともにインキュベートした。次いで、細胞をNK-92-CD16V/Vエフェクター細胞（E:T=1:8）と37℃で6時間共培養した。標的細胞死をフローサイトメトリーによって解析し、細胞傷害性を、CFSE⁺P/I⁺細胞の%によって決定した。

10

【図2】IgG1Fc画分が抗体にADCC活性を付与することを示す。hCD39Ref抗体は、当該技術分野における抗体と抗原結合部位を共有している。しかしながら、本実施例で使用されるRef抗体は、ADCC機能を有するように特異的に設計されたFc部分をともなって生成された。したがって、hCD39Ref抗体と本発明のPEOWT22とは両方とも、同じADCCコンピテントヒトIgG1Fc画分を含む。HCC1739BL細胞に対するNKの細胞傷害作用を、図1に記載の通りに実施し、hCD39Ref及びPEOWT22のADCC細胞殺傷プロファイルを決した。hCD39Ref及びPEOWT22が同様のADCC活性プロファイルを発揮することに留意されたい。

20

【図3】さらに最適化された脱フコシル化された対応物PEO22が、PEONP22よりも高いADCC活性を発揮することを示す。PEO22は、親クローンPEOWT22の脱フコシル化プロセスを最適化することによるさらなるADCC強化版である。HCC1739BL細胞に対するNKの細胞傷害作用を、図1に記載の通りに実施し、PEO22及びPEONP22のADCC細胞殺傷プロファイルを決した。

【図4】PEOWT22が誘発したADCC活性が、ヒトCD39を高発現する細胞に対して選択的であることを示す。Raji細胞（Raji-hCD39neg）、例えば、ヒトCD39を高発現するhCD39トランスフェクトRaji細胞（Raji-hCD39hi）、または低レベルのヒトCD39を発現するhCD39トランスフェクトRaji細胞（Raji-hCD39lo）など、異なるレベルのヒトCD39を発現するさまざまなRaji細胞株を標的細胞として使用し、5%CO₂中37℃で30分間、段階希釈したPEOWT22とともにプレインキュベートした。その後、エフェクター細胞（ルシフェラーゼ及びhCD16a-158Vを安定的に発現しているJurkat細胞）を培養物に添加し（E:T=6:1）、6時間インキュベートした。ADCC活性が、バックグラウンドを超えるルシフェラーゼ活性の増加によって示された（RLU）。RLU：相対発光量。

30

【図5】PEOWT22が、CD39-low正常内皮細胞（HUVEC）に対してADCC活性を発揮しないことを示しており、全身性副作用の可能性が低いことを示唆している。ヒト黒色腫細胞（SK-MEL-28；中程度のレベルのCD39を内在的に発現している）とヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC；低レベルのCD39を内在的に発現している）の両方を標的細胞として使用し、5%CO₂中37℃で30分間、段階希釈したPEOWT22とともにプレインキュベートした。その後、エフェクター細胞（すなわち、ルシフェラーゼ及びhCD16a-158Vを安定的に発現しているJurkat細胞）を培養物に添加し（E:T=6:1）、6時間インキュベートした。ADCC活性が、バックグラウンドを超えるルシフェラーゼ活性の増加によって示された。RLU：相対発光量。

40

【図6-1】ヒト／ウサギキメラ抗ヒトCD39モノクローナル抗体のほとんどが、参照抗ヒトCD39モノクローナル抗体クローンA1と同じエピトープを標的とすることを示す（HCC1739BL細胞を使用するエピトープ競合アッセイ）。HCC1739BL細胞を18種の抗ヒトCD39モノクローナル抗体（ヒト／ウサギキメラクローン；コン

50

ジュゲートされていない； $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ）のパネルと 4°C で30分間インキュベートし、続いて洗浄し、PEコンジュゲートマウス抗ヒトCD39モノクローナル抗体（クローンA1）で 4°C で30分間染色した。次いで、細胞をフローサイトメトリーによって解析し、PE中央値蛍光強度（MFI）を検出した。キメラ抗体の代わりに培地とともにインキュベートした細胞を対照として使用した。

【図6-2】ヒト／ウサギキメラ抗ヒトCD39モノクローナル抗体のほとんどが、参照抗ヒトCD39モノクローナル抗体クローンA1と同じエピトープを標的とすることを示す（HCC1739BL細胞を使用するエピトープ競合アッセイ）。HCC1739BL細胞を18種の抗ヒトCD39モノクローナル抗体（ヒト／ウサギキメラクローン；コンジュゲートされていない； $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ）のパネルと 4°C で30分間インキュベートし、続いて洗浄し、PEコンジュゲートマウス抗ヒトCD39モノクローナル抗体（クローンA1）で 4°C で30分間染色した。次いで、細胞をフローサイトメトリーによって解析し、PE中央値蛍光強度（MFI）を検出した。キメラ抗体の代わりに培地とともにインキュベートした細胞を対照として使用した。

【図7】クローンA1の同じエピトープで競合しないヒト／ウサギキメラ抗体が、高いADCC活性を有することを示す。HCC1739BL細胞を標的細胞として使用し、 $5\%\text{CO}_2$ 中 37°C で30分間段階希釈したキメラ抗体とともにプレインキュベートした。その後、エフェクター細胞（すなわち、ルシフェラーゼ及びhCD16a-158Vを安定的に発現しているJurkat細胞）を培養物に添加し（E：T＝6：1）、6時間インキュベートした。ADCC活性が、バックグラウンドを超えるルシフェラーゼ活性の増加によって示された。RLU：相対発光量。これらの高ADCCクローンの中で、PEO23抗体のみがクローンA1の同じエピトープで競合することに留意されたい（図6を参照されたい）。

【図8-1】クローンA1の同じエピトープ完全に競合するヒト／ウサギキメラ抗体が、低いADCC活性を有するかまたは有しないことを示す。Luc-レポーターADCCアッセイは、上記の図7に示すとおり実施した。PEO18は陽性対照として機能する。

【図8-2】クローンA1の同じエピトープ完全に競合するヒト／ウサギキメラ抗体が、低いADCC活性を有するかまたは有しないことを示す。Luc-レポーターADCCアッセイは、上記の図7に示すとおり実施した。PEO18は陽性対照として機能する。

【図9】高いADCC活性を有する抗体が細胞膜上に安定した免疫複合体を形成する一方で、低いADCC活性を有するかまたは有しない抗体は形成しないことを示す。高い、低いADCC活性を示すかまたは示さない例示的な抗ヒトCD39抗体（ $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ）をHCC1739BL細胞とともに、 $5\%\text{CO}_2$ 中 37°C で24時間、または 4°C で20分間インキュベートした後、 4°C で30分間、二次抗体（抗ヒトIgG（Fc特異的）、AlexaFluor（登録商標）488）により染色した。次いで、細胞は、洗浄され、フローサイトメトリーによって解析した。20分の処理と24時間の処理とのAF488MFIの違いは、材料及び方法に記載のとおり計算された、細胞膜上でのヒトCD39の喪失を表す。クローンPEO26（低ADCC活性）ならびにクローンPEO27、PEO28、及びPEO29（非ADCC活性）は、24時間のインキュベーション後に細胞膜上に安定した免疫複合体を形成しないことに留意されたい（例えば、CD39の損失は40%超である）。一方、クローンPEONP22、PEO19、PEO20、PEO21（高ADCC活性）は、安定した抗体-抗原免疫複合体を形成する（例えば、CD39の損失は30%未満である）。Hu/Ra：ヒト／ウサギキメラ抗体；hIgG1：ヒト化ウサギ抗体、IgG1アイソタイプ。

【図10-1】健常マウスの血液及び骨髄中の顆粒球亜集団のパーセンテージを示す。血液及び骨髄（BM）の資料を、健常ヒト（h）CD39KIマウスから採取し、フローサイトメトリーにより解析した。顆粒球を、好酸球（EO）（ $\text{CD}45^{+}\text{CD}11\text{b}^{+}\text{SSC}^{\text{high}}\text{Siglec-F}^{+}$ ）、好中球（Neu）（ $\text{CD}45^{+}\text{CD}11\text{b}^{+}\text{Ly-6G}^{+}$ ）、及び好塩基球（Baso）（ $\text{CD}45^{+}\text{SSC}^{\text{low}}\text{CD}200\text{R}3^{+}\text{FcεR1}\alpha^{+}$ ）でゲートした。それぞれの細胞サブタイプのパーセンテージを計算し、 $\text{CD}45^{+}$

10

20

30

40

50

CD11b⁺細胞の%として表した。n = 性別ごとに8匹のマウス。

【図10-2】健常マウスの血液及び骨髄中の顆粒球亜集団のパーセンテージを示す。血液及び骨髄(BM)の資料を、健常ヒト(h)CD39KIマウスから採取し、フローサイトメトリーにより解析した。顆粒球を、好酸球(Eo)(CD45⁺CD11b⁺SSC^{high}Siglec-F⁺)、好中球(Neu)(CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺)、及び好塩基球(Baso)(CD45⁺SSC^{low}CD200R3⁺FcεR1α⁺)でゲートした。それぞれの細胞サブタイプのパーセンテージを計算し、CD45⁺CD11b⁺細胞の%として表した。n = 性別ごとに8匹のマウス。

【図10-3】健常マウスの血液及び骨髄中の顆粒球亜集団のパーセンテージを示す。血液及び骨髄(BM)の資料を、健常ヒト(h)CD39KIマウスから採取し、フローサイトメトリーにより解析した。顆粒球を、好酸球(Eo)(CD45⁺CD11b⁺SSC^{high}Siglec-F⁺)、好中球(Neu)(CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺)、及び好塩基球(Baso)(CD45⁺SSC^{low}CD200R3⁺FcεR1α⁺)でゲートした。それぞれの細胞サブタイプのパーセンテージを計算し、CD45⁺CD11b⁺細胞の%として表した。n = 性別ごとに8匹のマウス。

【図10-4】健常マウスの血液及び骨髄中の顆粒球亜集団のパーセンテージを示す。血液及び骨髄(BM)の資料を、健常ヒト(h)CD39KIマウスから採取し、フローサイトメトリーにより解析した。顆粒球を、好酸球(Eo)(CD45⁺CD11b⁺SSC^{high}Siglec-F⁺)、好中球(Neu)(CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺)、及び好塩基球(Baso)(CD45⁺SSC^{low}CD200R3⁺FcεR1α⁺)でゲートした。それぞれの細胞サブタイプのパーセンテージを計算し、CD45⁺CD11b⁺細胞の%として表した。n = 性別ごとに8匹のマウス。

【図11-1】好酸球が、マウスにおいてそれらの膜上で最も高いCD39レベルを発現する顆粒球亜集団であることを示している。CD39は、マウス顆粒球における好酸球の高度に選択的な表現型バイオマーカーである。健常hCD39KIマウスの血液及びBMを、フローサイトメトリーにより、顆粒球細胞表面でのヒトCD39(hCD39)発現について分析した。それぞれの亜集団のhCD39発現レベルを、アイソタイプ対照と比較して示した。好酸球上でCD39発現が好中球よりもはるかに高い一方で、好塩基球がCD39タンパク質をほとんど発現していないことに留意されたい(CD39の発現レベルの順位：好酸球>好中球>好塩基球)。n = 8匹のマウス。

【図11-2】好酸球が、マウスにおいてそれらの膜上で最も高いCD39レベルを発現する顆粒球亜集団であることを示している。CD39は、マウス顆粒球における好酸球の高度に選択的な表現型バイオマーカーである。健常hCD39KIマウスの血液及びBMを、フローサイトメトリーにより、顆粒球細胞表面でのヒトCD39(hCD39)発現について分析した。それぞれの亜集団のhCD39発現レベルを、アイソタイプ対照と比較して示した。好酸球上でCD39発現が好中球よりもはるかに高い一方で、好塩基球がCD39タンパク質をほとんど発現していないことに留意されたい(CD39の発現レベルの順位：好酸球>好中球>好塩基球)。n = 8匹のマウス。

【図12】ADCC増強PEO22が、低ADCC対応物PEOWT22と比較して、より高い血中好酸球枯渇効果をもたらすことを示す。健常hCD39KIマウスを、生理食塩水または1mg/kgのPEO22もしくはPEOWT22(ADCC活性の順位：PEO22>PEOWT22)のi.p.で2回(0日目及び2日目)処置した。血液試料を収集し、0日目(処置前)及び3日目に、フローサイトメトリーにより顆粒球の最終採取時に分析した。PEO22抗体とPEOWT22抗体の両方が、Neuの量を減少させることなく、Eoを選択的に枯渇させることができることに留意されたい。このようなインビボEo枯渇効果は、それらのインビトロADCC活性と正の相関がある(PEO22>PEOWT22)。n = 1群あたりの1匹のマウス。

【図13-1】PEO22が、健常hCD39KIマウスにおいて血液及び骨髄の好酸球を選択的に枯渇させることを示している。健常hCD39KIマウスを、生理食塩水またはPEO22(1mg/kg)のi.p.で2日おきに、合計4回の投与で処置した。最

後の投与の1日後に血液及びBM試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。PEO22は、好中球と好酸球の両方のCD39膜発現を減少させるにもかかわらず、好酸球を枯渇させるが、好中球は枯渇させないことに留意されたい。n = 1群あたりの4~8匹のマウス。ns : 非有意 ; 対照生理食塩水群に対して * p < 0.05 ; *** p < 0.001 **** p < 0.0001 (独立t検定、片側)。

【図13-2】PEO22が、健常hCD39KIマウスにおいて血液及び骨髄の好酸球を選択的に枯渇させることを示している。健常hCD39KIマウスを、生理食塩水またはPEO22 (1mg/kg) のi.p.で2日おきに、合計4回の投与で処置した。最後の投与の1日後に血液及びBM試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。PEO22は、好中球と好酸球の両方のCD39膜発現を減少させるにもかかわらず、好酸球を枯渇させるが、好中球は枯渇させないことに留意されたい。n = 1群あたりの4~8匹のマウス。ns : 非有意 ; 対照生理食塩水群に対して * p < 0.05 ; *** p < 0.001 **** p < 0.0001 (独立t検定、片側)。

【図14】喘息マウスにおいて好酸球が著しく増加していることを示す。最後のOVA (i.n.) 負荷の1日後に好酸球性喘息hCD39KIマウスから血液及びBM試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。健常動物から得られたデータを比較のための参照として使用した。n = 1群あたりの8匹のマウス。健常動物に対して ** p < 0.01 (独立t検定、片側)。

【図15】PEO22が喘息hCD39KIマウスにおいて好酸球を選択的に枯渇させることを示している。喘息hCD39KIマウスを、生理食塩水またはPEO22 (1mg/kg) のi.p.で2日おきに合計4回処置した。最後の投与の1日後に血液及びBM試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。好酸球CD39の発現もまた、両方のコンパートメントにおいてPEO22処置後に劇的に減少していることに留意されたい。n = 1群あたり8匹のマウス。生理食塩水対照群に対して * p < 0.05、** p < 0.01、**** p < 0.0001 (独立t検定、片側)。

【図16-1】PEO22が喘息hCD39KIマウスにおいてCD39^{high}好酸球亜集団を選択的に枯渇させることを示している。喘息hCD39KIマウスを、生理食塩水またはPEO22 (1mg/kg) のi.p.で2日おきに、合計4回の投与で処置した。最後の投与の1日後に血液及びBM試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。健常マウスから得られたデータを比較のための参照として使用した。健常マウスではほとんどの好酸球が高CD39^{high}であり、- 毎日の環境の負荷に応答して「誘導性」であることに留意されたい。PEO22処置は、喘息マウスにおけるEOの絶対数を、健常マウスに存在する同等のレベルに回復させ、EO亜集団をCD39^{high}からCD39^{low}に変化させる。n = 1群あたり8匹のマウス。生理食塩水対照群に対して **** p < 0.0001 (独立t検定、片側)。

【図16-2】PEO22が喘息hCD39KIマウスにおいてCD39^{high}好酸球亜集団を選択的に枯渇させることを示している。喘息hCD39KIマウスを、生理食塩水またはPEO22 (1mg/kg) のi.p.で2日おきに、合計4回の投与で処置した。最後の投与の1日後に血液及びBM試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。健常マウスから得られたデータを比較のための参照として使用した。健常マウスではほとんどの好酸球が高CD39^{high}であり、- 毎日の環境の負荷に応答して「誘導性」であることに留意されたい。PEO22処置は、喘息マウスにおけるEOの絶対数を、健常マウスに存在する同等のレベルに回復させ、EO亜集団をCD39^{high}からCD39^{low}に変化させる。n = 1群あたり8匹のマウス。生理食塩水対照群に対して **** p < 0.0001 (独立t検定、片側)。

【図17】PEO22が、喘息hCD39KIマウスの肺において好酸球を著しく枯渇させ、疾患の重症度を改善することを示す。喘息hCD39KIマウスを、生理食塩水またはPEO22 (1mg/kg) のi.p.で2日おきに、合計4回の投与で処置した。最後の投与の1日後に肺試料を収集し、病理学者が分析した。PEO22処置群は、生理食塩水対照群で示されるOVA誘発性喘息の特徴的な徴候である主に気管支周囲及び血管周

10

20

30

40

50

囲領域での限局性好酸球性炎症の顕著な改善を示したことに留意されたい。n = 1 群あたり 8 匹のマウス。画像を 100 倍（バー 100 μm ）及び 400 倍（バー 10 μm ）で撮影した。1 群あたりの動物 1 匹の代表的な画像を示した。中実のアスタリスクは、好酸球が浸潤された血管周囲領域を強調表示する。白色のアスタリスクは好酸球が浸潤された血管壁の領域を示す。PEO22 処置群の両方の領域で肺浸潤好酸球の有意な減少が見られる。

【図 18】PEO22 が、喘息性 hCD39KI マウスにおける肺好酸球性血管炎を改善することを示している。喘息 hCD39KI マウスを、生理食塩水または PEO22（1 mg / kg）の i. p. で 2 日おきに、合計 4 回の投与で処置した。最後の投与の 1 日後に肺試料を収集し、病理学者が分析した。PEO22 処置群は、生理食塩水対照群と比較した場合、血管壁内の好酸球の数及び活性の減少の徴候を示したことに留意されたい。n = 1 群あたり 8 匹のマウス。画像を 100 倍（バー 100 μm ）及び 400 倍（バー 10 μm ）で撮影した。1 群あたりの動物 1 匹の代表的な画像を示した。中実のアスタリスクは、好酸球が浸潤された血管周囲領域を強調表示する。白色のアスタリスクは、好酸球が浸潤された血管壁を示す。

【図 19-1】CD39^{high} は表現型及び機能的に、喘息マウスにおいて活性化した好酸球亜集団を定義することを示す。喘息 hCD39KI マウス由来の血液及び BM 試料を、最後の OVA（i. n.）負荷の 1 日後に収集し、以前に報告された活性化マーカーを含む好酸球バイオマーカーについてフローサイトメトリーによって解析した。CD39 を高発現する EO 細胞（CD39^{high} サブタイプ）は、喘息マウスの血液と骨髄の両方において EO 亜集団の大部分を占めることに留意されたい。n = 1 群あたり 10 匹のマウス。

【図 19-2】CD39^{high} は表現型及び機能的に、喘息マウスにおいて活性化した好酸球亜集団を定義することを示す。喘息 hCD39KI マウス由来の血液及び BM 試料を、最後の OVA（i. n.）負荷の 1 日後に収集し、以前に報告された活性化マーカーを含む好酸球バイオマーカーについてフローサイトメトリーによって解析した。CD39 を高発現する EO 細胞（CD39^{high} サブタイプ）は、喘息マウスの血液と骨髄の両方において EO 亜集団の大部分を占めることに留意されたい。n = 1 群あたり 10 匹のマウス。

【図 20-1】健常マウスと喘息マウスの両方で示すように、IL-5R α がマウス顆粒球の好酸球の選択的バイオマーカーではないことを示している。最後の OVA（i. n.）負荷の 1 日後に採取した喘息 hCD39KI マウス由来の血液及び BM 試料をフローサイトメトリーによって顆粒球上の IL-5R α 発現に関して解析した。健常マウスからのデータを並行して比較に使用した。好酸球ではなく好中球が、健常マウスと喘息マウスの両方の血液及び BM において IL-5R α を高発現する顆粒球亜集団であることに留意されたい。n = 1 群あたり 8 匹のマウス。

【図 20-2】健常マウスと喘息マウスの両方で示すように、IL-5R α がマウス顆粒球の好酸球の選択的バイオマーカーではないことを示している。最後の OVA（i. n.）負荷の 1 日後に採取した喘息 hCD39KI マウス由来の血液及び BM 試料をフローサイトメトリーによって顆粒球上の IL-5R α 発現に関して解析した。健常マウスからのデータを並行して比較に使用した。好酸球ではなく好中球が、健常マウスと喘息マウスの両方の血液及び BM において IL-5R α を高発現する顆粒球亜集団であることに留意されたい。n = 1 群あたり 8 匹のマウス。

【図 21】血中好酸球がマウス皮膚炎において著しく増加することを示す。hCD39KI マウスを、材料及び方法に詳述されているようにアトピー性皮膚炎モデル誘導に供した。最後の OVA 負荷の 2 日後に血液試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。健常動物からデータを比較のための参照として使用した。n = 1 群あたり 5 ~ 8 匹のマウス。健常動物に対して **p < 0.01（独立 t 検定、片側）。

【図 22】PEO22 が、皮膚組織浸潤好酸球を減少させ、皮膚炎の特徴的な徴候 - 表皮肥厚、過角化症、壊死性角化細胞、及び炎症性浸潤を改善することを示す。皮膚炎モデル

10

20

30

40

50

誘導に供した h C D 3 9 K I マウスを、生理食塩水または P E O 2 2 (1 m g / k g) の i . p . で合計 3 回投与で処置した。最後の投与の 2 日後に皮膚試料を収集し、病理学者が分析した。n = 皮膚炎モデルにおける 1 群あたり 8 匹のマウス。画像は 4 0 0 倍 (パー 1 0 μ m) で撮影した。1 群あたりの動物 1 匹の代表的な画像を示した。比較のための参照として、健常マウスの皮膚病変を並行して示した。中実のアスタリスクは、好酸球が浸潤された局所の炎症領域を示しており、P E O 2 2 処置群において皮膚組織炎症の顕著な減少が認められている。

【図 2 3】P E O 2 2 がマウス好酸球性副鼻腔炎において血中好酸球を選択的に枯渇させることを示している。材料及び方法に詳述されているように、好酸球性副鼻腔炎モデル誘導に供した h C D 3 9 K I マウスを、生理食塩水または P E O 2 2 (3 m g / k g) の i . p . で 2 日おきに合計 4 回の投与で処置した。最後の投与の 1 日後に血液試料を収集し、フローサイトメトリーによって解析した。健常動物からのデータを比較のための参照として使用した。血中 E O 細胞が、健常マウスとは対照的に、副鼻腔炎モデルにおいて著しく増加しており、これは P E O 2 2 処置群において減少していることに留意されたい。n = 副鼻腔炎モデルにおける 1 群あたり 5 匹のマウス。それぞれの群に対して ** p < 0 . 0 1 (一元配置分散分析とそれに続く T u k e y の多重比較検定)。

【図 2 4】P E O 2 2 が、好酸球性副鼻腔炎の病因である好酸球によって支配される鼻腔上皮浸潤炎症細胞を減少させ、局所の病変を改善することを示す。好酸球性副鼻腔炎モデル誘導に供した h C D 3 9 K I マウスを、生理食塩水または P E O 2 2 (3 m g / k g) の i . p . で 2 日おきに合計 4 回処置した。最後の投与の 1 日後に鼻腔試料を収集し、病理学者が分析した。n = 1 群あたり 5 匹のマウス。鼻腔をレベル I I (切開乳頭から第 1 口蓋隆起まで) で一貫してサンプリングし、病理画像を鼻中隔に焦点を合わせた。画像を 1 0 0 倍 (パー 1 0 0 μ m) 及び 4 0 0 倍 (パー 1 0 μ m) で撮影した。1 群あたりの動物 1 匹の代表的な画像を示した。中実のアスタリスクは、好酸球が優勢な上皮浸潤炎症細胞を示す。

【図 2 5 - 1】ヒト血液中の顆粒球亜集団のパーセンテージを示す。健常ヒトの血液試料をフローサイトメトリーによって解析した。顆粒球を、好酸球 (E O) (C D 4 5 + S S C h i g h S i g l e c - 8 +) 、好中球 (N e u) (C D 4 5 + S S C h i g h S i g l e c - 8 -) 、及び好塩基球 (B a s o) (C D 4 5 + S S C l o w H L A - D R - I L - 3 R α +) でゲートした。それぞれの細胞サブタイプのパーセンテージを計算し、C D 4 5 + S S C h i g h (E O 及び N e u) の % 及び C D 4 5 + S S C l o w (B a s o) の % として表した。

【図 2 5 - 2】ヒト血液中の顆粒球亜集団のパーセンテージを示す。健常ヒトの血液試料をフローサイトメトリーによって解析した。顆粒球を、好酸球 (E O) (C D 4 5 + S S C h i g h S i g l e c - 8 +) 、好中球 (N e u) (C D 4 5 + S S C h i g h S i g l e c - 8 -) 、及び好塩基球 (B a s o) (C D 4 5 + S S C l o w H L A - D R - I L - 3 R α +) でゲートした。それぞれの細胞サブタイプのパーセンテージを計算し、C D 4 5 + S S C h i g h (E O 及び N e u) の % 及び C D 4 5 + S S C l o w (B a s o) の % として表した。

【図 2 6 - 1】好酸球が、ヒトにおいてそれらの膜上で最も高い C D 3 9 レベルを発現する顆粒球亜集団であることを示している。C D 3 9 は、ヒト顆粒球における好酸球の高度に選択的な表現型バイオマーカーである。健常ヒトの血液試料をフローサイトメトリーにより、顆粒球細胞表面での h C D 3 9 発現について分析した。それぞれのサブタイプの h C D 3 9 発現レベルを、アイソタイプ対照と比較して示した。好酸球上で C D 3 9 発現が好中球よりもはるかに高い一方で、好塩基球が C D 3 9 タンパク質をほとんど発現していないことに留意されたい (C D 3 9 の発現レベルの順位：好酸球 > 好中球 > 好塩基球)。

【図 2 6 - 2】好酸球が、ヒトにおいてそれらの膜上で最も高い C D 3 9 レベルを発現する顆粒球亜集団であることを示している。C D 3 9 は、ヒト顆粒球における好酸球の高度に選択的な表現型バイオマーカーである。健常ヒトの血液試料をフローサイトメトリーにより、顆粒球細胞表面での h C D 3 9 発現について分析した。それぞれのサブタイプの h

10

20

30

40

50

CD39発現レベルを、アイソタイプ対照と比較して示した。好酸球上でCD39発現が好中球よりもはるかに高い一方で、好塩基球がCD39タンパク質をほとんど発現していないことに留意されたい（CD39の発現レベルの順位：好酸球＞好中球＞好塩基球）。

【図27】健常マウスと同様に、健常ヒトにおいて、ほとんどの好酸球がCD39^{high}であることを示す。フローサイトメトリーによって解析されたhCD39発現に基づいて、健常ヒトの血中好酸球をさらに細分した。好酸球の大部分は、健常ヒトではCD39^{high}誘導性サブタイプであることに留意されたい。

【図28】ADCC増強PEO22が、その低ADCC対応物PEOWT22と比較して、ヒト好酸球に対して増加したADCC活性を示すことを示す。単離されたヒトEO標的細胞を、5%CO₂中37℃で30分間、段階希釈したPEOWT22またはPEO22とともにインキュベートした。次いで、細胞を分単離され活性化されたヒトNKエフェクター細胞とともに37℃で6時間共培養した（E：T＝1：5）。標的細胞死をフローサイトメトリーによって解析し、細胞傷害性を、7-AAD⁺EO細胞の%によって決定した。

【図29】PEO22がヒト好酸球に対してADCP活性を示すことを示す。紫色に標識したヒトEO標的細胞をアイソタイプ対照（10μg/mL）またはPEO22（1もしくは10μg/mL）とともに5%CO₂中37℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞をヒトマクロファージエフェクター細胞とともに37℃で6時間共培養した（E：T＝3：1）。結合したマクロファージを収集し、フローサイトメトリーによって解析し、ADCPをバシフィックブルー⁺（EO貪食）マクロファージ細胞の%によって決定した。ADCP培地で単独でインキュベートしたマクロファージを、食作用アッセイの陰性対照として使用した。

【図30-1】立体構造エピトープマッピング及び主要な推定エピトープ候補のリストを示す。

【図30-2】立体構造エピトープマッピング及び主要な推定エピトープ候補のリストを示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

I. 概要

炎症性疾患の効果的な治療は、病態生理が不均一であるため、多くの場合困難である。根底にある疾患メカニズムの理解は向上しており、好酸球が、2型炎症性疾患における中心的な役割を含む、広範囲の炎症性疾患において複雑な病態生理学的役割を果たしていることが現在では明らかとなっている。

【0034】

好酸球は、末梢血中を循環し、いくつかの体組織にホーミングする分化した顆粒球のサブセットである。好酸球は、蠕虫免疫やアレルギーにおける従来の関連性に加えて、いくつかの恒常性及び病理学的状況において重要な役割を果たすことが次第に明らかになってきた。例えば、アレルギーにおいて、好酸球は、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、及び喘息の病因に関与している。それらはまた、好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎、急性及び慢性の好酸球性肺炎、ならびに好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（血管炎のまれな形態）などの自己免疫障害にも基本的に関与している。さらに、二次性（または反応性）好酸球増多症もまた、ICIなどの薬物によって誘発される／引き起こされ得る。

【0035】

本発明は、ADCCコンピテント及び／またはADCPコンピテントの抗CD39抗体などの特定のCD39標的化薬剤が、CD39を発現する好酸球を選択的に標的化及び切除することができ、その結果、全身及び／または標的組織（炎症または病変の部位、または好酸球産生部位である骨髄など）内に位置する好酸球数の減少を引き起こす。生じるCD39⁺好酸球細胞の数及び／または機能の低減は、組織の炎症表現型の変化をもたらし得る。

【0036】

10

20

30

40

50

したがって、いくつかの態様では、本発明は、CD39標的化好酸球枯渇剤に関する。
「CD39標的化好酸球枯渇剤」という用語は、好酸球の表面上のCD39に特異的に結合し、好酸球の細胞死を誘導する任意の薬剤（例えば、抗体、低分子、アプタマーなど）を指す。いくつかの実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、ADCCコンピテント及び／またはADCPコンピテントの抗CD39抗体などの抗CD39抗体である。

【0037】

CD39標的化好酸球枯渇剤の例として抗CD39抗体の使用を説明すると、本発明の方法で使用するために選択され得る抗体は、CD39とより安定した免疫複合体を形成して、より強力なADCC殺傷効果をもたらすことができる。安定したCD39との免疫複合体を形成することができない抗体は、表面からのCD39の減少をもたらすが、CD39の脱落またはサイトーシス（内在化）が増加するメカニズムを介するものであり、抗体依存性細胞傷害によってCD39発現細胞を除去可能であるという点では、同じ効果を有しないことを、本発明者らは観察した。理論に拘束されるものではないが、CD39標的化好酸球枯渇剤の例として抗CD39抗体の使用により、本発明の方法で使用するために選択され得る抗体は、CD39とより安定した免疫複合体を形成して、より強力なADCP殺傷効果をもたらすことができるとさらに考えられている。ADCPは、別の主要なFcエフェクター機能であり、そのメカニズムにより、抗体オプソニン化標的細胞は、マクロファージの表面上のFcγR（NK細胞で発現し、NK細胞のADCC殺傷機能を付与する細胞上の本明細書に記載されるFcγRIIIa受容体など）を活性化して食作用を誘導し、その結果、標的細胞の内部移行及び分解がもたらされ、最終的には標的細胞の殺傷がもたらされる。治療用モノクローナル抗体の低フコシル化または脱フコシル化は、NK細胞によるFcγRIIIa受容体結合の強化及びその後のADCC媒介性標的細胞枯渇活性、ならびにマクロファージによるADCP媒介性標的細胞枯渇をもたらすことが示されている（本明細書の図1、3、12、13、15-18、22-24、28、及び29を参照されたい；また、Dagher et al., 2022, Eur. Respir. J. 59: 2004306を参照されたい（ここで、両方の実験環境での標的細胞は好酸球である））。

【0038】

文献に記載されている治療用抗CD39抗体で使用するためとは異なって教示されている特徴である、特定の好ましい抗CD39モノクローナル抗体の例示的な特徴を以下に要約する。

【0039】

本発明の抗体は、FcγRIIIa受容体依存性活性（例えば、ADCC及び／またはADCP）を介してCD39+好酸球細胞集団を減少させる。

【0040】

例として、図1及び図3は、フコシル化阻害剤（PEOAF22）を使用すること、または産生プロセス（PEONP22及びPEO22）を最適化することのいずれかによって、完全ヒト抗CD39モノクローナル抗体であるクローンPEOWT22のフコシル化の減少（別名、低フコシル化または脱フコシル化）により、インビトロにおいて、CD39+細胞に対するADCC活性が劇的に向上することを示している。ADCC活性の順位：PEO22>PEONP22>PEOWT22。このような現象はまた、インビトロADCCアッセイにおいてヒトNK細胞（エフェクター細胞として）及びヒト好酸球（標的細胞として）を使用した場合に有効であり、すなわち、PEO22は、好酸球に対して著しく増強されたNK細胞傷害性を示し（EC50=2.94E-04 μg/mL）、これは、完全フコシル化対応物であるPEOWT22（EC50=3.03E-03 μg/mL）とは対照的である（図28）。さらに、PEO22はまた、ヒトマクロファージ（エフェクター細胞として）及びヒト好酸球（標的細胞として）を使用したインビトロ食作用アッセイにおいて好酸球に対するADCP活性を示している（図29）。予想通り、これらのインビトロでのCD39標的化好酸球枯渇活性はすべて、インビボでの脱フコシル化抗体PEO22の抗好酸球活性の増強と同時に起こる（図12、13、15-18、及び

22～24)。

【0041】

CD39^{high}は表現型的に及び／または機能的に、誘導性及び／または活性化好酸球亜集団を定義する。

【0042】

好酸球は不均一であり、異なる好酸球亜集団、すなわち、さまざまな組織における常性好酸球及び誘導性好酸球が存在し、これらは好酸球を標的とした療法の有効性に影響を有し得る。好酸球亜集団の特性評価は、好酸球研究の重要な目的である。したがって、望まれない好酸球活性に関連する疾患または状態を治療するためのより安全でより選択的でより効果的な治療の開発のために、恒当好酸球と炎症性好酸球を区別するために、膜表面マーカーによって異なる好酸球亜集団の表現型を決定することは価値がある。すなわち、組織及び循環好酸球を完全に枯渇させる生物学的薬剤、またはその逆に好酸球、特に組織内に常在するまたは恒常性のものの最小限の割合を維持する生物学的薬剤による治療の介入は、特に長期間にわたるこれらの治療の投与を考慮すると、非常に異なる影響を有し得る。同様に、誘導性好酸球の真正のバイオマーカー（例えば、循環好酸球、臓器特異的好酸球）の使用も、増加する治療効果のある生物学的薬剤の中で最良の好酸球を標的とするアプローチを選択するのに役立ち得る。しかしながら、好酸球のサブタイプは、ヒトでは完全には特徴づけられていない (Messnill et al., 2016, J. Clin. Invest. 126:3279-3295; Kanda et al., 2021, Allergol. Int. 70(1):9-18; Lombardi et al., 2022, Curr. Res. Immunol. 3:42-53)。

10

20

【0043】

本明細書では、1) ほとんどすべての好酸球がCD39を発現する（好酸球細胞はCD39+である）、ならびに2) CD39^{high}表現型及び／または機能的に、マウスとヒトの両方において好酸球細胞の大部分を占める誘導性好酸球及び／または活性化好酸球を定義することが示される。

【0044】

例として、図16は、フローサイトメトリーによって解析された細胞表面CD39発現レベルに基づいて、好酸球が、健常マウスと喘息マウスの両方で2つの異なる亜集団、すなわちCD39^{high}とCD39^{low}とに表現型的に分類され得ることを示す。さらに、これらのCD39^{high}好酸球は、「誘導性」機能的特性を示し、炎症の誘導に応答して拡大する。すなわち、喘息マウスでは、末梢血及び骨髄におけるCD39^{high}好酸球亜集団の数の増加が認められる（図16）。これは、肺での浸潤好酸球数の増加を伴う（例えば、主に気管支周囲及び血管周囲領域における局所的な好酸球性炎症、血管炎を伴う）（図17及び18）。すべてが疾患の重症度の増加と正の相関がある（図17及び18）。このような現象は、アトピー性皮膚炎及び好酸球性副鼻腔炎のマウスモデルでも見られる（図22及び24）。より重要なことに、同様の好酸球のCD39発現プロファイルはヒト血液でも観察され（図25～27）、これは、本発明における対象の抗CD39抗体などのCD39標的化好酸球枯渇剤の良好な臨床的変換性を暗に示している。

30

40

【0045】

注目すべきことに、好酸球の大部分は、止血条件（健常マウス及び健常ヒトなど）下でCD39^{high}誘導性サブタイプであり、すなわち、80～90%のCD39^{high}と10～20%のCD39^{low}（図16及び27）である。喘息などの好酸球関連疾患（EAD）では、これらのCD39^{high}好酸球は拡大し増加し（図16）、CD39^{high}好酸球が「誘導性」であり、炎症誘導に応答性であることを示唆している。CD39^{high}は、EADの病因である「活性化」好酸球の選択的な表現型及び／または機能的バイオマーカーである。

【0046】

CD39とは異なり、例えば、好酸球上で「上方制御」と呼ばれるCD49b及びCD101などの、EADにおける「活性化」好酸球の他の以前に報告された表現型バイオマ

50

ーカーは、活性化好酸球垂集団をそれらの恒常性対応物と区別することができない（または少なくともCD39よりもはるかに少ない程度）（図19）。別の例として、好酸球及び好塩基球を枯渇させるためのADCC増強のために脱フコシル化されるヒト化IgG1抗IL-5R α モノクローナル抗体であるFASENRA（登録商標）（ベンラリズマブ）は、好酸球の表面に直接結合し、好酸球性喘息に対して承認されている、初めてで唯一の抗好酸球生物学的製剤である（ワールドワイドウェブ上のfasenrahcp.comで入手可能）。しかしながら、好酸球性喘息では、IL-5R α high好酸球垂集団は、好酸球のごく一部、すなわち、血液中で約20%、骨髄中では50%未満を占めるにすぎない（図19）。さらに、好中球は、実際に好酸球よりもはるかに高いIL-5R α レベルを発現している（Kda et al., 2021, Allergol. Int. 70(1):9-18-図3 Figure 3; 及び本明細書の図20）。したがって、ベンラリズマブなどのIL-5R α 標的化好酸球枯渇剤の枯渇活性は、実際に好酸球細胞選択性を欠いている。

10

【0047】

これらのデータは、CD39highが、EADにおける誘導性好酸球サブタイプ及び／または活性化好酸球サブタイプの真正な表現型及び／または機能的バイオマーカーとして機能することを示しており、望まれない好酸球活性に関連する疾患または状態を治療するためのCD39標的化好酸球枯渇剤の高い選択性及び潜在的に高い有効性のさらなる証拠が提供される。別の言い方をすれば、本明細書における本発明者らのデータはまた、EAD患者の層別化を補助するバイオマーカーとしてのCD39high好酸球の潜在的な臨床的有用性を示唆している。

20

【0048】

本発明の抗CD39抗体のADCC活性は、CD39high細胞、例えばCD39high誘導性及び／または活性化好酸球に対して選択的である。

【0049】

例として、図4及び図5は、PEOWT22のADCC活性が、インビトロでCD39high細胞（すなわち、図4のRaji-hCD39hi細胞及び図5のSK-MEL-28細胞）に対して選択的であることを示している。

【0050】

図16に示すさらなる例のように、PEO22は、インビボでCD39high誘導性及び活性化好酸球を選択的に標的化して除去することができる。その結果、好酸球性喘息などのEADにおいて、全身的にこれらのCD39high好酸球の数の減少が引き起こされる（図16）。同時に、組織浸潤好酸球の数もまた、喘息、血管炎、アトピー性皮膚炎、及び好酸球性副鼻腔炎のマウスモデルにおいて、PEO22処置によって病理学的病変において著しく減少する（図17、18、22、及び24）。結果として生じるCD39high好酸球垂集団の数及び／または機能の低減は、組織の炎症表現型の改善及び疾患の重症度の減少をもたらす（図17、18、22、及び24）。

30

【0051】

対照的に、図12及び13に示す追加の例のように、好酸球よりもはるかに低いCD39レベルを発現する好中球（図11）は、インビボPEO22処置によって枯渇しない。

40

【0052】

要約すると、この機能的形質は、対象の抗体に特異性を付与し、全身性副作用を回避するはずであり、その結果、EAD（望まれない好酸球活性に関連する疾患または状態）を治療するためのより安全で選択性が高く、より効果的な抗CD39抗体が得られるはずである。

【0053】

標的細胞膜上の抗原との抗CD39抗体の安定した免疫複合体が形成されることにより、高いADCC活性が抗体に付与される。

【0054】

図9に示す例として、標的細胞表面上の抗体-抗原免疫複合体の安定性を、次の3つの

50

群から選択した抗体を使用して調べた：ADCC-high（すなわち、PEONP22、hCD39 Ref、及びヒト／ウサギキメラクローンPEO19、PEO20、PEO21、及びPEO25）、ADCC-low（ヒト／ウサギキメラクローンPEO26）、またはADCC陰性（ヒト／ウサギキメラクローンPEO27、PEO28、及びPEO29）。このような免疫複合体の安定性と抗体のADCC活性との間には、強い正の相関関係が明確に見られる。すなわち、抗体－抗原免疫複合体の安定性が高いほど、抗体のADCC活性は高くなる。

【0055】

抗CD39抗体の異なるエピトープは、抗体のADCC活性に直接関連する。

【0056】

一例として、本発明のヒト／ウサギキメラ抗hCD39抗体のエピトープを市販の抗hCD39モノクローナル抗体クローンA1と比較することにより、図6～8は、クローンA1と非競合的または一部のみ競合してCD39に結合する様式で、CD39に結合する抗CD39抗体を示しており、この場合、高いADCC活性を含む高い可能性を有し、すなわち、6つのADCC-high抗体のうち、PEO23を除く5つ（PEO18、PEO19、PEO20、PEO21、及びPEO24）がそのような特性を示す（図6及び7）。対照的に、ADCC-low（PEO26、PEO30、PEO31、及びPEO32）及びADCC陰性（PEO27、PEO28、PEO29、PEO33、PEO34、PEO35、PEO36、及びPEO37）におけるすべての抗体は、クローンA1と完全に重複するエピトープを示す（図6及び8）。

【0057】

特定の実施形態では、例えば、先行技術の腫瘍学的使用における抗CD39治療用抗体に対する焦点であるように、CD39 NTPアーゼ活性の直接阻害に焦点を合わせるのではなく（Perrot et al., 2019, Cell Reports 27: 2411-2425; Liet al., 2019, Cancer Discovery 9 (12): 1754-1773; 及びWO/2017/089334）、本発明において有用な抗CD39抗体（NTPase活性を阻害するか否かに拘わらず）は、IgG1 Fcドメインを有するヒト定常領域を有するように設計されて得る。この設計は、FcγRIIIa受容体依存性細胞活性、例えば、CD39+細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び抗体依存性細胞食作用（ADCP）、及び（任意選択で）CD39+細胞に対する補体依存性細胞傷害（CDC）を与える。その結果、そのような細胞活性により、CD39+細胞の除去及び減少がもたらされる。

【0058】

特定の実施形態では、本発明に包含される特定の抗体は、モノクローナル抗体クローンA1のCD39への結合と非競合的であるか、または一部のみ競合的であるCD39上のエピトープに結合することが示されている。

【0059】

II. 定義

本発明の理解を促すために、いくつかの用語及び語句を以下に定義する。

【0060】

「CD39」は、「表面抗原分類39」、「エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドrolラーゼ1」または（遺伝子）「ENTPD1」及び（タンパク質）「NTPDase1」とも呼ばれ、細胞表面に位置するエクトヌクレオチダーゼであり、トリホスホヌクレオシド及びジホスホヌクレオシドのγ-及びβ-ホスフェート残基のモノホスホヌクレオシド誘導体への加水分解（ATP、ADP、UTP、及びUDPなどのP2受容体リガンドを加水分解するなど）を触媒する細胞外に面する触媒部位を有する（ENZYMEエントリー：EC 3.6.1.5）（Junger et al., 2011, Nat. Rev. Immunol. 11: 201-212）。代表的なヒトNTPDase1タンパク質配列は、UniProtKBエントリー「P49961（ENTP1_HUMAN）」で提供され、酵素の代表的なヒトコード配列は、GenBankアクセッションS73

10

20

30

40

50

813で提供される。

【0061】

代表的なヒトCD39 cDNA及びタンパク質配列は当該技術分野で周知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から公に入手可能である。例えば、少なくとも7つのヒトCD39転写バリエーションは、6つの異なるヒトCD39アイソフォームをコードすることが知られている。ヒトCD39アイソフォーム1は、アクセッション番号NM_001776.5及びNP_001767.3で入手できる。転写バリエーションは、最長の転写産物を表し、アイソフォーム1をコードする。アクセッション番号NM_001098175.1及びNP_001091645.1で入手可能なヒトCD39アイソフォーム2は、転写バリエーション1と異なる代替の5'エクソンを使用し、これは別個の5'非翻訳領域(UTR)となり、代替開始コドンで翻訳開始が引き起こされ、これにより、より長い、別個のN末端となる。アクセッション番号NM_001164178.1及びNP_001157650.1で入手可能なヒトCD39アイソフォーム3は、転写バリエーション1と異なる代替の5'エクソンを使用し、これは別個の5'UTRとなり、代替開始コドンで翻訳開始が引き起こされ、これにより、より長い、別個のN末端となる。アクセッション番号NM_001164179.1及びNP_001157651.1で入手可能なヒトCD39アイソフォーム4は、転写バリエーション1と比較して、代替のインフレームスプライス部位を使用し、これにより、より短いアイソフォームとなる。アクセッション番号NM_001164181.1及びNP_001157653.1で入手可能なヒトCD39アイソフォーム5は、5'領域で代替エクソンを使用し、これは転写バリエーション1と比べて、下流の開始コドンで別個の5'UTR及び翻訳開始をし、これにより、より短いアイソフォームとなっている。アクセッション番号NM_001164182.1及びNP_001157654.1で入手可能なヒトCD39アイソフォーム6は、代替エクソンを欠き、これにより、別個の5'UTRをもたらし、転写バリエーション1と比べて、下流の開始コドンで翻訳開始が引き起こされ、これにより、より短いアイソフォームとなる。ヒトCD39アイソフォーム6は、アクセッション番号NM_001164183.1及びNP_001157655.1で入手可能な別の転写バリエーションによってもコードされており、これは、2つの代替内部エクソンを欠き、これにより、別個の5'UTRをもたらし、転写バリエーション1と比べて、下流の開始コドンで翻訳開始が引き起こされ、これにより、より短いアイソフォームとなる。

【0062】

ヒト以外の生物におけるCD39オルソログの核酸配列及びポリペプチド配列はよく知られており、例えば、マウスCD39 (NM_009848.3及びNP_033978.1)、ラットCD39 (NM_022587.1及びNP_072109.1)、ウシCD39 (NM_174536.2及びNP_776961.1)、カエルCD39 (NM_001006795.1及びNP_001006796.1)、及びゼブラフィッシュCD39 (NM_001003545.1及びNP_001003545.1) が挙げられる。

【0063】

CD39の広範なグリコシル化は、その細胞表面の発現及び活性に関連しており、これにより、グリコシル化残基の欠失または非グリコシル化残基への変異により、CD39活性が大幅に低下する(例えば、ラットCD39のN末端でのグリコシル化可能な残基73、中央での333、及び/またはC末端での429及び/または458、またはそのオルソログ内での対応する残基の欠失または変異; Wu et al. (2005) Mol. Biol. Cell. 16:1661-1672を参照されたい)。同様に、アピラーゼ保存領域(ACR)1~5のうちのいずれか1つ以上のACRでの保存残基の変異により、CD39活性の低下が引き起こされる(Schulte am Esch et al. (1999) Biochem. 38:2248-2258; Yang et al. (2001) Biochem. 40:3943-4940; Wang and Guido

tti (1998) J. Biol. Chem. 273:11392-11399)。
【0064】

CD39活性の調節（例えば、減少）は、任意の数の方法で測定することができる（例えば、対照、比率、ベースラインとの比較などを使用することなど、本明細書に記載の測定による）。例えば、CD39活性調節因子は、試験剤の存在下でのそのようなエクトヌクレオチダーゼのレベルと比較して、エクトヌクレオチダーゼの触媒活性または全体的なCD39活性を減少させることができる。一実施形態では、CD39活性は、試料中のアデノシンの濃度を分析することによって決定される。濃度は、経時的に評価できる。別の実施形態では、試験される試料にATPが添加され、残りのATP、AMPまたはアデノシンの濃度が決定または評価される。この文脈での調節（減少など）は、1%、5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、120%、150%、200%、500%、1000%、またはそれ以上の減少を意味し得る。一実施形態では、この増加は、経時的に検出される。

10

【0065】

特定の実施形態では、好酸球などの細胞は、遺伝子（例えば、CD39）または他の目的のバイオマーカー（例えば、SSCとして知られるフローサイトメトリーサイド散乱）の発現を高レベルで示す。一実施形態では、遺伝子または他のバイオマーカーの発現レベルを決定するための本明細書に記載の任意の方法を使用して、高レベルを決定することができる。例えば、CD39^{high}好酸球を定義するための代表的な非限定的な方法は、Cytex（登録商標）Auroraフローサイトメーターを使用するなど、表1～3に列挙される検出抗体を使用して、例示的な材料及び方法で本明細書に記載される抗体ベースのフローサイトメトリーアッセイ下での、血液（または血液派生物）または骨髄、例えば、健常または喘息のhCD39KIマウス（Purinomia Animal Facilityから得たもの）から得た血液または骨髄、あるいは健常なヒトドナーから得た血液の分析を含む。

20

【0066】

特定の実施形態では、CD39^{high}好酸球は、好酸球に特徴的なマーカーを発現する及び／または好酸球の機能的特徴を有することに加えて、例えばCytex（登録商標）Auroraフローサイトメーターを使用して、例えば、表1～3に列挙された検出抗体を使用して、例示的な材料及び方法において本明細書に記載される抗体ベースのフローサイトメトリーアッセイを使用して検出されるフローサイトメトリーにより、少なくとも 10^3 のCD39検出抗体の蛍光強度を有するのに十分な高レベルでCD39を発現する好酸球として同定され得る。

30

【0067】

いくつかの実施形態では、好酸球などの細胞のCD39^{high}集団は、少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、またはそれ以上の、または、例えば、60～99%、65～95%、70～90%、70～80%などの任意の範囲（両端を含む）が、高レベル（例えば、単なる例示として、CD39検出抗体の蛍光強度は、この特定のフローサイトメトリーアッセイ下で少なくとも 10^3 、例えば少なくとも 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または、 10^3 ～ 10^7 、 10^4 ～ 10^6 、 10^3 ～ 10^6 などの任意の範囲（両端を含む））のCD39を発現する細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、好酸球などの細胞のCD39^{low}集団は、41、40、39、38、37、36、35、30、25、20、15、10、5未満、またはそれ未満の、または、例えば、4～41%、10～35%、15～25%などの任意の範囲（両端を含む）が、低レベル（例えば、単なる例示として、CD39検出抗体の蛍光強度は、この特定のフローサイトメトリーアッセイ下で 10^3 未満、例えば 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、または、 10^0 ～ 10^3 、 10^1 ～ 10^2 、 10^1 ～ 10^3 未満などの任意の範囲（両端を含む））のCD39を発現する細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、CD45+CD11b+CD39^{high}Siglec-8+好酸球細胞（マウス

40

50

におけるCD45+CD11b+CD39^{high}Siglec-F+好酸球細胞に相当する)などのCD39^{high}細胞は、CD45+CD11b+Siglec-8+CD39+好酸球集団などの全集団の60~99%、または、60~95%、60~80%、70~80%、75~80%などの任意の範囲(両端を含む)を占める。

【0068】

特定の実施形態では、好酸球などの細胞は、「誘導性及び／または活性化」好酸球である。一実施形態では、遺伝子または他のバイオマーカーの発現レベルを決定するための本明細書に記載の任意の方法を使用して、細胞サブタイプを決定することができる。例えば、「誘導性及び／または活性化」好酸球を定義するための代表的な非限定的な方法は、Cytek(登録商標)Auroraフローサイトメーターを使用するなど、表1~3に列挙される検出抗体を使用して、例示的な材料及び方法で本明細書に記載される抗体ベースのフローサイトメトリーアッセイ下での、血液(または血液派生物)または骨髄、例えば、健常または喘息のhCD39KIマウス(Purinomia Animal Facilityから得たもの)から得た血液または骨髄、あるいは健常なヒトドナーから得た血液の分析を含む。いくつかの実施形態では、「誘導性及び／または活性化」好酸球は、i)喘息、血管炎、皮膚炎、または副鼻腔炎などの病態で提示される；及び／またはii)血液、骨髄、病変、及び／またはそれらの組み合わせからなる群から選択される空間内に位置している。いくつかの実施形態では、「誘導性及び／または活性化」好酸球は、CD39^{high}好酸球集団である。いくつかの実施形態では、「誘導性及び／または活性化」好酸球は、CD45+CD11b+CD39^{high}Siglec-8+好酸球集団(これはマウスにおけるCD45+CD11b+CD39^{high}Siglec-F+好酸球細胞に相当する)である。いくつかの実施形態では、「誘導性及び／または活性化」好酸球はCD45+CD11b+CD39^{high}Siglec-8^{high}好酸球集団である。

【0069】

「CD39抗体」(代替的に「抗CD39抗体」)は、NTPDase1タンパク質の1つ以上のエピトープに選択的に結合する抗体を指し、モノパラトピック抗体、ならびにバイパラトピック及び他のマルチパラトピック型抗体が含まれる。

【0070】

「免疫複合体」(抗原-抗体複合体または抗原結合抗体としても知られる)は、いくつかの実施形態では、抗原(例えば、細胞などの培地、または単独で発現される)の抗体への結合によって形成される組成を指す場合がある。「安定した免疫複合体」は、抗原と抗体との間の相互作用の喪失が、24時間後に免疫複合体の40%未満、24時間後に35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、もしくは10%未満、または40%~35%、35%~30%、30%~25%、25%~20%、20%~15%、15%~10%などの任意の範囲(両端を含む)である(例えば、HCC1739BL細胞などの抗原を発現する細胞と抗体をインキュベートした場合)。いくつかの実施形態では、免疫複合体形成は、蛍光標識した二次抗体を使用する蛍光強度によって検出される(例えば、単なる例示として、抗CD39抗体で形成された免疫複合体の安定性は、抗CD39モノクローナル抗体(mAb)(例えば、2µg/mL以上)をHCC1739BL細胞とともに異なる時間インキュベートし、その後、蛍光コンジュゲート二次抗体によって免疫複合体の存在を検出することによって決定され得)。

【0071】

a. 抗体及び他のポリペプチド

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、標的、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述の任意ものの組み合わせに、通常は免疫グロブリン分子の可変領域内にある抗原結合部位の少なくとも1つの抗原結合部位を介して認識し、特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。本明細書で使用される場合、この用語は、インタクトなポリクローン抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片)、そ

10

20

30

40

50

れら断片がFcまたは他のFcγRIII結合ドメインを含むようにフォーマットされているという条件で一本鎖Fv(scFv)抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、単一特異性抗体、一価抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原結合部位を含む融合タンパク質(Fcまたは他のFcγRIII結合ドメインを含むようにフォーマットされた)、及び抗体が所望の生物活性を示す限り、抗原結合部位を含む任意の他の修飾された免疫グロブリン分子を包含する。

【0072】

本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」または「抗体結合断片」という用語は、抗原(例えば、ヒトCD39)に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行できることが示されている。抗体、例えば、本明細書に記載の抗CD39抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) Fab断片、すなわちVL、VH、CL、及びCH1ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')₂断片、すなわちヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結される2つのFab断片を含む二価断片；(iii) VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546)、及び(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)、または(vii) 合成リンカーによって任意選択で結合され得る2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられる。このような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることが意図される。これら及び他の潜在的な構成は、Chan and Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10: 301に記載されている。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同一の方法で有用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、組み換えDNA技術によって、またはインタクトの免疫グロブリンの酵素的切断または化学的切断によって産生可能である。

【0073】

抗体の「可変領域」という用語は、単独のまたは組み合わされた、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。一般に、重鎖及び軽鎖の可変領域はそれぞれ、4つのフレームワーク領域(FR)と「超可変領域」としても知られる3つの相補性決定領域(CDR)からなる。それぞれの鎖内のCDRは、フレームワーク領域によって極めて近接して一緒に保持され、他の鎖に由来するCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。少なくとも2つのCDRを決定するための技法が存在する：(1) 種間の配列変化に基づくアプローチ(すなわち、Kabata et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, National Institutes of Health, Bethesda Md.)、及び(2) 抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ(Al Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948)。さらに、当該技術分野ではこれら2つの方法の組み合わせを用いてCDRを決定することもある。

【0074】

抗体は、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる重鎖定常ドメインの識別性に基づいて、5つの主な免疫グロブリンクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、またはそれらのサブクラス(アイソタイプ)(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)のいずれかであり得、好ましいCD39抗体は、FcγRIIIに最も効果的に関与するためのIgG1及びIgG3アイソタイプである(すなわち、Kdが10⁻⁷以下である)。

【0075】

特定の実施形態では、抗体は「低フコシル化」されており、「脱フコシル化」されていてもよい。「低フコシル化」抗体調製物は、オリゴ糖鎖の50%未満がα-1, 6-フコースを含む抗体調製物を指す。典型的には、「低フコシル化」抗体調製物中にオリゴ糖鎖

の約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、または5%未満または1%未満には、a-1, 6フコースが含まれる。「脱フコシル化」抗体は、IgG重鎖のCH2ドメインに結合した炭水化物中にa-1, 6-フコシルを欠く。

【0076】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す抗体、またはすべての抗体が特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す抗体の組成物を指す。典型的には、このようなモノクローナル抗体は、単一の細胞または抗体をコードする核酸に由来し、いかなる配列の改変も意図的に導入することなく増殖する。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変及び任意選択の定常領域を有するモノクローナル抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、例えば、トランスジェニックまたはトランス染色体非ヒト動物（例えば、ヒトの重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウス）から得られたB細胞を不死化細胞へ融合することによって得られるハイブリドーマによって産生される。

10

【0077】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト配列を含む特定の免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそれらの断片である非ヒト（例えば、マウス）抗体の形態を指す。典型的には、ヒト化抗体は、CDRの残基が、所望の特異性、親和性及び／または結合能を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはハムスター）のCDRに由来する残基によって置き換えられるヒト免疫グロブリンである。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域の残基は、非ヒト種由来の抗体おける対応する残基で置き換えられる。ヒト化抗体を、Fvフレームワーク領域での及び／または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかでのさらなる残基の置換によってさらに改変し、抗体の特異性、親和性、及び／または結合能を改善し、最適化することができる。ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDRのすべてまたは実質的にすべてを含む可変ドメインを含んでもよいのに対して、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてはヒト免疫グロブリン配列のものである。いくつかの実施形態では、可変ドメインはヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域を含む。いくつかの実施形態では、可変ドメインはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域を含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）の少なくとも一部、一般的にはヒト免疫グロブリンのものを含み得る。ヒト化抗体は通常、キメラ抗体とは異なるとみなされる。

20

30

【0078】

本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生される抗体、または当該技術分野で知られている技術のいずれかを使用して作製されるヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。

【0079】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種由来である抗体を指す。通常、軽鎖と重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、及び／または結合能を有する哺乳動物の一種（例えば、マウス、ラット、ウサギ等）由来の抗体の可変領域に対応し、その定常領域は、別の種（通常はヒト）由来の抗体の配列に対して相同であり、その種での免疫応答の誘発を回避する。

40

【0080】

「Fc受容体」または「FcR」は、免疫グロブリンのFc領域に結合する受容体である。IgG抗体に結合するFcRは、対立遺伝子バリエーション及びこれらの受容体の選択的スプライシング形態など、FcγRファミリーの受容体を含む。FcγRファミリーは、3つの活性化受容体（マウスではFcγRI、FcγRII、及びFcγRIII、ヒトではFcγRI、FcγRII、及びFcγRIII）と、1つの阻害性（FcγRIIB）受容体とからなる。

50

【0081】

「FcγRIII結合部分」は、抗CD39抗体の抗原結合部位と会合したときに、FcγRIII(CD16)に結合し、任意選択で抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び/または抗体依存性細胞食作用(ADCP)を媒介することができるペプチド、タンパク質、核酸または他の部分である。IgG1及びIgG3のアイソタイプのCH2及びCH3のドメインを含む重鎖Fc断片は、FcγRIII結合部分である。

【0082】

「エピトープ」及び「抗原決定基」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、特定の抗体によって認識され特異的に結合されることが可能な抗原の部分を目指す。抗原がポリペプチドの場合、エピトープは、連続アミノ酸とタンパク質の三次フォールディングによって並置された非連続アミノ酸の両方から形成し得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープ(線形エピトープとも呼ばれる)は、典型的には、タンパク質変性の際に保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープ(立体構造エピトープとも呼ばれる)は、典型的には、タンパク質変性の際に失われる。エピトープは典型的には、固有の空間構造にて少なくとも3、さらに通常は少なくとも5、6、7または8~10のアミノ酸を含む。

【0083】

本明細書で使用する時、「~に特異的に結合する」または「~に特異的」という用語は、標的と抗体との間の結合などの、測定可能かつ再現性のある相互作用を指し、これは、生物学的分子を含む分子の異種集団の存在下での、標的の存在を判定する。例えば、標的(エピトープであり得る)に特異的に結合する抗体は、それが他の標的に結合するよりも、この標的に、より高い親和性で、より強い結合活性で、より容易に、及び/またはより長時間結合する抗体部分である。一実施形態では、抗体が無関係の標的に結合する程度は、例えば、放射免疫測定法(RIA)によって測定される場合、抗体の標的への結合の約10%未満である。特定の実施形態では、標的に特異的に結合する抗体は、1μM以下、100nM以下、10nM以下、1nM以下、またはさらには0.1nM以下の解離定数(Kd)を有する。特定の実施形態では、抗体は、異なる種由来のタンパク質間で保存されるタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態では、特異的結合は、排他的結合を含み得るが、それを必要としない。

【0084】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では、交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマー及び指す。ポリマーは、直鎖状または分枝状であってよく、修飾アミノ酸を含み得、そして非アミノ酸により中断されていてもよい。この用語は、天然にまたは介入によって修飾されたアミノ酸ポリマーも包含し、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作または修飾を包含する。この定義に同様に含まれるのは、例えば、アミノ酸(例えば、非天然アミノ酸を含む)の1つ以上の類似体を含むポリペプチド、及び当該技術分野で既知の他の修飾である。本発明に包含されるポリペプチドは、抗体または免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバーに基づく可能性があるため、特定の実施形態では、ポリペプチドは、一本鎖または結合鎖として生じ得ることが理解される。

【0085】

2つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「同一」または「同一性」パーセントという用語は、配列同一性の一部としていずれかの保存的アミノ酸置換を考慮せずに、最大の対応のために比較及び整列された場合(必要に応じてギャップを導入)に、同一であるか、または同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する2つ以上の配列またはサブ配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアまたはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定できる。アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用されてもよい種々のアルゴリズム及びソフトウェアは当該技術分野で周知である。これらには、BLAST、ALIGN、

10

20

30

40

50

MegaAlign、BestFit、GCG Wisconsin Package、及びそれらの変形が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明に包含される2つの核酸またはポリペプチドは、実質的に同一であり、これは、配列比較アルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定された場合、最大に対応させるために比較し、アラインしたとき、それらが少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、及びいくつかの実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一性を有することを意味する。いくつかの実施形態では、同一性は、少なくとも約10残基、少なくとも約20残基、少なくとも約40~60残基、少なくとも約60~80残基の長さ、またはその間での任意の整数値であるアミノ酸配列の領域にわたって存在する。いくつかの実施形態では、同一性は、少なくとも約80~100残基のような60~80残基よりも長い領域にわたって存在し、いくつかの実施形態では、配列は標的タンパク質または抗体のコード領域のような比較される配列の完全長にわたって実質的に同一である。いくつかの実施形態では、同一性は、少なくとも約10塩基、少なくとも約20塩基、少なくとも約40~60塩基、少なくとも約60~80塩基の長さ、またはその間での任意の整数値であるヌクレオチド配列の領域にわたって存在する。いくつかの実施形態では、同一性は、少なくとも約80~1000塩基またはそれ以上のような60~80塩基よりも長い領域にわたって存在し、いくつかの実施形態では、配列は目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列のような比較される配列の完全長にわたって実質的に同一である。

10

20

【0086】

「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置き換えられている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において一般に定義され、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、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（例えば、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）、β分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。例えば、チロシンをフェニルアラニンに置換することは、保存的置換である。一般に、本発明に包含されるポリペプチド、可溶性タンパク質、及び／または抗体の配列における保存的置換は、そのアミノ酸配列を含むポリペプチド、可溶性タンパク質、または抗体の標的結合部位への結合を無効にしない。結合を排除しないアミノ酸の保存的置換を同定する方法は当該技術分野で周知である。

30

【0087】

「単離された」ポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、天然には見られない形態のポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物には、もはやそれらが天然に見られる形態ではない程度まで精製されたものが含まれる。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。

40

【0088】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋」という用語は、少なくとも50%純粋（すなわち、汚染物質を含まない）、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%である物質を指す。

【0089】

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」または「融合ポリペプチド」という用語は、少なくとも2つの遺伝子のヌクレオチド配列を含む核酸分子によって発現されるハイブリッドタンパク質を指す。

50

【0090】

本明細書で使用される場合、「リンカー」または「リンカー領域」という用語は、第1のポリペプチド（例えば、抗CD39抗体）と第2のポリペプチド（例えば、Fcまたは他のFcγRIII結合部分；異なるタンパク質に結合して、CD39の二価性を維持する二重特異性抗体フォーマットを作製するscFv、Vhhドメインなど）との間に挿入されるリンカーを指す。いくつかの実施形態では、リンカーはペプチドリナーである。リンカーは、ポリペプチドの発現、分泌、または生物活性に悪影響を及ぼしてはならない。好ましくは、リンカーは抗原性ではなく、免疫応答を誘発しない。

【0091】

b. 治療

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、治療的または予防的な利益をもたらすための量を指す。

【0092】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、臨床疾患の進行過程を変えるための個人による行為を指し、臨床病理の経過を変えるための予防的または介入的であってよい。この用語には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、あらゆる疾患の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、疾患の軽減または寛解、予後の改善のための治療が含まれるが、これらに限定されない。

【0093】

「対象」という用語は、特定の治療を受けることになる、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯類などを含むがこれらに限定されない任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。典型的には、「対象」及び「患者」という用語は、本明細書では、例えば、ヒト対象を参照して交換可能に使用される。

【0094】

本明細書で使用される場合、「アゴニスト」及び「アゴニストの」という用語は、直接的または間接的に、標的及び／または経路の生物学的活性を実質的に誘導、活性化、促進、増加、または増強することができる治療部分を指すかまたは治療部分を記載する。「アゴニスト」という用語は、本明細書では、目的のタンパク質または他の標的の活性を、部分的または完全に誘導、活性化、促進、増加、または増強する任意の薬剤を含むために使用される。

【0095】

本明細書で使用される場合、「アンタゴニスト」及び「アンタゴニストの」という用語は、直接的または間接的に、標的及び／または経路の生物学的活性を、部分的または完全に遮断、阻害、減少、または中和することができる治療部分を指すかまたはそのような治療部分を記載する。「アンタゴニスト」という用語は、本明細書では、目的のタンパク質または他の標的の活性を部分的または完全に遮断、阻害、減少、または中和する任意の薬剤を含むために使用される。

【0096】

本明細書で使用される場合、「調節」及び「調節する」という用語は、生物学的活性の変化または改変を指す。調節には、活性を刺激することまたは活性を阻害することが含まれるが、これらに限定されない。調節は、活性の増加もしくは活性の減少、結合特性の変化、または目的のタンパク質、経路、系、もしくは他の生物学的標的の活性に関連する生物学的、機能的、または免疫学的特性の任意の他の変化であり得る。

【0097】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」という用語には、自然免疫系と適応免疫系の両方からの応答が含まれる。これには、細胞媒介性及び／または体液性免疫応答の両方が含まれる。これには、T細胞とB細胞の両方の応答、ならびにナチュラルキラー（NK）細胞、単球、マクロファージなど、免疫系の他の細胞からの応答が含まれる。

【0098】

「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制当局によって承認

10

20

30

40

50

されるもしくは承認可能であるか、またはヒトを含む動物で使用するために米国薬局方または他の一般的に認められている薬局方に記載されている物質を指す。

【0099】

用語「薬学的に許容される賦形剤、担体またはアジュバント」または「許容される医薬担体」は、本開示の少なくとも1つの薬剤と共に、対象に投与することができ、かつ治療効果を送達するのに十分な用量で投与された場合に、その薬理活性が損なわれず、かつ非毒性である賦形剤、担体、またはアジュバントを指す。一般に、当業者及び米国FADは、薬学的に許容される賦形剤、担体、またはアジュバントを、任意の製剤の不活性成分であるとみなしている。

【0100】

「有効量」または「治療有効量」または「治療効果」という用語は、哺乳動物などの対象における疾患または障害を「治療する」のに有効な抗CD39抗体の量を指す。

【0101】

「治療すること」または「治療」または「治療するため」または「軽減すること」または「軽減するため」という用語は、(1) 診断された病的状態または障害を治癒させる、減速させる、症状を軽減させる、及び／または進行を停止させる治療措置と、(2) 標的となる病的状態または障害の発症を予防または減速させる予防的または防止的措置との両方を指す。したがって、治療が必要なものとしては、障害を既に有するもの、ならびに障害を有する傾向にあるもの、及び障害を予防する必要があるものが挙げられる。

【0102】

c. その他

本明細書で「含むこと (comprising)」という文言で実施形態が記載されている場合は常に、「からなる (consisting of)」及び／または「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語で記載されている類似の実施形態も提供されていることを理解されたい。実施形態が「本質的からなる (consisting essentially of)」という文言を用いて本明細書に記載されている場合は常に、そうでなければ「からなる (consisting of)」という用語で記載されている類似の実施形態もまた提供されることも理解される。

【0103】

本明細書で使用される場合、値またはパラメータの「約」または「およそ」への言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（及び記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は、「X」の記載を含む。

【0104】

したがって、本明細書で「A及び／またはB」などの語句で使用される「及び／または」という用語は、「AとBの両方」、「AまたはB」、「A」（単独）、及び「B」（単独）が含まれることが意図される。同様に、「A、B、及び／またはC」などの語句で使用される「及び／または」という用語は、次の実施形態のそれぞれを包含することを意図する：A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

【0105】

III. 抗CD39抗体

a. モノクローナル抗体

本発明の方法及び医薬製剤において有用な抗CD39抗体は、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495によって記載されるものなどのハイブリドーマ法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、典型的には、免疫化剤により免疫されて、免疫化剤に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生できるリンパ球を誘発する。代替的に、リンパ球をインビトロで免疫化できる。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体、例えば、ウサギモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体は、単一B細胞クローニング技術、例えば、Rashidian and Lloyd, 2020, Methods Mol. Biol. 2070: 423-441に記載される技術を使用して産生でき、その内容は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0106】

免疫化剤は、典型的に、CD39ポリペプチドまたはその融合タンパク質を含む。一般に、ヒト由来細胞が望まれる場合は末梢血リンパ球（「PBL」）を使用するか、または、非ヒト哺乳類源が望まれる場合は脾臓細胞若しくはリンパ節細胞を使用する。次いで、ポリエチレングリコールなどの適した融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103）。不死化細胞株は、通常は、形質転換された哺乳類細胞、特に、げっ歯類、ウシ及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株が用いられる。ハイブリドーマ細胞を、好ましくは、未融合の不死化細胞の増殖または生存を阻害する1種または2種以上の物質を含む適切な培養培地中に、播種し、増殖することができる。例えば、親の細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培地は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を防ぐ物質である、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含む（「HAT培地」）。

【0107】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支持し、HAT培地などの培地に感受性であるものである。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髓腫株であり、それらは例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. and the American Type Culture Collection, Manassas, Va. から入手可能である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている（Kozbor et al., 1984, J. Immunol. 133: 3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63）。

【0108】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、続いて、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイできる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降法により、または、ラジオイムノアッセイ（RIA）若しくは酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などのインビトロ結合アッセイによって決定する。このような技術及びアッセイは、当業者に即知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, 1980, Anal. Biochem. 107: 220のスキチャード解析によって決定することができる。

【0109】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、限界希釈手順によってクローンをサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる（Goding、前出）。この目的のために好適な培地として、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が挙げられる。代替的に、ハイブリドーマ細胞を哺乳類中の腹水としてインビボで増殖させることもできる。

【0110】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養

培地または腹水から単離または精製することができる。

【0111】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されるものなどの組み換えDNA法により作製されてもよい。本発明に包括されるモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定され得る。本発明に包含されるハイブリドーマ細胞は、こうしたDNAの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、DNAは、発現ベクター中に置かれてもよく、次にシミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされ、組み換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、同種マウス配列の代わりにヒト重鎖定常ドメイン及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより（米国特許第4,816,567；Morrisson et al.、前出）、または免疫グロブリンコード配列を非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてまたは一部に共有結合することにより、改変することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明に包含される抗体の定常ドメインと置換され得るか、またはキメラ二価抗体を創出するために、本発明に包含される抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインと置換され得る。

10

【0112】

b. ヒト抗体及びヒト化抗体

20

本発明に包含される抗CD39抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含み得る。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体のその他の抗原結合サブ配列）である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDR由来の残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が含まれる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、移入されたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み得、すべてまたは実質的にすべてのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのものと一致し、すべてまたは実質的にすべてのFR領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にヒト免疫グロブリンの定常領域も含む（Jones et al.、1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al.、1988, Nature 332:323-329; and Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596）。

30

【0113】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野に周知されている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からこの抗体に導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば、「移入（import）」残基と呼ばれ、典型的には「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、げっ歯類のCDRまたはCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列に置換することによって、Winterと同僚の方法（Jones et al.、1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al.、1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al.、1988, Science 239:1534-1536）に従って基本的な実施できる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている、キメラ抗体である（米国特許第4,816,567号）。実際に、ヒ

40

50

ト化抗体は、典型的にはヒト抗体であり、いくつかのCDR残基と、可能性のあるいくつかのFR残基が、げっ歯類の抗体の類似部位からの残基によって置換されている。

【0114】

またヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーなど、当該技術分野において既知のさまざまな技法を使用して産生され得る (Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581), and yeast display (Chao et al., 2006, Nat. Protoc. 1(2):755-68)。Coleら及びBoernerらの技法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に使用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77 (1985) and Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147(1):86-95)。同様に、ヒト抗体は、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されている、トランスジェニック動物、例えば、マウスへのヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入によって作製できる。誘発時、遺伝子再配列、集合、及び抗体レパートリーなどのすべての点において、ヒトで見られるものとよく似たヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号；及び以下の科学出版物：Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783; Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-859; Morrison, 1994, Nature 368:812-13; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology 14:845-51; Neuberger, 1996, Nature Biotechnology 14:826; Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93に記載されている。

10

20

【0115】

抗体はまた、上記のような既知の選択及び／または変異導入法を使用して、親和性成熟され得る。好ましい親和性成熟抗体は、成熟抗体が調製される出発抗体（一般にマウス、ヒト化、もしくはヒト）よりも5倍、より好ましくは10倍、さらにより好ましくは20または30倍優れた親和性を有する。

30

【0116】

c. 二重特異性抗体

本明細書に記載の抗CD39抗体には、二重特異性分子が含まれる。抗CD39抗体またはその抗原結合部分は、誘導体化されるか、または別の機能性分子、例えば、別のペプチドもしくはタンパク質（例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド）に連結されて、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を生成し得る。本明細書に記載の抗体は、実際には、誘導体化されるか、または2つ以上の他の機能的分子に連結されて、2つ以上の異なる結合部位及び／または標的分子に結合する多重特異性分子を生成し得る。そのような多重特異性分子はまた、本明細書で使用される場合、「二重特異性分子」という用語に包含されることを意図している。本明細書に記載の二重特異性分子を創出するために、本明細書に記載の抗体は、別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣体などの1つ以上の他の結合分子に機能的に連結することができ（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合による会合またはその他によって）、これにより、二重特異性分子がもたらされる。

40

【0117】

したがって、本明細書で提供されるのは、CD39に対する少なくとも1つの第1の結合特異性と第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性とを含む二重特異性分子である。二重特異性分子が多重特異性である本明細書に記載の実施形態では、分子は、第3の結合特異性をさらに含むことができる。

50

【0118】

特定の実施形態では、本発明は、CD39と、Siglec-8、IL-5R α (CD125)、IL-3R α (CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2 (IL-33R)、PIRA、PIRB、L-セレクトリン、EMR1、CCR3 (CD193)、及びCRTh2 (CD294) から選択される好酸球細胞表面抗原との両方に結合し、好ましくは、ADCC媒介性殺傷及び／またはADCP媒介性殺傷によって、または好酸球によって優先的に取り込まれ、好酸球に対して毒性がある抗体-薬物コンジュゲートの形態で、好酸球枯渇を引き起こす二重特異性抗体を提供する。

【0119】

他の実施形態では、二重特異性は、両方ともが好酸球上に発現して選択性をもたらす、異なる抗原 (CD39と第二の抗原) に対する二重特異性抗体の親和性を有する、活性化好酸球 (または病変に見出される好酸球) 上で上方制御される抗原に対する結合ドメインを用いて生成される。本発明のCD39バインダーを使用して二重特異性を生成するための例示的な抗原としては、CD3、CD4、 $\gamma\delta$ TCR、CD9、CD28、CD29、CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63 (リソソーム結合膜タンパク質3)、CD66b (CEACAM8)、CD66e (CEACAM5)、CD67、CD69、CD80、CD86、C5 α R (CD88)、CD101、CD122、CD137 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9、リンパ球活性化によって誘導される、4-1BB)、CD274 (プログラム死リガンド1)、 α ITbインテグリン (CD41)、 α 2インテグリン (CD49b)、 α 4インテグリン (CD49d)、 α Lインテグリン (CD11a)、 α Mインテグリン (CD11b)、 α Xインテグリン (CD11c)、 α Dインテグリン、 β 2インテグリン (CD18)、アミノペプチダーゼN (CD13)、Fc α RI (CD89)、Fc γ RIII (CD16)、Fc γ RII (CD32)、Fc ϵ RII (CD23)、顆粒球単球コロニー刺激因子R α (CD116)、HLA-DR、細胞間接着分子-1 (CD54)、インターロイキン (IL)-2R α (CD25)、IL-17RA、IL-17RB、ガレクチン-3、ニューロペプチドS受容体、P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1 (CD162)、セマフォリン7A (CD108)、胸腺間質性リンパ球新生因子タンパク質受容体 (TSLPR)、活性化 α Mインテグリン、活性化 β 1インテグリン (CD29)、活性化 β 2インテグリン、活性化Fc γ RII、及び活性化CRTh2 (CD294) が挙げられる。このような二重特異性は、好酸球に結合し、好ましくは、ADCC媒介性殺傷及び／またはADCP媒介性殺傷によって、または好酸球によって優先的に取り込まれ、好酸球に対して毒性がある抗体-薬物コンジュゲートの形態で、好酸球枯渇を引き起こす。

【0120】

一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性分子は、結合特異性として、少なくとも1つの抗体または、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、または一本鎖Fvを含むその抗体断片を含む。抗体はまた、軽鎖もしくは重鎖の二量体、またはFvもしくは一本鎖(scFv)構築物など、それらの任意の最小断片であり得る。

【0121】

二重特異性分子のそれらの特異的標的への結合は、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS解析、バイオアッセイ (例えば、増殖阻害)、またはウエスタンブロットアッセイなど、当該技術分野で認識されている方法を使用して確認され得る。これらのアッセイのそれぞれは、一般に、目的の複合体に対して特異的である標識試薬 (例えば、抗体) を使用することによって、特定の目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。

【0122】

二重特異性抗体の作製方法は、当該技術分野で公知である。伝統的に、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの重鎖が異なる特異性を持つ2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく (Milstein and Cuello, 1983, Nature 305: 537-539)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の無作為の組み合わせにより、

10

20

30

40

50

これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生成し、そのうちの1つだけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は通常、アフィニティークロマトグラフィーのステップで達成される。同様の手技が、1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTraunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659に開示されている。

【0123】

所望の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。好ましくは、ヒンジ、CH2、及びCH3領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。融合のうちの少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む、第1の重鎖定常領域（CH1）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合、及び必要に応じて、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクターに挿入され、適切な宿主生物に共トランスフェクトされる。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210を参照されたい。

【0124】

WO96/27011に記載される別の手法に従い、一对の抗体分子間の界面を、組み換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大化するように改変し得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換えられる。大きい側鎖（複数可）と同一または類似のサイズの代償「空洞」は、大きいアミノ酸側鎖を小さいもの（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置き換えることにより、第2の抗体分子の界面に作成される。これは、ホモ二量体などの他の不要な最終産物よりもヘテロ二量体の収量を増やすためのメカニズムを提供する。

【0125】

二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片として調製できる（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）。二重特異性抗体を抗体断片から生成するための技法は、文献において記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennan et al., 1985, Science 229:81は、インタクトな抗体がタンパク質分解により切断されてF(ab')₂断片を生成する手順について記載している。これらの断片は、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元され、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防ぐ。次いで、生成されたFab'断片は、チオニトロベンゾエート（TNB）誘導体に変換される。次いで、Fab'-TNB誘導体のうちの1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によりFab'-チオールに再変換され、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合されて二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化用の薬剤として使用され得る。

【0126】

Fab'断片はE. coliから直接回収でき、化学的に結合して二重特異性抗体を形成できる。Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225は、完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生について記載している。それぞれのFab'断片は、E. coliから別個に分泌され、インビトロでの指向性化学的カップリングに供されて、二重特異性抗体が形成された。

【0127】

二重特異性抗体断片を組み換え細胞培養物から直接作製及び単離するためのさまざまな技術についても記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている（Kostelný et al., 1992, J. Immunol. 148(5):1547-1553）。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合により2つの異なる抗体のFab'部分に連結された。抗体ホ

モノ量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成し、次いで、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生にも利用され得る。Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448により記載される「ダイアボディ」技法は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的メカニズムを提供している。断片は、同一の鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(V_L)に接続された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。したがって、1つの断片のV_H及びV_Lドメインは、別の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと対になることを強いられ、それにより2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)二量体を使用して二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368を参照されたい。

10

【0128】

2を超える価数を有する抗体が企図される。1つの非限定例として、三重特異性抗体が調製され得る。例えば、Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60を参照されたい。

【0129】

d. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合した2つの抗体からなる。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を望まない細胞に標的化する(米国特許第4,676,980号を参照されたい)ため、及びHIV感染の治療のために(WO91/00360; WO92/200373; EP03089)提案されている。抗体は、架橋剤を含むものを含む合成タンパク質化学における既知の方法を使用してインビトロで調製できると考えられる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって構築することができる。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

20

【0130】

e. エフェクター機能操作

例えば、好酸球を枯渇させることにおける抗CD39抗体の有効性をさらに増強するように、エフェクター機能に関して本発明に包含される抗体を改変することが望ましい場合がある。例えば、システイン残基(複数可)をFc領域に導入することができ、それにより、この領域での鎖間ジスルフィド結合の形成が可能になる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力、改善された補体媒介性細胞殺傷、改善された抗体依存性細胞傷害(ADCC)、及びまたは改善された抗体依存性細胞食作用(ADCP)を有し得る。Caron et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195 and Shopes, 1992, J. Immunol., 148:2918-2922を参照されたい。

30

【0131】

f. 代表的な抗CD39抗体配列

40

【表 1】

特定の実施形態では、抗CD39抗体は、ヒト抗体ライブラリから生成されるような完全ヒト抗体である。例示的な完全ヒト抗CD39抗体は、クローPEOWT22であり、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメイン（VH及びVL）配列は、以下に提供される：

	核酸配列	アミノ酸配列
VHドメイン	配列番号1（VH）	配列番号2（VH）
VLドメイン	配列番号3（VL）	配列番号4（VL）

10

【表 2】

PEOWT22クローンでは、VH及びVLドメインのそれぞれのCDRは、次のとおりである：

	CDR 1	CDR 2	CDR 3
VH	配列番号29	配列番号30	配列番号31
VL	配列番号32	配列番号33	配列番号34

20

【表 3】

上記のVHドメイン及びVLドメインを利用する例示的な全長抗体及び例示的な一本鎖抗体（scFV）の配列は、以下に提供される：

30

	核酸配列	アミノ酸配列
全長重鎖	配列番号35	配列番号36
全長軽鎖	配列番号37	配列番号38
scFV	配列番号39	配列番号40

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、配列番号2と少なくとも60%同一であり、さらにより好ましくは、配列番号2と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、またはさらには90%同一である少なくとも1つの重鎖可変を含み、ヒトCD39に特異的に結合することができる。

40

【0132】

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、配列番号4と少なくとも60%同一であり、さらにより好ましくは、配列番号4と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、またはさらには90%同一である少なくとも1つの軽鎖可変を含み、ヒトCD39に特異的に結合することができる。

【0133】

特定の実施形態では、抗CD39抗体は、配列番号29、30、及び31に示されるVHドメインのCDRに関連するヒトフレームワーク配列を有するVHドメインと、配列番号32、33、及び34に示される対応するVLドメインのCDRとを含むヒト化抗体で

50

ある。CDRは、好ましくは同一であるが、得られる抗体がヒトCD39に特異的に結合する限り、それぞれのCDRにおいて、1、2または3のアミノ酸が異なり得る。

【0134】

特定の実施形態では、抗CD39抗体の重鎖及び軽鎖は、配列番号1（VH）及び配列番号3（VL）に示されるコード配列に同一であるか、またはストリンジェントな条件下（45℃で6倍の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、50～65℃で0.2倍のSSC／0.1%SDSで洗浄するなど）でそれらにハイブリダイズする核酸によってコードされ得る可変ドメインを有する。

【0135】

【表4-1】

10

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、ウサギにおいて生成され、これらの抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはウサギ配列であり、一方、定常ドメインは、ヒト配列である。ウサギ抗CD39抗体のVHドメイン及びVLドメインの例示的な配列は、次のとおりである：

クローン	核酸配列	アミノ酸配列	CDR配列
PEO18	配列番号5（VH） 配列番号7（VL）	配列番号6（VH） 配列番号8（VL）	配列番号6（VH） CDR CDR1：GFSLSAYG CDR2：IYSSGRT CDR3：ARSRAGISSG DGFDS 配列番号8（VL） CDR CDR1：QNIYSN CDR2：RAS CDR3：QQGFDSNID NT
PEO19	配列番号9（VH） 配列番号11（VL）	配列番号10（VH） 配列番号12（VL）	配列番号10（VH） CDR CDR1：GFSLSKSI CDR2：IGSSGST CDR3：ARGLLYSGNKS 配列番号12（VL） CDR CDR1：QSVLLNNQ CDR2：DAS CDR3：LGGYSGNLYA
PEO20	配列番号13（VH） 配列番号15（VL）	配列番号14（VH） 配列番号16（VL）	配列番号14（VH） CDR CDR1：GFSLSSEA CDR2：INSYGTT CDR3：ARGDSYGSV GLGL 配列番号16（VL） CDR CDR1：QNIYSN CDR2：RAS CDR3：QQGFSSNNVD NT

20

30

40

50

【表 4 - 2】

PEO21	配列番号17 (VH) 配列番号19 (VL)	配列番号18 (VH) 配列番号20 (VL)	配列番号18 (VH) CDR CDR1: GFSLS SYA CDR2: ISSSGST CDR3: ARDRVIYS IGPYFNL 配列番号20 (VL) CDR CDR1: EIIYSN CDR2: GAS CDR3: QQSFS SNN VGNI
PEO23	配列番号21 (VH) 配列番号23 (VL)	配列番号22 (VH) 配列番号24 (VL)	配列番号22 (VH) CDR CDR1: GFSLS THA CDR2: TYASGRT CDR3: ARNGADET FYYFDL 配列番号24 (VL) CDR CDR1: QNINTW CDR2: RAS CDR3: QQYDASIN IDNA
PEO24	配列番号25 (VH) 配列番号27 (VL)	配列番号26 (VH) 配列番号28 (VL)	配列番号26 (VH) CDR CDR1: GIDLSSNA CDR2: IRNNDIT CDR3: ARGGGSYS IVFWNL 配列番号28 (VL) CDR CDR1: ERIYSN CDR2: YAS CDR3: QQGYSNNN VDNT

10

20

30

40

50

【表 4－3】

PEO 2 5	配列番号 4 1 (VH) 配列番号 4 3 (VL)	配列番号 4 2 (VH) 配列番号 4 4 (VL)	配列番号 4 2 (VH) CDR CDR 1 : G I D L S N N A CDR 2 : I R S S G S T CDR 3 : A R G G G S Y S I V F W N L 配列番号 4 4 (VL) CDR CDR 1 : E R I Y S N CDR 2 : Y T S CDR 3 : Q Q G Y S S S N V D N T
---------	--------------------------------	--------------------------------	--

10

20

30

40

50

【表 5】

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、ウサギにおいて生成され、次いで、CDR移植によってヒト化された。ウサギ抗CD39抗体のVHドメイン及びVLドメインの例示的な配列は、次のとおりである：

クローン	核酸配列	アミノ酸配列	CDR配列
ヒト化PE O20	配列番号45 (VH) 配列番号47 (VL)	配列番号46 (VH) 配列番号48 (VL)	配列番号46 (VH) CDR CDR1:GFSLSSYA CDR2:INSYGTT CDR3:ARGDSYGSG VGLGL 配列番号48 (VL) CDR CDR1:QNIYSN CDR2:RAS CDR3:QQGFSSNNV DNT
ヒト化PE O19	配列番号49 (VH) 配列番号51 (VL)	配列番号50 (VH) 配列番号52 (VL)	配列番号50 (VH) CDR CDR1:GFSLSKSI CDR2:IGSSGST CDR3:ARGLLYSGN KS 配列番号52 (VL) CDR CDR1:QSVLLNNQ CDR2:DAS CDR3:LGGYSGNLY A
ヒト化PE O21	配列番号53 (VH) 配列番号55 (VL)	配列番号54 (VH) 配列番号56 (VL)	配列番号54 (VH) CDR CDR1:GFSLSSYA CDR2:ISSSGST CDR3:ARDRVIIYSI GPYYFNL 配列番号56 (VL) CDR CDR1:EIIYSN CDR2:GAS CDR3:QQSFSSNNV GNI

10

20

30

40

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗CD39抗体は、以下を促進する：(i) 24時間後の免疫複合体の30%未満の喪失を特徴とする、HCC1739BL細胞とインキュベートした場合の安定した免疫複合体形成（任意選択で、免疫複合体形成は、蛍光標識二次抗体を使用して、蛍光強度によって検出される）；(ii) CD39+細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び／または抗体依存性細胞食作用（ADCP）；(iii) CD39+好酸球の枯渇；(iv) 図30に列挙されたCD39アミノ酸エピトープ配列の群から選択された配列を有するCD39エピトープへの結合（例えば、1) IYLTDCMERAR、2) LRMESEELADR、3) RVKGP GISKFV、4) DCMERAREV IPR、5) LTDCMERAREV IPR、6) SLSN

50

10

20

30

40

50

50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

配列番号3 (クローンPEOWT22 vLドメイン核酸配列)

gat gtt gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tac 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144 10

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gtc agg ttc agt ggc 192

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cca 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agg tca cct cgg 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg 20

85 90 95

acg ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 321

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

配列番号4 (クローンPEOWT22 vLドメインアミノ酸配列)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 30

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

配列番号5 (クローンPEO18 vHドメイン核酸配列)

cag tca gtg aag gag gcc ggg ggt cgc ctg gta acg cct gga gga tcc 48

Gln Ser Val Lys Glu Ala Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser

1 5 10 15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt gcg tat gga 96

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Gly

20 25 30

ata agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag gga ctg gaa tgg atc gga 144

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

atc att tat agt agt ggt agg act tac tac gcg aac tgg gcg aaa ggc 192 50

Ile Ile Tyr Ser Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg tcg acc acg gtg gat ctg aaa atg 240
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
 65 70 75 80
 acc agt ctg aca acc gag gac acg gcc gcc tat ttc tgt gcc aga tca 288
 Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
 85 90 95
 cgg gct ggt att agt agt ggt gat ggt ttt gat tcc tgg ggc cca ggc 336
 Arg Ala Gly Ile Ser Ser Gly Asp Gly Phe Asp Ser Trp Gly Pro Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

配列番号6 (クローンPEO18 vHドメインアミノ酸配列)

Gln Ser Val Lys Glu Ala Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Gly
 20 25 30
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Ile Ile Tyr Ser Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
 65 70 75 80
 Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
 85 90 95
 Arg Ala Gly Ile Ser Ser Gly Asp Gly Phe Asp Ser Trp Gly Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

配列番号7 (クローンPEO18 vLドメイン核酸配列)

gcc ctt gtg atg acc cag act cca tcc tcc gtg tct gca gct gtg gga 48
 Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt cag aac att tac agc aat 96
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc cag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 tac agg gca tcc act ctg gca tct ggg gtc cca tcg cgg ttc aaa ggc 192
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 agt gca tct ggg aca gaa tac act ctc acc atc agc ggt gtg cag tgt 240
 Ser Ala Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 gac gat gct gcc act tac tat tgt caa cag ggt ttt gat agt agt aac 288
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Asp Ser Ser Asn
 85 90 95

att gat aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aca 330
 Ile Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr

100

105

110

配列番号 8 (クローン PEO18 vLドメインアミノ酸配列)

Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly

1

5

10

15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Gln Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly

50

55

60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys

65

70

75

80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Asp Ser Ser Asn

85

90

95

Ile Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr

100

105

110

配列番号 9 (クローン PEO19 vHドメイン核酸配列)

cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca cac 48 20

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr His

1

5

10

15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt aag agt ata 96

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser Ile

20

25

30

ata agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tac atc gga 144

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly

35

40

45

atc att ggt agt agt ggt agc aca tac tac gcg aac tgg gcg aaa ggc 192

Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly 30

50

55

60

cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg tcg acc acg gtg gat ctg aga atg 240

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Met

65

70

75

80

acc agt ctg aca ccc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga gga 288

Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly

85

90

95

ctt ctt tat tct ggt aat aaa tcg tgg ggc ccg ggc acc ctg gtc acc 336

Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

gtc tcc tca

345

Val Ser Ser

115

配列番号 10 (クローン PEO19 vHドメインアミノ酸配列)

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr His

1

5

10

15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser Ile

20

25

30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly

35

40

45

10

20

30

40

50

Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Met
 65 70 75 80
 Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
 85 90 95
 Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

10

配列番号 1 1 (クローン PEO19 vLドメイン核酸配列)

gcc att gat atg acc cag act cca tcc tcc gtg tct gca gct gtg gga 48
 Ala Ile Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 ggc aca gtc acc atc aac tgc cag tcc agt cag agt gtt tta ctg aac 96
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Asn
 20 25 30
 aac caa tta tcc tgg ttt cag cag aaa cca ggg cag cct ccc aag ctc 144
 Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 ctg atc tat gat gca tcc act ctg gaa tct ggg gtc cca tct cgg ttc 192
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 aca ggc agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc gac ctg 240
 Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
 65 70 75 80
 gag tgt gac gat gct gcc act tac tat tgt tta ggc ggt tat agt ggg 288
 Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Gly
 85 90 95
 aac ctt tat gct ttc ggc gga ggg acc gag gtg cta gtc aaa 330
 Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Leu Val Lys
 100 105 110

20

30

配列番号 1 2 (クローン PEO19 vLドメインアミノ酸配列)

Ala Ile Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Asn
 20 25 30
 Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Gly
 85 90 95
 Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Leu Val Lys
 100 105 110

40

配列番号 1 3 (クローン PEO20 vHドメイン核酸配列)

cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc 48
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

50

1	5	10	15		
ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt agc tat gca	96				
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala					
20	25	30			
ata agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctc gaa tat atc gcg	144				
Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Ala					
35	40	45			
atc att aat agt tat ggt acc aca tac tac gcg agc tgg gcg aaa ggc	192				
Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly					
50	55	60			10
cga gtc acc atc tcc aaa acc tcg agc acg gtg gat ctg aaa atc tcc	240				
Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser					
65	70	75	80		
agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga ggc gat	288				
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp					
85	90	95			
agt tat ggt agt ggt gtt ggt ttg ggc ttg tgg ggc cca ggc acc ctg	336				
Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu					
100	105	110			
gtc acc gtc tcc tca	351				20
Val Thr Val Ser Ser					
115					
配列番号 14 (クローン PEO20 vHドメインアミノ酸配列)					
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro					
1	5	10	15		
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala					
20	25	30			
Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Ala					
35	40	45			
Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly					30
50	55	60			
Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser					
65	70	75	80		
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp					
85	90	95			
Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu					
100	105	110			
Val Thr Val Ser Ser					
115					
配列番号 15 (クローン PEO20 vLドメイン核酸配列)					
gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tct gtg gag gta gct gtg gga	48				40
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly					
1	5	10	15		
ggc aca gtc acc atc aag tgc cag gcc agt cag aac att tac agc aat	96				
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn					
20	25	30			
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc aag ctc ctg atc	144				
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile					
35	40	45			
tac agg gca tcc agt ctg gca tct ggg gtc ccg tcg cgg ttc agt ggc	192				50

Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc agc ggt gtg cag tgt 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 gac gat gct gcc act tac tac tgt caa cag ggt ttt agt agt aat aat 288
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn Asn
 85 90 95
 gtt gat aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa 330
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys 10
 100 105 110
 配列番号16 (クローンPEO20 vLドメインアミノ酸配列)
 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60 20
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn Asn
 85 90 95
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 配列番号17 (クローンPEO21 vHドメイン核酸配列)
 cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc 48
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15 30
 ctg aca ctc acc tgc acc gtc tcc gga ttc tcc ctc agt agc tat gca 96
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tac atc gga 144
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45
 atc att agt agt agt ggt agc aca tac tac gcg agc tgg gcg aaa ggc 192
 Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg aaa atc tcc 240 40
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga gat cgt 288
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg
 85 90 95
 gtt att tat agt att ggt ccg tat tat ttt aat ttg tgg ggc cca ggc 336
 Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 50

115

配列番号18 (クローンPEO21 vHドメインアミノ酸配列)

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45
 Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg
 85 90 95
 Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

115

配列番号19 (クローンPEO21 vLドメイン核酸配列)

gcc tat gat atg acc cag act cca tcc tcc gtg tct gca act gtg gga 48 20
 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Thr Val Gly
 1 5 10 15
 ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt gag atc att tat agc aat 96
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cct ccc aag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat ggc gca tcc act ctg gca tct ggg gtc cca tcg cgg ttc aaa ggc 192
 Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gag tac act ctc acc atc agc gac ctg cag tgt 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Gln Cys
 65 70 75 80
 gac gat gct gcc act tac tac tgt caa cag agt ttt agt agt aat aat 288
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn Asn
 85 90 95
 gtt ggg aat att ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa 330
 Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

40

配列番号20 (クローンPEO21 vLドメインアミノ酸配列)

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Thr Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Gln Cys

50

65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn Asn
 85 90 95
 Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 配列番号 2 1 (クローン P E O 2 3 v H ドメイン 核酸配列)
 cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc 48
 Gln Ser Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 ctg aca ctc acc tgc aca gcc tct gga ttc tcc ctc agt acc cat gca 96 10
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr His Ala
 20 25 30
 ata aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tgg atc ggg 144
 Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 atc act tat gct agt ggt agg aca tat tac gcg agc tgg gcg aaa ggc 192
 Ile Thr Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg aaa atc acc 240
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr 20
 65 70 75 80
 agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga aat ggg 288
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Gly
 85 90 95
 gct gat gaa aca ttt tac tac ttt gac ttg tgg ggc cca ggc acc ctg 336
 Ala Asp Glu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 gtc acc gtc tcc tca 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115 30
 配列番号 2 2 (クローン P E O 2 3 v H ドメイン アミノ酸配列)
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr His Ala
 20 25 30
 Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Ile Thr Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr 40
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Gly
 85 90 95
 Ala Asp Glu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 配列番号 2 3 (クローン P E O 2 3 v L ドメイン 核酸配列)
 gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tcc gtg gag gca gct gtg gga 48
 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly 50

1	5	10	15	
ggc aca gtc acc atc aag tgc cag gcc agt cag aat att aat act tgg	96			
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Thr Trp				
20	25	30		
tta tcc tgg tat cag cag aag gca ggg cag cct ccc aag ctc ctg atc	144			
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile				
35	40	45		
tac agg gca tcc act ctg gca tct ggg gtc tca tcg cgg ttc aaa ggc	192			
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly				
50	55	60		10
agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc ggc gtg gag tgt	240			
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys				
65	70	75	80	
gcc gat gct gcc act tac tac tgt caa caa tat gat gct agt att aat	288			
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ala Ser Ile Asn				
85	90	95		
att gat aat gct ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa	330			
Ile Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys				
100	105	110		
配列番号 24 (クローン PEO23 vLドメインアミノ酸配列)				20
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly				
1	5	10	15	
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Thr Trp				
20	25	30		
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile				
35	40	45		
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly				
50	55	60		
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys				
65	70	75	80	30
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ala Ser Ile Asn				
85	90	95		
Ile Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys				
100	105	110		
配列番号 25 (クローン PEO24 vHドメイン核酸配列)				
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc	48			
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro				
1	5	10	15	
ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga atc gac ctc agt agc aat gca	96			
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala				40
20	25	30		
atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tat atc gga	144			
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly				
35	40	45		
att att agg aat aat gat atc aca tac tac gcg agc tgg gcg aaa ggc	192			
Ile Ile Arg Asn Asn Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly				
50	55	60		
cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg ata atc acc	240			
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr				
65	70	75	80	50

agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga ggg ggt 288
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
 85 90 95
 ggt tct tac agt att gtc ttc tgg aac tta tgg ggc cca ggc acc ctg 336
 Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 gtc acc gtc tcc tca 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115

配列番号 26 (クローン PEO24 vHドメインアミノ酸配列)

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45
 Ile Ile Arg Asn Asn Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

配列番号 27 (クローン PEO24 vLドメイン核酸配列)

gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tct gtg gag gta gct gtg gga 48
 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15
 ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt gag agg att tat agc aat 96
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc aaa ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat tat gca tcc act ctg gca tct ggg gtc tca tcg cgg ttc aaa ggc 192
 Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc ggc gtg cag tgt 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 gcc gat gct gcc act tac tac tgt cag cag ggt tat agt aat aat aat 288
 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Asn Asn Asn
 85 90 95
 gtt gac aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aga 330
 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
 100 105 110

配列番号 28 (クローン PEO24 vLドメインアミノ酸配列)

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly

1	5	10	15	
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn				
20	25	30		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile				
35	40	45		
Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly				
50	55	60		
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys				
65	70	75	80	
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Asn Asn Asn				10
85	90	95		
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg				
100	105	110		
配列番号 29 (クローン P E O W T 2 2 v H ドメイン C D R 1 アミノ酸配列)				
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala				
1	5			
配列番号 30 (クローン P E O W T 2 2 v H ドメイン C D R 2 アミノ酸配列)				
Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys				
1	5			
配列番号 31 (クローン P E O W T 2 2 v H ドメイン C D R 3 アミノ酸配列)				
Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val				20
1	5	10		
配列番号 32 (クローン P E O W T 2 2 v L ドメイン C D R 1 アミノ酸配列)				
Gln Ser Ile Ser Arg Tyr				
1	5			
配列番号 33 (クローン P E O W T 2 2 v L ドメイン C D R 2 アミノ酸配列)				
Asp Ala Ser				
1				
配列番号 34 (クローン P E O W T 2 2 v L ドメイン C D R 3 アミノ酸配列)				
Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg Thr				30
1	5			
配列番号 35 (クローン P E O W T 2 2 全長 v H 鎖核酸配列)				
gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta agg cct ggg ggg				48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly				
1	5	10	15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat				96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr				
20	25	30		
gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg				144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				40
35	40	45		
gca gtt ata tca tat gat gta agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg				192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val				
50	55	60		
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat				240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
65	70	75	80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt				288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
85	90	95		50

gcg aga tct tac tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg	336	
Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		
100 105 110		
acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc act aag ggc cca tcc gtg ttc	384	
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115 120 125		
cca ctg gca ccc tct agt aag agc aca tct ggg ggt act gcc gct ctg	432	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130 135 140		
gga tgt ctg gtg aag gat tac ttc cca gag cca gtc acc gtg tcc tgg	480	10
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145 150 155 160		
aac agc ggg gcc ctg act tcc ggt gtc cat acc ttt cca gct gtg ctg	528	
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165 170 175		
cag tca tcc ggc ctg tac agc ctg agc tct gtg gtc acc gtc ccc agt	576	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180 185 190		
tca tcc ctg gga aca cag act tat atc tgc aac gtg aat cac aag cca	624	20
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195 200 205		
tcc aat aca aaa gtc gac aag aaa gtg gaa ccc aag agc tgt gat aaa	672	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210 215 220		
acc cat aca tgc ccc cct tgt cct gct cca gag ctg ctg gga gga cca	720	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225 230 235 240		
tcc gtg ttc ctg ttt cca ccc aag cct aaa gac act ctg atg att tct	768	
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245 250 255		30
cga acc ccc gaa gtc aca tgc gtg gtc gtg gac gtg tcc cac gag gat	816	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260 265 270		
cct gaa gtc aag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtc gag gtg cat aat	864	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275 280 285		
gcc aag aca aaa cca cga gag gaa cag tac aac agt acc tat cgt gtc	912	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290 295 300		
gtg tca gtc ctg aca gtg ctg cac cag gac tgg ctg aac ggg aag gaa	960	40
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305 310 315 320		
tat aag tgc aaa gtg agc aat aag gca ctg ccc gcc cct atc gag aaa	1008	
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325 330 335		
aca att tct aag gct aaa gga cag cct agg gaa cca cag gtg tac act	1056	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340 345 350		
ctg cct cca tca cgg gac gag ctg aca aag aac cag gtc agt ctg act	1104	50
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		

355 360 365
 tgt ctg gtg aaa ggg ttc tat cct tct gat atc gcc gtg gag tgg gaa 1152
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 agt aat ggt cag cca gag aac aat tac aag acc aca ccc cct gtc ctg 1200
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 gac tct gat ggg agt ttc ttt ctg tat tcc aag ctg acc gtg gat aaa 1248
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 agc cgg tgg cag cag ggt aat gtc ttt agt tgt tca gtg atg cac gag 1296
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 gca ctg cac aat cac tac acc cag aaa tca ctg tca ctg tca cca ggt 1344
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

aaa tga

1350

Lys

配列番号 36 (クローン P E O W T 2 2 全長 v H 鎖 アミノ酸配列)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

10

20

30

40

50

	245	250	255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp				
260	265	270		
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn				
275	280	285		
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val				
290	295	300		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu				
305	310	315	320	
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys				10
325	330	335		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr				
340	345	350		
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr				
355	360	365		
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu				
370	375	380		
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu				
385	390	395	400	
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys				20
405	410	415		
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu				
420	425	430		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly				
435	440	445		
Lys				
配列番号 37 (クローン P E O W T 2 2 全長 v L 鎖核酸配列)				
gat gtt gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga			48	
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1 5 10 15				30
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tac			96	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr				
20 25 30				
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc			144	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile				
35 40 45				
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gtc agg ttc agt ggc			192	
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly				
50 55 60				
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cca			240	40
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro				
65 70 75 80				
gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agg tca cct cgg			288	
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg				
85 90 95				
acg ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga act gtg gct gca			336	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala				
100 105 110				
cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga			384	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly				50

115 120 125
 act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 528
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 ttc aac agg gga gag tgt tag 645
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

配列番号 38 (クローン P E O W T 2 2 全長 v L 鎖アミノ酸配列)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

配列番号 39 (クローン P E O W T 2 2 s c F v 核酸配列)

gat gtt gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

10

20

30

40

50

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tac 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gtc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly 10
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cca 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agg tca cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa ggc gga tcc tct agg 336
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Ser Arg
 100 105 110 20
 tca agt tcc agc ggc ggc ggt ggc agc gga ggc ggc ggt gag gtg caa 384
 Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln
 115 120 125
 ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta agg cct ggg ggg tcc ctg aga 432
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 130 135 140
 ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat gct atg cac 480
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
 145 150 155 160
 tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata 528 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile
 165 170 175
 tca tat gat gta agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cga 576
 Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg 624
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga tct 672
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
 210 215 220 40
 tac tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc 720
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 225 230 235 240
 acc gtc tcc tca 732
 Thr Val Ser Ser
 配列番号 40 (クローン P E O W T 2 2 s c F v アミノ酸配列)
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr 50

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Ser Arg
 100 105 110
 Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
 145 150 155 160
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile
 165 170 175
 Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
 210 215 220
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 225 230 235 240
 Thr Val Ser Ser

配列番号 41 (クローン PEO25 vHドメイン核酸配列)

cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc 48 30
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga atc gac ctc agt aac aat gca 96
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Asn Ala
 20 25 30
 atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tat atc gga 144
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45
 atc att agg agt agt ggt agt aca tat tac gcg aac tgg gca aaa ggc 192
 Ile Ile Arg Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly 40
 50 55 60
 cgg ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg ata atc acc 240
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
 65 70 75 80
 agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga ggg ggt 288
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
 85 90 95
 ggt tct tac agt att gtc ttc tgg aac ttg tgg ggc cca ggc acc ctg 336
 Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

配列番号 42 (クローン PEO25 vHドメインアミノ酸配列)

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Asn Ala
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45
Ile Ile Arg Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
65 70 75 80
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
85 90 95
Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

10

20

配列番号 43 (クローン PEO25 vLドメイン核酸配列)

gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tct gtg gag gta gct gtg gga 48
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15
ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt gag agg att tat agc aat 96
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tat tat aca tcc act ctg gca tct ggg gtc tca tcg cgg ttc aaa ggc 192
Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc ggc gtg gag tgt 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80
gcc gat gct gcc act tac tac tgt caa cag ggt tat agt agt agt aat 288
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95
gtt gac aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa ggt 333
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
100 105 110

30

40

配列番号 44 (クローン PEO25 vLドメインアミノ酸配列)

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly

50

50	55	60		
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys				
65	70	75	80	
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn				
85	90	95		
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly				
100	105	110		
配列番号 45 (ヒト化 PEO20 vHドメイン 核酸配列)				
ggc gag cag cag ctg gtg gag agc ggc gga ggc ctg gtg cag cct gga			48	
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly				10
1	5	10	15	
gga agc ctg agg ctg agc tgc gcc gtg tcc ggc ttc agc ctg agc agc			96	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser				
20	25	30		
tac gcc atc agc tgg gtg agg cag gcc ccc gga aag ggc ctg gag tac			144	
Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr				
35	40	45		
atc gcc atc atc aac agc tac ggc acc acc tac tac gcc agc tgg gcc			192	
Ile Ala Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala				20
50	55	60		
aag ggc aga gtg acc atc tcc aag gat tcc tcc aag aac acc gtg tac			240	
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr				
65	70	75	80	
ctg cag atg ggc tcc ctg aga gcc gag gat atg gcc gtg tac ttt tgc			288	
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys				
85	90	95		
gcc aga ggc gat tcc tac ggc tcc ggc gtg ggc ctg ggc ctg tgg gga			336	
Ala Arg Gly Asp Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly				
100	105	110		
cct gga acc ctg gtg aca gtg tcc tcc			363	
Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				30
115	120			
配列番号 46 (ヒト化 PEO20 vHドメイン アミノ酸配列)				
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly				
1	5	10	15	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser				
20	25	30		
Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr				
35	40	45		
Ile Ala Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala				40
50	55	60		
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr				
65	70	75	80	
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys				
85	90	95		
Ala Arg Gly Asp Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly				
100	105	110		
Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
115	120			
配列番号 47 (ヒト化 PEO20 vLドメイン 核酸配列)				

gga gac tac cag atg aca cag tcc cct agc acc ctg tcc gcc tcc gtg	48	
Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val		
1 5 10 15		
ggc gac aga gtg aca atc acc tgt cag gcc tcc cag aat atc tac agc	96	
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser		
20 25 30		
aat ctg gcc tgg tac cag cag aag cct ggc aag agg ccc aag ctg ctg	144	
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Arg Pro Lys Leu Leu		
35 40 45		
atc tac aga gcc agc tcc ctg gcc tcc ggc gtg cca tct aga ttt tcc	192	10
Ile Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser		
50 55 60		
ggc tcc ggc agc ggc aca gag ttt acc ctg aca atc agc agc ctg cag	240	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
65 70 75 80		
ccc gat gat ttc gcc acc tac tac tgt cag cag ggc ttc agc agc aat	288	
Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn		
85 90 95		
aat gtg gac aat aca ttt ggc ggc ggc aca aag gtg gag atc aag	333	
Asn Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		20
100 105 110		
配列番号 48 (ヒト化PEO20 vLドメインアミノ酸配列)		
Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val		
1 5 10 15		
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser		
20 25 30		
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Arg Pro Lys Leu Leu		
35 40 45		
Ile Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser		30
50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
65 70 75 80		
Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn		
85 90 95		
Asn Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100 105 110		
配列番号 49 (ヒト化PEO19 vHドメイン核酸配列)		
ggc gag cag cag ctg gtg gag agc ggc gga ggc ctg gtg cag cct gga	48	
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		40
1 5 10 15		
gga agc ctg agg ctg agc tgc gcc gtg tcc ggc ttt tcc ctg agc aag	96	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys		
20 25 30		
agc atc atc agc tgg gtg agg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gag tac	144	
Ser Ile Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr		
35 40 45		
atc ggc atc atc ggc agc agc ggc tcc acc tac tac gcc aac tgg gcc	192	
Ile Gly Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala		
50 55 60		
aag ggc aga ttc aca atc tcc aag gac tcc tcc aag aat acc gtg tac	240	50

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg ggc tcc ctg agg gcc gag gat atg gcc gtg tac ttt tgt 288
 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gcc aga ggc ctg ctg tac tcc ggc aat aag tcc tgg ggc ccc ggc aca 336
 Ala Arg Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110
 ctg gtg acc gtg agc tcc 354
 Leu Val Thr Val Ser Ser

10

配列番号50 (ヒト化PEO19 vHドメインアミノ酸配列)

Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys
 20 25 30
 Ser Ile Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
 35 40 45
 Ile Gly Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

20

配列番号51 (ヒト化PEO19 vLドメイン核酸配列)

ggc gac atc gtg atg acc cag tcc ccc gat tcc ctg gcc gtg tcc ctg 48
 Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 ggc gag aga gcc aca atc aat tgt cag tcc tcc cag agc gtg ctg ctg 96
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu
 20 25 30
 aac aat cag ctg tcc tgg ttc cag cag aag cct ggc cag cct ccc aag 144
 Asn Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 35 40 45
 ctg ctg atc tac gac gcc tcc aca ctg gag tcc ggc gtg ccc gat agg 192
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60
 ttc agc ggc tcc ggc agc ggc acc gac ttt acc ctg acc atc tcc agc 240
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 ctg cag gcc gag gat gtg gcc gtg tac tac tgc ctg ggc ggc tac agc 288
 Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser
 85 90 95
 ggc aac ctg tac gcc ttt ggc ggc ggc acc aag gtg gag atc aag 333
 Gly Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

30

40

50

配列番号 5 2 (ヒト化 P E O 1 9 v L ドメイン アミノ酸配列)

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu
 20 25 30
 Asn Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser
 85 90 95
 Gly Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

配列番号 5 3 (ヒト化 P E O 2 1 v H ドメイン 核酸配列)

ggc gag cag cag ctg gtg gag tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cca gga 48
 Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 gga agc ctg agg ctg tcc tgt gcc gtg agc ggc ttc tcc ctg agc tcc 96 20
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
 20 25 30
 tac gcc atg agc tgg gtg agg cag gcc ccc gga aag ggc ctg gag tac 144
 Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
 35 40 45
 atc ggc atc atc agc agc agc ggc agc aca tac tac gcc agc tgg gcc 192
 Ile Gly Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 aag ggc agg ttc aca atc agc aag gat tcc tcc aag aat aca gtg tac 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr 30
 65 70 75 80
 ctg cag atg ggc tcc ctg agg gcc gag gac atg gcc gtg tac ttc tgt 288
 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gcc aga gac agg gtc atc tat tcc atc ggc cct tac tac ttc aac ctg 336
 Ala Arg Asp Arg Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu
 100 105 110
 tgg ggc ccc ggc aca ctg gtg aca gtg tcc agc 369
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 40

配列番号 5 4 (ヒト化 P E O 2 1 v H ドメイン アミノ酸配列)

Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
 35 40 45
 Ile Gly Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr 50

65 70 75 80
 Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu
 100 105 110
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 配列番号 55 (ヒト化 PEO21 vL ドメイン 核酸配列)
 ggc gat tac cag atg aca cag tcc ccc tcc tcc ctg agc gcc tcc gtg 48
 Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val 10
 1 5 10 15
 gga gat agg gtg acc atc aca tgc cag gcc agc gag atc atc tac agc 96
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser
 20 25 30
 aat ctg gcc tgg tac cag cag aag ccc ggc aag ccc ccc aag ctg ctg 144
 Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 atc tac ggc gcc tcc aca ctg gcc agc ggc gtg cct agc aga ttc agc 192
 Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60 20
 ggc agc ggc tcc ggc acc gat tac acc ctg aca atc tcc agc ctg cag 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 cct gag gat ttt gcc aca tac tac tgt cag cag tcc ttc agc tcc aat 288
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn
 85 90 95
 aac gtg ggc aac atc ttc ggc ggc ggc aca aag gtg gag atc aag 333
 Asn Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 配列番号 56 (ヒト化 PEO21 vL ドメイン アミノ酸配列) 30
 Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80 40
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn
 85 90 95
 Asn Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

【0137】

ヒト患者で使用するためには、これらの抗体をヒト化して、重鎖と軽鎖の定常領域の両方をヒト定常領域に置き換え、ならびに可変領域のフレームワーク領域をヒト抗体フレームワーク領域に置き換えることが望ましいであろう。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、ウサギ抗体のヒト化型である。

【0138】

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、配列番号2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または54と少なくとも60%同一であり、さらにより好ましくは、配列番号2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または54と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、またはさらには90%同一である少なくとも1つの重鎖可変を含み、ヒトCD39に特異的に結合することができる。

【0139】

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体またはその抗原結合断片は、配列番号4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または56と少なくとも60%同一であり、さらにより好ましくは、配列番号4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または56と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、またはさらには90%同一である少なくとも1つの軽鎖可変を含み、ヒトCD39に特異的に結合することができる。

【0140】

特定の実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはそれらの部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（またはそれらの部分）がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。任意選択でヒト化抗体はまた、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元するまたは改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

【0141】

特定の実施形態では、抗CD39抗体は、配列番号2、6、10、14、18、22、26、42、46、50、または54から選択されるVHドメインのCDRと結合するヒトフレームワーク配列を有するVHドメインと、配列番号4、8、12、16、20、24、28、44、48、52、または56から選択される対応するVLドメインのCDRと、を含むヒト化抗体である。CDRは、好ましくは同一であるが、得られる抗体がヒトCD39に特異的に結合する限り、それぞれのCDRにおいて、1、2または3のアミノ酸が異なり得る。

【0142】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, 2008, Front. Biosci. 13:1619-1633に概説され、例えば、Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Queen et al., 1989, Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033; 米国特許第5,821,337号; 同第7,527,791号; 同第6,982,321号; 及び同第7,087,409号; Kashmiri et al., 2005, Methods 36:25-34 (特異性決定領域 (SDR) 移植について記載する); Padlan, 1991, Mol. Immunol. 28:489-498 (「表面再構成」について記載する); Dall'Aquila et al., 2005, Methods 36:43-60 (「FRシャッフリング」について記載する); 及び Osbourn et al., 2005, Methods 36:61-68 and Klimka et al., 2000, Br. J. Cancer 83:252-260 (FRシャッフリングへの「誘導選択」手法を記載する) にさらに記載されている。

【0143】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、次のものが含まれるが、これらに限定されない: 「最良適合」法を使用して選択されるフレームワーク領域 (例えば、Simms et al. 1993, J. Immunol. 151:2296を参照されたい)、軽鎖可変領域または重鎖可変領域の特定の亜集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来

するフレームワーク領域（例えば、Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; 及び Presta et al., 1993, J. Immunol. 151:2623を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞変異した）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系列フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, 2008, Front. Biosci. 13:1619-1633を参照されたい）; 及びFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-10684、及びRosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:22611-22618を参照されたい）。

【0144】

特定の実施形態では、本明細書に提供される抗CD39抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の種々の技法を使用して産生することができる。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, 2001, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-7、及びLonberg, 2008, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459に記載されている。

【0145】

例えば、ヒト抗体は、免疫原を、抗原負荷に応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製されてもよい。このような動物は典型的には、内在性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するかもしれない動物の染色体内に無作為に組み込まれているヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスにおいて、内在性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, 2005, Nat. Biotech. 23:1117-1125を参照されたい（例えば、XENOMOUSEについて記載する米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号; HuMAB技術について記載する米国特許第5,770,429号; K-M MOUSEについて記載する米国特許第7,041,870号; 及びVELOCIMOUSE技術について記載する米国特許出願公開第US2007/0061900号もまた参照されたい）。そのような動物によって生成されるインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、異なるヒト定常領域と組み合わせることによってさらに改変され得る。

【0146】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫細胞株及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及びBoerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86を参照されたい）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体も、Liet al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562に記載されている。追加の方法には、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する）、及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する）に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）は、Vollmers and Brandlein, 2005, Histology and Histopathology 20(3):927-937、及びVollmers and Brandlein, 2005, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-91にも記載され

10

20

30

40

50

ている。

【0147】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージ、酵母または細菌ディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成されてもよい。このような可変ドメイン配列は次いで、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられてもよい。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が、以下に記載される。

【0148】

例示として、本発明に包含される抗CD39抗体は、所望の活性（複数可）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージまたは酵母のディスプレイライブラリを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてそのようなライブラリをスクリーニングするためのさまざまな方法が当該技術分野において既知である。このような方法は、例えば、Hoogenboom et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N. J., 2001) に概説され、または、例えば、McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624-628; Marks et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N. J., 2003); Sidhu et al., 2004, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee et al., 2004, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093; Fellouse, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472; 及び Lee et al., 2004, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 にさらに記載される。

【0149】

ファージディスプレイ法の一例として、Winter et al., 1994, *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-455 に記載されるように、VH及びVLの遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ中で無作為に組み換えられ、それを次いで、抗原結合ファージに対してスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、単鎖Fv（scFv）断片またはFab断片のいずれかとして抗体断片を提示する。免疫源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、ナイーブ型レパートリーを（例えば、ヒトから）クローン化して、Griffiths et al., 1993, *EMBO J.* 12:725-734 に記載されているようないずれもの免疫化なしに、非自己及び自己抗原さえも含む広範囲の抗原に対する単一の抗体源を提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 227:381-388 に記載されているように、ナイーブライブラリはまた、幹細胞から再構成されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用して高度に可変のCDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成することにより、合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリを記載する特許公報には、例えば、米国特許第5,750,373号、並びに米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、及び同第2009/0002360号が挙げられる。

【0150】

ヒト抗体ライブラリから単離される抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片とみなされる。

【0151】

F c y R I I I 結合はまた、最先端の方法、例えば、抗体の F c 部分のアミノ酸配列を改変または F c 部分のグリコシル化を修飾することによって増加させることができる（例えば、E P 2 2 3 5 0 6 1 を参照されたい）。特定の実施形態では、本発明の抗体は、グリコシル化された場合、抗体上のオリゴ糖鎖の 5 0 % 未満が a - 1 , 6 - フコースを含むように細胞によって産生される。典型的には、「低フコシル化」抗体調製物中にオリゴ糖鎖の約 4 0 % 未満、約 3 0 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 0 % 未満、または 5 % 未満または 1 % 未満には、a - 1 , 6 フコースが含まれる。「脱フコシル化」抗体は、I g G 重鎖の C H 2 ドメインに結合した炭水化物中に a - 1 , 6 - フコシルを欠く。M o r i e t a l . , 2 0 0 7 , C y t o t e c h n o l o g y 5 5 (2 - 3) : 1 0 9 - 1 1 4 、及び S a t o h e t a l . , 2 0 0 6 , E x p e r t O p i n B i o l T h e r . 6 : 1 1 6 1 - 1 1 7 3 は、脱フコシル化抗体を生成するための F U T 8 (α - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ) 遺伝子ノックアウト C H O 株に関連する。

10

【0152】

I V . 発現ベクター

特定の実施形態では、組み換え発現ベクターは、本明細書に記載される抗 C D 3 9 抗体をコードする D N A を増幅及び発現するために使用される。例えば、組み換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子に由来する好適な転写及び／または翻訳調節エレメントに作動可能に連結された抗 C D 3 9 抗体のポリペプチド鎖をコードする合成であるかまたは c D N A 由来の D N A 断片を有する複製可能な D N A 構築物であり得る。転写ユニットは一般に、(1) 遺伝子発現において調節的役割を担う遺伝エレメント（複数可）、例えば、転写のプロモーターまたはエンハンサーと、(2) m R N A に転写されタンパク質に翻訳される、構造配列またはコード配列と、(3) 適切な転写及び翻訳の、開始配列及び終結配列との構築体を含む。調節エレメントは、転写を制御するためのオペレーター配列を含むことができる。通常は、複製起点によって付与される宿主中で複製する能力、及び形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子をさらに組み込むことができる。- D N A 領域は、機能的に相互に関連する場合、「作動可能に連結」されている。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）の D N A は、それがポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現される場合、ポリペプチドの D N A に作動可能に連結しているか；プロモーターは、コード配列の転写を制御する場合、その配列に作動可能に連結しているか；または、リボソーム結合部位は、翻訳が可能になるように位置付けられている場合、コード配列に作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、酵母発現系での使用を意図された構造エレメントは、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。組み換えタンパク質が、リーダーまたは輸送配列を含まずに発現される他の実施形態では、N 末端メチオニン残基が含まれ得る。この残基は、任意選択で、その後、発現された組み換えタンパク質から切断されて、最終産物が提供され得る。

20

30

【0153】

発現制御配列及び発現ベクターの選択は、宿主の選択に応じて異なる。多種多様な発現宿主／ベクターの組み合わせが使用され得る。真核生物宿主の有用な発現ベクターとしては、例えば、S V 4 0 、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、及びサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、p C R 1 、p B R 3 2 2 、p M B 9 、及びそれらの誘導体など、E . c o l i 由来プラスミドのような既知の細菌プラスミド、また M 1 3 及び他の繊維状一本鎖 D N A フェージなどの広宿主域プラスミドが挙げられる。

40

【0154】

抗 C D 3 9 抗体（または標的として使用するタンパク質）のポリペプチド鎖の発現にとって好適である宿主細胞としては、適切なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母細胞、昆虫細胞、または高等真核生物細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性の生物、例えば、E . c o l i または B a c i l l u s が挙げられる。高

50

等真核細胞としては、以下に記載のように哺乳動物起源の確立された細胞株が挙げられる。無細胞翻訳系が使用されてもよい。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物の細胞宿主で使用するための適切なクローニング及び発現ベクターは、当業者によく知られている。

【0155】

組み換えポリペプチドを発現させるために、さまざまな哺乳動物細胞培養系が使用される。哺乳動物細胞における組み換えタンパク質の発現は、そのようなタンパク質が一般に正しく折りたたまれ、適切に修飾され、かつ生物学的に機能的であるため、好ましくなり得る。好適な哺乳動物宿主細胞株の例としては、COS-7（サル腎臓由来）、L-929（マウス線維芽細胞由来）、C127（マウス乳腺腫瘍由来）、3T3（マウス線維芽細胞由来）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣由来）、HeLa（ヒト子宮頸癌由来）、BHK（ハムスター腎臓線維芽細胞由来）、及びHEK-293（ヒト胎児腎臓由来）の細胞株及びそれらのバリエーションが挙げられる。哺乳類発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、発現対象遺伝子に連結された適切なプロモーターとエンハンサー、及び5'または3'に隣接する他の非転写配列など、ならびに5'または3'の非翻訳配列、例えば、必要な、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位とスプライスアクセプター部位、及び転写終結配列などを含むことができる。

【0156】

昆虫細胞培養系（例えば、バキュロウイルス）での組み換えタンパク質の発現も、正しく折りたたまれた生物学的に機能的なタンパク質を産生するための強力な方法を提供する。昆虫細胞において異種タンパク質を産生するためのバキュロウイルス系は、当業者によく知られている。

【0157】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1と少なくとも60%同一であり、さらにより好ましくは配列番号1と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、またはさらには90%同一である可変領域を含み、ヒトCD39に特異的に結合することができる抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0158】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2と少なくとも60%同一であり、さらにより好ましくは配列番号2と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、またはさらには90%同一である可変領域を含み、ヒトCD39に特異的に結合することができる抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0159】

V. インビボ送達のためのコードされた抗CD39抗体

患者内で発現される抗CD39抗体のコード配列を送達するための治療用ベクターは、ウイルス性、非ウイルス性、または物理的であり得る。例えば、Rosenberg et al., 1988, Science 242:1575-1578、及びWolf et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9011-9014. を参照されたい。遺伝子治療で使用するための方法及び組成物の議論としては、Eck et al., 1996, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, Hardman et al., eds., McGraw-Hill, New York, Chapter 5, pp. 77-101; Wilson et al., 1997, Clin. Exp. Immunol. 107 (Suppl. 1): 31-32; Wivel et al., 1998, Hematology/Oncology Clinics of North America, Gene Therapy, S. L. Eck, ed., 12 (3): 483-501; Romano et al., 2000, Stem Cells 18:19-39; 及びその中に引用されている参考文献が挙げられる。第6,080,728号にはまた、多種多様な遺伝子送達方法及び組成物についての議論が提供されている。送達経路としては、例えば、全身投与及びインサイチュ投与が挙げられる。よく知られているウイルス送達技術としては、

アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、フォーミーウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、及びアデノ随伴ウイルスのベクターの使用が挙げられる。

【0160】

a. ウイルスベクター

好ましいウイルスベクターは、非必須遺伝子が、目的のエピトープ及び標的化配列をコードする核酸配列を担持する核酸構築物で置き換えられている非細胞障害性真核生物ウイルスに基づく。本発明に包含される特定の実施形態にとって好ましいウイルスは、遺伝子治療におけるヒトの使用がすでに承認されている二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルス及びアデノ随伴（AAV）ウイルスである。さらに、寛容化するための好ましいベクターは、免疫刺激配列を含まない。

10

【0161】

アデノウイルスベクター

1つ以上の核酸配列のインビボ送達のための1つの例示的な方法は、アデノウイルス発現ベクターの使用を伴う。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a)構築物のパッケージングを補助する、及び(b)センスまたはアンチセンス配向において、その中にクローン化されたポリヌクレオチドを発現するのに十分なアデノウイルス配列を含むそれらの構築物を含むことを意味する。当然のことながら、アンチセンス構築物の文脈において、発現は、遺伝子産物が合成されることを必要としない。特定の実施形態では、送達ベクターは、C末端のFlag及びHisタグを有する、アデノウイルスベクターpAd中の転写バリエーション1であるシトクロムb5レダクターゼ3(CYB5R3)の市販のORFに係する(Vigene Biosciences製品コードAH889428)。WIPO特許出願WO/2015/050364は、Cyb5r3遺伝子を含む発現構築物を備えたベクターも教示している。

20

【0162】

アデノウイルスベクターは免疫原性が高いため、抗原を提示することによって寛容を誘導するための投与、または自己免疫疾患の場合には、あまり好ましくない。しかしながら、これらのベクターは、例えば、感染症、例えば、インフルエンザ、HBV、HCV、及びHIVなどの治療において免疫を誘導するために使用され得る。

【0163】

アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)

AAVは、その安全性、すなわち、遺伝子操作された(組み換え)が宿主ゲノムに組み込まれないため、送達ビヒクルの良い選択肢である。同様に、AAVは、病原性ではなく、いかなる疾患にも関連していない。ウイルスのコード配列を除去することにより、ウイルスの遺伝子発現に対する免疫反応が最小限に抑えられるため、rAAVが炎症応答を誘起することはない。特定の実施形態によれば、本明細書に記載の核酸構築物を含むエピトープ配列を含むAAVベクターは、APCの形質導入に有用である。

30

【0164】

典型的には、核酸構築物を含むエピトープを含むウイルスベクターは、所望のエピトープ、好適な調節エレメント、及び細胞形質導入を媒介するエピトープ発現に必要なエレメントをコードするポリヌクレオチドから組み立てられる。一実施形態では、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが使用される。より具体的な実施形態では、AAVベクターは、AAV1、AAV6、またはAAV8である。

40

【0165】

AAV ITRによって結合された目的のDNA分子を担持するAAV発現ベクターは、それらから切除された主要なAAVオープンリーディングフレーム(「ORF」)を有するAAVゲノムに、選択された配列(複数可)を直接挿入することによって構築される。本発明のAAVに含まれ得る構成的プロモーターの例としては、非限定的に、例示されたCMV最初期エンハンサー/ニワトリβ-アクチン(CBA)プロモーターが挙げられる。

50

【0166】

真核細胞の場合、発現制御配列は、典型的には、プロモーター、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルスなどに由来するものなどのエンハンサー、及びスプライシングドナー及びアクセプター部位を含み得るポリアデニル化配列を含む。ポリアデニル化配列は、一般に、導入遺伝子配列の後、3' ITR配列の前に挿入される。一実施形態では、ウシ成長ホルモンポリAを使用してもよい。

【0167】

これら及び他の一般的なベクター及び調節エレメントの選択は慣用的であり、そのような配列の多くが利用可能である。例えば、Sambrook et al., 及びその中で引用されている参考文献、例えば、3.18~3.26ページ及び16.17~16.27ページ、ならびにAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New Yorkを参照されたい。当然のことながら、すべてのベクター及び発現制御配列が、本発明の導入遺伝子のすべてを発現するために等しくうまく機能するわけではない。しかしながら、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、これらの発現制御配列の中から選択を行うことができる。好適なプロモーター／エンハンサー配列は、本出願によって提供されるガイダンスを使用して当業者によって選択され得る。このような選択は日常的な問題であり、分子または構築物を限定するものではない。

【0168】

レトロウイルスベクター

特定の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターであり得る。「レトロウイルス」とは、RNAゲノムを有するウイルスである。特定の実施形態では、レトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージング及び組み込みに必要なシス作用性配列のすべて、すなわち、(a)ベクターのそれぞれの末端の長い末端反復(LTR)またはその一部；(b)マイナス鎖及びプラス鎖のDNA合成のためのプライマー結合部位；及び(c)ゲノムRNAをビリオンに組み込むために必要なパッケージングシグナルを含む。レトロウイルスベクターに関する詳細は、Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302; Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599; 及びGrossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114に見出すことができる。

【0169】

「ガンマレトロウイルス」は、レトロウイルス科の属を指す。例示的なガンマレトロウイルスとしては、マウス幹細胞ウイルス、マウス白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、及びトリ網状内皮症ウイルスが挙げられる。

【0170】

広く使用されるレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病(GaLV)、シミアン免疫不全ウイルス(SiV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、及びそれらの組み合わせに基づくものを含む(例えば、Buchsch et al., 1992, J. Virol. 66:2731-2739; Johansen et al., 1992, J. Virol. 66:1635-1640; Sommerfelt et al., 1990, Virol. 176:58-59; Wilson et al., 1989, J. Virol. 63:2374-2378; Miller et al., 1991, J. Virol. 65:2220-2224; 及びPCT/US94/05700を参照されたい)。

【0171】

レンチウイルスベクターは、分裂細胞及び非分裂細胞に感染し、かつ典型的には高いウ

10

20

30

40

50

イルス力価を生み出すことができるレトロウイルスベクターの属である。レンチウイルスのいくつかの例としては、H I V（ヒト免疫不全ウイルス：H I V型1及びH I V型2を含む）、ウマ伝染性貧血ウイルス；ネコ免疫不全ウイルス（F I V）；ウシ免疫不全ウイルス（B I V）；及びサル免疫不全ウイルス（S I V）が挙げられる。

【0172】

特定の実施形態では、他のレトロウイルスベクターを使用することができる。これらとしては、例えば、ヒトフォーミーウイルス（H F V）またはスプーマウイルス属の他のウイルスに基づくベクターが挙げられる。フォーミーウイルス（F V）は、今日知られている最大のレトロウイルスであり、すべての非ヒト霊長類種など、さまざまな哺乳動物に広く存在しているが、ヒトには存在しない。この完全な非病原性により、F Vベクターがヒトにおける遺伝子治療のための理想的な遺伝子導入ビヒクルとして認定され、遺伝子送達系としてのF Vベクターが、H I V由来及びガンマレトロウイルス由来のベクターと明確に区別される。

10

【0173】

非細胞変性ウイルスとしてはレトロウイルス例えば、レンチウイルス）が挙げられ、そのライフサイクルはゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写とそれに続く宿主細胞DNAへのプロウイルスへの組み込みを含む。ヒトの遺伝子治療試験では、レトロウイルスが承認されている。最も有用なのは、複製欠損（すなわち、所望のタンパク質の合成を指示することはできるが、感染性粒子を製造することはできない）レトロウイルスである。そのような遺伝的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、インビボでの遺伝子の高効率形質導入のための一般的な有用性を有する。複製欠損レトロウイルスを生産する（外来遺伝物質のプラスミドへの組み込み、パッケージング細胞株のプラスミドによるトランスフェクション、パッケージング細胞株による組み換えレトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子の収集、ウイルス粒子による標的細胞の感染を含む）ための標準的なプロトコールは、当業者に知られている。

20

【0174】

レトロウイルスゲノムには、キャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、及びエンベロープ成分をそれぞれコードするg a g、p o l、及びe n vの3つの遺伝子が含まれている。g a g遺伝子上流に見られる配列には、ゲノムをビリオンにパッケージングするためのシグナルが含まれている。レトロウイルスベクターは、異種核酸が2つのレトロウイルスL T Rの間に存在する遺伝子導入プラスミドである。レトロウイルスベクターは、典型的には、レトロウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターを鋳型として使用して転写されたRNAが、適切なパッケージング細胞株のウイルスビリオンにパッケージングされることを可能にする適切なパッケージングシグナルを含む（例えば、米国特許第4,650,764号を参照されたい）。これらの2つの長い末端反復（L T R）配列は、ウイルスゲノムの5'及び3'末端に存在する。これらは強力なプロモーター及びエンハンサー配列を含み、宿主細胞ゲノムへの組み込みにも必要である（C o f f i n, 1990）。レトロウイルスベクターを構築するために、目的の1つ以上のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列をコードする核酸を特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損ウイルスを生産する。レンチウイルス（例えば、レトロウイルスの一種）に基づくレトロウイルスベクターのエピソーム型または非組み込み型も含まれる。

30

40

【0175】

レンチウイルスベクターは、安定した発現が必要な場合に有用であるが、レンチウイルスベクターは、免疫原性であり得、他の望ましくない影響を有する可能性がある。したがって、レンチウイルスベクターは、研究には簡便であるが、ヒトの投与に使用する場合、特に免疫ではなく寛容を誘導することが望まれる場合は注意が必要である。レンチウイルスは、がん治療のためにエクスピボでT細胞または樹状細胞または他の抗原提示細胞を操作するのに好適であるが、mRNAエレクトロポレーションはより安全である。しかし、近年の2つの進歩により、レンチウイルスの使用がより安全になり、臨床的に翻訳可能に

50

なっている。第一に、薬物投与時にその産物が機能するようになる自殺遺伝子の抗原との共発現である。典型的な例は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（H S V - T k）である。これらの遺伝子を発現する細胞は、薬物ガンシクロビルを代謝して細胞死を誘導する細胞傷害性産物にすることができる。したがって、いくつかの形質導入された細胞が悪性になった場合、それらは根絶することができる。約12のそのような系が存在する（D u a r t e e t a l . , 2 0 1 2 , C a n c e r L e t t e r s 3 2 4 : 1 6 0 - 1 7 0）。第二に、現在開発中の非組み込みレンチウイルスベクターがあり、したがって非発がん性である（N i g h t i n g a l e e t a l . , 2 0 0 6 , M o l . T h e r . 1 3 : 1 1 2 1 - 1 1 3 2）。これらの方法は、当業者の判断に従って本発明と共に使用することができる。

10

【0176】

本明細書で使用するために好適であるレトロウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,399,346号及び同第5,252,479号；WIPO公開WO92/07573、WO90/06997、WO89/05345、WO92/05266、及びWO92/14829に記載されており、これらは、そのようなレトロウイルスベクターを使用してヒト細胞に核酸を効率的に導入するための方法の説明を提供する。他のレトロウイルスベクターとしては、例えば、マウス乳腺腫瘍ウイルスベクター（例えば、S h a c k l e f o r d e t a l . , 1 9 9 8 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 9 6 5 5 - 9 6 5 9）、レンチウイルスなどが挙げられる。例示的なウイルスベクターは、p l e n t i l o x - I R E S - G F Pである。

20

【0177】

抗CD39抗体剤をコードする導入遺伝子の送達に容易に適合させることができる追加のレトロウイルス送達系としては、単なる例示として、公開されたPCT出願WO/2010/045002、WO/2010/148203、WO/2011/126864、WO/2012/058673、WO/2014/066700、WO/2015/021077、WO/2015/148683、WO/2017/040815が挙げられ、それぞれの明細書及び図面は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0178】

特定の実施形態では、レトロウイルスは、以下を含む組み換え複製コンピテントレトロウイルスである：レトロウイルスGAGタンパク質をコードする核酸配列；レトロウイルスPOLタンパク質をコードする核酸配列；レトロウイルスエンベロープをコードする核酸配列；オンコレトロウイルスポリヌクレオチド配列の5'末端及び3'末端に長い末端反復（LTR）配列を含むオンコレトロウイルスポリヌクレオチド配列；抗CD39抗体剤のコード配列に作動可能に連結されている配列内リボソーム侵入部位（IRES）を含むカセット（カセットは、5'が3'LTRのU3領域に配置され、3'がレトロウイルスエンベロープをコードする配列に配置されている）；及び逆転写、標的細胞へのパッケージング及び組み込みのためのシス作用性配列。

30

【0179】

特定の実施形態では、レトロウイルスは、以下を含む組み換え複製コンピテントレトロウイルスである：レトロウイルスGAGタンパク質；レトロウイルスPOLタンパク質；レトロウイルスエンベロープ；レトロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長い末端反復（LTR）配列を含むレトロウイルスポリヌクレオチド、レトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端でのプロモーター配列（哺乳類細胞での発現に適したプロモーター）、gag核酸ドメイン、pol核酸ドメイン、及びenv核酸ドメイン；異種ポリヌクレオチドに作動可能に連結されている抗CD39抗体剤のコード配列を含むカセット（カセットは、5'が3'LTRに配置され、作動可能に連結され、3'がレトロウイルスエンベロープをコードするenv核酸ドメインに配置されている）；及び逆転写、標的細胞へのパッケージング及び組み込みに必要なシス作用性配列。

40

【0180】

組み換え複製コンピテントレトロウイルスの特定の好ましい実施形態では、エンベロー

50

ブは、広宿主性、ポリトロピック、異種指向性、10A1、GALV、バブーン内在性ウイルス、RD114、ラブドウイルス、アルファウイルス、麻疹またはインフルエンザウイルスエンベロープのうちの1つから選択される。

【0181】

組み換え複製コンピテントレトロウイルスの特定の好ましい実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチド配列は、マウス白血病ウイルス（MLV）、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）、バブーン内在性レトロウイルス（BEV）、ブタ内在性ウイルス（PERV）、ネコ由来レトロウイルス RD114、リスサルレトロウイルス、異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス（XMRV）、トリ細網内皮症ウイルス（REV）、またはテナガザル白血病ウイルス（GALV）からなる群から選択されるウイルスから操作される。

10

【0182】

組み換え複製コンピテントレトロウイルスの特定の好ましい実施形態では、レトロウイルスは、ガンマレトロウイルスである。

【0183】

組み換え複製コンピテントレトロウイルスの特定の好ましい実施形態には、例えば、カセットの下流に、別のチェックポイント阻害剤ポリペプチド、共刺激ポリペプチド及び／または免疫刺激サイトカイン（単なる例として）などの第2の治療用タンパク質のコード配列を含む第2のカセットが存在する。特定の例において、第2のカセットは、第2の治療用タンパク質のコード配列に作動可能に連結された配列内リボソーム侵入部位（IRES）またはミニプロモーターまたは pol III プロモーターを含むことができる。

20

【0184】

組み換え複製コンピテントレトロウイルスの特定の好ましい実施形態では、それは、非溶解性、広宿主性のレトロウイルス複製ベクターであり、炎症組織微小環境の細胞に選択的に感染し、複製することが好ましい。

【0185】

発現構築物としての他のウイルスベクター

他のウイルスベクターは、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を宿主細胞に送達するために、本発明における発現構築物として使用され得る。ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、及びヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターが使用され得る。これらは、さまざまな哺乳動物細胞にいくつかの魅力的な機能を提供する。B型肝炎ウイルスも含まれる。

30

【0186】

b. 非ウイルスベクター

プラスミドベクター

他のベクターには、プラスミドベクターが含まれる。プラスミドベクターは当該技術分野で広く記載されており、そして当業者に周知である。例えば、上記で引用した Sambrook et al., 1989 を参照されたい。過去数年間、プラスミドベクターは、インビボで細胞に抗原をコードする遺伝子を送達するための DNA ワクチンとして使用されている。このプラスミドベクターは、ウイルスベクターの多くと同じ安全上の懸念を有しないため、こうした送達に特に有利である。しかしながら、これらのプラスミドは、宿主細胞と適合性のあるプロモーターを有し、プラスミド内の核酸によってコードされているペプチドエピトープを発現することができる。他のプラスミドは、当業者によく知られている。さらに、プラスミドは、制限酵素及びライゲーション反応を使用してカスタム設計して、DNA の特定の断片を除去し、追加することができる。プラスミドは、さまざまな非経口、粘膜、及び局所経路により送達させ得る。例えば、DNA プラスミドは、筋肉内、皮内、皮下、または他の経路によって注射することができる。また、鼻腔内スプレーまたは点滴薬、直腸坐剤、及び経口により投与してもよい。また、遺伝子銃を使用して、表皮または粘膜表面に投与してもよい。プラスミドは、水溶液中で得られ、金粒子上で乾燥され得るか、またはリボソーム、デンドリマー、渦巻状物、及びマイクロカプセル化を

40

50

含むがこれらに限定されない別のDNA送達系と関連して得られてもよい。

【0187】

したがって、一態様では、発現カセットを含む核酸構築物を含むエピトープの発現のためにプラスミドが提供され、これは、転写ユニットとも呼ばれる。プラスミドが、エピトープ発現に好適である環境に置かれると、転写ユニットは、エピトープをコードする配列、ETS及びMHCI活性因子配列、またはエピトープ及び分泌シグナル配列をコードする配列、及び構築物にコードされる他のものを含むポリヌクレオチドを発現する。転写ユニットは、細胞性免疫応答エレメントコード配列と転写的に連結されている転写制御配列を含む。転写制御配列は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター／エンハンサー配列などのプロモーター／エンハンサー配列を含み得る。しかしながら、当業者であれば、真核細胞での発現に好適であるさまざまな他のプロモーター配列が知られており、本明細書に開示される構築物において同様に使用することができることを認識するであろう。核酸産物の発現レベルは、結合するプロモーター、ならびに結合するエンハンサーエレメントの存在及び活性化に依存するであろう。

10

【0188】

特定の実施形態では、所望のエピトープ及び標的化配列をコードする配列は、転写、翻訳、RNA安定性、及び複製のための調節エレメント(すなわち、転写制御配列を含む)を含む発現プラスミドにクローニングされ得る。そのような発現プラスミドは、当該技術分野において周知であり、当業者は、細胞免疫応答エレメントが発現可能であるように、細胞免疫応答エレメントまたはその断片をコードする配列を含むポリヌクレオチドを有する適切な発現構築物を設計することができる。pCIneo、pUMVC、またはpCDNA3などの、一定の配列を含むポリヌクレオチドをクローニングできる好適な発現プラスミドの例は、数多く存在する。

20

【0189】

細胞性免疫応答エレメントまたはその断片の発現のためのプラスミドを保有する大量の細菌宿主を発酵させてもよく、プラスミドは、その後の使用のために精製することができる。プラスミドを使用する現在のヒト臨床試験は、このアプローチを利用している(Recombinant DNA Advisory Committee Data Management Report, 1994, Human Gene Therapy 6: 535-548)。当該技術分野で公知である現在のDNA単離方法は、プラスミドを増殖させるために使用される細菌からの汚染物質であるリポ多糖(エンドトキシン)を除去することを含む。エンドトキシンは、強力なアジュバントとして作用し、望ましくない免疫刺激を引き起こし得るため、このステップは、寛容原性DNAワクチンの使用に最も好ましく行われる。

30

【0190】

プラスミドの目的は、細胞または組織への核酸配列の効率的な送達及び細胞または組織における治療用エピトープの発現である。特に、プラスミドの目的は、高いコピー数を達成し、プラスミドの不安定性の潜在的な原因を回避し、プラスミド選択のための手段を提供することであり得る。発現に関しては、核酸カセットは、カセット内の核酸の発現に必要なエレメントを含む。発現には、挿入された遺伝子、核酸配列、または核酸カセットのプラスミドによる効率的な転写が含まれる。発現産物は、タンパク質、ポリペプチド、またはRNAであり得る。核酸配列は、核酸カセットに含まれ得る。核酸の発現は、連続的であり得るかまたは調節され得る。

40

【0191】

ミニサークル

本明細書に記載の核酸構築物の実施形態は、ミニサークルDNAの形態で処理され得る。ミニサークルDNAは、すべての原核生物のベクター部分から遊離されている小さい(2~4 kb)環状プラスミド誘導体に関する。ミニサークルDNAベクターには細菌のDNA配列が含まれていないため、異物として認識されて破壊される可能性は低くなる(典型的な導入遺伝子送達方法は、外来DNAを含むプラスミドを含む)。結果として、これ

50

らのベクターは、従来のプラスミド（数日から数週間）と比較して、より長い期間（数週間または数ヶ月のオーダー）で発現させ得る。ミニサークルのサイズが小さいほど、クローニング能力が拡張され、それらの細胞への送達が容易になる。ミニサークルDNAを産生するためのキットは当該技術分野で知られており、市販されている（System Biosciences, Inc., Palo Alto, Calif.）。ミニサークルDNAに関する情報は、Dietz et al., 2013, Vector Engineering and Delivery Molecular Therapy 21(8):1526-1535 and Hou et al., 2015, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, Article number:14062 doi:10.1038/mtm.2014.62に提供されている。ミニサークルのさらなる情報は、Chen et al., 2003 September, Mol. Ther. 8(3):495-500に提供されており、ミニサークルDNAベクターは、活性クロマチン及び転写レベルによって反映される持続的な発現を達成する（Gracey Maniar et al., 2013 January, Mol. Ther. 21(1):131-8）。

10

20

30

40

50

【0192】

核酸によってコードされる産物の発現を最終的に得る過程における最初のステップは、細胞による核酸の取り込みをもたらすことである。細胞による核酸の取り込みは、いくつかの因子に依存しており、そのうちの1つは、核酸が細胞表面に近接している時間の長さである。例えば、緩衝液中のプラスミドDNAを筋肉内（i.m.）投与後、筋肉をマッサージした場合に、おそらく直接またはリンパ管を介してこの筋肉からDNAが漏出することによる、遺伝子発現の著しい低下が観察された（Human Gene Therapy 4:151-159（1993））。したがって、核酸が拡散する速度を遅らせるか、または核酸の細胞取り込みが望まれる部位から運び出される化合物とともに核酸を製剤化することが望ましい場合がある。さらに、これらの化合物は、核酸の細胞取り込みを増加させるために必要な物理的特性を維持または回復しながら、注射などの手段による生物への投与に好適であり得る。

【0193】

オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列の発現をもたらすために、発現構築物は、細胞に送達される必要がある。本発明に包含される特定の実施形態では、1つ以上のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列を含む発現構築物は、ネイキッド組み換えDNAまたはプラスミドから単に構成され得る。

【0194】

免疫を刺激するために、任意の型のDNAワクチンベクターは、CpGリッチになるように（免疫細胞上のTLR9を刺激するように）設計されるか、逆にCpGを除去するように設計され、可能であれば、CpGモチーフをGpGモチーフに置き換える（Hoe et al., 2003, J. Immunol. 171(9):4920-6; Hoe et al., 2005, J. Immunol. 175(9):6226-34）。DNAワクチンは、抗原（複数可）／エピトープ（複数可）を含むように設計することができ、また、アジュバントまたは免疫調節剤として作用するように、抗原と共発現させるための追加の遺伝子を含むことができる（複数のプロモーターベクター）。これらのDNAワクチンは、例えば、T1D患者において、臨床的に安全であることが判明している（Roep et al., 2013, Sci. Transl. Med. 5(191):191ra82）。

【0195】

機械式送達系

追加の非ウイルス送達方法としては、Woffendin et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24):11581に記載されているアプローチなど、インビトロで使用され得る機械的送達系；光重合ヒドロゲル材料の堆積または電離放射線の使用（例えば、米国特許第5,206,152号及びWO92

／ 1 1 0 3 3 を参照されたい) ; ハンドヘルド遺伝子導入粒子銃の使用 (例えば、米国特許第 5 , 1 4 9 , 6 5 5 号を参照されたい) ; 及び移入された遺伝子を活性化するための電離放射線の使用 (例えば、米国特許第 5 , 2 0 6 , 1 5 2 号及び WO 9 2 / 1 1 0 3 3 を参照されたい) が挙げられるがこれらに限定されない。送達デバイスはまた、生体適合性であり得、また生分解性であり得る。製剤は、好ましくは、比較的一定レベルの活性成分の放出をもたらす。他方で、投与直後のより迅速な放出速度が望まれる場合がある。そのような組成物の製剤は、既知の技術を使用する当業者のレベルの十分な範囲内である。

【 0 1 9 6 】

送達を増強するための物理的方法としては、エレクトロポレーション (高電圧の短いパルスが膜を越えて核酸を運ぶ)、遺伝子銃 (DNA が金粒子に充填され、強制的に DNA の細胞への透過を達成する)、ソノポレーション、マグネトフェクション、流体力学的送達などが挙げられ、これらはすべて当業者に公知である。DNA はまた、リポソーム、好ましくはカチオン性リポソーム、またはポリマーソーム (合成リポソーム) に内包化させ得、これらは細胞膜と相互作用し、融合またはエンドサイトーシスを受けて、細胞への DNA 移入をもたらすことができる。DNA は、ポリマー (ポリプレックス) またはデンドリマーとの複合体に形成することもでき、これらは、細胞の細胞質に積載物を直接放出することができる。

【 0 1 9 7 】

この点で有用な例示的担体としては、ポリ (ラクチド-コ-グリコリド)、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微粒子が挙げられる。他の例示的な遅延放出担体としては、非液体親水性コア (例えば、架橋多糖またはオリゴ糖)、及び任意選択で、リン脂質などの両親媒性化合物を含む外層を含む超分子バイオベクターが挙げられる (例えば、米国特許第 5 , 1 5 1 , 2 5 4 号、ならびに P C T 出願 WO 9 4 / 2 0 0 7 8 、 WO / 9 4 / 2 3 7 0 1 及び WO 9 6 / 0 6 6 3 8 を参照されたい)。徐放性製剤に含まれる活性剤の量は、移植部位、放出速度及び予想される放出時間、ならびに治療または予防を受ける状態の性質に依存する。

【 0 1 9 8 】

生分解性ミクロスフェア (例えば、ポリ乳酸ポリグリコレート) は、組成物の担体として使用され得る。好適な生分解性ミクロスフェアは、例えば、米国特許第 4 , 8 9 7 , 2 6 8 号 ; 第 5 , 0 7 5 , 1 0 9 号 ; 第 5 , 9 2 8 , 6 4 7 号 ; 第 5 , 8 1 1 , 1 2 8 号 ; 第 5 , 8 2 0 , 8 8 3 号 ; 第 5 , 8 5 3 , 7 6 3 号 ; 第 5 , 8 1 4 , 3 4 4 号、第 5 , 4 0 7 , 6 0 9 号、及び第 5 , 9 4 2 , 2 5 2 号に開示されている。WO / 9 9 / 4 0 9 3 4 及びそこに引用されている参考文献に記載されているような修飾された B 型肝炎コアタンパク質担体系もまた、多くの用途に有用であろう。別の例示的な担体 / 送達系では、微粒子状タンパク質複合体を含む担体、例えば、米国特許第 5 , 9 2 8 , 6 4 7 号に教示されているものを使用する。

【 0 1 9 9 】

生分解性高分子ナノ粒子では、細胞への非ウイルス性核酸の移入が容易になる。小さい (約 2 0 0 nm)、正に帯電した (約 1 0 mV) 粒子は、カチオン性の加水分解性ポリ (ペター-アミノエステル) とプラスミド DNA の自己組織化によって形成される。

【 0 2 0 0 】

ポリヌクレオチドはまた、直接マイクロインジェクション、一時的な細胞透過化 (例えば、リプレッサー及び / または活性化因子と細胞透過剤との共投与)、膜移行ペプチドへの融合などによって細胞に投与され得る。

【 0 2 0 1 】

本開示の特定の実施形態では、遺伝子構築物は、エレクトロポレーションを介して標的細胞に導入される。エレクトロポレーションは、細胞 (または組織) 及び DNA (または DNA 複合体) を高電圧放電にさらすことを伴う。インビボエレクトロポレーションは、多くの異なる組織へのプラスミド DNA の効率的な送達に成功裏に使用されてきた遺伝子送達技術である。プラスミドによってコードされる遺伝子または cDNA の全身的発現及

10

20

30

40

50

び局所的発現は、インビボエレクトロポレーションを行うことにより得ることができる。インビボエレクトロポレーションの使用により、標的炎症組織内でのプラスミドDNAの取り込みが増強され、これにより炎症組織内での発現がもたらされ、プラスミドが筋肉組織に送達され、抗CD39抗体の全身的発現がもたらされる（例えば、US8026223を参照されたい）。インビボで細胞に抗CD39抗体剤導入遺伝子をエレクトロポレーションするための例示的な技術、ベクター、及びデバイスとしては、PCT公開WO/2017/106795、WO/2016/161201、WO/2016/154473、WO/2016/112359、及びWO/2014/066655が挙げられる。

【0202】

米国特許第7,245,963号は、体内または植物内での選択された組織の細胞への生体分子の導入を容易にするためのモジュラー電極システム及びその使用について記載している。モジュラー電極システムは、複数の針電極と、皮下注射針と、プログラム可能な定電流パルスコントローラから複数の針電極への導電性リンクを提供する電気コネクタと、電源とを含む。オペレーターは、支持構造に取り付けられた複数の針電極をつかみ、それらを生体または植物の選択された組織にしっかりと挿入することができる。次いで、生体分子は皮下注射針を介して選択された組織に送達される。プログラム可能な定電流パルスコントローラが作動し、定電流電気パルスが複数の針電極に印加される。印加された定電流電気パルスは、複数の電極間の細胞への生体分子の導入を促進する。米国特許第7,245,963号の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0203】

米国特許第2005/0052630号は、体内または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を効果的に促進するために使用され得るエレクトロポレーションデバイスについて記載している。エレクトロポレーションデバイスは、動作がソフトウェアまたはファームウェアによって指定される動電学的デバイス（「EKDデバイス」）を含む。EKDデバイスは、ユーザー制御とパルスパラメータの入力に基づいて、アレイ内の電極間に一連のプログラム可能な定電流パルスパターンを生成し、電流波形データの保存と取得を可能にする。エレクトロポレーションデバイスはまた、針電極のアレイを有する交換可能な電極ディスク、注射針用の中央注射チャンネル、及び取り外し可能なガイドディスクを含む（米国特許公開第2005/0052630号を参照されたい、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0204】

米国特許第7,245,963号及び米国特許公開第2005/0052630号に記載されている電極アレイ及び方法は、筋肉などの組織だけでなく、他の組織または器官への深い浸透にも適合している。電極アレイの構成により、（選択した生体分子を送達するための）注射針も完全に標的器官に挿入され、注射は、電極によって事前に描写された領域で標的組織に対して垂直に投与される。

【0205】

典型的には、インビボでの細胞エレクトロポレーションに必要な電場は、一般に、インビトロでの細胞に必要な電場と大きさが類似している。一実施形態では、電場の大きさは、約10V/cm～約1500V/cm、好ましくは約300V/cm～1500V/cm、好ましくは約1000V/cm～1500V/cmの範囲である。代替的に、より低い電場強度（約10V/cm～100V/cm、より好ましくは約25V/cm～75V/cm）でのパルス長は長い。例えば、公称電場が約25～75V/cmである場合、パルス長が約10ミリ秒であることが好ましい。

【0206】

パルス長は、約10秒から約100ミリ秒であり得る。任意の所望の数のパルス、典型的には、1秒あたり1～100パルスであり得る。パルスセット間の遅延は、1秒などの任意の所望の時間に行うことができる。波形、電場強度、及びパルス持続時間は、エレクトロポレーションを介して細胞に入る細胞の型及び分子の型にも依存し得る。

【0207】

電気化学的インピーダンス分光法（「EIS」）を組み込んだエレクトロポレーションデバイスも含まれる。このようなデバイスは、インビボでのリアルタイム情報、特に炎症組織エレクトロポレーション効率をもたらし、条件の最適化が可能になる。EISを組み込んだエレクトロポレーションデバイスの例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるWO2016/161201に見出すことができる。

【0208】

本発明に包含される非ウイルス送達ベクターの取り込みはまた、avalancheトランスフェクションとも呼ばれる血漿エレクトロポレーションによって増強され得る。簡潔に述べると、マイクロ秒の放電により、電極表面にキャビテーションマイクロバブルが生じる。磁場と組み合わせた崩壊マイクロバブルによって作り出される機械的力は、従来のエレクトロポレーションに関連する拡散媒介輸送と比較して、細胞膜での輸送効率を高めるのに役立つ。血漿エレクトロポレーションの技術は、米国特許第7,923,251号及び第8,283,171号に記載されている。この技術は、細胞の形質転換のためにインビボでも利用することができる（Chaiberg et al., 2006, Investigative Ophthalmology & Visual Science 47:4083-4090; Chaiberg et al., United States Patent No 8,101,169 Issued January 24, 2012）。

【0209】

他の代替エレクトロポレーション技術も企図されている。インビボプラスミド送達は、コールドプラズマを使用して実施され得る。プラズマは、物質の4つの基本的な状態のうちの1つであり、他は固体、液体、及び気体である。プラズマは、結合していない正及び負の粒子の電氣的に中性の媒体である（すなわち、プラズマの全体的な電荷は、ほぼゼロである）。プラズマは、気体を加熱するか、レーザーまたはマイクロ波発生器を使用して強力な電磁場に供することによって作り出すことができる。これにより、電子の数が増減し、イオンと呼ばれる正または負の荷電粒子が生成され（Luo et al., 1998, Phys. Plasma 5:2868-2870）、存在する場合は分子結合の解離を伴う。

【0210】

コールドプラズマ（すなわち、非熱プラズマ）は、パルス化された高電圧信号を好適な電極に送達させることによって生成される。コールドプラズマデバイスは、ガスジェットデバイスまたは誘電体バリア放電（DBD）デバイスの形態を取り得る。低温プラズマは、比較的低い気体温度でプラズマを供給することにより、多くの熱意及び関心を惹きつけている。このような温度でのプラズマの供給は、創傷治癒、抗菌プロセス、他のさまざまな医学的治療及び滅菌など、さまざまな用途にとって興味深いものである。前述のとおり、コールドプラズマ（すなわち、非熱プラズマ）は、パルス化された高電圧信号を好適な電極に送達させることによって生成される。コールドプラズマデバイスは、ガスジェットデバイス、誘電体バリア放電（DBD）デバイス、または多周波高調波リッチ電源の形態をとり得る。

【0211】

誘電体バリア放電デバイスは、コールドプラズマを生成するために別の過程に依存する。誘電体バリア放電（DBD）デバイスは、誘電体層で覆われた少なくとも1つの導電性電極を備える。電氣的戻り経路は、コールドプラズマ処理を受ける標的基質によって提供され得る接地によって、または電極に内蔵の接地を提供することによって形成される。誘電体バリア放電デバイスのエネルギーは、上記のようなものなど、高電圧電源によって提供され得る。より一般的には、エネルギーは、プラズマ放電を形成するために、パルスDC電圧の形態で誘電体バリア放電デバイスに入力される。誘電体層により、放電は導電性電極から分離され、電極のエッチング及びガス加熱が減少する。パルスDC電圧は、振幅及び周波数を変化させて、さまざまな動作領域を実現させ得る。コールドプラズマ生成のそのような原理を組み込んだ任意のデバイス（例えば、DBD電極デバイス）は、本発明

に包含されるさまざまな実施形態の範囲内である。

【0212】

特定の例示的な実施形態では、本発明に包含される抗CD39抗体剤をコードする導入遺伝子構築物は、アプリケーションタと；アプリケーションタから伸長している複数の電極であって、カバー領域に関連している電極と；電極と電気的に通信する電源であって、カバー領域内の細胞に対して、1つ以上のエレクトロポレーション信号を生成するように構成された電源と；電極に結合されているガイド部材であって、電極のカバー面積を調整するように構成されているガイド部材と、を備えるエレクトロポレーションデバイスを使用して送達される。電極の少なくとも一部は、円錐配置でアプリケーションタ内に配置することができる。1つ以上のエレクトロポレーション信号は、それぞれ電場に関連し得る。デバイスは、電源及び電極に結合されているポテンショメータをさらに備え得る。ポテンショメータは、電場を実質的に所定の範囲内に維持するように構成することができる

10

1つ以上のエレクトロポレーション信号は、それぞれ電場に関連し得る。デバイスは、電源及び電極に結合されているポテンショメータをさらに備え得る。ポテンショメータは、カバー領域内の細胞の永久的な損傷を実質的に防止し、及び／または疼痛を実質的に最小化するように、電場を所定の範囲内に維持するように構成され得る。例えば、ポテンショメータは、電場を約1300V/cmに維持するように構成され得る。

【0213】

電源は、第1の電気信号を第1の電極に提供し、第2の電気信号を第2の電極に提供し得る。第1の電気信号と第2の電気信号は、組み合わせられて、うなり周波数を有する波を生成し得る。第1の電気信号と第2の電気信号はそれぞれ、単極波形及び双極波形のうちの少なくとも1つを有し得る。第1の電気信号は、第1の周波数及び第1の振幅を有し得る。第2の電気信号は、第2の周波数及び第2の振幅を有し得る。第1の周波数は、第2の周波数とは異なるか、または同じであり得る。第1の振幅は、第2の振幅とは異なるか、または同じであり得る。

20

【0214】

特定の実施形態では、本発明は、炎症状態を有する対象を治療するための方法を提供し、本方法は、抗CD39抗体剤をコードするプラスミドの有効量を、炎症を起こした組織（またはそれに近い組織）に注射することと；標的組織に対して、エレクトロポレーション療法を施すことと、を含む。特定の実施形態では、エレクトロポレーション療法は、約100マイクロ秒～約20ミリ秒のパルス幅において、約200V/cm～約1500V/cmの少なくとも1つの電圧パルスを与えることをさらに含む。

30

【0215】

特定の実施形態では、プラスミド（または第二のエレクトロポレーションされるプラスミド）はさらに、アダリムマブ、セルトリズマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、インフリキシマブ、リサンキズマブ、及びウステキヌマブなどの少なくとも1つまたは複数の追加の免疫抑制性生物製剤（複数可）をコードする。

【0216】

抗CD39抗体をコードする核酸構築物を送達するための脂質及びポリカチオン性分子脂質媒介性の核酸の送達及びmRNAなどの外来核酸のインビトロ及びインビボでの発現は非常に成功している。脂質ベースの非ウイルス製剤は、アデノウイルス遺伝子治療の代替手段を提供する。現在のインビボ脂質送達方法は、皮下、皮内、肺、胃腸、粘膜下、滑膜内、髄腔内、または頭蓋内の注射を使用する。脂質製剤の進歩により、インビボでの遺伝子導入の効率が改善されている（PCT出願WO98/07408を参照されたい）。例えば、等モル比の1，2-ビス（オレオイルオキシ）-3-（トリメチルアンモニオ）プロパン（DOTAP）とコレステロールで構成される脂質製剤は、全身でのインビボ遺伝子導入を有意に向上させることができる。DOTAP：コレステロール脂質製剤は、「サンドイッチリポソーム」と呼ばれる独特の構造を形成する。この製剤は、陥入した二層構造または「花瓶（vase）」構造の間にDNAを「サンドイッチ」することが報告されている。これらの脂質構造の有益な特徴には、陽性のp、コレステロールによるコロイ

40

50

ド安定化、二次元核酸パッキング、及び血清安定性の増大が含まれる。

【0217】

カチオン性リボソーム技術は、正に帯電した頭部基及び疎水性の脂質尾部を保有する両親媒性脂質が、負に帯電したDNAまたはRNAに結合し、エンドサイトーシスによって一般に細胞に入る粒子を形成する能力をベースにする。一部のカチオン性リボソームには、哺乳動物細胞によるリボソームの取り込みを増強すると考えられている中性の共脂質も含まれる。同様に、ポリ-L-リジン及びポリエチレンイミンなどの他のポリカチオンは、電荷相互作用を介して核酸と複合体を形成し、DNAまたはRNAのナノ粒子への縮合を補助し、これらのナノ粒子がエンドソーム媒介取り込みのための基質となる。プラスミドDNA (pDNA)、オリゴデオキシヌクレオチド、及び合成RNAのさまざまな形態との複合体を含む、これらのカチオン性核酸複合体技術のいくつかは、潜在的な臨床製品として開発されている。

10

【0218】

本明細書に開示される核酸構築物は、細胞への取り込みを増強するのに役立つポリカチオン性分子と会合してもよい。また、核酸構築物をポリカチオン性分子と複合体化することは、そのサイズの減少など、構築物のパッケージングに役立ち、これは細胞の取り込みを支援するものと考えられている。エンドソームに入ると、pHが低いので複合体が解離し、ポリカチオン性分子がエンドソームの膜を破壊して、DNAが分解され得る前にDNAの細胞質への逃避を促進することができる。予備データは、核酸構築物の実施形態が、ポリカチオン性分子であるポリリジンまたはポリエチレンイミンと複合体を形成した場合に、DCよりもSCへの取り込みが増強されたことを示している。

20

【0219】

核酸構築物との複合体形成に有用なポリカチオン性分子の一例としては、細胞透過性ペプチド (CPP) が挙げられ、例としては、ポリリジン (上記)、ポリアルギニン、及び Tat ペプチドが挙げられる。細胞透過性ペプチド (CPP) は、DNAに結合することができ、放出されると細胞膜を透過して、エンドソームから細胞質へのDNAの逃避を容易にできる小さいペプチドである。CPPの別の例は、27残基のキメラペプチドに関し、これは、MPGと呼ばれ、ss-オリゴヌクレオチド及びds-オリゴヌクレオチドに安定した方法で結合し、これにより、核酸がDNaseによる分解から保護され、オリゴヌクレオチドをインビトロで細胞に効率よく送達させる非共有複合体が得られることが少し前に示された (Mahapatra et al., 2011, J Nanobiotechnol 9:55)。異なるペプチド:DNA比、ならびに10:1及び5:1の比 (それぞれ150nm及び1um) を調べたときに、複合体は、約150nm~1umの小さい粒子を形成した。別のCPPは、修飾テトラペプチド (グアニジノカルボニルピロール (GCP) 基を含むテトラリジン (TL-GCP)) に関し、これは、6.2kbのプラスミドDNAに対して高い親和性で結合し、700~900nmの正に帯電した凝集体を生成することが報告されている (Li et al., 2015, Agnew Chem Int Ed Engl, 54(10):2941-4)。RNAはまた、インビボ送達のために、そのようなポリカチオン性分子によって複合体を形成することができる。

30

40

【0220】

本明細書に記載の核酸構築物と複合体を形成し得るポリカチオン性分子の他の例としては、JETPRIME (登録商標) 及びインビボJET (Polypus-transfection, S.A., Illkirch, France) として市販されているポリカチオン性ポリマーが挙げられる。

【0221】

VI. 使用方法及び医薬組成物

本発明に包含される抗CD39抗体は、炎症性疾患及び障害、ならびに一般に好酸球増多症を特徴とする状態の治療などの治療法を含むがこれらに限定されないさまざまな用途において有用である。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗CD39抗体は、炎症及

50

び免疫応答の好酸球媒介性の態様、ならびに全身性または局所性の好酸球増多症または薬物誘発性好酸球増多症を不活性化またはそうでなければ減少させるのに有用である。

【0222】

一般に、「好酸球」は、造血細胞のクラスを包含する。特定の実施形態では、本発明によって包含される好酸球は、(i) CD39+好酸球であり；(ii) CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受容体の α サブユニット(IL-5R α またはCD125)、IL-3受容体の α サブユニット(IL-3R α またはCD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-セレクトリン、EMR1、CCR3(CD193)、及びCRTh2(CD294)からなる群から選択される細胞表面マーカーのうちの1つ以上を共発現し；(iii) CD45+CD11b+好酸球細胞であり；及び／または(iv) CD45+CD11b+Siglec-8+好酸球細胞である。

10

【0223】

特定の実施形態では、本発明のCD39標的化好酸球枯渇剤は、胃腸炎症性状態を治療するために使用され得る。本開示は、胃腸炎症性疾患に関連する症状及び／または炎症を治療、予防、改善、または遅延させるためのCD39標的化好酸球枯渇剤を含む医薬組成物を投与する方法を提供する。いくつかの実施形態では、胃腸炎症性障害は、食道にある。いくつかの実施形態では、胃腸炎症性障害は、好酸球性食道炎である。いくつかの実施形態では、患者は、食道溝の減少、食道焦点狭窄の減少、食道直径の増加、食道コンプライアンスの増加、食道体の伸展性の増加、嚥下容易性の増加、浮腫の低減、血管新生の改善、輪の縮小、滲出液の減少または消失、及び／または狭窄の消失を含む、食道機能及び形態の実質的な改善を示す。

20

【0224】

例示すると、CD39標的化好酸球枯渇剤は、対象が食道の炎症及び／または腫脹に苦しみ、患者が食物を飲み込む能力に影響を及ぼし、その結果、栄養失調及び発育不全を引き起こすことがある、アレルギー／免疫状態である好酸球性食道炎(EoE)の治療の一部として使用することが得る。典型的には、好酸球は食道には見られないが、EoEではこれらの細胞が蓄積し、腫脹が生じ、食道の内径が縮小し、嚥下及び摂食が非常に困難になる。多くの場合、患者は、患者の食道に食物が詰まってしまう食片圧入のエピソードを経験し、これは緊急治療を必要とし得る。嚥下困難、及び食片圧入の恐怖のために、多くのEoE患者は、ヨーグルト、スープ、及び、スムージーなどの柔らかいものを食べるように自身を制限する。EoEの重症例では、患者は非経口栄養法(例えば、静脈内栄養)を受ける。これは、必要な栄養を提供し得るが、患者の活動を制限し、カテーテル部位での感染症の増加をもたらし得る。

30

【0225】

特定の実施形態では、本発明は、好酸球性食道炎に関連する症状及び／または炎症を治療するために、CD39標的化好酸球枯渇剤を含む医薬組成物を投与する方法を提供する。医薬組成物は、単なる例示として、粘膜下注射を含む食道に局所的に、及び全身的に送達することができる。CD39標的化好酸球枯渇剤をコードする核酸の場合、核酸は、好酸球浸潤部分を含む食道組織、またはそれに隣接する組織にトランスフェクトされ得る。

40

【0226】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、1つ以上のグルココルチコステロイド、ロイコトリエンアンタゴニスト、マスト細胞安定剤、免疫調節剤、プロトンポンプ阻害剤(PPI)を含む治療の一部であり得る。

【0227】

一実施形態では、本開示による抗体もしくはその抗原結合断片または製剤は、慢性炎症状態の治療に用いられ、この状態は、不適切な炎症に関連する状態である。そのような状態としては、関節リウマチ(RA)、自己免疫状態、炎症性腸疾患、治癒しない創傷、多発性硬化症、がん、アテローム性動脈硬化症、血管炎、シェーグレン病、糖尿病、紅斑性ループス(全身性エリテマトーデスを含む)、喘息、線維性疾患(肝硬変を含む)、肺

50

線維症、ならびにUVによる損傷及び乾癬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0228】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、慢性炎症性の疾患または障害の治療の一部であり得る。慢性炎症は、上記の疾患の多くに関連する消耗性かつ重篤な状態であり、感染部位または損傷部位での持続的な炎症、または原因不明の持続的な炎症、または自己免疫疾患における免疫応答の変化に関連する持続的な炎症を特徴とする。

【0229】

したがって、一実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、慢性炎症状態の治療に使用され、この状態は、不適切な炎症に関連する任意の状態と関連する。そのような状態としては、関節リウマチ(RA)、自己免疫状態、炎症性腸疾患、治癒しない創傷、多発性硬化症、がん、アテローム性動脈硬化症、血管炎、シェーグレン病、糖尿病、紅斑性ループス(全身性エリテマトーデスを含む)、喘息、線維性疾患(肝硬変を含む)、肺線維症、UVによる損傷、及び乾癬が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0230】

特定の実施形態では、CD39標的化好酸球枯渇剤は、体軸性脊椎関節症、原発性胆汁性胆管炎、及びアレルギー、例えば、ピーナッツアレルギーなどの食物アレルギー、または花粉アレルギーから選択される状態の治療に使用される。

【0231】

本発明によるCD39標的化好酸球枯渇剤は、炎症性または閉塞性気道疾患の治療に有用であり、例えば、組織損傷、気道炎症、気管支過反応性、リモデリング、または疾患の進行の低減をもたらす。本発明が適用可能である炎症性または閉塞性気道疾患としては、内因性(非アレルギー性)喘息と外因性(アレルギー性)喘息の両方、軽度喘息、中等度喘息、重度喘息、気管支喘息、運動誘発性喘息、職業喘息、及び細菌感染後に誘発される喘息を含む、あらゆる種類または起源の喘息が挙げられる。喘息の治療はまた、喘息の治療は、喘鳴の症状を示し、主要な医学的関心対象の確立された患者カテゴリーである「喘鳴を伴う乳児」として診断されたまたは診断可能であるが、現在では、発作性または初期段階の喘息として特定されることが多い対象、例えば4歳未満または5歳未満の対象の治療を包含する。

20

【0232】

喘息の治療における予防効果は、症候性発作、例えば、急性喘息発作または気管支収縮発作の頻度または重症度の減少、肺機能の改善、または気道過反応性の改善によって証明される。さらに、他の対症療法、例えば、症候性発作が生じた場合にそれを制限するかまたは中止することを意図した療法、例えば抗炎症療法または気管支拡張療法に対する必要性の減少によって証明され得る。喘息の予防効果は、特に、「モーニングディップ」をする傾向のある対象において明らかであり得る。「モーニングディップ」とは、認識されている喘息症候群であり、かなりの割合の喘息患者に共通し、例えば約4~6時間の間、すなわち、通常は以前に投与された症候性喘息治療から実質的に離れた時間の喘息発作を特徴とする。

30

【0233】

本発明のCD39標的化好酸球枯渇剤は、急性肺損傷(ALI)、成人/急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、慢性気管支炎またはそれに関連する呼吸困難を含む、慢性の閉塞性肺、気道または肺疾患(COPD、COADまたはCOLD)、肺腫、ならびに他の薬物療法、特に他の吸入薬物療法に起因する気道過反応性の増悪を含む、本発明が適用可能である他の炎症性または閉塞性の気道の疾患及び状態に使用することができる。本発明はまた、急性、アラキジン酸性、カタル性、クループ性、慢性または結核性気管支炎を含むがこれらに限定されない、あらゆるタイプまたは原因の気管支炎の治療に適用可能である。本発明が適用可能であるさらなる炎症性または閉塞性気道疾患としては、アルミノシス、炭疽病、石綿肺、霰粒腫、粟粒腫、鉄沈着症、珪肺症、タバコ病、綿肺症など、あらゆる種類や原因の塵肺症(慢性または急性の気道閉塞を伴うことが多く、粉塵を繰り返し吸入することで起こる、一般的に職業性の肺の炎症性疾患)が挙げられる。

40

50

【0234】

それらの抗炎症活性に関して、特に好酸球活性の阻害に関して、本発明のCD39標的化好酸球枯渇剤は、好酸球関連の障害、例えば好酸球増多症、特に、好酸球関連の気道の障害（例えば、肺組織の病的な好酸球浸潤を伴う）の治療にも有用であり、これには気道及び／または肺に影響を及ぼす好酸球増多症、ならびに例えば、レフラー症候群の結果としてまたは同時に生じる気道の好酸球関連障害、好酸球性肺炎、寄生虫（特に後生動物）感染（熱帯性好酸球増多症を含む）、気管支肺アスペルギルス症、結節性多発動脈炎（チャーグーストラウス症候群を含む）、好酸球性肉芽腫、及び薬物反応によって引き起こされる気道に影響を及ぼす好酸球関連障害が含まれる。

【0235】

本発明のCD39標的化好酸球枯渇剤はまた、皮膚の炎症状態またはアレルギー状態、例えば、乾癬、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、紅斑、ヘルペス性皮膚炎、強皮症、白斑、過敏性血管炎、蕁麻疹、水疱性天疱瘡、紅斑性ループス、全身性エリテマトーデス、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、傍腫瘍性天疱瘡、水疱性表皮、尋常性座瘡、及びその他の皮膚の炎症またはアレルギー状態の治療において有用である。

【0236】

本発明のCD39標的化好酸球枯渇剤はまた、炎症性要素を有する疾患または状態、例えば、眼アレルギー、結膜炎、乾性角結膜炎、及び春季カタルなどの眼の疾患及び状態、自己免疫反応が関与している、または自己免疫の要素または病因を持つ炎症性疾患（自己免疫性血液疾患（例えば、溶血性貧血、再生不良性貧血、赤血球貧血、特発性血小板減少症）を含む、アレルギー性鼻炎を含む鼻に影響を及ぼす疾患、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性軟骨炎、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、重症筋無力症、スティーブーン・ジョンソン症候群、特発性スプルー、自己免疫性炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎及びクローン病）、過敏性腸症候群、セリアック病、歯周炎、硝子膜疾患、腎臓病、糸球体疾患、アルコール性肝疾患、多発性硬化症、内分泌眼症、バセドウ病、サルコイドーシス、肺炎、慢性過敏性肺炎、多発性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、ぶどう膜炎（前部及び後部）、シェーグレン症候群、乾性角結膜炎及び春季カタル、間質性肺線維症、乾癬性関節炎、全身性若年性特発性関節炎、クリオピリン関連周期性症候群、腎炎、血管炎、憩室炎、間質性膀胱炎、糸球体腎炎（ネフローゼ症候群を伴うかまたは伴わない、特発性ネフローゼ症候群または微小変化腎症を含む）、慢性肉芽腫症、子宮内膜症、レプトスピラ症、腎疾患、緑内障、網膜疾患、老化、頭痛、疼痛、複合性局所疼痛症候群、心肥大、筋萎縮、異化障害、肥満、胎児発育遅延、高コレステロール血症、心臓病、慢性心不全、中皮腫、無汗性外胚葉異形成症、ベーチェット病、色素失調症、パジェット病、脾炎、遺伝性周期熱症候群、喘息（アレルギー性及び非アレルギー性、軽度、中等度、重度、気管支炎性、運動誘発性）、急性肺障害、急性呼吸窮迫症候群、好酸球増多症、過敏症、アナフィラキシー、副鼻腔炎、眼アレルギー、シリカ誘発性疾患、COPD（損傷の軽減、気道炎症、気管支過敏症、リモデリングまたは疾患進行）、肺疾患、嚢胞性線維症、酸誘発性肺障害、肺高血圧症、多発性神経障害、白内障、全身性強皮症に伴う筋炎、封入体筋炎、重症筋無力症、甲状腺炎、アジソン病、扁平苔癬、1型糖尿病または2型糖尿病、虫垂炎、アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー、眼瞼炎、細気管支炎、気管支炎、滑液包炎、子宮頸管炎、胆管炎、胆嚢炎、慢性移植片拒絶反応、大腸炎、結膜炎、クローン病、膀胱炎、涙腺炎、皮膚炎、皮膚筋炎、脳炎、心内膜炎、子宮内膜炎、腸炎、腸炎、上顎炎、精巣上体炎、筋膜炎、線維症、胃炎、胃腸炎、ヘノッホーシェーライン紫斑病、肝炎、化膿性汗腺炎、免疫グロブリンA腎症、間質性肺疾患、喉頭炎、乳房炎、髄膜炎、脊髄炎、心筋炎、筋炎、腎炎、卵巣炎、睾丸炎、骨炎、中耳炎、脾炎、耳下腺炎、心膜炎、腹膜炎、咽頭炎、胸膜炎、静脈炎、肺炎、肺炎、多発性筋炎、直腸炎、前立腺炎、腎盂腎炎、鼻炎、卵管炎、副鼻腔炎、口内炎、滑膜炎、腱炎、扁桃炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、膣炎、血管炎、または外陰炎などの、他の疾患または状態の治療に使用することができる。

【0237】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に従って治療され得る炎症性疾患は、皮膚の疾患である。いくつかの実施形態では、皮膚の炎症性疾患は、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、多形紅斑、疱疹状皮膚炎、強皮症、白斑、過敏性血管炎、蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、後天性表皮水疱症、及び皮膚の他の炎症性またはアレルギー性疾患から選択される。

【0238】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に従って治療され得る炎症性疾患は、急性及び慢性痛風、慢性痛風性関節炎、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、若年性リウマチ性関節炎、全身性若年性特発性関節炎（S J I A）、クリオピリン関連周期性症候群（C A P S）、及び骨関節炎から選択される。

【0239】

特定の実施形態では、本発明のCD39標的化好酸球枯渇剤は、ICI治療及び／または抗マラリア剤（例えば、ピリメタミン及びダブソン）、ペニシリン、グリコペプチド、セファロポリン、スルホンアミド、テトラサイクリン（特にミノサイクリン）、ニトロフラントイン、抗結核療法、ACE阻害剤、トリプトファン、抗けいれん剤（例えば、フェニトイン、カルバマゼピン、及びフェノバルビトン）、NSAID、金、H₂受容体拮抗薬、プロトンポンプ阻害剤、アミノサリチル酸塩、及びクロルプロパミドを含むがこれらに限定されない他の薬物に続発する好酸球性喘息及び過好酸球性障害などの薬物誘発性好酸球増多症の治療に使用できる。

【0240】

本発明は、CD39標的化好酸球枯渇剤、例えば本明細書に記載の抗CD39抗体を含む組成物を提供する。本発明はまた、本明細書に記載の抗CD39抗体と薬学的に許容されるビヒクルとを含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、免疫療法での使用が見出されている。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、炎症性疾患及び／または自己免疫疾患で使用される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、ヒト患者の治療で使用される。

【0241】

製剤は、本発明に包含される精製された薬剤を薬学的に許容されるビヒクル（例えば、担体または賦形剤）と組み合わせることによって、貯蔵及び使用のために調製される。当業者は、一般に、薬学的に許容される担体、賦形剤、及び／または安定剤を、製剤または医薬組成物の不活性成分であるとみなす。

【0242】

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、凍結乾燥され、及び／または凍結乾燥された形態で保存される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗CD39抗体を含む製剤は、凍結乾燥される。

【0243】

好適な薬学的に許容されるビヒクルとしては、非毒性緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸；塩、例えば、塩化ナトリウム；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド（約10アミノ酸残基未満）；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンなどの炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び非イオン性界面活性、例えば、TWEENまたはポリエチレングリコール（PEG）が挙げられるが、これらに

10

20

30

40

50

限定されない。(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22. sup. nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.)。

【0244】

本発明に包含される医薬組成物は、局所的または全身的治療のいずれかのために任意の数の方法で投与することができる。投与は、表皮または経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴薬、坐剤、スプレー、液体及び粉末によって局所的；ネブライザー、気管内、及び鼻腔内など、粉末またはエアロゾルの吸入または吹送による肺；経口；または、静脈内、動脈内、洞内、皮下、腹腔内、筋肉内（例えば、注射または注入）、もしくは頭蓋内（例えば、髄腔内または脳室内）などの非経口であってよい。

10

【0245】

治療用製剤は、単位剤形にすることができる。そのような製剤としては、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、顆粒、水または非水性媒体中の溶液もしくは懸濁液、または坐剤が含まれる。錠剤などの固形組成物では、主要な活性成分が医薬担体と混合される。標準的な打錠用成分としては、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸ニカルシウムまたはガム、及び希釈剤（例えば、水）が挙げられる。これらを使用して、本発明に包含される化合物の均質な混合物、またはその非毒性の薬学的に許容される塩を含む固形予備処方組成物を形成することができる。次に、固形予備処方組成物は、上記のタイプの単位剤形に細分割される。製剤または組成物の錠剤または丸剤などをコーティングまたは他の方法で調合して、長期作用の利点をもたらす剤形を提供することができる。例えば、錠剤または丸剤は、外側の構成成分によって覆われている内側の組成物を含むことができる。さらに、2つの構成成分は、腸管層によって分離され得、これにより、崩壊に抵抗するように機能し、内側構成成分が無傷で胃内を通過するか、または放出を遅延させることができるようにする。さまざまな物質がそのような腸溶性層またはコーティングとして利用することができ、そのような物質としては、多数のポリマー酸、及びシェラック、セチルアルコール、及び酢酸セルロース等の物質とのポリマー酸の混合物が挙げられる。

20

【0246】

抗CD39抗体は、マイクロカプセルに封入することもできる。そのようなマイクロカプセルは、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22. sup. nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press, Londonに記載のとおり、例えば、コアセルベーション技法によって、または界面重合によって、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）中またはマクロエマルジョン中に調製される。

30

【0247】

特定の実施形態では、医薬製剤は、リポソームと複合体を形成した抗CD39抗体を含む。リポソームを産生する方法は、当業者に公知である。例えば、一部のリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物での逆相蒸発により生成され得る。リポソームは、所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームを得ることができる。

40

【0248】

特定の実施形態では、抗CD39抗体を含む徐放性製剤を産生することができる。持続放出製剤の適切な例には、抗CD39抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、マトリックスは、成形品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラ

50

クチド、Ｌ－グルタミン酸及び７エチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニル、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア）などの分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、イソ酪酸酢酸スクロース、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【０２４９】

特定の実施形態では、抗ＣＤ３９抗体を投与することに加えて、方法または治療は、少なくとも１つの追加の免疫応答刺激剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、追加の免疫応答刺激剤としては、コロニー刺激因子（例えば、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ））、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ２、ＩＬ－３、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８）、チェックポイント阻害剤、免疫抑制機能を遮断する抗体（例えば、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＣＤ２８抗体、抗ＣＤ３抗体）、ｔｏｌｌ様受容体（例えば、ＴＬＲ４、ＴＬＲ７、ＴＬＲ９）、またはＢ７ファミリーのメンバー（例えば、ＣＤ８０、ＣＤ８６）が挙げられるが、これらに限定されない。追加の免疫応答刺激剤は、抗ＣＤ３９抗体の投与の前、同時、及び／または後に投与することができる。抗ＣＤ３９抗体と免疫応答刺激剤（複数可）とを含む医薬組成物も提供される。いくつかの実施形態では、免疫応答刺激剤は、１、２、３、またはそれ以上の免疫応答刺激剤を含む。

10

【０２５０】

特定の実施形態では、抗ＣＤ３９抗体を投与することに加えて、方法または治療は、少なくとも１つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。追加の治療剤は、抗ＣＤ３９抗体の投与の前、同時、及び／または後に投与することができる。抗ＣＤ３９抗体と追加の治療剤（複数可）とを含む医薬組成物も提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加の治療剤は、１、２、３、またはそれ以上の追加の治療剤を含む。

20

【０２５１】

２つ以上の治療剤との組み合わせ療法では、必須ではないが、多くの場合、異なる作用機序で作用する薬剤を使用する。異なる作用機序を有する薬剤を使用する組み合わせ療法は、相加効果または相乗効果をもたらし得る。組み合わせ療法では、単剤療法で使用されるよりも低用量のそれぞれの薬剤が可能になり、それにより、毒性の副作用を低減し、及び／または抗ＣＤ３９抗体の治療指数を増加させ得る。いくつかの実施形態では、組み合わせ療法は、免疫活性化を阻害するか、または免疫刺激シグナルを阻害するか、または炎症による損傷の部位における正常な組織再生を促進する薬剤であり得る治療剤を含む。

30

【０２５２】

特定の実施形態では、本発明は、炎症性の疾患、障害、または状態を治療する方法であって、ＣＤ３９標的化好酸球枯渇剤と１つ以上の追加の治療剤とをそれを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。このような追加の治療剤は、小分子または組換え生物学的薬剤であり得、例えば、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤＳ）、例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、エトドラク（Ｌodine（登録商標））及びセレコキシブ、コルヒチン（Colcrys（登録商標））、コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾンなど、プロベネシド、アロプリノール、フェブキソスタット（Uoric（登録商標））、スルファサラジン（Azulfidine（登録商標））、抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン（Plaquenil（登録商標））及びクロロキン（Aralen（登録商標））、メトトレキサート（Rheumatrex（登録商標））、金塩、例えば、金チオグルコース（Solganal（登録商標））、金チオリンゴ酸塩（Myochrysine（登録商標））、及びオーラノフィン（Ridaura（登録商標））、Ｄ－ペニシラミン（Depen（登録商標））またはCuprimine（登録商標））、アザチオプリン（Imuran（登録商標））、シクロホスファミド（Cyttoxan（登録商標））、クロラムブシル（Leukeran（登録商標））、シ

40

50

クロスボリン (Sandimmune (登録商標))、レフルノミド (Arava (登録商標))、及び「抗TNF」剤、例えば、エタネルセプト (Enbrel (登録商標))、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、ゴリムマブ (Simponi (登録商標))、セルトリズマブペゴル (Cimzia (登録商標)) 及びアダリムマブ (Humira (登録商標))、「抗IL-1」剤、例えば、アナキンラ (Kineret (登録商標)) 及びリロナセプト (Arcalyst (登録商標))、カナキヌマブ (Ilaris (登録商標))、「抗Jak」阻害剤、例えば、トファシチニブ、抗体、例えば、リツキシマブ (Rituxan (登録商標))、「抗T細胞」剤、例えば、アバタセプト (Orencia (登録商標))、「抗IL-6」剤、例えば、トシリズマブ (Actemra (登録商標))、ジクロフェナク、コルチゾン、ヒアルロン酸 (Synvisc (登録商標) または Hyalgan (登録商標))、モノクローナル抗体、例えば、タネズマブ、抗凝固剤、例えば、ヘパリン (Calciparine (登録商標)) Liquaemin (登録商標) 及びワルファリン (Coumadin (登録商標))、下痢止め剤、例えば、ジフェノキシレート (Lomotil (登録商標)) 及びロペラミド (Imodium (登録商標))、胆汁酸結合剤、例えば、コレステラミン、アロトロン (Lotronex (登録商標))、ルビプロストン (Amitiza (登録商標))、下剤、例えば Milk of Magnesia、ポリエチレングリコール (MiraLax (登録商標))、Dulcolax (登録商標)、及び Seconcot (登録商標)、抗コリン作用薬または抗痙攣薬、例えば、ジシクロミン (Bentyl (登録商標))、Singulair (登録商標)、ベータ2アゴニスト、例えば、アルブテロール (Ventolin (登録商標) HFA、Proventil (登録商標) HFA)、レバルブテロール (Xopenex (登録商標))、メタプロテレノール (Alupent (登録商標))、酢酸ビルブテロール (Maxair (登録商標))、硫酸テルブタリン (Brethaire (登録商標))、キシナギ酸サルメロール (Serevent (登録商標)) 及びホルモテロール (Foradil (登録商標))、抗コリン作用剤、例えば、臭化イプラトロピウム (Atrovent (登録商標)) 及びチオトロピウム (Spiriva (登録商標))、吸入コルチコステロイド、例えばニプロピオン酸ベクロメタゾン (Beclovent (登録商標))、Qvar (登録商標)、及び Vanceril (登録商標))、トリアムシノロンアセトニド (Azmacort (登録商標))、モメタゾン (Asthmanex (登録商標))、ブデソニド (Pulmocort (登録商標))、及びフルニゾリド (Aerobid (登録商標))、Afviar (登録商標)、Symbicort (登録商標)、Dulera (登録商標)、クロモリンナトリウム (Intal (登録商標))、メチルキサンチン、例えば、テオフィリン (Theo-Dur (登録商標))、Theolair (登録商標)、Slo-bid t、Uniphyll (登録商標)、Theo-24 (登録商標))、及びアミノフィリン、IgE抗体、例えば、オマリズマブ (Xolair (登録商標))、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、例えば、ジドブジン (レトロビル (登録商標))、アバカビル (Ziagen (登録商標))、アバカビル／ラミブジン (Epzicom (登録商標))、アバカビル／ラミブジン／ジドブジン (Trizivir (登録商標))、ジダノシン (Videx (登録商標))、エムトリシタビン (Emtriva (登録商標))、ラミブジン (Epivir (登録商標))、ラミブジン／ジドブジン (Combivir (登録商標))、スタブジン (Zerit (登録商標))、及びザルシタビン (Hivid (登録商標))、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、例えば、デラビルジン (Rescriptor (登録商標))、エフェビレンツ (Sustiva (登録商標))、ネバイラピン (Viramune (登録商標))、及びエトラビリン (Intelence (登録商標))、ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤、例えば、テノフォビル (Viread (登録商標))、アンプレナビル (Agenerase (登録商標)) 等のプロテアーゼ阻害剤、アタザナビル (Reyataz (登録商標))、ダルナビル (Prezista (登録商標))、ホサンプレナビル (Lexiva (登録商標))、インジナビル (Crivivan (登録商標))、ロピナビル 及びリトナビル (Kaletra (登録商標))、ネルフィナビル (Viracept (

10

20

30

40

50

登録商標))、リトナビル (Norvir (登録商標))、サビキナビル (Fortovase (登録商標) または Invirase (登録商標))、及びチプラナビル (Aptivus (登録商標))、進入阻害剤、例えば、エンフビルチド (Fuzeon (登録商標))、及びマラビロク (Selzentry (登録商標))、インテグラーゼ阻害剤、例えば、ラルテグラビル (Isenpress (登録商標))、ドキソルビシン (ヒドロダウノルビシン (登録商標))、ピンクリスチン (オンコピン (登録商標))、ボルテゾミブ (Velcade (登録商標))、及レナリドマイド (Revlimid (登録商標))と組み合わせたビデキサメタゾン (Decadron (登録商標))、またはそれらの任意の組み合わせ (複数可) が挙げられる。

【0253】

別の実施形態では、本発明は、痛風を治療する方法であって、CD39 標的化好酸球枯渇剤と、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDS)、例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、エトドラク (Lodine (登録商標)) 及びセレコキシブ、コルヒチン (Colcrys (登録商標))、コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾンなど、プロベネシド、アロプリノール、及びフェブキソスタット (Uloric (登録商標)) から選択される1つ以上の追加の治療剤とをそれを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

【0254】

別の実施形態では、本発明は、関節リウマチを治療する方法であって、CD39 標的化好酸球枯渇剤と、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDS)、例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、エトドラク (Lodine (登録商標)) 及びセレコキシブ、コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、スルファサラジン (Azaulfidine (登録商標))、抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン (Plaquenil (登録商標)) 及びクロロキン (Aralen (登録商標)) など、メトトレキサート (Rheumatrex (登録商標))、金塩、例えば、金チオグルコース (Solganal (登録商標))、金チオリンゴ酸塩 (Myochrysine (登録商標))、及びオーラノフィン (Ridaura (登録商標))、D-ペニシラミン (Depen (登録商標) または Cuprimine (登録商標))、アザチオプリン (Imuran (登録商標))、シクロホスファミド (Cytosan (登録商標))、クロラムブシル (Leukeran (登録商標))、シクロスポリン (Sandimmune (登録商標))、レフルノミド (Arava (登録商標))、及び「抗TNF」剤、例えば、エタネルセプト (Enbrel (登録商標))、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、ゴリムマブ (Simponi (登録商標))、セルトリズマブベゴル (Cimzia (登録商標)) 及びアダリムマブ (Humira (登録商標))、「抗IL-1」剤、例えば、アナキンラ (Kinerekt (登録商標)) 及びリロナセプト (Arcalyst (登録商標))、抗体、例えば、リツキシマブ (Rituxan (登録商標))、「抗T細胞」剤、例えば、アバタセプト (Orencia (登録商標))、及び「抗IL-6」剤、例えば、トシリズマブ (Actemra (登録商標)) から選択される1つ以上の追加の治療剤とを、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

【0255】

いくつかの実施形態では、本発明は、骨関節炎を治療する方法であって、CD39 標的化好酸球枯渇剤と、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDS)、例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、エトドラク (Lodine (登録商標)) 及びセレコキシブ、ジクロフェナク、コルチゾン、ヒアルロン酸 (Synvisc (登録商標) または Hyalgan (登録商標))、及びモノクローナル抗体、例えば、タネズマブから選択される1つ以上の追加の治療剤とを、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

【0256】

いくつかの実施形態では、本発明は、ループスを治療する方法であって、CD39 標的

10

20

30

40

50

化好酸球枯渴剤と、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）、例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、エトドラク（Lodine（登録商標））及びセレコキシブ、コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾンなど、抗炎症剤、例えば、ヒドロキシクロキン（Plaquenil（登録商標））及びクロロキン（Alalen（登録商標））、シクロホスファミド（Cytosan（登録商標））、メトトレキサート（Rheumatrex（登録商標））、アザチオプリン（Imuran（登録商標））、及び抗凝固剤、例えば、ヘパリン（Calciparine（登録商標））及びLiquaemin（登録商標）、ワルファリン（Coumadin（登録商標））から選択される1つ以上の追加の治療剤とを、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

【0257】

10

いくつかの実施形態では、本発明は、炎症性腸疾患を治療する方法であって、CD39標的化好酸球枯渴剤と、メサラミン（Asacol（登録商標））スルファサラジン（Azulfidine（登録商標））、下痢止め剤、例えば、ジフェノキシレート（Lomotil（登録商標））及びロペラミド（Imodium（登録商標））、胆汁酸結合剤、例えば、コレスチラミン、アロトロン（Lotronex（登録商標））、ルビプロストン（Amitiza（登録商標））、下剤、例えば、Milk of Magnesia、ポリエチレングリコール（Miralax（登録商標））、Dulcolax（登録商標）、及びSeconcot（登録商標）、抗コリン作用薬または抗痙攣薬、例えば、ジシクロミン（Bentyl（登録商標））、抗TNF療法、ステロイド、及び抗生物質、例えば、フラジルまたはシプロフロキサシンから選択される1つ以上の追加の治療剤とを、それを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。

20

【0258】

いくつかの実施形態では、本発明は、喘息を治療する方法であって、CD39標的化好酸球枯渴剤と、Singulair（登録商標）、ベータ2アゴニスト、例えば、アルブテロール（Ventolin（登録商標）HFA、Proventil（登録商標）HFA）、レバルブテロール（Xopenex（登録商標））、メタプロテレノール（Alupent（登録商標））、酢酸ピルブテロール（Maxair（登録商標））、硫酸テルブタリン（Brethaire（登録商標））、キシナギ酸サルメロール（Serevent（登録商標））及びホルモテロール（Foradil（登録商標））、抗コリン作用剤、例えば、臭化イプラトロピウム（Atrovent（登録商標））及びチオトロピウム（Spiriva（登録商標））、吸入コルチコステロイド、例えばニプロピオン酸ベクロメタゾン（Beclovent（登録商標））、Qvar（登録商標）、及びVancerial（登録商標）、トリアムシノロンアセトニド（Azmacort（登録商標））、モメタゾン（Asthmanex（登録商標））、ブデソニド（Pulmocort（登録商標））、及びフルニゾリド（Aerobid（登録商標））、Afviar（登録商標）、Symbicort（登録商標）、Dulera（登録商標）、クロモリンナトリウム（Intal（登録商標））、メチルキサンチン、例えば、テオフィリン（Theo-Dur（登録商標））、Theolair（登録商標）、Slo-bid、Uniphyll（登録商標）、Theo-24（登録商標）、及びアミノフィリン、及びIgE抗体、例えば、オマリズマブ（Xolair（登録商標））から選択される1つ以上の追加の治療剤とを、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

30

40

【0259】

いくつかの実施形態では、本発明は、COPDを治療する方法であって、CD39標的化好酸球枯渴剤と、ベータ2アゴニスト、例えば、アルブテロール（Ventolin（登録商標）HFA、Proventil（登録商標）HFA）、レバルブテロール（Xopenex（登録商標））、メタプロテレノール（Alupent（登録商標））、酢酸ピルブテロール（Maxair（登録商標））、硫酸テルブタリン（Brethaire（登録商標））、キシナギ酸サルメロール（Serevent（登録商標））及びホルモ

50

テロール (Foradil (登録商標))、抗コリン作用剤、例えば、臭化イプラトロピウム (Atrovent (登録商標)) 及びチオトロピウム (Spiriva (登録商標))、メチルキサンチン、例えば、テオフィリン (Theo-Dur (登録商標)、Theolair (登録商標)、Slo-bidit、Uniphyll (登録商標)、Theo-24 (登録商標))、及びアミノフィリン、吸入コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ニプロピオン酸ベクロメタゾン (Beclivent (登録商標)、Qvar (登録商標)、及び Vanceril (登録商標))、トリアムシノロンアセトニド (Azmacort (登録商標))、モメタゾン (Asthmanex (登録商標))、ブデソニド (Pulmocort (登録商標))、フルニゾリド (Aerobid (登録商標))、Afviar (登録商標)、Symbicort (登録商標)、及び Dulera (登録商標) から選択される 1 つ以上の追加の治療剤とを、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

10

【0260】

疾患の治療のために、抗 CD39 抗体の適切な投与量は、治療される疾患の種類、その疾患の重症度及び経過、疾患の応答性、抗 CD39 抗体が治療目的または予防目的で投与されるか否か、これまでの治療法、患者の臨床歴などすべて、治療を行う主治医の判断に依る。抗 CD39 抗体は、1 回または数日から数ヶ月続く一連の治療にわたって、または治癒がもたらされるか、病状の縮小が達成されるまで投与することができる。最適な投与スケジュールは、患者の身体内での薬物蓄積の測定値から計算でき、個々の薬剤の相対的な効力によって異なるであろう。投与する医師は、最適な投与量、投与方法、及び繰り返し率を決定することができる。特定の実施形態では、投与量は、 $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.01 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.01 \text{mg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.01 \text{mg} \sim 50 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.01 \text{mg} \sim 25 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.01 \text{mg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.01 \text{mg} \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \text{mg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \text{mg} \sim 50 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \text{mg} \sim 25 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \text{mg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $0.1 \text{mg} \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $1 \text{mg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $1 \text{mg} \sim 50 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $1 \text{mg} \sim 25 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $1 \text{mg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、または $1 \text{mg} \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。特定の実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.01 \text{mg} \sim$ 約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.01 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。

20

30

【0261】

いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.025 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.05 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.1 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.25 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $1 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $1.5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $2 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $2.5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $7.5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、抗 CD39 抗体の投与量は、約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。いくつかの実施形態では、投与量は、本明細書に記載の投与量によって境界が定められた範囲、例えば、 $0.025 \text{mg} / \text{kg} \sim 25 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、またはその間の任意の範囲、例えば、 $2 \sim 25 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、 $5 \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ などである。特定の実施形態では、投与量は、1 日 1 回以上、1 週間に 3 回、1 週間に 2 回、1 週間に 1 回、1 か月に 1 回、ま

40

50

たは1年間に1回投与することができる。特定の実施形態では、抗CD39抗体は、1週間に1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、または4週間ごとに1回投与される。

【0262】

いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、初回よりも高い「負荷」用量で投与されてもよく、1回以上のより低い用量が続けて投与されてもよい。いくつかの実施形態では、投与の頻度もまた変動してもよい。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、初期用量を投与し、その後、1週間に1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、または1か月ごとに1回、追加の用量（または「維持」用量）を投与することを含み得る。例えば、投与レジメンは、初期負荷用量を投与し、その後、例えば、初期用量の半分の維持用量を毎週投与することを含み得る。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、初期負荷用量を投与し、その後、例えば初期用量の半分の維持用量を1週間おきに投与することを含み得る。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、3週間に3回の初期用量を投与し、その後、例えば同じ量の維持用量を1週間おきに投与することを含み得る。

10

【0263】

当業者に公知であるとおり、任意の治療剤の投与は、副作用及び／または毒性をもたし得る。場合によっては、副作用及び／または毒性が非常に深刻であるため、治療的有効用量での特定の剤の投与が不可能になる。場合によっては、薬物療法を中止する必要がある、他の薬剤を試す場合がある。しかしながら、同じ治療クラスの多くの薬剤は、多くの場合、同様の副作用及び／または毒性を示す。これは、患者は治療を中止する必要があるか、または、可能ならば治療剤に関連する不快な副作用を受けることを意味する。

20

【0264】

いくつかの実施形態では、投与スケジュールは、特定の数の投与または「サイクル」に限定され得る。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のサイクルで投与される。例えば、抗CD39抗体は、2週間ごとに6サイクル投与される、抗CD39抗体は、3週間ごとに6サイクル投与される、抗CD39抗体は、2週間ごとに4サイクル投与される、抗CD39抗体は、3週間ごとに4サイクル投与される。投与スケジュールは、当業者によって決定され、その後変更され得る。

【0265】

したがって、本発明は、本明細書に記載の抗CD39抗体を対象に投与する方法であって、抗CD39抗体、抗炎症剤などの投与に関連する副作用及び／または毒性を低減し得る1つ以上の薬剤を投与するための断続的投与戦略を使用することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、ヒト対象における望まれない好酸球活性に関連する疾患または状態を治療する方法であって、治療有効用量の抗CD39抗体を、治療有効用量の抗炎症剤と組み合わせて対象に投与することを含み、薬剤のうちの1つまたは両方が、断続的な投与戦略に従って投与される、方法を提供する。いくつかの実施形態では、断続的投与戦略は、対象に抗CD39抗体の初期用量を投与することと、約2週間ごとに1回、抗CD39抗体のその後の用量を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、断続的投与戦略は、対象に抗CD39抗体の初期用量を投与することと、約3週間ごとに1回、抗CD39抗体のその後の用量を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、断続的投与戦略は、対象に抗CD39抗体の初期用量を投与することと、約4週間ごとに1回、抗CD39抗体のその後の用量を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、断続的投与戦略を使用して投与され、抗炎症剤は、毎週投与される。

30

40

【0266】

VII. 抗CD39抗体複合体

本明細書に開示の抗CD39抗体はまた、細胞毒性部分にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される二重特異性抗CD39抗体は、特異性をさらに改善するために細胞毒性部分にコンジュゲートされる。

【0267】

特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD3

50

9 抗体) は、細胞毒性部分にコンジュゲートまたは会合する抗体の内在化によって、CD 39 発現細胞 (例えば、好酸球) において細胞毒性を誘導することができる。細胞毒性部分は、例えば、タキソール; サイトカラシン B; グラミシジン D; 臭化エチジウム; エメチン; マイトマイシン; エトポシド; テノポシド; ビンクリスチン; ビンブラスチン; コルヒチン; ドキソルビシン; ダウノルビシン; ジヒドロキシアントラシンジオン; チューブリン阻害剤、例えば、メイタンシンまたはその類似体もしくは誘導体; 有糸分裂阻害剤、例えばモノメチルアウリスタチン E または F またはその類似体もしくは誘導体; ドラスタチン 10 もしくは 15 またはその類似体; イリノテカンまたはその類似体; ミトキサントロン; ミトラマイシン; アクチノマイシン D; 1-デヒドロテストステロン; 糖質コルチコイド; プロカイン; テトラカイン; リドカイン; プロプラノロール; ピューロマイシン; カリケアマイシンまたはその類似体もしくは誘導体; 代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサート、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、またはクラドリビン; アルキル化剤、例えば、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシン C; 白金誘導体、例えば、シスプラチンまたはカルボプラチン; デュオカルマイシン A、デュオカルマイシン SA、ラケルマイシン (CC-1065)、またはその類似体もしくは誘導体; 抗生物質、例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン (AMC); ピロロ [2, 1-c] [1, 4]-ベンゾジアゼピン (PDB); ジフテリア毒素及びその関連分子、例えば、ジフテリア A 鎖及びその活性断片及びハイブリッド分子、リシン A または脱グリコシル化リシン A 鎖毒素などのリシン毒素、コレラ毒素、志賀毒素様毒素、例えば、SLTI、SLT II、SLT IIV、LT 毒素、C3 毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆ボーマン-バークプロテアーゼ阻害剤、緑膿菌外毒素、アロリン、サポリン、モデシン、ゲラニン、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、アルファサルシン、*Aleurites fordii* タンパク質、ジアンチンタンパク質、*Phytolacca americana* タンパク質、例えば、PAPI、PAPII、及び PAP-S、ツルレイシ阻害剤、クルシン、クロタン、*sapaonaria officinalis* 阻害剤、ジェロニン、ミトゲリン、レストリクトシン *restrictocin*、フェノマイシン、及びエノマイシン毒素; リボヌクレアーゼ (RNase); DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシン A; ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質; ジフテリア毒素; 及びシュードモナスエンドトキシンからなる群から選択されてもよい。

【0268】

一実施形態では、抗 CD 39 抗体 (例えば、本明細書に記載の二重特異性抗 CD 39 抗体) は、アウリスタチンまたはそのペプチド類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。アウリスタチンは、微小管動態、GTP 加水分解、ならびに核及び細胞分裂に干渉し (Woyke et al., 2001, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45 (12): 3580-3584)、抗がん活性 (US 5663149) 及び抗真菌活性 (Pettit et al., 1998, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42: 2961-2965) を有する。例えば、アウリスタチン E は、パラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応して、それぞれ AEB 及び AEVB を生成することができる。他の典型的なアウリスタチン誘導体としては、AFP、MMAF (モノメチルアウリスタチン F)、及び MMAE (モノメチルアウリスタチン E) が挙げられる。好適なアウリスタチン及びアウリスタチン類似体、誘導体及びプロドラッグ、ならびにアウリスタチンの Ab へのコンジュゲーションのための好適なリンカーは、例えば、米国特許第 5,635,483 号、同第 5,780,588 号、及び同第 6,214,345 号、ならびに国際特許出願公開 WO 02088172、WO 2004010957、WO 2005081711、

10

20

30

40

50

WO 2005084390、WO 2006132670、WO 03026577、WO 200700860、WO 207011968、及びWO 205082023に記載されている。

【0269】

別の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、ピロロ[2, 1-c][1, 4]-ベンゾジアゼピン（PDB）またはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。好適なPDB及びPDB誘導体、ならびに関連する技術は、例えば、Sagnou et al., 2000, Bioorg Med Chem Lett 10(18):2083-2086; Antnow et al., 2008, Cancer J 14(3):154-169; Howard et al., 2009, Bioorg Med Chem Lett 19:6463-6466; 及びHartley et al., 2010, Cancer Res 70(17):6849-6858に記載されている。

10

【0270】

別の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、アントラサイクリン、メイタンシン、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ラケルマイシン（CC-1065）、ドラスタチン10、ドラスタチン15、イリノテカン、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF、PDB、またはそれらのいずれかの類似体、誘導体、もしくはプロドラッグからなる群から選択される細胞毒性部分にコンジュゲートされる。

20

【0271】

特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、アントラサイクリンまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、マイタンシンまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、カリチアマイシンまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、デュオカルマイシンまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、ラケルマイシン（CC-1065）またはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、ドラスタチン10またはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、ドラスタチン15またはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、モノメチルアウリスタチンEまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、モノメチルアウリスタチンFまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、ピロロ[2, 1-c][1, 4]-ベンゾジアゼピンまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。別の特定の実施形態では、抗CD39抗体（例えば、本明細書に記載の二重特異性抗CD39抗体）は、イリノテカンまたはその類似体、誘導体もしくはプロドラッグにコンジュゲートされる。

30

40

【0272】

VIII. 医薬組成物

本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターは、組成物、特

50

に医薬組成物に製剤化させ得る。そのような組成物は、好適な担体、例えば、薬学的に許容される薬剤と混合して、治療有効量または予防有効量の抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターを含む。典型的には、本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターは、医薬組成物に製剤化する前に動物に投与するために十分に精製される。

【0273】

本発明の医薬組成物中で使用するための薬学的に許容される薬剤としては、担体、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、保存剤、着色剤、香味料及び希釈剤、乳化剤、懸濁剤、溶媒、充填剤、増量剤、緩衝液、送達ビヒクル、張性剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝剤、抗菌剤、ならびに界面活性剤が挙げられる。

【0274】

中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、例示的な適切な担体である。医薬組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンなどの他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；及び／またはTween、Pluronic、ポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含むことができる。また、例として、好適な張性増強剤としては、アルカリ金属ハロゲン化物（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。好適な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などが挙げられる。過酸化水素も、保存剤として使用され得る。好適な共溶媒としては、グリセリン、プロピレングリコール、及びPEGが挙げられる。好適な錯化剤としては、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルベータシクロデキストリンが挙げられる。好適な界面活性剤または湿潤剤としては、ソルビタンエステル、ポリソルベート80などのポリソルベート、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパルなどが挙げられる。緩衝液は、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、重炭酸塩、またはTris-HClなどの標準的な緩衝液であり得る。酢酸緩衝液は、約pH4～5.5であり得、Tris緩衝液は約pH7～8.5であり得る。追加の医薬剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990に記載されている。

【0275】

組成物は、液体形態または凍結乾燥もしくはフリーズドライ形態であり得、1つ以上の凍結防止剤、賦形剤、界面活性剤、高分子量構造添加剤及び／または増量剤を含み得る（例えば、米国特許第6,685,940号、同第6,566,329号、及び同第6,372,716号を参照されたい）。一実施形態では、凍結防止剤が含まれ、凍結防止剤は、糖、ラクトース、またはトレハロースなどの非還元糖である。一般に含まれる凍結防止剤の量は、再構成時に、得られる製剤が等張になるようなものであるが、高張性またはわずかに低張性の製剤も好適であり得る。さらに、凍結防止剤の量は、凍結乾燥時のタンパク質の許容できない量の分解及び／または凝集を防ぐのに十分であるものとする。予備凍結乾燥製剤中の糖（例えば、スクロース、ラクトース、トレハロース）の例示的な凍結防止剤濃度は、約10mM～約400mMである。別の実施形態では、例えば、非イオン性界面活性剤及びイオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80）；ポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）；ポリ（エチレングリコール）フェニルエーテル（例えば、Triton）；ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）；ラウリル硫酸ナトリウム；オクチルグルコシドナトリウム；ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、またはステアリル

10

20

30

40

50

スルホベタイン；ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、またはステアリルサルコシン；リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、またはセチルベタイン；ラウロアミドプロピルベタイン、コカミドプロピルベタイン、H n o l e a m i d o p r o p y l ベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、またはイソステアラミドプロピルベタイン（例えば、ラウロアミドプロピル）；ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、またはイソステアラミドプロピルジメチルアミン；メチルココイルタウレートナトリウム、またはメチルオフェイルタウレートナトリウム；ならびにMONAQUAT（商標）シリーズ（M o n a I n d u s t r i e s , I n c . , P a t e r s o n , N . J . ）、ポリエチルグリコール、ポリプロピルグリコール、及びエチレンとプロピレングリコールとのコポリマー（例えば、P l u r o n i c s 、 P F 6 8 など）などの界面活性剤が含まれる。予備凍結乾燥製剤中に存在し得る界面活性剤の例示的な量は、約0.001～0.5%である。高分子量構造添加剤（例えば、充填剤、結合剤）としては、例えば、アカシアゴム、アルブミン、アルギン酸、リン酸カルシウム（二塩基性）、セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶性セルロース、デキストラン、デキストリン、デキストレート、スクロース、タイロース、アルファ化デンプン、硫酸カルシウム、アミロース、グリシン、ベントナイト、マルトース、ソルビトール、エチルセルロース、リン酸水素ナトリウム、リン酸ナトリウム、ピロ硫酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ゼラチン、グルコース、グアーガム、液体グルコース、圧縮性糖、マグネシウムケイ酸アルミニウム、マルトデキストリン、ポリエチレンオキシド、ポリメタクリレート、ポビドン、アルギン酸ナトリウム、トラガカンス微結晶性セルロース、デンプン、及びゼインが挙げられ得る。高分子量構造添加剤の例示的な濃度は、0.1重量%～10重量%である。他の実施形態では、増量剤（例えば、マンニトール、グリシン）が含まれ得る。

10

20

30

40

50

【0276】

組成物は、非経口投与に好適であり得る。例示的な組成物は、関節内、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、脳内（脳実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、または病変内経路など、当業者が利用できる任意の経路による動物への注射または注入に好適である。非経口製剤は、典型的には、滅菌パイロジェンフリー等張水溶液であり、任意選択で薬学的に許容される保存剤を含む。

【0277】

非水性溶液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルである。水性担体としては、生理食塩水及び緩衝媒体を含む、水、アルコール／水溶液、乳剤または懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、または不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、液体及び栄養補充薬、電解質補充薬、例えば、リンゲルデキストロースに基づくものなどが挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどの保存剤及び他の添加剤も存在し得る。一般に、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., Mack Eds., 1980を参照されたい。

【0278】

本明細書に記載の医薬組成物は、産物の局所濃度（例えば、ボーラス、デポー効果）及び／または特定の局所環境における安定性または半減期の増加をもたらす様式で、徐放または持続送達のために製剤化され得る。組成物は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの高分子化合物の粒子状調製物、ならびに生分解性剤マトリックス、注射可能なミクロスフェア、マイクロカプセル粒子、マイクロカプセル、生体侵食性粒子ビーズ、リポソームなどの薬剤、及びデポー注射として送達可能な活性剤の徐放または持続放出をもたらす移植可能な送達デバイスと共に、本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、または

ベクターの製剤を含むことができる。そのような持続送達手段または徐放送達手段を製剤化するための技術が知られており、薬物の徐放放出及び送達のためにさまざまなポリマーが開発され、使用されている。このようなポリマーは、典型的には、生分解性及び生体適合性である。エナンチオマーポリマーまたはポリペプチドセグメントの複合体形成によって形成されるものなどのポリマーヒドロゲル、及び温度またはpH感受性特性を有するヒドロゲルは、生物活性タンパク質剤（例えば、抗体）の捕捉に伴う穏やかな水性条件のために、薬物デポー効果をもたらすために望ましくあり得る。例えば、PCT出願公開WO 93/15722における医薬組成物の送達のための徐放多孔質ポリマー微粒子の記載を参照されたい。

【0279】

この目的にとって好適である材料としては、ポリラクチド（例えば、米国特許第3,773,919号を参照されたい）、ポリ-D-(−)-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,988A）などのポリ-(α-ヒドロキシカルボン酸)のポリマー、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタミン酸のコポリマー（Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547-556）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 and Langer et al., 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレン酢酸ビニル、またはポリD-(~)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。他の生分解性ポリマーとしては、ポリ(ラクトン)、ポリ(アセタール)、ポリ(オルトエステル)、及びポリ(オルトカーボネート)が挙げられる。徐放性組成物はまた、当該技術分野で知られているいくつかの方法のいずれかによって調製することができるリボソームを含み得る（例えば、Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92を参照されたい）。担体自体、またはその分解産物は、標的組織において無毒であるものとし、状態をさらに悪化させてはならない。これは、標的障害の動物モデルで、またはそのようなモデルが利用できない場合は、正常な動物で、日常的なスクリーニングによって判定することができる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン-γ(rhIFN-γ)、インターロイキン-2、及びMNRgp120で成功裏に行われている（Johnson et al., 1996, Nat. Med. 2:795-799; Yasuda et al., 1993, Biomed. Ther. 27:1221-1223; Horie et al., 1990, Bio/Technology 8:755-758; Cleland et al., "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO97/03692, WO96/40072, WO96/07399; 及び米国特許第5,654,010号）。これらのタンパク質の徐放性製剤は、その生体適合性及び幅広い生分解性により、ポリ乳酸-コグリコール酸(PLGA)ポリマーを使用して開発された。PLGA、乳酸、及びグリコール酸の分解産物は、ヒトの身体中で迅速に除去され得る。さらに、このポリマーの分解性は、その分子量及び組成に依存し得る。（Lewis et al., "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41）。徐放性組成物の追加の例としては、例えば、EP58,481A、米国特許第3,887,699号、EP158,277A、カナダ特許第1176565号; Sidman et al., 1983,

10

20

30

40

50

Biopolymers 22:547; Langer et al., 1982, Chem. Tech. 12:98; Sinha et al., 2003, J. Control. Release 90:261; Zhu et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18:24; 及び Dai et al., 2005, Colloid Surf B Biointerfaces 41:117が挙げられる。

【0280】

生体接着性ポリマーはまた、本発明に包含される組成物中または組成物と共に使用することが企図されている。生体接着剤は、生物学的基質に長期間付着することができる合成及び天然に存在する材料である。例えば、カーボポールとポリカルボフィルは両方ともポリ（アクリル酸）の合成架橋誘導体である。天然に存在する基質をベースとした生体接着性送達系には、例えば、ヒアルロナンとしても知られるヒアルロン酸が含まれる。ヒアルロン酸は、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンの残基からなる天然に存在するムコ多糖である。ヒアルロン酸は、結合組織中に含まれる、脊椎動物の細胞外組織マトリックス、滑液、眼の硝子体液、及び房水中に見られる。ヒアルロン酸のエステル化誘導体は、生体適合性及び生分解性である送達において使用するためのミクロスフェアを製造するために使用されている（例えば、Cortivo et al., 1991, Biomaterials 12:727-730; 欧州公開第517, 565号; 国際公開第WO96/29998号; Ilium et al., 1994, J. Controlled Rel. 29:133-141を参照されたい）。本発明によって包含される例示的なヒアルロン酸含有組成物は、ヒアルロン酸ポリマーに対するIL-1/3結合抗体または断片の約0.1%〜約40%（w/w）の量でヒアルロン酸エステルポリマーを含む。生分解性と非生分解性の両方のポリマーマトリックスを使用して、本発明によって包含される組成物を送達することができ、かかるポリマーマトリックスは、天然または合成ポリマーを含み得る。生分解性マトリックスが好ましい。放出が起こる期間は、ポリマーの選択に基づく。典型的には、数時間、及び3ヶ月〜12ヶ月の範囲の期間にわたる放出が最も望ましい。生分解性送達系を形成するために使用できる例示的な合成ポリマーとしては、乳酸及びグリコール酸のポリマー、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリ無水物、ポリウレタン及びそれらのコポリマー、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリル及びメタクリルエステルのポリマー、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシブチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシエチルセルロース、セルローストリアセテート、セルロースサルフェートナトリウム塩、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリエチレンオキシド、ポリエチレンテレフタレート、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ならびにポリビニルピロリドンが挙げられる。例示的な天然ポリマーとしては、アルギン酸塩、及びデキストランを含む他の多糖類、及びセルロース、コラーゲン、それらの化学誘導体（化学基の置換、付加、例えば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシ化、酸化、及び当業者によって日常的に行われる他の修飾）、アルブミン及び他の親水性タンパク質、ゼイン及び他のプロラミン、ならびに疎水性タンパク質、コポリマー及びそれらの混合物が挙げられる。一般に、これらの材料は、酵素加水分解またはインビボでの水への曝露

10

20

30

40

50

、表面またはバルク侵食のいずれかによって分解される。ポリマーは、任意選択で、水中でのその重量の最大約90%を吸収することができるヒドロゲルの形態（例えば、WO 04/009664、WO 05/087201、Sawhney et al., 1993, Macromolecules 26:581-587を参照されたい）であり、さらに、任意選択で、多価イオンまたは他のポリマーで架橋される。

【0281】

送達系には、コレステロール、コレステロールエステル、及び脂肪酸などのステロール、またはモノグリセリド、ジグリセリド及びトリグリセリドなどの中性脂肪を含む脂質である非ポリマー系；ヒドロゲル放出系；シラスティック系；ペプチドベース系；ワックスコーティング；従来の結合剤及び賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分融合インプラントなども含まれる。具体例としては、（a）産物が任意の形態でマトリックス内に含まれている侵食系（米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号、及び同第5,736,152号に記載されるもの）、ならびに（b）産物がポリマーから制御された速度で浸透する拡散系（米国特許第3,854,480号、同第5,133,974号、及び同第5,407,686号に記載されるもの）が含まれるが、これらに限定されない。産物を含むリポソームは、例えば、（DE 3,218,121；Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692；Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034；EP 52,322；EP 36,676；EP 88,046；EP 143,949；EP 142,641；日本国特許公開第83-118008号；米国特許第4,485,045号、及び同第4,544,545号；及びEP 102,324）など、既知の方法で調製することができる。

【0282】

代替的にまたは追加的に、組成物は、本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターが吸収または内包される膜、スポンジ、または他の適切な材料の罹患領域への移植を介して、局所的に投与することができる。移植デバイスが使用される場合、デバイスは任意の好適な組織または器官に移植することができ、本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターの送達は、ポラスを介するまたは連続投与を介するデバイスを介して、または連続注入を使用するカテーテルを介して、直接行うことができる。

【0283】

本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターを含む医薬組成物は、例えば、乾燥粉末として、吸入用に製剤化され得る。吸入溶液は、エアロゾル送達の液化噴射剤に製剤化され得る。さらに別の製剤では、溶液を噴霧され得る。肺投与用の追加の医薬組成物としては、例えば、化学修飾されたタンパク質の肺送達を開示するPCT出願公開WO 94/20069に記載されているものが挙げられる。肺送達の場合、粒径は、遠位肺への送達に好適である必要がある。例えば、粒径は1 μ m～5 μ mであり得る。しかしながら、例えば、それぞれの粒子がかなり多孔質である場合、より大きい粒子を使用してもよい。

【0284】

本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターを含む特定の製剤は、経口投与することができる。この様式で投与される製剤は、錠剤及びカプセルなどの固形剤形の配合に慣例的に使用される担体を伴ってまたは伴わずに製剤化され得る。例えば、カプセルは、生物学的利用能が最大化され、事前の全身分解が最小化される場合、胃腸管の点で製剤の活性部分を放出するように設計することができる。選択的結合剤の吸収を容易にするために、追加の薬剤を含めることができる。希釈剤、香料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、及び結合剤も使用することができる。

【0285】

別の調製物は、錠剤の製造にとって好適である非毒性賦形剤との混合物中に、有効量の本発明に包含される抗CD39抗体、抗体断片、核酸、またはベクターを含み得る。錠剤

を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することにより、溶液を単位剤形で調製することができる。好適な賦形剤としては、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは重炭酸塩、ラクトース、またはリン酸カルシウムなどの不活性希釈剤；または、デンプン、ゼラチン、アカシアゴムなどの結合剤；またはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、もしくはタルクなどの潤滑剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0286】

IX. 例示的な材料及び方法

試薬

特に明記しない限り、すべての化学試薬はSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から、細胞培養培地は、Life Technologies (Carlsbad, CA) から、細胞培養消耗品はCELLTREAT (登録商標) Scientific Products (Shirley, MA) から、市販の抗体は、Biolegend (San Diego, CA) から購入した。二次抗体Alexa Fluor (登録商標) 488コンジュゲートAffiniPureロバ抗ヒトIgG (Fc特異的) (番号709-545-098) は、Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) から入手し、Bio-Glo (商標) (番号G7941) はPromega (Madison, WI) から入手し、2-デオキシ-2-フルオロ-ル-フコース (番号MD06089) はBIOSYNTH Carbosynth (Gardner, MA) から入手し、ヒト組換えIL-2 (番号78036.1) 及びヒト組換えIL-15 (番号78218) は、STEMCELL Technologies (Cambridge, MA) から入手した。

【0287】

抗ヒトCD39参照抗体 (hCD39 Ref) は、ExpichO (商標) Expression System Kit (番号A29133; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用した一過性トランスフェクションによって生成され、抗体配列は公開されているとおりに得た (Perrot et al., Cell Reports 27: 2411-2425 (2019))。hCD39 Ref抗体と本発明の完全ヒト抗CD39モノクローナル抗体 (PEOWT22) の両方とも、同じADCCコンピテントヒトIgG1 Fc画分を含む。hCD39 Ref抗体は、当該技術分野の抗体と抗原結合部位を共有している。しかしながら、本実施例で使用されるRef抗体とは異なり、その先行技術の抗体は、無効化されたADCC機能を有するように特別に設計されたFc部分をともなって生成された (すなわち、CD39依存性ADCC細胞殺傷を引き起こすことなく、CD39に結合してNTPase活性を阻害するように特別に生成されたと教示された)。

【0288】

細胞培養

ヒトBリンパ芽球様HCC1739BL細胞 (ATCC番号CRL-2334)、Raji細胞 (Raji-hCD39neg)、及びヒトCD39安定トランスフェクトRaji細胞 (高レベルのhCD39を発現するRaji-hCD39hi及び低レベルのhCD39を発現するRaji-hCD39lo) を、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したRPMI 1640中で培養した。ヒト黒色腫細胞 (SK-MEL-28、ATCC番号HTB-72) は、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシンを加えたEMEM中で増殖させた。ヒトナチュラルキラー細胞 (NK-92-CD16V/V) (ATCC番号PTA-6967) は、IL-2 (10 ng/ml) を含むMEM-Alpha培地で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、シングルダー、EGM (商標) -2 (Lonza番号C2517A, Basel, Switzerland) は、EGM (商標) 内皮細胞増殖培地BulletKit (Lonza番号CC-3124) 中で増殖させた。実験に使用する前に37°Cの水浴で解凍されたJurkat細胞/NFAT-luc+FcγRIIIA (Promega番号G7011) を除いて、すべての細胞株は、5% CO₂ 雰囲気、湿度100%中37°Cの培養フラスコ

で維持された。

【0289】

完全ヒト抗CD39抗体の産生、脱フコシル化、及び最適化

完全ヒト抗CD39抗体は、フコシル化阻害剤2-デオキシ-2-フルオロ-L-フコースの非存在下（PEOWT22、抗CD39抗体の親の完全フコシル化版）、または存在下（PEOAF22、抗CD39抗体の脱フコシル化版）のいずれかで、FreeStyle（商標）293-F細胞（Thermo Fisher Scientific 番号R79007）を使用する一過性トランスフェクションによって産生された。抗体ADCC活性の順位は：PEOAF22>PEOWT22である。

【0290】

最適化された対応物PEONP22及びPEO22（抗CD39抗体の脱フコシル化版）を、ADCC活性増強のために化学的に修飾した細胞培養培地を使用して、親PEOWT22プラスミドを安定的に形質移入したCHO細胞によって産生した。抗体ADCC活性の順位は：PEO22>PEONP22>PEOWT22である。

【0291】

いずれの脱フコシル化プロセスでも遺伝子改変は使用されなかった。

【0292】

NK細胞媒介性抗体依存性細胞傷害性（ADCC：NK細胞傷害性アッセイ）

HCC1739BL標的細胞は、CFSE（0.025μM）で37℃の水浴で5分間前標識した。1×PBSで2回洗浄後、細胞を、モノクローナル抗体を伴ってまたは伴わずに、4%超低IgG FBS（Thermo Fisher Scientific 番号A3381901）を含むMEM-アルファ培地（Thermo Fisher Scientific 番号32561037）で、5%CO₂中37℃で30分間、でインキュベートした。次いで、標的細胞を、NK-92-CD16 V/Vエフェクター細胞と、E:T=1:8の比率で5%CO₂中で37℃6時間共培養した。インキュベーション後、細胞をヨウ化プロピジウム（P/I）（200ng/mL）で室温で10分間染色し、Cytex（商標）Auroraフローサイトメトリー（Cytex Biosciences）によって標的細胞死を解析した。結果は、CFSE+P/I+細胞の%を表す細胞傷害%として表した。

【0293】

ヒト好酸球（EO）でのNK細胞殺傷アッセイでは、NK細胞をまず健常ヒトの血液から、EasySep（商標）Direct Human NK Cell Isolation Kit（STEMCELL Technologies 番号19665）を使用して、製造業者のプロトコールに従って単離した。次いで、NK細胞を洗浄し、増殖培地（RPMI-1640+10%FBS+10%ウマ血清+10ng/mLのIL-2+10ng/mLのIL-15）に再懸濁し、5%CO₂中37℃で24時間インキュベートした。翌日、EASP（商標）Direct Human Eosinophil Isolation Kit（STEMCELL Technologies 番号19656）を使用して、製造業者の使用説明書に従って、EO細胞を健常ヒトの血液から単離した。次いで、単離されたEO細胞を洗浄し、ADCC培地（RPMI-1640+4%超低IgG FBS）に再懸濁し、段階希釈したモノクローナル抗体とともに、5%CO₂中37℃で30分間インキュベートした。次いで、標的EO細胞とエフェクターNK細胞をE:T=3:1の比率で、5%CO₂中37℃で6時間共培養した。インキュベーション後、細胞を7-AAD（1:20）で室温で5分間染色し、Cytex（商標）Auroraフローサイトメトリー（Cytex Biosciences）によって標的細胞死を解析した。結果は、7-AAD+EO細胞の%を表す細胞傷害%として表した。

【0294】

抗体依存性細胞食作用（ADCP）アッセイ

まず、ヒト単球を、EasySep（商標）Direct Human Monocyte Isolation Kit（STEMCELL Technologies 番号

10

20

30

40

50

19669)を使用して、製造業者のプロトコールに従って単離した。次いで、単球を洗浄し、増殖／分化培地(RPMI-1640+10%FBS+10%ウマ血清+5%ヒト血清+50ng/mlのM-CSF)に再懸濁し、5%CO₂中37℃で7日間インキュベートし、マクロファージ分化を促した。7日後、健常ヒト血液から新たに単離したEO細胞を洗浄し、Tag-It Violet(5mM)(BioLegend番号425101)で標識し、ADCP培地(RPMI-1640+4%超低IgG FBS+50ng/mlのM-CSF)に再懸濁し、アイソタイプ対照(10μg/ml)またはPEO22(1または10μg/ml)とともに、5%CO₂中37℃で30分間インキュベートした。バイオレット標識EO標的細胞を2回洗浄し、マクロファージエフェクター細胞とE:T=1:5の比率で5%CO₂中37℃で6時間共培養した。インキュベーション後、付着したマクロファージを取り出し、洗浄し、フローサイトメトリーで解析した。バイオレット蛍光色素(Pacific Blueチャネル)に陽性のマクロファージは、ADCP誘導-EO貪食を表す。ADCP培地のみでインキュベートしたマクロファージを、陰性対照として使用した。

10

【0295】

NFATルシフェラーゼレポーターJurkat系(ADCCアッセイ)

実験の直前に、懸濁液標的細胞(HCC1739BL)(5×10⁵細胞/ml)を播種しながら、付着した標的細胞(中レベルのCD39を内在的に発現するSK-MEL-28黒色腫細胞または低レベルのCD39を内在的に発現するHVEC細胞)を96ウェルプレート(BRANDplates番号781965)に播種し(8×10³細胞/100μl/ウェル)、24時間増殖させた。次いで、細胞をADCCアッセイ緩衝液(4%超低IgG血清を補充したDMEMまたはRPMI1640培地)で2回洗浄し、段階希釈したモノクローナル抗体と共に37℃で30分間インキュベートした。次に、エフェクター細胞(Jurkat細胞/NFAT-luc+FcγRIIIA)(3×10⁶細胞/ml)をウェルに加え、混合物(E:T=1:6)を37℃で6時間インキュベートした。最後にBio-Glo(商標)をウェルに加え、Synergy(商標)Neo2 Multi-Mode Reader(BioTek Instruments Inc.)を使用して、5分、15分、及び30分に、発光値を読み取った。ADCC活性が、バックグラウンドを超えるルシフェラーゼ活性の増加によって示された。

20

【0296】

エピトープ競合アッセイ

非コンジュゲートは抗ヒトCD39モノクローナル抗体(ヒト/ウサギキメラクローン; 2μg/ml)をHCC1739BL細胞(1×10⁵細胞)と4℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞を細胞染色緩衝液で2回洗浄し、PE-コンジュゲートマウス抗ヒトCD39モノクローナル抗体クローンA1(0.25μg/ml、BioLegend番号328208)によって4℃で30分間染色した。次いで、細胞を2回洗浄し、Cytex(商標)Auroraフローサイトメトリーで解析した。PE中央値蛍光強度(MFI)が検出され、データはFCS 30 Express 7ソフトウェア(De Novo Software)によって分析した。キメラ抗体の代わりに培地とともにインキュベートした細胞を対照として使用した。

30

40

【0297】

安定免疫複合体アッセイ

5%CO₂中37℃で24時間、HCC1739BL細胞(5×10⁵細胞/ml)を抗ヒトCD39モノクローナル抗体(2μg/ml)とインキュベートするか、または未処理のままにした。翌日、未処理の細胞を同じパネルのモノクローナル抗体(2μg/ml)に曝露したが、4℃で20分間、基礎レベルのCD39発現を得た。次いで、細胞を細胞染色緩衝液で2回洗浄し、抗ヒトIgG(Fc特異的)AlexaFluor(登録商標)488(1:2000)で4℃で30分間染色した後、さらに2回洗浄し、パラホルムアルデヒド(PFA、2%)で、室温で10分間固定した。最後に、細胞を2回洗浄し、Cytex(商標)Auroraフローサイトメトリー(Cytex Biosci

50

ences) で解析した。AlexaFluor (登録商標) 488 (AF488) MFI が検出され、データは FCS Express 7 ソフトウェア (De Novo Software) によって分析した。24 時間での細胞膜上のヒト CD39 喪失のパーセンテージは、 $[(20 \text{ 分 MFI} - 24 \text{ 時間 MFI}) / 20 \text{ 分 MFI}] \times 100$ として計算した。

【0298】

立体配座エピトープマッピング

これは、Pepscan (Lelystad, The Netherlands) による独自の CLIPS 技術を使用して行った。

【0299】

動物

C57BL/6 ヒト CD39 ノックイン (hCD39KI) マウスを Beth Israel Deaconess Medical Center からライセンスを取得し、Purinomia Biotech, Inc. の特定病原体除去動物施設で繁殖させ、収容した。すべてのマウスを恒温室内で 12 時間交互の暗明サイクルで飼育した。

【0300】

健常 hCD39KI マウスの血液及び骨髄の顆粒球プロファイルを、安楽死後の 8~12 週齢のオス及びメスのマウスを使用して評価した。試料を以下に記載されるように処理し、分析した。

【0301】

健常 hCD39KI マウスにおける抗体投与

図 12 の場合：PEO22 及びその低 ADC 対応物 (PEOWT22) の血中顆粒球に対するインビボ効果を分析するために、8~12 週齢のオスの健常 hCD39KI マウスに滅菌 0.9% 生理食塩水または 1 mg/kg の PEO22 を 0 日目と 2 日目に投与した (i.p.)。血液試料を、0 日目 (抗体注射前) に側静脈切開を通して、及び 3 日目の最終採取時に大静脈を通して採取した。試料を以下に記載されるように処理し、分析した。

【0302】

図 13 の場合：血液及び骨髄の好酸球に対する PEO22 のインビボ効果を分析するために、8~12 週齢のメスの健常 hCD39KI マウスを、生理食塩水または PEO22 (1 mg/kg 、i.p) で 2 日おきに合計 4 回の投与で処置した。血液及び骨髄試料を最後の投与の 1 日後に安楽死させた動物から採取し、以下に記載されるように処理及び分析した。

【0303】

マウス好酸球性喘息モデルの確立及び研究デザイン

マウス好酸球性喘息モデルは、文献 (Matsuoka et al., Kurume Medical Journal, 65:37-46 (2018); Chen et al., Scientific Reports, 10:10557 (2020)) に記載されている通りに修正を加えて確立した。8~12 週齢のメス hCD39KI マウスを試験に使用した。簡潔に述べると、オボアルブミン (OVA) 感作溶液 (水酸化アルミニウムアジュバント 0.1 mL と混合された $100 \mu\text{g}$ の OVA) を 1 日目及び 7 日目に投与 (i.p) することにより、すべてのマウスを感作させた。OVA 負荷では、11~25 日目 (15 日間連続して毎日) に、マウスをイソフルランで麻酔して、 $40 \mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ の OVA 溶液を投与した (i.n.)。

【0304】

マウスに生理食塩水または 1 mg/kg の PEO22 (i.p.) のいずれかを 2 日おきに 19、21、23、及び 25 日目に合計 4 回投与した。最後の投与の 1 日後、マウスをイソフルランで麻酔し、血液、骨髄、及び肺を収集し、以下に記載の通りに分析した。

【0305】

マウスアトピー性皮膚炎 (AD) モデルの確立及び研究デザイン

10

20

30

40

50

A Dマウスモデルは、O V Aで接着剤ストリッピングした皮膚での反復した皮下（E C）負荷によって誘発された。このために、8～12週齢のメスh C D 3 9 K Iマウスを、最初に、1日目及び7日目のO V A溶液（10 μ gのO V A + 0.1 mLの水酸化アルミニウムアジュバント）の腹腔内投与によるO V A感作に供した。14日目にマウスをイソフルランで麻酔し、背中のマウスの皮膚（直径約1 cm）を剃毛し、組織接着液（L i q u i V e t R a p i d、O a s i s M e d i c a l M e t a w a）を剃毛した皮膚に塗布した。5分後、付着プラークを表面角膜上皮とともに除去した。次いで、0.1 mg / mLのO V A溶液を露出した皮膚に適用することにより、O V A負荷を行った。それぞれのマウスを、5週間にわたり1週間に2回、同じ部位でO V A溶液による負荷に曝露させた。アレルギー反応を防止し、動物の水分を保つために、O V A負荷中に0.5 mLの生理食塩水をそれぞれのマウスに皮下投与した。

10

【0306】

O V A負荷の最後の1週間の間、マウスに生理食塩水または1 mg / kgのP E O 2 2のいずれかを2日ごとに合計3回投与した（i . p .）。最後の投与の2日後に動物を安楽死させ、フローサイトメトリー及び組織学的検査のためにそれぞれ血液及び皮膚を収集した。

【0307】

マウス好酸球性副鼻腔炎モデルの確立及び研究デザイン

好酸球性副鼻腔炎マウスモデルは、O V A感作及びO V A / A s p e r g i l l u s o r y z a e由来のプロテアーゼ負荷によって誘導された。このために、8～12週齢のメスのh C D 3 9 K Iマウスを、まず1日目及び7日目にO V A溶液（10 μ gのO V A + 0.1 mLの水酸化アルミニウムアジュバント）の皮下投与によるO V A感作に供した。O V A / プロテアーゼ負荷については、14日目に、マウスをイソフルランで麻酔し、20 μ g / 20 μ LのO V A / プロテアーゼ混合物溶液を1週間に3回、6週間投与した（i . n .）。

20

【0308】

O V A / プロテアーゼ負荷の最後の1週間の間、マウスに生理食塩水または3 mg / kgのP E O 2 2のいずれかを2日ごとに合計4回投与した（i . p .）。最後の投与の1日後に動物を安楽死させ、フローサイトメトリー及び組織学的検査のためにそれぞれ血液及び鼻腔組織を収集した。

30

【0309】

マウス骨髄の採取、処理、及び分析

マウスの大腿骨を回収し、滅菌ハサミで四肢を切断した。2% F B S（R 2緩衝液）を補充した冷R P M I - 1 6 4 0培地を含む1 mLシリンジに取り付けた25 G針を骨に挿入することにより、骨髄細胞をフラッシュした。次いで、細胞フラッシュを70 μ mのストレーナーに通し、氷上の5 mLのF A C Sチューブに回収し、3500 rpmで5分間、8℃で遠心分離した。上清を除去した後、残りの細胞を1 mLの1×溶解緩衝液（B D P h a r m L y s e）中に再懸濁させ、混合し、光から保護した氷上で3分間インキュベートした。8℃にて5分間、3500 rpmで遠心分離した後、細胞を1 mLのR 2緩衝液中に再懸濁させ、70 μ mのストレーナーに通し、新しい1.5 mLのエッペンドルフチューブ中に収集した。次いで細胞を再度3500 rpmで5分間、8℃で遠心分離し、1 mLのR 2緩衝液で再懸濁した。その後、50 μ Lの細胞懸濁液を等分し、0.5 μ LのF cブロッカー（B D B i o s c i e n c e s 番号553142）で4℃で10分間ブロッキングし、続いて抗体パネル染色（表1）を4℃で15分間行った。最後に、細胞をR 2緩衝液で1回洗浄し、100 μ LのR 2緩衝液中に再懸濁させ、氷上で7-A A D（1：20）で5分間染色し、400 μ LのR 2緩衝液を含むF A C Sチューブに移し、C y t e k A u r o r aフローサイトメーターによって解析した。それぞれの細胞亜集団の絶対数及びパーセンテージ（C D 4 5 + またはC D 4 5 + C D 1 1 b + 細胞に対する相対として表される）、ならびにそれらのそれぞれのヒトC D 3 9発現及び他の好酸球細胞表面マーカー（平均蛍光強度-M F Iとして表される）は、F C S E x p r e s s

40

50

7ソフトウェア (De Novo Software) を使用して決定された。

【0310】

マウスの血液の採取、処理、及び分析

マウスの最終採血：動物をイソフルランガスで麻酔した後に大静脈から血液試料を採取し、開腹手術に供した。

【0311】

マウスの非最終採血の場合：血液試料を麻酔なしで側静脈切開を通して採取した。

【0312】

動物の血液 (200 μ L) を、1 μ L の 10% EDTA 及び 50 μ L の EDTA 含有血液試料混合物を含む 1.5 mL のエッペンドルフチューブを新しい 1.5 mL のエッペンドルフチューブに移し、0.5 μ L の Fc ブロッカー (BD Biosciences #553142) と 4°C で 10 分間インキュベートし、続いて 4°C で 15 分間抗体パネル染色 (表 2) を行った。次いで、赤血球溶解を、1 mL の 1×ACK 溶解緩衝液を使用して、室温で、暗所で 10 分間行った。その後、細胞を 3500 rpm で 5 分間、4°C で遠心分離し、続いて第 2 回の赤血球溶解を (BD Pharm Lyse を使用して) 行った。次いで、白血球を 1 mL の R2 緩衝液で洗浄し、100 μ L の R2 緩衝液中に再懸濁させ、氷上で 5 分間 7-AAD (1:20) で染色した。最後に、細胞を 400 μ L の R2 緩衝液を含む FACS チューブに移し、Cytek Aurora フローサイトメーターで解析した。それぞれの顆粒球亜集団の絶対数及びパーセンテージ (CD45+ または CD45+CD11b+ 細胞に対する相対として表される)、ならびにそれらのそれぞれのヒト CD39 発現及び他の好酸球細胞表面マーカー (平均蛍光強度-MFI として表される) は、FCS Express 7 ソフトウェア (De Novo Software) を使用して決定された。

10

20

【0313】

マウスの組織の採取、処理、及び分析

肺、皮膚、及び鼻腔を安楽死させたマウスから取り出し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロック中に固定し、H&E (ヘマトキシリン及びエオシン) で染色して、組織の病理を評価した。

【0314】

ヒト血液の処理及び分析

健常ヒトドナーからの血液試料を顆粒球分析に使用した。簡潔に述べると、50 μ L の試料を等分し、2.5 μ L のヒト Fc ブロッカー (Biolegend 番号 422302) と 4°C で 10 分間インキュベートし、続いて抗体パネル染色 (表 3) を 4°C で 15 分間行った。次いで、赤血球溶解を、1 mL の 1×ACK 溶解緩衝液を使用して、室温で、暗所で 10 分間行った。その後、細胞を 3500 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、1 mL の R2 緩衝液で 1 回洗浄した。次いで、100 μ L の R2 緩衝液中に再懸濁させ、氷上で 5 分間 7-AAD (1:20) で染色した。最後に、細胞を 400 μ L の R2 緩衝液を含む FACS チューブに移し、Cytek Aurora フローサイトメーターで解析した。それぞれの顆粒球亜集団のパーセンテージ (%), 及びそれらのそれぞれのヒト CD39 発現 (平均蛍光強度-MFI として表す) を、FCS Express 7 ソフトウェア (De Novo Software) を使用して決定した。

30

40

【0315】

統計解析

結果を平均 ($\pm$ SEM) として表し、GraphPad Prism9 (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用して、統計解析を実施した。

【0316】

50

【表 6 - 1】

表 1. マウス骨髄分析のための検出抗体

名称	供給業者／カタログ番号	濃度
ラット抗マウスCD45__Brilliant Violet 510 (商標)	BioLegend／ 103138	1:1000
ラット抗マウス／ヒトCD11b__Alexa Fluor (登録商標) 700	BioLegend／ 101222	1:1000
ラット抗マウスLy-6G__Brilliant Violet 785 (商標)	BioLegend／ 127645	1:1000
ラット抗マウスLy-6C__Brilliant Violet 605 (商標)	BioLegend／ 128035	1:1000
ラット抗マウスLy-6G及びLy-6C (Gr-1) __Brilliant Violet 480 (商標)	BD Biosciences／ 746614	1:1000
ラット抗マウスF4／80__PE／シアニン5	BioLegend／ 123112	1:1000
ラット抗マウスCD200R3__PE／シアニン7	BioLegend／ 142212	1:500
ラット抗マウスCD138__Brilliant Violet 421 (商標)	BioLegend／ 142523	1:500
ラット抗マウスCD49b (汎NK細胞) __PE	BioLegend／ 108908	1:500
アルメニアンハムスター抗マウスCD11c __Pacific Blue (商標)	BioLegend／ 117322	1:500
ラット抗マウスCD193 (CCR3) __PE	BioLegend／ 144505	1:500
アルメニアンハムスター抗マウスFcεRI α__APC	BioLegend／ 134316	1:500
アルメニアンハムスター抗マウスFcεRI α__PE／シアニン7	BioLegend／ 134318	1:500
ウサギ抗ヒトCD39クローン8C11__Alexa Fluor (登録商標) 647	Purinomia Biotech Inc. ／ NA	1:500
ウサギIgGアイソタイプ対照 (RbNP15) __Alexa Fluor (登録商標) 647	eBioscience (商標)／ 51461682	1:250

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

ラット抗マウスCD170 (Siglec-F) __Alexa Fluor (登録商標) 488	BioLegend/ 155524	1 : 250
ラット抗マウスCD125 (IL-5R α) __Brilliant Violet 711 (商標)	BD Biosciences/ 740817	1 : 250
ラット抗マウスCD101__PE	Invitrogen/ 12-1011-82	1 : 250

10

20

30

40

50

【表 7】

表 2. マウス血液分析のための検出抗体

名称	供給業者／カタログ番号	濃度
ラット抗マウスCD45__Brilliant Violet 510 (商標)	BioLegend／ 103138	1:1000
ラット抗マウス／ヒトCD11b__Alexa Fluor (登録商標) 700	BioLegend／ 101222	1:1000
ラット抗マウスLy-6G__Brilliant Violet 785 (商標)	BioLegend／ 127645	1:1000
ラット抗マウスLy-6C__Brilliant Violet 605 (商標)	BioLegend／ 128035	1:1000
ラット抗マウスLy-6G及びLy-6C (Gr-1) __Brilliant Violet 480 (商標)	BD BioSciences／ 746614	1:1000
ラット抗マウスCD49b (汎NK細胞) __PE	BioLegend／ 108908	1:500
ラット抗マウスCD200R3__PE／シアニン7	BioLegend／ 142212	1:500
アルメニアンハムスター抗マウスFcεRI α__APC	BioLegend／ 134316	1:500
ラット抗マウスCD193 (CCR3) __PE	BioLegend／ 144505	1:500
ウサギ抗ヒトCD39クローン8C11__Alexa Fluor (登録商標) 647	Purinomia Biotech Inc. ／ NA	1:500
ウサギIgGアイソタイプ対照 (RbNP15) __Alexa Fluor (登録商標) 647	eBioscience (商標) 51461682	1:250
ラット抗マウスCD125 (IL-5Rα) __Brilliant Violet 711 (商標)	BD BioSciences／ 740817	1:250
ラット抗マウスCD170 (Siglec-F) __Alexa Fluor (登録商標) 488	BioLegend／ 155524	1:250
ラット抗マウスCD101__PE	Invitrogen／ 12-1011-82	1:250

10

20

30

40

50

【表 8】

表 3. ヒト血液分析のための検出抗体

名称	供給業者／カタログ番号	濃度
マウス抗ヒトCD45__Brilliant Violet 510 (商標)	BioLegend／ 304036	1:20
マウス抗ヒトCD16 (FcγRIII) __FITC	BioLegend／ 360716	1:20
マウス抗ヒトCD14__PE-シアニン5	ThermoFisher Scientific／ 15-0149-42	1:20
マウス抗ヒトCD24__Brilliant Violet 421 (商標)	BioLegend／ 311122	1:20
マウス抗ヒトCD123 (IL-3Rα) __Alexa Fluor (登録商標) 700	BioLegend／ 306040	1:20
マウス抗ヒトHLA-DR__Brilliant Violet 650 (商標)	BioLegend／ 307650	1:20
マウス抗ヒトCD3__PE	BioLegend／ 981004	1:20
マウス抗ヒトCD56 (NCAM) __Brilliant Violet 605 (商標)	BioLegend／ 318334	1:20
マウス抗ヒトCD4__Pacific Blue (商標)	BioLegend／ 317429	1:20
マウス抗ヒトCD193 (CCR3) __Brilliant Violet 711 (商標)	BioLegend／ 310731	1:20
マウス抗ヒトSiglec-8__PE／シアニン7	BioLegend／ 347111	1:20
マウス抗ヒトCD11c__Brilliant Violet 785 (商標)	BioLegend／ 301644	1:20
ウサギ抗ヒトCD39クローン8C11__Alexa Fluor (登録商標) 647	Purinomia Biotech Inc.	1:500
ウサギIgGアイソタイプ対照 (RbNP15) __Alexa Fluor (登録商標) 647	eBioscience (商標) 51461682	1:250

【0317】

参照による組み込み

本明細書で言及されたすべての刊行物、特許、及び特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されているかのように、参照により全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、本明細書のいずれかの定義を含む本出願が優先するであろう。

【0318】

ワールドワイドウェブ上でThe Institute for Genomic Research (TIGR) 及び／またはワールドワイドウェブ上でNational

Center for Biotechnology Information (NCBI)によって維持されているものなどの公開データベースにおけるエントリーに対応するアクセッション番号を参照する任意のポリヌクレオチド及びポリペプチドの配列も参照によってそれらの全体が組み込まれる。

【0319】

均等物及び範囲

本発明により包含される1つ以上の実施形態の詳細は、上記の記載に示される。好ましい材料及び方法は上記に記載されているが、本明細書に記載されているものと類似または均等の任意の材料及び方法を、本発明により包含される実施形態の実施または試験に使用することができる。本発明に関連する他の特徴、目的、及び利点が、記載から明らかである。別途定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明の所属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。競合が発生した場合は、上記の現在の記載が優先される。

10

【0320】

当業者は、本明細書に記載の本発明に包含される実施形態に対する多くの均等物を認識し、または日常的な実験のみを使用して確認することができるであろう。本発明に包含される範囲は、本明細書で提供される記載に限定されることを意図するものではなく、そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されることを意図する。

【0321】

冠詞「a」及び「an」は、反対の指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、冠詞の文法上の目的語のうちの1または1つを超えるもの（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使われる。例えば、「要素(an element)」とは、1つの要素または複数の要素を意味する。群の1つ以上のメンバー間に「または」を含む請求項または記載は、反対の指示がない限り、または文脈から明白でない限り、群の1つ、1つを超える、またはすべてのメンバーが所与の製品またはプロセスに存在、採用、またはさもなくば関連する場合、満たされているとみなされる。本発明は、群の厳密に1つのメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在する、採用される、またはさもなくば関連する実施形態を含む。本発明はまたは、群の1つを超える、または全体のメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在する、採用される、またはさもなくば関連する実施形態を含む。

20

30

【0322】

また、「含むこと」という用語は、オープンであることを意図しており、追加の要素またはステップの包含を許可するものであるが、その包含は必ずしも必要ではないことに留意されたい。本明細書で「含むこと」という用語が使用されるとき、「～からなる」という用語もそれによって包含され、開示される。

【0323】

範囲が指定されている場合、端点が含まれている。さらに、別段の指示がない限り、または文脈及び当業者の理解から明白でない限り、範囲として表される値は、本発明に包含される異なる実施形態で述べられた範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、文脈の別段の定めがない限り、範囲の下限の単位の10分の1までをとることができることを理解されたい。

40

【0324】

さらに、先行技術に含まれる本発明に包含される任意の実施形態は、特許請求の範囲のうちのいずれか1つ以上から明示的に除外され得ることを理解されたい。そのような実施形態は、当業者に知られているとみなされるため、除外が本明細書に明示的に記載されていない場合でも、除外されてもよい。本発明に包含される組成物のいずれの特定の実施形態（例えば、いずれかの抗生剤、治療、または活性の成分、任意の産生方法、任意の使用方法など）も、先行技術の存在に関連するか否かに拘わらず、あらゆる理由により、任意の1つ以上の請求項から除外することができる。

【0325】

50

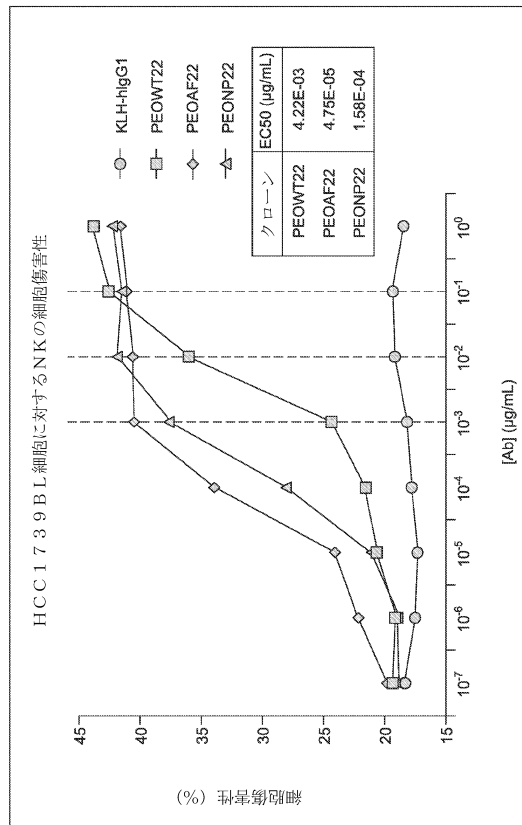
使用されている言葉は限定ではなく説明の言葉であり、その広い態様における本発明に包含される真の範囲及び趣旨から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で変更を加えることができることを理解されたい。

【0326】

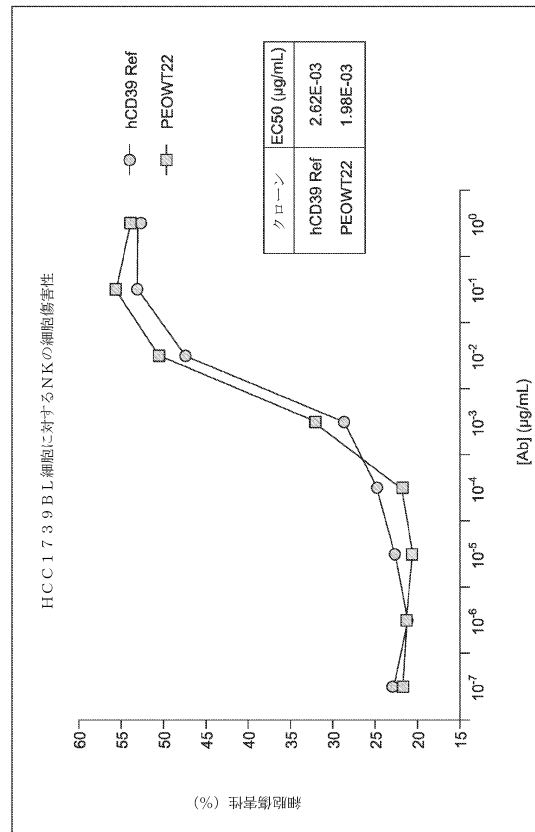
本発明は、いくつかの記載された実施形態に関してある程度の長さ及びある程度の詳細さをもって説明されてきたが、そのような詳細または実施形態または特定の実施形態に限定されるべきではなく、むしろ先行技術に照らしてそのような特許請求の範囲の可能な限り広い解釈を提供し、したがって、本発明に包含される意図された範囲を効果的に包含するように、添付の特許請求の範囲への参照と解釈されるべきである。

【図面】

【図1】



【図2】



10

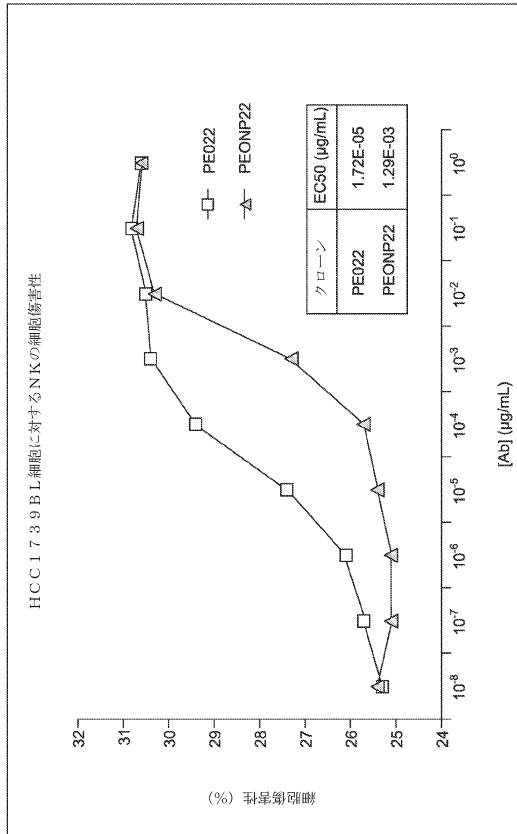
20

30

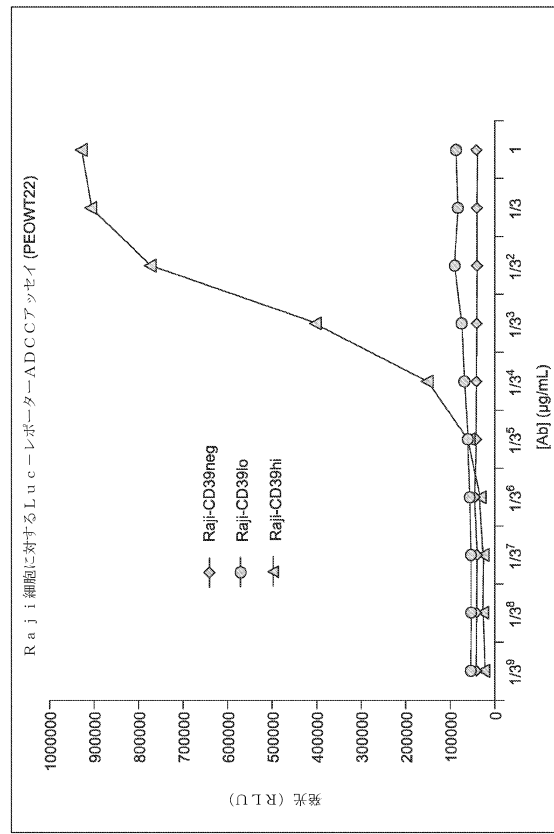
40

50

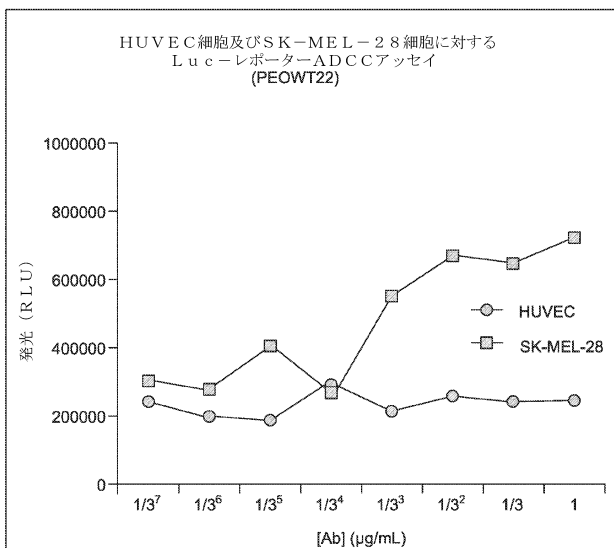
【図 3】



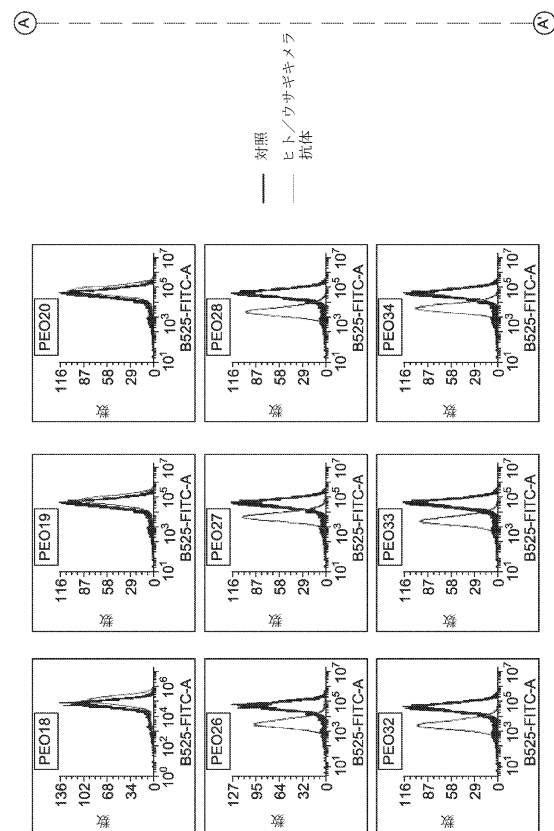
【図 4】



【図 5】



【図 6 - 1】



10

20

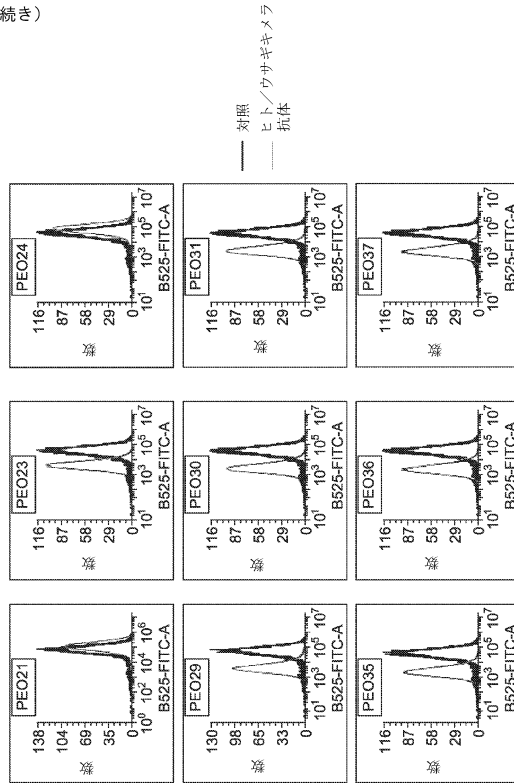
30

40

50

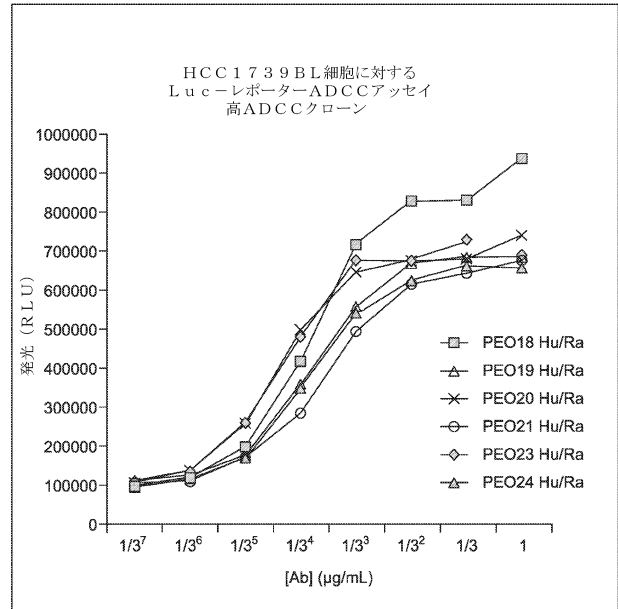
【図 6 - 2】

(続き)



A ————— A'

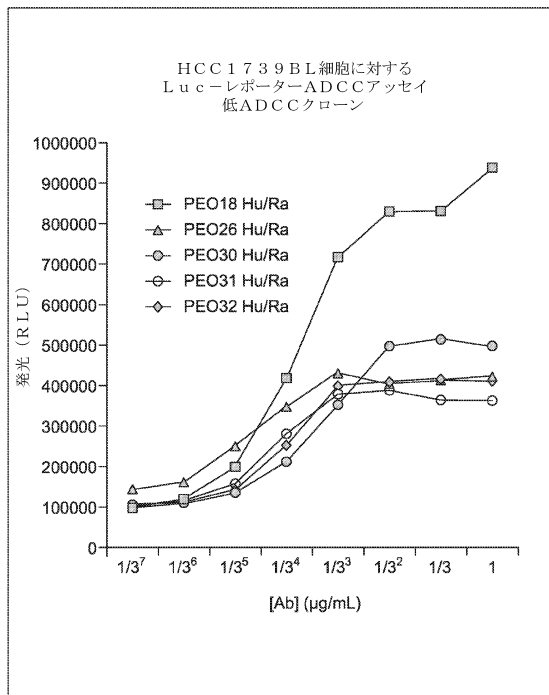
【図 7】



10

20

【図 8 - 1】

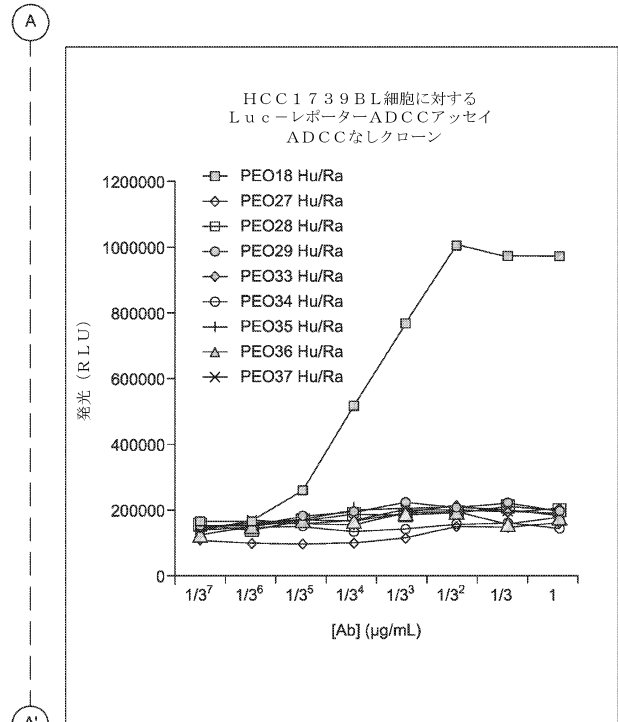


A

A'

【図 8 - 2】

(続き)



A

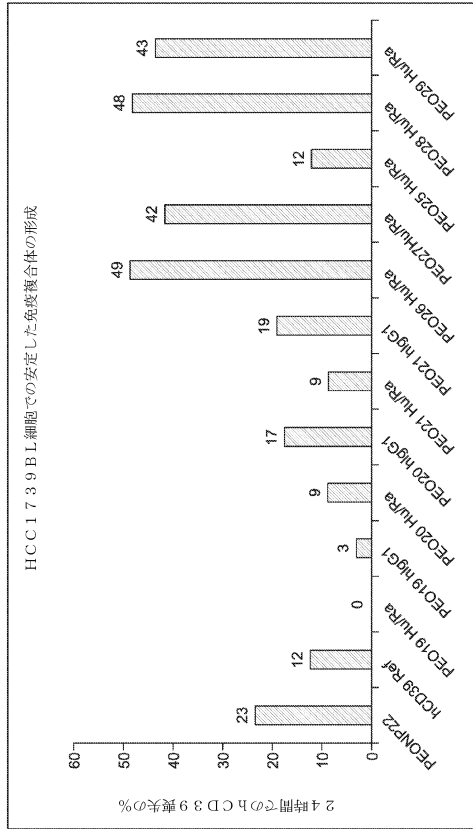
A'

30

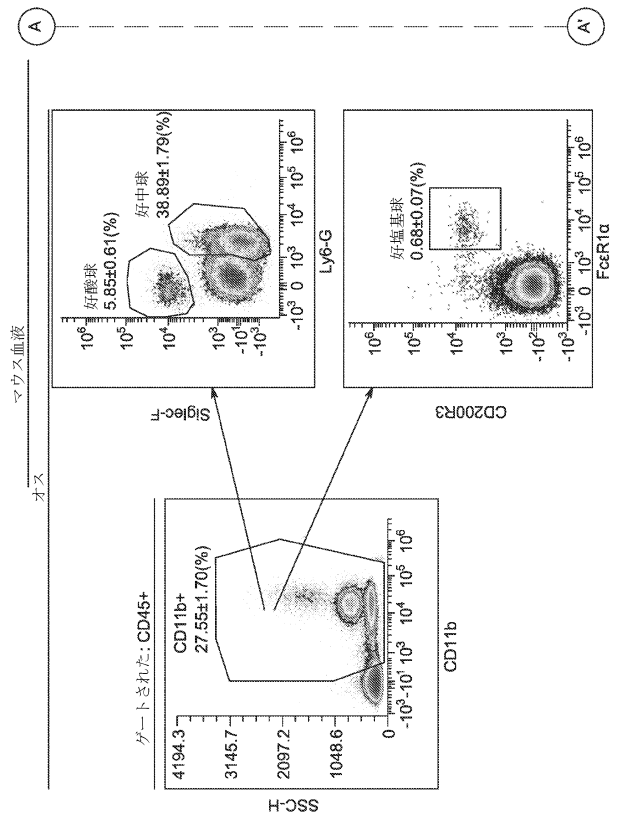
40

50

【図 9】



【図 10 - 1】

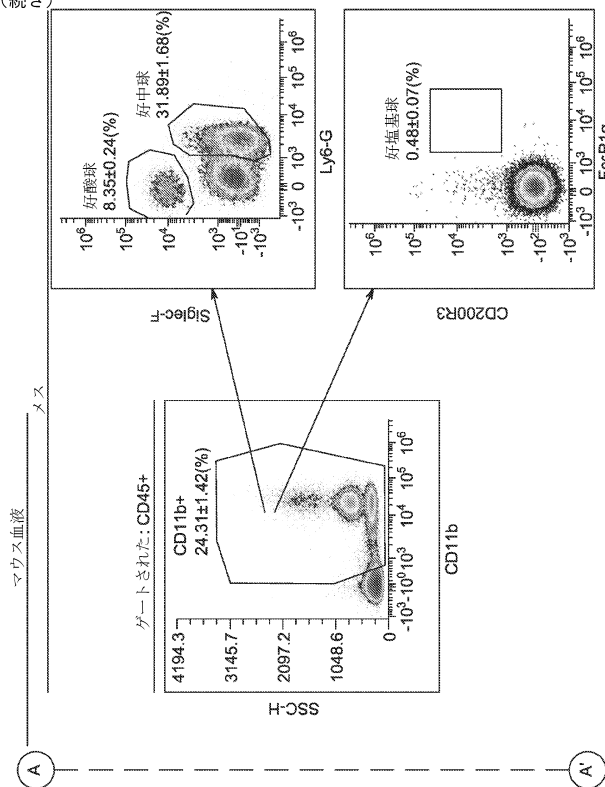


10

20

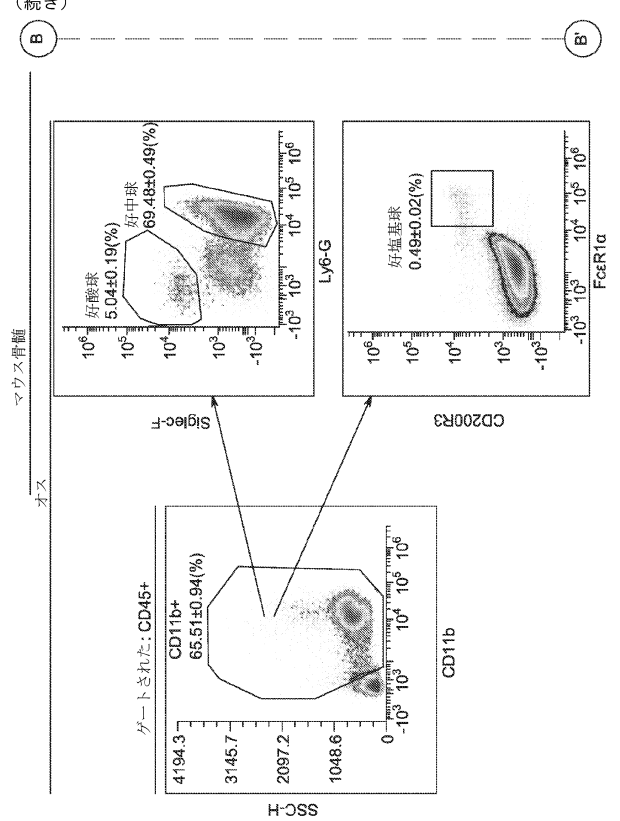
【図 10 - 2】

(続き)



【図 10 - 3】

(続き)

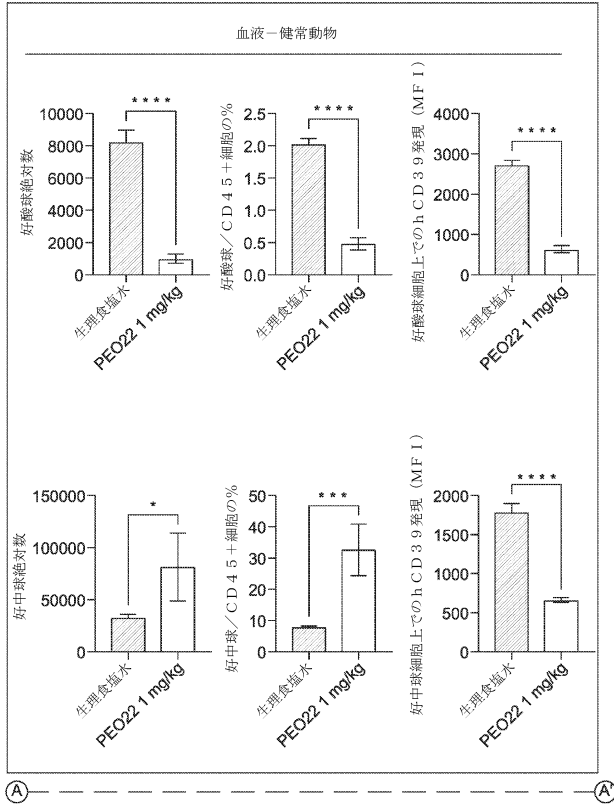


30

40

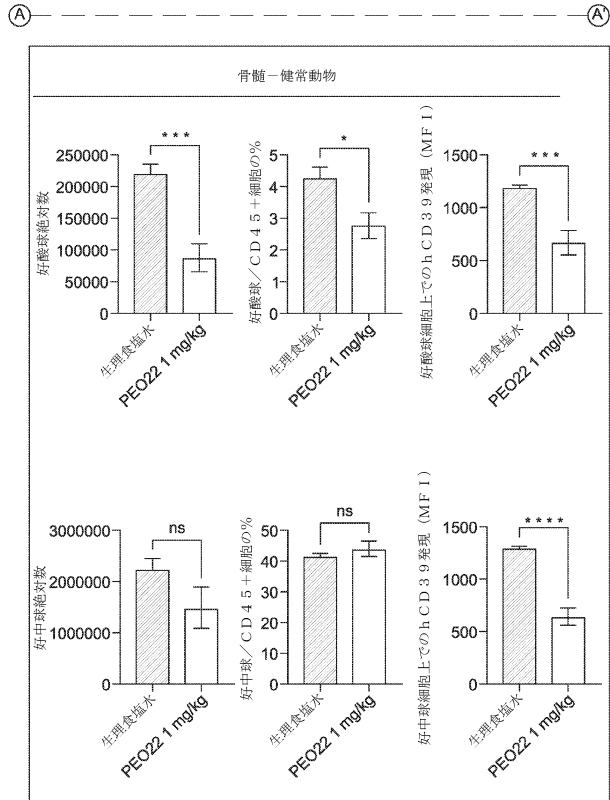
50

【図 13-1】



【図 13-2】

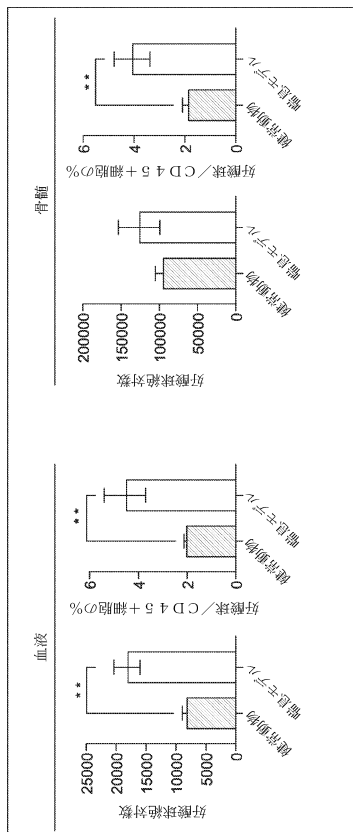
(続き)



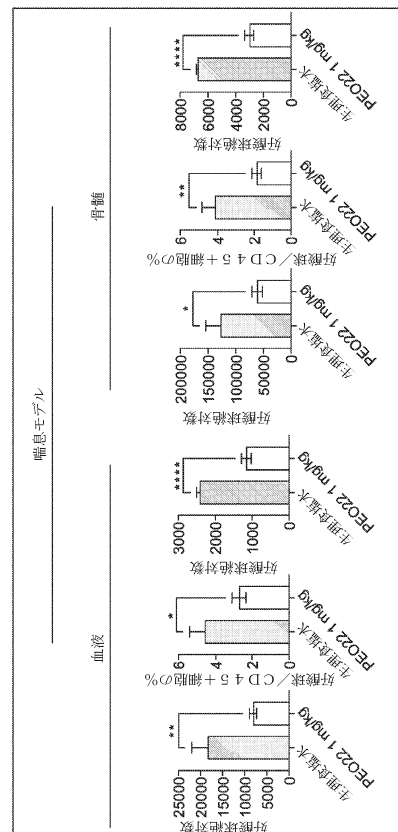
10

20

【図 14】



【図 15】

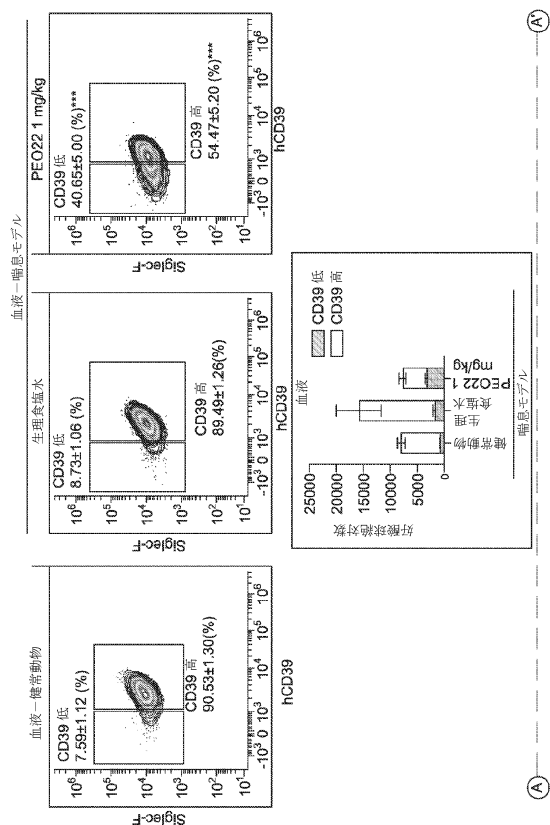


30

40

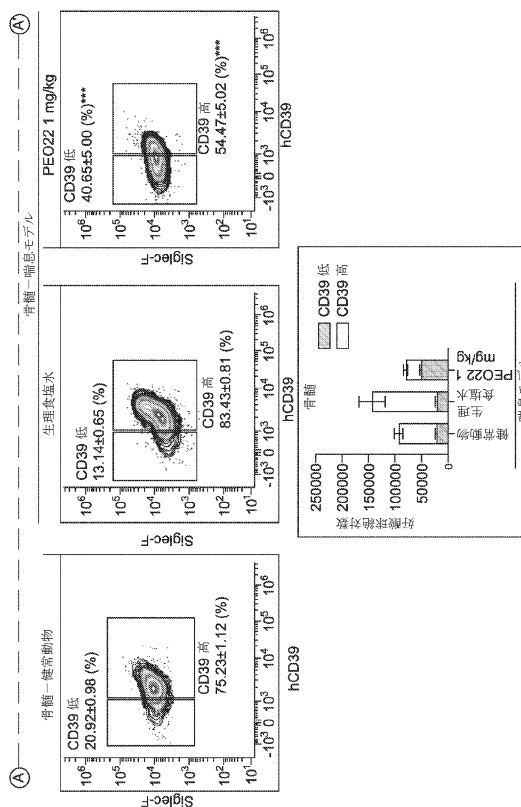
50

【圖 16-1】

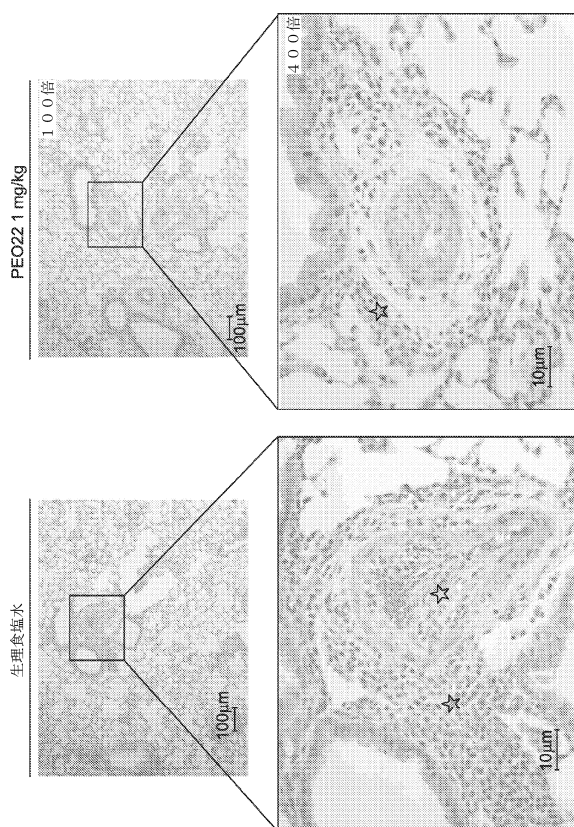


【圖 16-2】

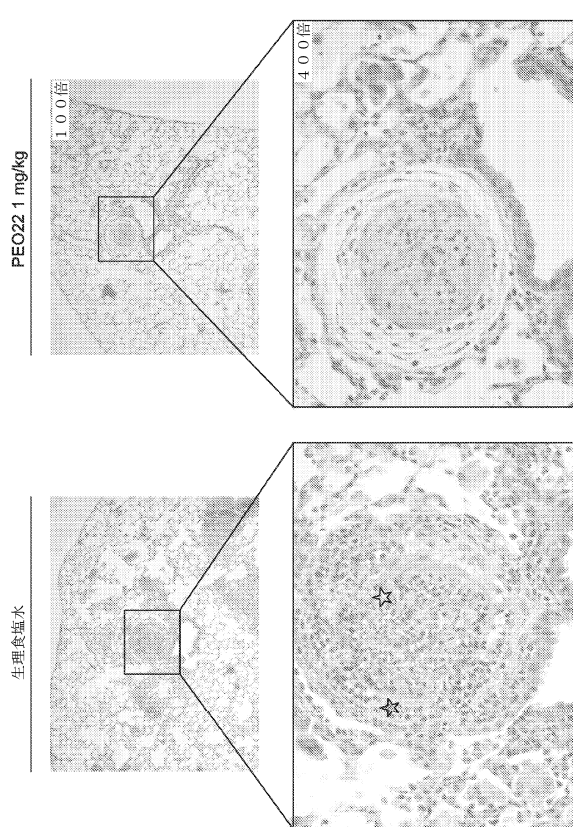
(続き)



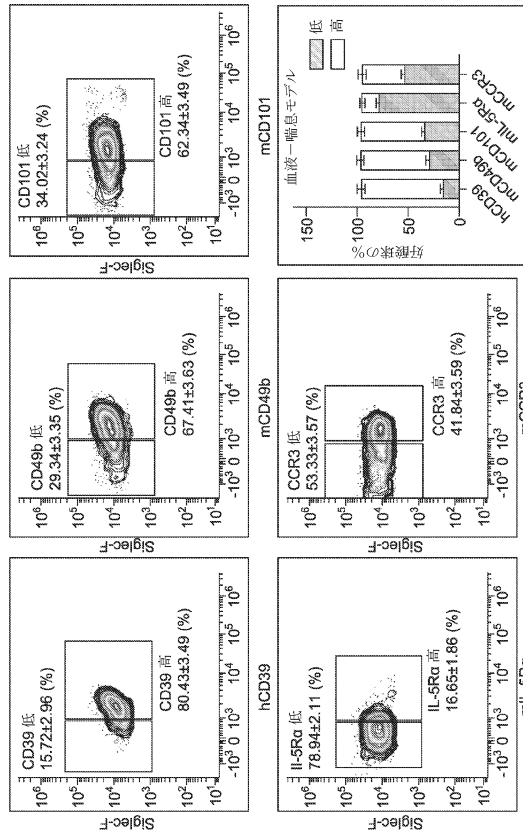
【圖 17】



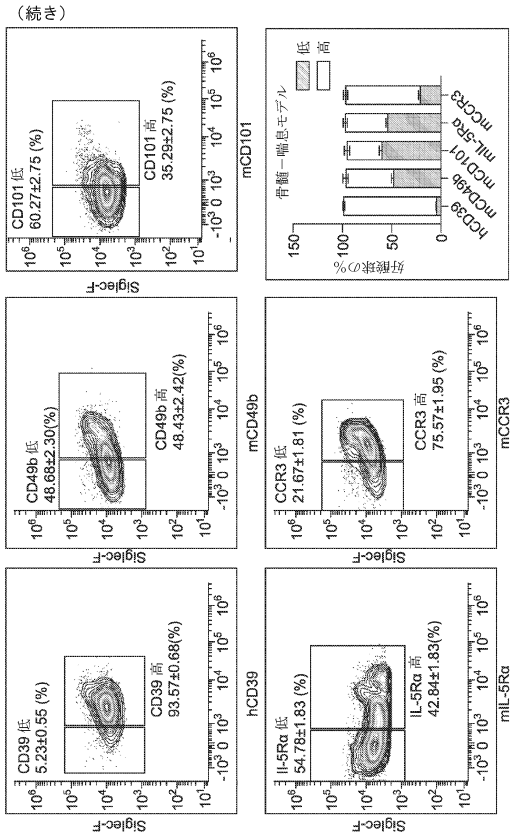
【圖 18】



【図 19 - 1】



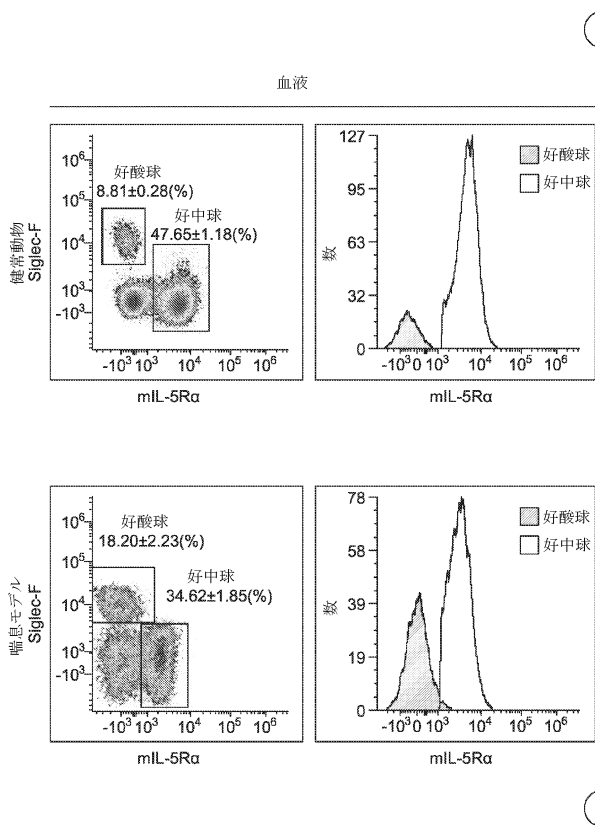
【図 19 - 2】



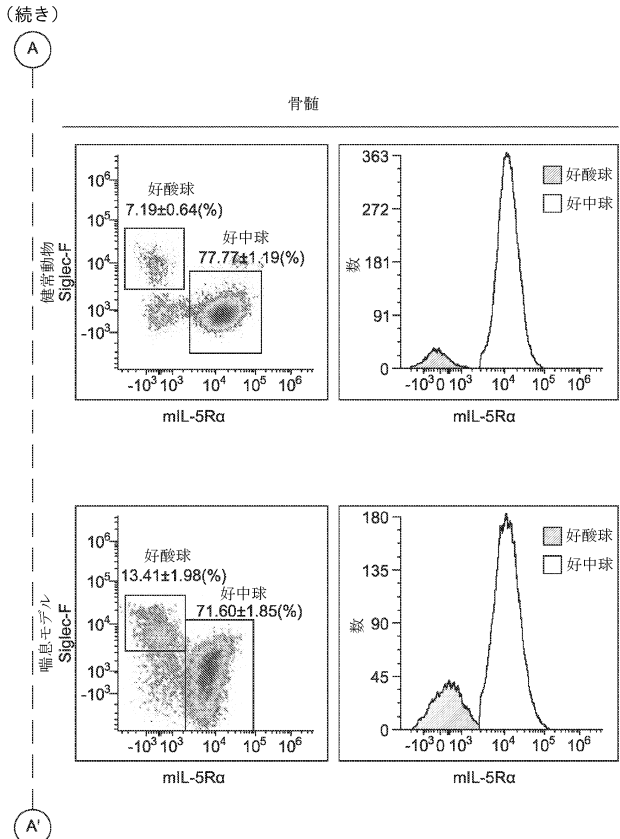
10

20

【図 20 - 1】



【図 20 - 2】

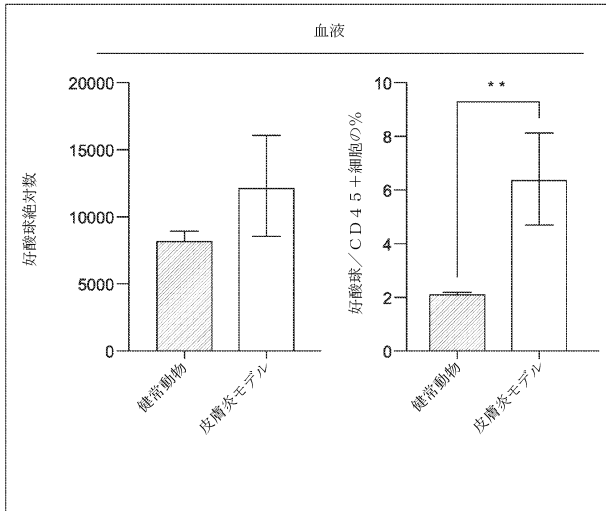


30

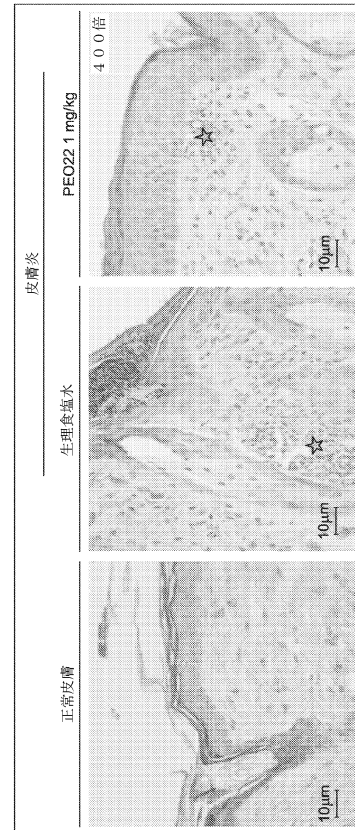
40

50

【図 2 1】



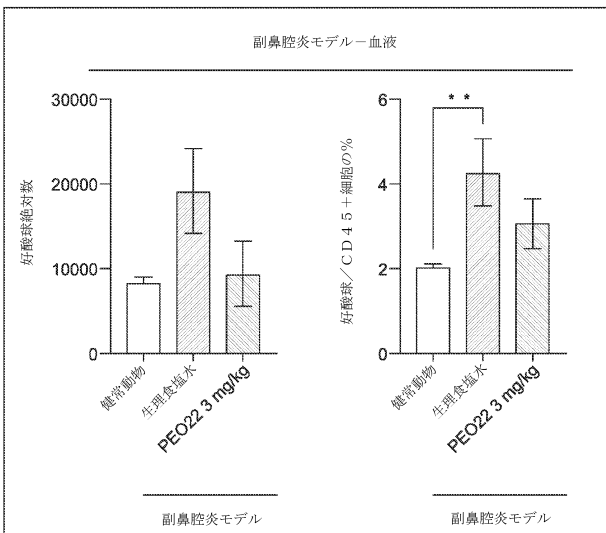
【図 2 2】



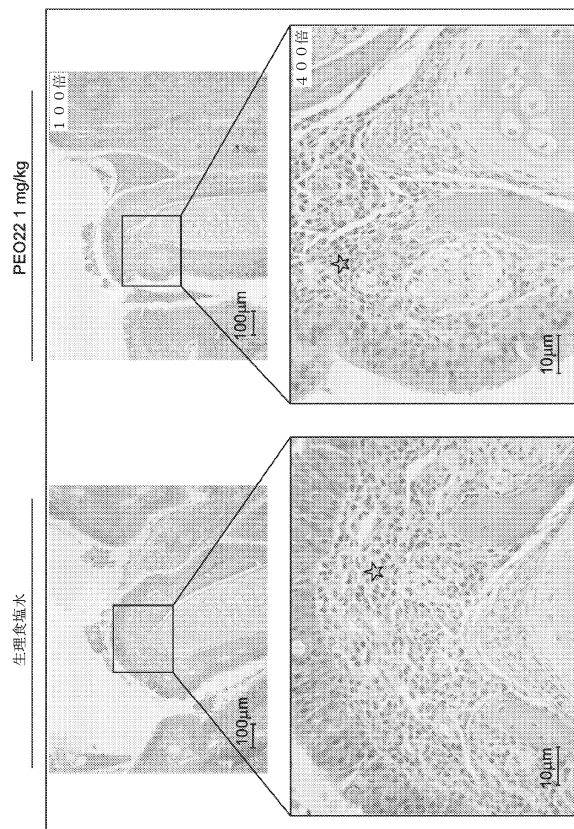
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】



30

40

50

【図 30 - 2】

(続き)

3ZX3.pdbに基づく、ヒトCD39の二量体の相同性モデルのレンダリング。



10

20

【配列表】

2025515486000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 39/395, C07K 16/28, A61P 37/02, A61P 35/00 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. A61K 39/39533, C07K 16/2896, A61P 37/02, A61P 35/00

ADD. C07K 2317/52

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020/0148758 A1 (VAL-CHUM, LIMITED PARTNERSHIP) 14 May 2020 (14.05.2020) especially para [0005]-[0006], [0030], [0040], [0049]	1-3, 58-60
Y	US 2019/0071514 A1 (INNATE PHARMA et al.) 7 March 2019 (07.03.2019); especially para [0057], [0065], [0083]	1-3, 58-60
Y	Li et al., Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. Cancer Discovery, December 2019, Vol. 9, No. 12, pg 1754-1773, especially pg 1756, col 2, para 2; pg 1762, col 1, para 2; pg 1770, col 2, para 5 - pg 1771, col 1, para 1; Figure 4A	3

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 2023

Date of mailing of the international search report

AUG 17 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65762

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65762

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-57, 61-111
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/62 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)
A 6 1 K 39/395(2006.01)
A 6 1 P 17/14 (2006.01)
A 6 1 P 37/08 (2006.01)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)
A 6 1 P 13/12 (2006.01)
A 6 1 P 17/02 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/06 (2006.01)
A 6 1 P 11/06 (2006.01)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)

C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/0783
C 1 2 P 21/08
C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/02 Z
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 17/14
A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 17/02
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/68

4 H 0 4 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

ーズワン・ナンバー・1

Fターム (参考)

4B064 AG26 CA19 CC24

4B065 AA90X AA94X AB01 BA02 CA44

4C076 AA95 BB13 BB15 BB16 CC07 EE41 EE59

4C084 AA19 MA02 NA05 ZA011 ZA012 ZA361 ZA362 ZA451 ZA452 ZA511

ZA512 ZA591 ZA592 ZA681 ZA682 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892

ZA921 ZA922 ZA961 ZA962 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZB151

ZB152 ZB261 ZB262 ZC351 ZC352 ZC412 ZC75

4C085 AA13 AA14 AA21 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 CC01 DD62

EE01 EE03 GG02 GG03 GG04

4H045 AA11 AA30 BA09 BA41 CA40 DA75 DA76 EA22 FA74