

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-505605

(P2008-505605A)

(43) 公表日 平成20年2月28日(2008.2.28)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B 0 2 4 |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 | 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 B | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 C | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 4 C 0 8 4 |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-546178 (P2006-546178)
 (86) (22) 出願日 平成16年12月21日 (2004.12.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年8月23日 (2006.8.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/053639
 (87) 国際公開番号 W02005/063819
 (87) 国際公開日 平成17年7月14日 (2005.7.14)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP03/51096
 (32) 優先日 平成15年12月23日 (2003.12.23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2004/052110
 (32) 優先日 平成16年9月9日 (2004.9.9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 301055549
 クルセル ホランド ベー ヴェー
 オランダ国 2333 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4
 (71) 出願人 501335771
 ザ ジョンズ ホプキンス ユニヴァーシ
 ティ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 212
 18 ボルティモア ノース チャールズ
 ストリート 3400
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作
 (74) 代理人 100107227
 弁理士 藤谷 史朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD1aに対するヒト結合分子

(57) 【要約】

本発明は、CD1aと特異的に結合するヒト結合分子、そのヒト結合分子をコードする核酸分子、そのヒト結合分子を含む組成物、及びそのヒト結合分子を同定又は作製する方法を提供する。そのヒト結合分子は、腫瘍疾患及び疾病の診断、予防及び治療に使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD1aに特異的に結合可能なヒト結合分子。

【請求項 2】

前記ヒト結合分子が、APYMMYFDS（配列番号1）、SQMPSYFDY（配列番号2）、SAWWLSFDS（配列番号3）、STPWFSFDY（配列番号4）、DALWLAFDY（配列番号5）、及びETWWQSFDY（配列番号6）からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するCDR3領域を少なくとも有する、請求項1記載のヒト結合分子。

【請求項 3】

配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、及び配列番号18からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する重鎖を有するヒト結合分子である、請求項1又は請求項2に記載のヒト結合分子。

【請求項 4】

機能的変異体が、ヒトCD1aへの特異的な結合に競合することができる、請求項1～3のいずれか1つに記載のヒト結合分子の機能的変異体。

【請求項 5】

請求項1～3のいずれか一つに記載のヒト結合分子又は請求項4に記載の機能的変異体を有し、更に少なくとも1つのタグを有する免疫複合体。

【請求項 6】

前記タグが、毒性物質、放射性物質、リポソーム、酵素及びこれらの組み合わせからなる群から選択されている、請求項5に記載の免疫複合体。

【請求項 7】

請求項1～3のいずれか1つに記載のヒト結合分子又は請求項4に記載の機能的変異体をコードする核酸分子。

【請求項 8】

請求項7に記載の核酸分子を少なくとも1つ有するベクター。

【請求項 9】

請求項8に記載のベクターを少なくとも1つ有する宿主。

【請求項 10】

前記宿主がヒト細胞に由来する細胞である、請求項9に記載の宿主。

【請求項 11】

請求項1～3のいずれか1つに記載のヒト結合分子又は請求項4に記載の機能的変異体を製造する方法であって、以下の、

a) 請求項9又は10に記載の宿主を、結合分子又は機能的変異体の発現を誘導する条件下で培養する工程、および、任意であるが、

b) 発現したヒト結合分子又は機能的変異体を回収する工程、を有する方法。

【請求項 12】

ヒトCD1aに特異的に結合するヒト結合分子又はCD1aに特異的に結合するヒト結合分子をコードする核酸分子を同定する方法であって、以下の、

a) ヒト結合分子のファージライブラリーを、ヒトCD1aを有する材料に接触させる工程、

b) ヒトCD1aを有する該材料に結合しているファージを少なくとも1回選択する工程、および、

c) ヒトCD1aを有する材料に結合しているファージを分離して回収する工程、を有する方法。

【請求項 13】

ヒトCD1aに特異的に結合するヒト結合分子又はヒトCD1aに特異的に結合するヒト結合分子をコードする核酸分子を得る方法であって、以下の、

10

20

30

40

50

a) 請求項 1 2 に記載の方法を実施する工程、および
 b) 回収したファージから、ヒト結合分子及び / 又は該ヒト結合分子をコードする核酸分子を単離する工程、
 を有する方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の結合分子、請求項 4 に記載の機能的変異体、又は請求項 5 若しくは 6 に記載の免疫複合体を含有する組成物。

【請求項 1 5】

請求項 7 に記載の核酸分子を含有する組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の結合分子、請求項 4 に記載の機能的変異体、請求項 5 若しくは 6 に記載の免疫複合体、又は請求項 1 4 若しくは 1 5 に記載の組成物を含有し、更に少なくとも 1 種類の薬学的に許容される賦形剤を有する医薬組成物。

【請求項 1 7】

更に少なくとも 1 種類の他の治療薬剤を含有する、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

医薬として用いるための、請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載の結合分子、請求項 4 に記載の機能的変異体、請求項 5 若しくは 6 に記載の免疫複合体、請求項 1 4 若しくは 1 5 に記載の組成物、又は請求項 1 6 若しくは 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

腫瘍性疾患又は疾病の診断、予防、治療、又はこれらの組み合わせに用いるための、請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載の結合分子、請求項 4 に記載の機能的変異体、請求項 5 若しくは 6 に記載の免疫複合体、請求項 1 4 若しくは 1 5 に記載の組成物、又は請求項 1 6 若しくは 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

腫瘍性疾患又は疾病の診断、予防、治療、又はこれらの組み合わせのための医薬の調製において、請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載の結合分子、請求項 4 に記載の機能的変異体、請求項 5 若しくは 6 に記載の免疫複合体、請求項 1 4 若しくは 1 5 に記載の組成物、又は請求項 1 6 若しくは 1 7 に記載の医薬組成物を使用する方法。

【請求項 2 1】

前記腫瘍性疾患又は疾病が、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病の急性転化、慢性骨髄単球性白血病、急性前骨髄球性白血病、骨髄異形成症候群、若年性骨髄単球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性非リンパ性白血病、T細胞性急性リンパ芽球性白血病、大型顆粒球性リンパ球性白血病、B細胞性慢性リンパ性白血病及びランゲルハンス細胞組織球症からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の使用する方法。

【請求項 2 2】

a) 診断上有効な量の請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載のヒト結合分子、請求項 4 に記載の機能的変異体又は請求項 5 若しくは 6 に記載の免疫複合体を標本と接触させる工程、および

b) ヒト結合分子、機能的変異体又は免疫複合体が、該標本の化合物と特異的に結合するかどうかを測定する工程、
 を有する、ヒト CD 1 a を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、CD 1 a に特異的に結合することのできるヒト結合分子の同定、これらの結合分子を含む免疫複合体及び前記結合分子を得る方法に関する。本発明は更に、医学における前記ヒト結合分子の利用方法、特に腫瘍性疾患及びランゲルハンス細胞組織球増加症の診断、予防及び / 又は治療のための利用方法を含むものである。

10

20

30

40

50

【0002】

発明の背景

CD1分子は樹状細胞、単球及びいくつかの胸腺細胞の表面に発現する分子のファミリーである。CD1分子は、抗原提示に関わるという点でMHCクラスI分子に類似している。ヒトでは5種類のCD1分子、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d及びCD1e、がこれまで同定されている。これら5種類のCD1遺伝子産物のうち4種類が血清学的に定義されている。これらはCD1a、CD1b、CD1c及びCD1dと呼ばれ、固有の重鎖により区別され、それぞれの分子量は各々、約49kDa、約45kDa、約43kDa及び約48kDaである。

【0003】

CD1a分子が、プレB細胞系、B細胞系、T細胞系及び非リンパ球系の急性及び慢性白血病細胞で発現されているという事実から、CD1aは原理上、これらの疾患を検出又は攻撃する標的となる。(Salamone et al. (1990a)、Salamone et al. (1990b)、Merle-Beral et al. (1989))

【0004】

さらに、CD1a分子はランゲルハンス細胞(皮膚における主要な樹状抗原提示細胞)上に存在する(Teunissen (1992))。このことから、CD1aは原理上、ランゲルハンス細胞組織球増加症(LCH)の検出又は治療の標的となり、それは単独の局所的な病変から生命に関わる多臓器疾患まで様々な臨床的症状をとるクローン増殖性新生物である。

【0005】

CD1aに特異的に結合する結合分子は上記の疾患の診断及び治療に非常に有用である可能性がある。CD1aに対するいくつかのマウスモノクローナル抗体が当該技術分野において知られている(Kelly (1994)、Amiot et al. (1986)、Furue et al. (1992))。しかしながら、マウス抗体は抗体単独の形であれ免疫複合体の形であれ、生体内での利用は限界がある。これは、血清半減期が短い、特定のヒトのエフェクター機能を引き起こすことができない、望ましくない劇症のマウス抗体に対するヒトの免疫反応を惹起する、といったマウスの抗体をヒトに投与することに関連した問題によるものである(「ヒト抗マウス抗体」(HAMAs)反応)(Van Kroonenburgh and Pauwels (1988))。

【0006】

一般に、完全なマウスの抗体をヒトで利用することに関連した問題を克服する試みとして、遺伝学的に抗体をより「ヒト様に」することに関連してきた。ヒト化する工程の最初の段階はキメラ抗体、即ち、抗体鎖の可変領域がマウス由来で抗体鎖の定常領域がヒト領域であるような抗体を作製することであった。次に、抗原結合を規定する可変領域どうしの間をヒトで対応するものと置き換え、これによりいわゆるヒト化抗体となった。このようなキメラ化したヒト化抗体の欠点は、これらの抗体にはまだマウスの配列を若干残っているため、特に長期間投与した場合には、不所望な免疫反応をまだ惹起してしまうことである。

【0007】

治療上の利点を考えると、CD1aに対するヒト結合分子がまだ必要である。

【0008】

本発明は、医学において、特にCD1a関連疾患の診断、予防及び/又は治療のために用いることのできる、CD1aに対するヒト結合分子を提供する。

【0009】

発明の説明

以下に、本発明で用いられる用語の定義を示す。

【0010】

定義急性骨髄性白血病

本願明細書に用いられる用語「急性骨髄性白血病」とは、骨髄由来の前駆細胞の無制限な増殖により特徴づけられる。骨髄由来の前駆細胞は、骨髄性前駆細胞、骨髄単球性前駆

10

20

30

40

50

細胞、未熟巨核芽細胞を含むが、これらに限定されるものではない。急性骨髄性白血病（AML）のサブタイプには、FAB分類によれば、F A B - M 0、F A B - M 1、F A B - M 2、F A B - M 3、F A B - M 4、F A B - M 5、F A B - M 6及びF A B - M 7がある。

【 0 0 1 1 】

アミノ酸配列

本願明細書に用いられる用語「アミノ酸配列」とは、天然又は合成の分子、及びペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド又はタンパク質配列のことを示す。

【 0 0 1 2 】

アポトーシス

本願明細書に用いられる用語「アポトーシス」とは、細胞分化の特定の段階及び特定の刺激に対する反応の中で起きる細胞的事象の複雑なカスケードにより起こる、秩序だった又は制御された全ての細胞死を意味する。アポトーシスは1種類以上の特徴的な細胞変化によって特徴づけられ、及び/又はこれに付随する。特徴的な細胞変化には、細胞質の凝縮、細胞膜微絨毛の消失、核の断片化、染色体DNAの分解又はミトコンドリア機能の喪失が含まれるが、これらに限定されるものではない。アポトーシスは、例えば、細胞生体判別試験、FACS分析又はDNA電気泳動法により決定し測定することができるが、これら全ては当該技術分野において既知のものである。

【 0 0 1 3 】

結合分子

本願明細書に用いられる用語「結合分子」とは、キメラ化、ヒト化又はヒトモノクローナル抗体のような、無傷の免疫グロブリン、若しくは免疫グロブリンの結合パートナー、即ちCD1aに対する特異的な結合を無傷の免疫グロブリンと競合するような免疫グロブリン断片を有する抗原結合領域及び/又は可変領域を意味する。構造によらず、抗原結合断片は無傷の免疫グロブリンにより認識されるのと同じ抗原に結合する。用語「結合分子」が本願明細書に用いられる際には、無傷の抗体のクラス及びサブクラスの免疫グロブリンが含まれる。この中には、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが含まれ、これらの内いくつかは更にサブクラス（アイソタイプ）、即ち、IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4に分類され、これはその抗原結合断片についても同様である。

【 0 0 1 4 】

抗原結合断片には、とりわけ、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、相補性決定領域（CDR）断片、単鎖抗体（scFv）、二価単鎖抗体、抗体ダイマー（diabodies）、抗体トリマー（triabodies）、抗体テトラマー（tetrabodies）、少なくともその（ポリ）ペプチドに特異的な抗原結合を十分に示す免疫グロブリン断片を有する（ポリ）ペプチドなどが含まれる。上記断片は、合成によって、又は無傷の免疫グロブリンを酵素的な若しくは化学的な切断することによっても生成しても良く、組換えDNAの技術を用いて遺伝子工学的に作っても良い。これらを生成する方法は当該技術分野では良く知られており、例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow and D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されており、本願明細書に参考として組み込む。結合分子又はその抗原結合断片は、1箇所以上の結合部位を有することができる。もし結合部位が2箇所以上の場合には、結合部位は互いに同じものであっても、異なるものであっても良い。

【 0 0 1 5 】

結合分子は、単独（naked）及び複合体を形成していない（unconjugated）結合分子でよい。単独及び複合体を形成していない結合分子とは、例えば、とりわけ毒性物質、放射活性物質、リポソーム、酵素といった、エフェクター構成部分又はタグと複合体を形成しておらず、機能を有して結合していない、あるいは生理的又は機能的に関連していない結合分子を指し示すことを意図している。単独及び複合体を形成していない結合分子とは、安定化した、多量体化した、ヒト化した、若しくは、どのような方法により操作された結合分子も除外するものではないことが理解されるが、エフェクター構成部分又はタグに結

10

20

30

40

50

合させることによるものは除かれる。従って、翻訳後修飾を受けた単独及び複合体を形成していない結合分子は全てこれに含まれ、修飾が天然の結合分子を生成する細胞環境中ではなされたものも、組換えの結合分子を生成する細胞によるものも、修飾が最初に結合分子を調製した後に人間の手により導入されたものも含まれる。もちろん、単独又は複合体を形成していない結合分子という用語は、体内に投与した後にエフェクター細胞及び/又は分子と機能的に会合することのできる結合分子を含む。この理由は生物学的効果を発揮するには何らかのこのような相互作用が必要だからである。

【0016】

生物学的標本

本願明細書に用いられる用語「生物学的標本」とは、様々な標本の種類を含んでおり、血液や生物由来の他の液体標本、生検標本や組織培養物といった固形組織標本、又はここから採取した細胞若しくはその子孫を含む。この用語は、採取してから薬剤処理、可溶化、タンパク質やポリヌクレオチドといった、特定の成分を濃縮するなどのいかなる操作を加えた標本も含まれる。この用語はいかなる動物種から採取した様々な臨床検体を含んでおり、培養した細胞、細胞上清及び細胞溶解物もこれに含まれる。

10

【0017】

慢性骨髄性白血病

本願明細書に用いられる用語「慢性骨髄性白血病」とは、骨髄及び骨髄以外の部位における骨髄造血細胞の無制限な増殖により特徴づけられ、悪性の骨髄芽球は分化して骨髄球、後骨髄球、杆状球及び顆粒球を作ることができる。

20

【0018】

相補性決定領域

本願明細書に用いられる用語「相補性決定領域」とは、免疫グロブリンのような結合分子の可変領域内の配列を意味しており、抗原上で認識される抗原決定基と形状及び電荷の分布が相補的な抗原結合部位を作る。CDR領域は、タンパク質又はタンパク質断片の直線状抗原決定基、不連続抗原決定基又は立体構造抗原決定基に特異的であり、これは元々の立体構造のタンパク質上、又は、場合によっては、変性した、即ちSDSにより可溶化したタンパク質上に存在する。抗原決定基にはタンパク質の翻訳後修飾も含まれる。

【0019】

欠失

本願明細書に用いられる用語「欠失」とは、アミノ酸又は核酸配列の変化であって、親分子、即ち通常天然由来の分子と比べてそれぞれ1個以上のアミノ酸又は核酸が存在しないことを意味する。

30

【0020】

発現調節核酸配列

本願明細書に用いられる用語「発現調節核酸配列」とは、特定の宿主生物体において機能を有して結合したコード配列の発現に必要となる及び/又は影響を与えるポリヌクレオチド配列を意味する。2つの核酸配列が機能を有して結合している場合には、同じ配向であり、同じリーディングフレームでもある。これらは通常、原則的には隣接しているが、このことは必須ではない。発現調節核酸配列、例えば、なかでも適切な転写開始、終止、プロモーター、エンハンサー配列；レプレッサー又は活性化配列；スプライシングやポリアダニル化シグナルといった効率的なRNA処理シグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を高める配列（即ち、リボソーム結合部位）；タンパク質の安定性を高める配列；必要に応じて、タンパク質の分泌を高める配列は、選択された宿主生物体において活性を示すいかなる核酸配列であっても良く、タンパク質をコードする遺伝子に由来する、宿主生物体に相同又は非相同のものであっても良い。

40

【0021】

機能的変異体

本願明細書に用いられる用語「機能的変異体」とは、親結合分子の核酸及び/又はアミノ酸配列と比べ、核酸及び/又はアミノ酸配列が1箇所以上変化しているが、結合パート

50

ナー、即ちCD1aに親結合分子と競合して結合することがまだできる核酸及び/又はアミノ酸配列からなる結合分子を意味する。言い換えれば、親結合分子の核酸及び/又はアミノ酸配列の修飾は、その核酸配列によりコードされる又はそのアミノ酸配列を含む結合分子の結合特性に有意な影響を与えないか又は変化させることはなく、即ち、結合分子はまだその標的を認識し結合できる。機能的変異体は、核酸及びアミノ酸の置換、付加及び欠失を含め、保存配列修飾を有する。これらの修飾は、例えば部位特異的変異導入やランダムPCRによる変異導入のような、当該技術分野で知られる標準的な技術により導入することができる。

【0022】

保存的なアミノ酸置換には、例えば、アミノ酸残基を構造的又は化学的特性の似たアミノ酸残基で置換するものがある。似た側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当該技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（即ち、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（即ち、アスパラギン酸、グルタミン酸）、電荷を持たない極性側鎖を有するアミノ酸（即ち、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性の側鎖を有するアミノ酸（即ち、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）、分岐側鎖を有するアミノ酸（即ち、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（即ち、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）がある。さらに、変異体は非保存的なアミノ酸置換を有していても良い、即ち、アミノ酸を構造的又は化学的特性が異なったアミノ酸残基により置換しても良い。同様の軽微な変更は、アミノ酸の欠失又は挿入、又は両方も含むことができる。どのアミノ酸残基が、免疫学的な活性を失うことなく、置換、挿入又は欠失することができるかは、当該技術分野において良く知られているコンピュータープログラムを用いることにより見つけることができる。

【0023】

核酸配列の変異は、転移やトランスポージョン変異のように、ある場所に1つだけ変化させる（点突然変異）ものでもよく、或いは又、多複数の塩基を1箇所に挿入、欠失又は変化させても良い。加えて、1つ以上の変化を核酸配列内で何カ所でも加えて良い。変異は、当該技術分野で知られる適切でないかなる方法によっても良い。

【0024】

ホスト

本願明細書に用いられる用語「ホスト」とは、クローニングベクターや発現ベクターといったベクターを導入する生物体又は細胞を指し示すことを意図している。生物体又は細胞は、原核生物であっても、真核生物であってもよい。この用語が特定の対象となる生物体又は細胞だけでなく、そのような生物体や細胞の子孫も指し示すことを意図していることを理解されたい。ある修飾は変異又は環境の影響によりそれ以降の世代に生じることがあるので、そのような子孫は事実上、親生物体又は細胞と同質ではないが、このような子孫も本願明細書で用いられる用語「ホスト」の範囲内に含まれる。

【0025】

ヒト

用語「ヒト」とは、本願明細書で定義された結合分子について用いられ、ヒトに直接由来する分子、又はヒトの配列に基づく分子を意味する。結合分子がヒトの配列に由来する又は基づくもので、その後修飾を受けた場合でも、本願明細書を通じて用いられているようにヒトであると考えられる。言い換えれば、用語「ヒト」は、結合分子について用いる場合には、ヒト生殖細胞の免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域であってヒト若しくはヒトリンパ球に又は修飾形に生じる又は生じていない可変領域又は定常領域に基づくものを含むことを意図している。従って、ヒト結合分子はヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列にコードされていないアミノ酸残基を含むことができ、置換及び/又は欠失（即ち、試験管内における例えばランダム又は部位特異的変異導入によって、又は導入された変異生体内での体細胞突然によって導入された変異）を有することができる。本願明

10

20

30

40

50

細書で用いられる「基づく」とはまた、核酸配列がテンプレートから正確にコピーされている、若しくは例えば変異性 (error-prone) PCR などにより軽微な変異が入っている、又は核酸配列がテンプレートに完全に合わせて、若しくは軽微な修飾を伴って合成で作られる状況も意味する。ヒト配列に基づく半合成分子もまた本願明細書で用いるヒトであると考えられる。

【0026】

免疫リボソーム

用語「免疫リボソーム」とは、本願明細書で定義された結合分子を有するリボソームであって、標的部分として作用してリボソームを結合分子の結合パートナーに特異的に結合させることのできるものを意味する。結合パートナーは、体液に存在しても良いし、細胞表面に結合していても良い。

10

【0027】

挿入

用語「挿入」は、用語「付加」としても知られるが、アミノ酸又はヌクレオチド配列の変化であって、親分子、即ち通常は天然由来の分子と比べ、アミノ酸又はヌクレオチド残基が1以上追加されるものを意味する。

【0028】

内在化する結合分子

本願明細書に用いられる用語「内在化する (internalising) 結合分子」とは、結合した標的細胞内に内在化する (internalised) ことができる本願明細書で定義された結合分子を意味する。言い換えれば、結合分子は取り込まれる、即ち標的細胞の外側 (細胞表面) から内側 (例えば、エンドソーム分画内、若しくは他の分画、又は細胞の細胞質内に) に、結合分子の結合パートナーに結合して直ちに標的細胞により輸送される。

20

【0029】

単離された

本願明細書に用いられる用語「単離された」とは、本願明細書で定義された結合分子について用いる場合には、結合分子が他のタンパク質又はポリペプチドを実質的に含まないこと、特に異なった抗原特異性を有する他の結合分子を含まず、他の細胞の物質及び/又は化学物質を含まないことを意味する。例えば、結合分子を組換え技術で生成した場合には、好ましくはこれらの結合分子は培養液を含まず、結合分子が化学合成により生成された場合には、好ましくはこれらの結合分子は化学前駆物質又は他の化学物質を実質的に含まず、即ち、これらはタンパク質の合成に関わる化学前駆物質又は他の化学物質から分離されている。用語「単離された」は、本願明細書で定義された結合分子をコードする核酸分子について用いる場合には、本結合分子をコードするヌクレオチド配列が他のヌクレオチド配列、特にCD1a以外の結合パートナーに結合する結合分子をコードするヌクレオチド配列を含まない核酸分子を指し示すことを意図している。更に、用語「単離された」は、天然の核酸分子がその天然の宿主中に本来伴っている他の細胞成分、例えば、リボソーム、ポリメラーゼ、核酸分子が本来関連するゲノム配列から核酸分子が実質的に分離されていることを意味する。更に、用語「単離された」核酸分子は、cDNA分子のように、他の細胞物質を実質的に含まず、組換え技術により生成した場合には培地を実質的に含まず、化学的に合成された場合には化学前駆物質又は他の化学物質を実質的に含まない。

30

40

【0030】

ランゲルハンス細胞組織球増加症 (LCH)

用語「ランゲルハンス細胞組織球増加症 (LCH)」とは、ランゲルハンス細胞に類似した樹状細胞の局所性又は全身性の増殖により特徴づけられる疾患を意味する。これらの細胞は、骨髄に由来し、通常は主に皮膚に存在する。LCHでは、これらの細胞は増殖し、とりわけ骨、肝臓、肺及び脳のような他の多くの臓器に影響を与えることもあるし、与えないこともある。LCHは、組織球増加性疾患の中では最も頻度の多い疾患である。本疾患は、全年齢に発症するが、0~4歳の子供に最も頻度が高い。臨床症状は、自然に治

50

癒する可能性のある局所の皮膚の発赤又は単独の骨病変から、最終的には患者の死に至る広範囲の内臓障害及び機能不全まで、様々である。

【0031】

リポソーム

本願明細書に用いられる用語「リポソーム」とは、様々な種類の脂質、好ましくは両親媒性脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤から成る層により囲まれた小胞であり、この小胞はこれらの分子から、超音波処理又はリン脂質界面活性剤複合体からの界面活性剤の除去といった当該技術分野において知られている技術により人工的に作られる。この層は疎水性部分と親水性部分とを有する分子により形成された2本層であり、ここで疎水性部分は親水性培地中で会合して層の内部を形成し、親水性部分は培地と接したままとなる。この層は内部を囲んで封入し、この中には、全体的に又は部分的に、水相、固体、ゲル、気体相又は非水性の液体を含むことができる。リポソームは、核酸分子、結合分子、タンパク質、毒性物質及び他の物質又は化合物といった1種類以上の分子を、リポソームと細胞膜との融合により動物細胞のような細胞に輸送するのに有用であり、それはリポフェクションとも称される過程である。分子はリポソームの内部に含まれても、脂質層内に含まれても、脂質層の外表面に接着していても良い。

10

【0032】

モノクローナル抗体

本願明細書に用いられる用語「モノクローナル抗体」とは、特定の抗原決定基に対して単一の結合特異性及び親和性を示すモノクローナル抗体を意味する。従って、用語「ヒトモノクローナル抗体」とはヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列由来、又は完全に合成若しくは半合成配列由来の可変領域及び定常領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を意味する。

20

【0033】

骨髄異形成症候群

本願明細書に用いられる用語「骨髄異形成症候群」とは、骨髄の初期造血細胞に由来する密接に関連し合ったクローン性造血疾患の不均質なグループを含む。全ての疾患は、形態及び成熟が損なわれた細胞性骨髄(骨髄異形成性造血:dysmyelopoiesis)、および末梢血血球減少により特徴づけられ、無効な血液細胞が作られる結果となる。言い換えると、成熟過程にある血球細胞が十分に成熟して血液中に入る前に骨髄中で頻りに細胞死を起こすため、血球濃度が低くなるのである。骨髄異形成症候群の患者では、白血病性芽球と呼ばれる、極めて未成熟な骨髄細胞の蓄積も見ることがある。

30

【0034】

天然由来

本願明細書に用いられる用語「天然由来」とは、物について用いるとき、その物が自然界に見つけられる、という事実を示す。例えば、自然から単離することのできる生物体に存在し、研究室でヒトに修飾を加えられていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は天然由来である。

【0035】

腫瘍細胞

本願明細書に用いられる用語「腫瘍細胞」とは、明らかな生理学的機能を有しない不所望な新しい自律的増殖により生じた細胞を意味する。腫瘍細胞は更に、形質転換細胞及び血液の癌(良性及び悪性)を含む癌細胞を含む。

40

【0036】

核酸分子

本願明細書に用いられる用語「核酸分子」とは、ヌクレオチドの高分子形態の物を意味し、RNA、cDNA、ゲノムDNA、並びにこれらの合形成態及び混合高分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方を含む。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、又はいずれかの種類のヌクレオチドの修飾した形態を指す。この用語は、単鎖又は2本鎖体のDNAも指す。加えて、ポリヌクレオチドは、天然由来及び/又は非天然

50

由来の結合により互いに結合した、自然起源及び修飾ヌクレオチドの一方又は両方を含むことができる。核酸分子は、当業者に容易に理解されるように、化学的若しくは生物学的に修飾されても良いし、又は天然のものではない若しくは誘導化ヌクレオチド塩基を含んでも良い。そのような修飾には、例えば、標識化、メチル化、天然由来のヌクレオチドのうち1つ以上を類似物質で置換すること、ヌクレオチド間修飾があり、ヌクレオチド間修飾の例には、非荷電結合（例えば、メチルスルホン酸、ホスホトリエステル、ホスホアミド、カルバミン酸等）、荷電結合（例えば、ホスホロチオ酸、ホスホロジチオ酸等）、ペンドラント部分（例えば、ポリペプチド）、挿入剤（例えば、アクリジン、プソラレン等）、キレート剤、アルキル化剤、及び修飾結合（例えば、アルファアノマー核酸等）などがある。上記の用語は、1本鎖、2本鎖、部分的2本鎖、3本鎖、ヘアピン状、環状及びパドロック体といった、任意の位相形態も含むことも意図している。水素結合又は他の化学的相互作用を介して指定配列に結合できるようにポリヌクレオチドを模倣した合成分子も含まれる。このような分子は当該技術分野で知られており、例えば、分子骨格でリン酸結合をペプチド結合で置換した分子がある。核酸配列を参照することにより、別に特定されている場合を除いてはその相補鎖も含むことになる。従って、特定の配列を有する核酸分子を参照することにより、相補配列とともに相補鎖も含むと理解されるであろう。相補鎖は、例えば、アンチセンス療法、ハイブリダイゼーションプローブ及びPCRプライマーにも有用である。

10

【0037】

機能を有して結合した

用語「機能を有して結合した」とは、物理的に結合した2つ以上の核酸配列構成要素で、互いに機能的な関連のあるもののことを指し示す。例えば、プロモーターがコード配列の転写又は発現を開始又は制御しうる場合には、プロモーターはコード配列と機能を有して結合しており、この場合には、コード配列はプロモーターの「制御下」にあると理解するべきである。一般に、2つの核酸配列が機能を有して結合している場合には、これらは同じ配向であり、通常同じリーディングフレームでもある。これらは通常、原則的には隣接しているが、このことは必須ではない。

20

【0038】

薬学的に許容される賦形剤

「薬学的に許容される賦形剤」により、薬剤、医薬品又は結合分子といった活性分子と組み合わせて好ましい又は使いやすい投薬形態を調製する任意の不活性物質を意味する。「薬学的に許容される賦形剤」は、使用投与量及び濃度では服用者に無害であり、薬剤、医薬品又は結合分子を含有する製剤の他の構成成分に適合する賦形剤である。

30

【0039】

特異的に結合する

本願明細書に用いられる用語「特異的に結合する」とは、例えば抗体のような結合分子と、例えば抗原のようなその結合パートナーの相互作用に関して、その相互作用が結合分子状の、例えば抗原決定基即ち抗原決定基のような特定の構造が存在することに依存していることを意味する。言い換えれば、抗体は、結合パートナーが他の分子が混合した中にある場合でさえ、結合パートナーに選択的に結合又は認識する。この結合は、共有相互作用若しくは非共有相互作用、又はその両者の組合せにより媒介される。

40

【0040】

置換

本願明細書で用いる「置換」とは、1つ以上のアミノ酸又はヌクレオチドを、各々異なったアミノ酸又はヌクレオチドで置き換えることを意味する。

【0041】

治療に有効な量

用語「治療に有効な量」とは、CD1a分子が役割を果たす若しくは関連する疾患又は病気を予防及び/又は治療する、又はそのような病気又は疾患に関連した状態を改善する効果のある本願明細書で定義される結合分子の量を指し示す。

50

【 0 0 4 2 】

治療

用語「治療」とは、治療上の処置だけでなく、予防又は阻止手段も指す。治療を必要とする人には、CD1a分子が役割を果たす又は関連する病気又は疾患に既に罹患している人だけでなく、そのような病気又は疾患を予防すべき人も含まれる。

【 0 0 4 3 】

ベクター

用語「ベクター」とは、ホストに導入するために第2の核酸分子を挿入することができる核酸分子であって、それはホストで複製され、場合によっては発現する。言い換えれば、ベクターとは、ベクターが関連している第2の核酸分子を運ぶことのできるものである。クローニングベクター及び発現ベクターは本願明細書に用いる用語「ベクター」において想定されているものである。ベクターには、プラスミド、コスミド、細菌性人工染色体(BAC)及び酵母人工染色体(YAC)が含まれるが、これらに限定されるものではなく、バクテリオファージ又は植物又は動物(ヒトを含む)ウイルスに由来するベクターも含まれる。ベクターはここに提案されたホストにより認識される複製起点を有しており、発現ベクターの場合には、ホストにより認識されるプロモーター及び他の制御領域を有する。第2の核酸分子を有するベクターは形質転換、トランスフェクション又はウイルス侵入機構を利用することにより導入することができる。あるベクターは導入されたホストの中で自律的に複製することができる(例えば、細菌性の複製起点を有する細菌性ベクター)。他のベクターではホスト内に導入されるとホストのゲノムに統合され、それによりホストのゲノムとともに複製される。

10

20

【 0 0 4 4 】

発明の概要

本発明において、ヒトCD1aに結合することのできるいくつかのヒト結合分子が、ファージディスプレイ法を用いることにより同定され、得られた。更に、このようなヒト結合分子を生成する方法、並びにヒト結合分子を、とりわけ腫瘍性の疾患及び病気の診断、予防及び治療に使用する方法を記載した。

【 0 0 4 5 】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトCD1aに特異的に結合することのできるヒト結合分子を含む。本結合分子は、ヒトCD1a断片、本発明のヒト結合分子により認識されるCD1aの抗原決定基を少なくとも有するCD1a断片に結合することもでき、特に特異的に結合することができる。CD1aの自然起源の切断型又は分泌型、天然由来の変異体(例えば、オルタナティブスプライシングを受けたもの)及び天然由来の対立遺伝子変異体に特異的に結合できるヒト結合分子も本発明の一部である。本発明の結合分子は、修飾により結合分子のCD1a分子への結合が失われない限り、CD1aの天然由来ではない変異体又は類似体にも特異的に結合することができる。

30

【 0 0 4 6 】

本発明に従うヒト結合分子は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体のような無傷の免疫グロブリン分子であっても良い。又は、結合分子は、抗原結合断片であっても良く、このような抗原結合断片にはFab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、相補性決定領域(CDR)断片、単鎖抗体(scFv)、二価単鎖抗体、抗体ダイマー(diabodies)、抗体トリマー(triabodies)、抗体テトラマー(tetrabodies)、及び少なくとも(ポリ)ペプチドに特異的な抗原結合を十分に示す免疫グロブリン断片を有する(ポリ)ペプチドなどが含まれるが、これに限定されるものではない。本発明のヒト結合分子は、単離されていない状態又は単離された状態で用いることができる。更に、本発明のヒト結合分子は単独、又は少なくとも1種類のヒト結合分子(又はその変異体又は断片)を含む混合液中で用いることができる。言い換えれば、ヒト結合分子は、例えば薬学的組成物として2種類以上のヒト結合分子又はその断片を含む組み合わせで用いることができる。例えば、異なっているが相補的な活性を有するヒト結合分子を単一の治療で組

40

50

み合わせて所望の治療的又は診断的効果を得ることもできるが、或いは又、同一の活性を有するヒト結合分子を単一の治療で組み合わせてもまた、所望の治療的又は診断的効果を得ることもできる。更に、混合物は治療薬剤を少なくとも1種類含むことができる。一般に、本発明に従うヒト結合分子は、その結合パートナー、即ちCD1aに、 0.2×10^{-4} M、 1.0×10^{-5} M、 1.0×10^{-6} M、 1.0×10^{-7} M未満、好ましくは 1.0×10^{-8} M未満、より好ましくは 1.0×10^{-9} M未満、より好ましくは 1.0×10^{-10} M未満、さらにより好ましくは 1.0×10^{-11} M未満、特に 1.0×10^{-12} M未満の結合定数(Kd値)で結合することができる。結合定数は抗体のアイソタイプによって様々である。例えば、IgMアイソタイプの親和結合は、少なくとも約 1.0×10^{-7} Mの親和結合である。親和結合は例えば、表面プラズモン共鳴、即ち、例えばBIAcoreシステム(スウェーデンウプサラのPharmacia Biosensor AB社)を用いてバイオセンサー内のタンパク質濃度の変化を検出することによりリアルタイム生物特異的相互作用の解析を可能とする光学的現象を用いて、測定することができる。

【0047】

本発明に従うヒト結合分子は可溶化状態のヒトCD1aに結合することができ、又はキャリア又は基材に結合又は接着したヒトCD1aに結合することができる。キャリア又は基材は、ガラス、プラスチック(例えば、ポリスチレン)、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース又はテフロン等から作ることができる。このような支持体の表面は固体又は多孔性であり、いかなる使いやすい形状であっても良い。更に、ヒト結合分子は精製状態又は非精製状態のヒトCD1aに結合することができる。好ましくは、ヒト結合分子は、ヒトCD1a陽性細胞又はヒトCD1a若しくはその断片を有するこれらの細胞の一部若しくは部分のような、細胞に関連したヒトCD1a分子に特異的に結合できる。

【0048】

本発明の態様において、本発明のヒト結合分子は、標的細胞の表面に存在するヒトCD1aに結合してからすぐに表面に結合したままとなり、単独の結合分子の状態、抗体依存性細胞障害(ADCC)及び補体依存性細胞障害(CDC)の可能なエフェクター機能を支持するのに用いることができる。

【0049】

ADCCとは、Fc受容体を発現した非特異的細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)が結合分子のいわゆるFc部分を認識する、細胞を介した反応を意味しており、結合分子が標的細胞に結合し、これにより標的細胞を融解させる。CDCは、補体存在下で分子が標的を融解させる能力を意味する。補体活性化経路は、補体系の最初の分子(C1q)が同種抗原と複合体を形成している結合分子に結合することにより開始される。細胞死が抗体依存性細胞傷害(ADCC)又は補体依存性細胞傷害(CDC)により起きたものであることを区別するために、細胞死を試験管内で補体及び免疫エフェクター細胞非存在下で測定することができる。細胞死の測定は、例えば、熱不活化血清(即ち、補体非存在下)を用いて、免疫エフェクター細胞非存在下で行うことができる。結合分子が細胞死を誘導しうるかを決定するために、プロピジウムアイオダイド(PI)、トリパンブルー又は7AADの取り込みにより評価される膜の統合性を、未処理の細胞を比較して測定した。

【0050】

本発明に従う単独(naked)の抗体はまた、ADCC又はCDCによらない他の方法で、標的細胞のアポトーシスを誘導することができる。標的細胞には、腫瘍細胞のようなCD1a陽性細胞が含まれるが、これに限定されるものではない。アポトーシスを測定する方法は、当業者に知られているものであり、アネキシンV染色を用いたFACS解析、DNA電気泳動法、プロピジウムアイオダイド(PI)、トリパンブルー又は7AADの取り込みが含まれるが、これに限定されるものではない。

【0051】

本発明に従う単独(naked)の結合分子は、リガンドのような、通常はCD1aに結合

10

20

30

40

50

する他の分子が結合するのを阻害又は遮断するのに用いることもできる。このように、ヒト結合分子は、分子がCD1aに結合又は相互作用することにより引き起こされる又は活性化させる、1種類以上の考え得る下流の過程に干渉することができる。

【0052】

或いは又、標的細胞表面に存在するCD1a分子に結合してすぐに、本願明細書に定義されるヒト結合分子は内在化(internalise)されることができる。結合分子の内在化(internalisation)は、既知の技術により測定することができ、この方法には、CD1a分子に結合しうる内在化結合分子の特異的トレーシングが含まれるが、これに限定されるものではない。結合分子を蛍光色素により標識することができ、内在化をフローサイトメトリ又は共焦点レーザー顕微鏡により測定することができる。

10

【0053】

本発明で定義されたヒト結合分子がゆっくりと内在化され、内在化される前に長時間標的細胞表面に結合している場合には、全く内在化されない結合分子と同様に、ADCC、CDC、アポトーシス又は抗体介在性酵素プロドラッグ療法(ADEPT)を用いる治療において有用である。ADCC、CDC及びアポトーシスについては上述しており、ADEPTについては以下に述べる。

【0054】

好ましい実施形態において、本発明によるヒト結合分子は少なくとも、CDR3領域、好ましくはHCDR3領域を有しており、この領域は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する。

20

【0055】

更に他の実施形態では、本発明によるヒト結合分子は可変重鎖を有しており、これは配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16および配列番号18から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する。

【0056】

更なる実施形態において、本発明によるヒト結合分子は、配列番号8に示したアミノ酸配列を有する可変重鎖及び配列番号20に示したアミノ酸配列を有する可変軽鎖、配列番号10に示したアミノ酸配列を有する可変重鎖及び配列番号20に示したアミノ酸配列を有する可変軽鎖、配列番号12に示したアミノ酸配列を有する可変重鎖及び配列番号22に示したアミノ酸配列を有する可変軽鎖、配列番号14に示したアミノ酸配列を有する可変重鎖及び配列番号20に示したアミノ酸配列を有する可変軽鎖、配列番号16に示したアミノ酸配列を有する可変重鎖及び配列番号20に示したアミノ酸配列を有する可変軽鎖、配列番号18に示したアミノ酸配列を有する可変重鎖及び配列番号20に示したアミノ酸配列を有する可変軽鎖を有する。CD1aに対するヒトIgG1抗体、02-113、02-114、02-115、02-116、02-117及び02-118と呼ばれている前記抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAを有するプラスミドは登録されている。抗CD1aヒトIgG1重鎖をコードするDNAを有するプラスミドは、pgG102-113C03、pgG102-114C03、pgG102-115C03、pgG102-116C03、pgG102-117C03及びpgG102-118C03と呼ばれ、欧州細胞カルチャーコレクション(ECACC)に、2003年10月28日に、それぞれ03102801、03102802、03102803、03102804、03102805及び03102806のアクセション番号にて登録されている。02-113、02-114、02-116、02-117及び02-118と呼ばれる、抗CD1aヒトIgG1軽鎖をコードするDNAを有するプラスミドは、pSyn-C05-VkIと呼ばれ、欧州細胞カルチャーコレクション(ECACC:英国 SP4 OJG ソールズベリー、CAMR)に、2003年10月28日に、03102807のアクセション番号にて登録されている。02-115と呼ばれる、抗CD1aヒトIgG1軽鎖をコードするDNAを有するプラスミドは、pSyn-C04-V13と呼ばれ、欧州細胞カルチャーコレクション(ECACC:英国 SP4 OJG ソールズベリー、CA

30

40

50

MR)に、2003年10月28日に、03102808のアクセション番号にて登録されている。

【0057】

本発明の他の態様は、本願明細書に定義された、結合分子の機能的変異体又はその断片を含む。分子を本発明による結合分子の機能的変異体であるとみなすのは、変異体が親結合分子とヒトCD1aに特異的な結合を競合する、好ましくはヒトCD1a上の同じ結合部位に競合することができる場合である。言い換えれば、機能的変異体がまだヒトCD1a又はその一部に結合することができる場合である。機能的変異体には、親結合分子にはない化学的及び/又は生化学的、試験管内又は生体内修飾を含む一次構造配列において実質的に同一である誘導体を含むが、これに限定されるものではない。このような修飾には、とりわけアセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム分子(heme moiety)の共有結合付加、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質又は脂質誘導体の共有結合付加、フォスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環状化、ジフルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合形成、シスチン形成、ピログルタミン酸形成、フォルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニン化のようなトランスファーRNAにより媒介されるタンパク質に対するアミノ酸付加、ユビキチン化などが含まれる。

10

【0058】

あるいは又、機能的変異体は、親結合分子のアミノ酸配列と比べて、1つ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失又はそれらの組み合わせを有する、本発明において定義される結合分子であってもよい。更に機能的変異体は、アミノ又はカルボキシ末端のいずれか又は両方で、アミノ酸配列の配列の切断を有してもよい。本発明に従う機能的変異体は、親結合分子と結合親和性が同じのものであっても異なるものであってもよく、またより高いものであっても低いものであってもよいが、たとえば細胞上のヒトCD1a分子に結合することができる。好ましくは、可変領域のアミノ酸配列は修飾されており、このような配列にはフレームワーク領域、超可変領域、特にCD3領域が含まれているが、これらに限定されるものではない。一般に軽鎖及び重鎖可変領域は3つのCDRを有する3カ所の超可変領域及び、より保存された領域である、いわゆるフレームワーク領域(FR)を有する。超可変領域は、CDRからのアミノ酸残基と超可変ループからのアミノ酸残基とからなる。本発明の範囲にあると考えられる機能的変異体は、少なくとも約50%~約99%、好ましくは少なくとも約60%~約99%、より好ましくは少なくとも約70%~約99%、さらにより好ましくは約80%~約99%、最も好ましくは少なくとも約90%~約99%、特に少なくとも約95%~約99%、特に約97%から99%の本願明細書で定義する親結合分子とのアミノ酸配列相同性を有する。コンピューターアルゴリズム、例えばとりわけギャップ又はベストフィットといった当業者に知られたものを、比較されるアミノ酸配列と最適に並べ、類似又は同一アミノ酸残基を定義するのに用いることができる。

20

30

【0059】

機能的変異体は、親結合分子又はその一部分を当業者に知られている一般的な分子生物学的方法によって改変して得ることができ、このような方法には誤りがちな(error-prone)PCR法、オリゴヌクレオチド特異的変異導入法及び部位特異的変異導入法が含まれるが、これらにかぎるものではない。

40

【0060】

更なる態様において、本発明は免疫複合体、即ち少なくとも1つの本願明細書に定義されるヒト結合分子を有し、さらに少なくとも一つの、細胞機能の阻害または妨害及び/又は細胞の破壊の誘導をおこす治療的部分のような、タグを更に含む。本発明に考慮されるものとして、本発明による免疫複合体の混合物、又は少なくとも1つの本発明による免疫複合体と、治療薬剤又は他の結合分子又は他の免疫複合体のような他の分子との混合物がある。更なる態様において、本発明の免疫複合体は1つ以上のタグを有することができる

50

。これらのタグは、互いに同じものであっても異なるものであってもよく、結合分子に対して非共有結合的に接合又は結合させることができる。タグは共有結合により結合分子に接合又は結合させることができ、その共有結合には、ジスルフィド結合、水素結合、静電結合、組み替え融合及び立体結合が含まれるが、これに限定されるものではない。或いは又、タグは1種類以上の結合化合物を用いて結合分子に接合又は結合させることができる。タグを結合分子に結合する技術は周知であり、たとえば、Arnon et al., *Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*, p. 243-256 in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (1985), Edited by: Reisfeld et al., A. R. Liss, Inc.; Hellstrom et al., *Antibodies For Drug Delivery*, p. 623-653 in *Controlled Drug Delivery*, 2nd edition (1987), Edited by: Robinson et al., Marcel Dekker, Inc.; Thorpe, *Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents*, p. 475-506 In *Cancer Therapy: A Review*, in *Monoclonal Antibodies'84 : Biological And Clinical Applications* (1985), Edited by: Pinchera et al.; Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy, p. 303-316 in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (1985), Edited by: Baldwin et al., Academic Pressを参照されたい。

10

【0061】

本発明によるタグには、毒性物質、放射活性物質、リポソーム、酵素、ポリヌクレオチド配列、プラスミド、タンパク質、ペプチド又はそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されるものではない。毒性物質には、例えば低分子毒素又は化学治療薬剤のような細胞毒性薬剤、又は細菌性、真菌性、植物性又は動物性由来の酵素的な活性を有する毒素、又はその断片が含まれる。細胞毒性薬剤の例には、チオテバ及びシクロフォスファミドといったアルキル化薬剤；プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなアルキルスルホン酸塩；ベンゾドパ、カルボコン、メツルドパ及びウレドパのようなアジリジン；アルトレタミン、トリエチルエネメラミン、トリエチレンフォスフォラミド、トリエチレンチオフォスフォラミド及びトリメチルオロメラミンのようなエチレンイミン；及びメチルアメラミン、クロラムブチル、クロルナファジン、コロフォスファミド、エストラムスチン、イソスファミド、メクロレタミン、メクロロエタミンオキサイドヒドロクロライド、メルファラン、ノベンピエイン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンのようなニトロソウレア；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアミシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモイニシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、ミトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシンのような抗生物質；ゲルダナマイシン及びマイタンシンのようなマクロライド系抗生物質；メトトレキサート及び5 - フルオロウラシルのような抗代謝薬；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートのような葉酸類似体；フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタピン、アザチオチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、デオキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンのようなピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンのようなアンドロゲン、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎薬；フロリン酸のような葉酸補充剤；シスプラチン及びカルボプラチンのような白金類似体；トリアゼン；エピボドフィロトキシシン；プラチナ配位錯体；メイトランシノイド；及びパクリタキセル及びドセタキセルのようなタキソイドが含まれるが、これらに限定されるものではない。薬学的に許容さ

20

30

40

50

り、超音波処理、押し出し、高圧処理/ホモジェナイズ、マイクロ流動化、界面活性剤透析、小リポソーム小胞のカルシウム誘導融合及びエーテル注入法が含まれるが、これらに限定されるものではない。リポソームは、多層性小胞であってもよいが、好ましくは小単層性(200 - 500)又は大単層性(500 - 5000)小胞のような単層性小胞である。調製した後、形成中に大きさを調整していない小胞を当該技術分野で知られる方法により、所望の大きさの範囲でリポソームの大きさの分布が比較的狭くなるように大きさを調整する。薬剤をリポソーム内に導入する方法は当業者に周知である。もっとも一般的な方法には、カプセル化技術及び膜透過可能導入法が含まれる。カプセル化技術において、薬剤とリポソーム分画を有機溶媒中又はすべての種類が混和性である溶媒の混合液中に溶解し、濃縮して乾燥フィルムにする。次に、乾燥したフィルムにバッファーを加えると、リポソームが形成されて小胞壁には薬剤が組み込まれている。この方法は、本願明細書に参考として組み込んだ、米国特許第4,885,172号、第5,059,421号及び第5,171,575号明細書に詳述されている。膜透過可能導入法は、本願明細書に参考として組み込んだ、米国特許第4,885,172号、第5,059,421号、第5,171,578号、第5,316,771号、及び第5,380,531号明細書に詳述されている。理解されるとおり、搭載する技術はこれら2つの一般的な導入技術に限定されるものではない。

10

【0067】

リポソーム内に搭載することのできる薬剤には、上述の毒性物質が含まれるが、これらに限定されるものではない。異なった複数の薬剤を有するリポソーム、及び異なったりポゾームの個々のリポソームに1種類の薬剤が搭載されたりポソームは、用いることのできる代替的態様のリポソームであり、従って、これらの態様も又本発明に考えられる。本発明のヒト結合分子はリポソームの表面に、又は従来の化学的共役技術を用いてリポソームの表面に移植したポリエチレングリコールのようなポリマーの末端に接着することができる。免疫リポソームの利点は、数万もの薬剤分子をリポソームあたり数十の結合分子で輸送できることであり、これにより結合分子に対して高い薬剤比を得ることができる。免疫リポソームが標的細胞に結合した後、薬剤は、結合分子がゆっくりと吸収される又は全く吸収されない場合には、徐々に免疫リポソームから放出されて通常の取り込みメカニズムを用いて遊離した薬剤として細胞に取り込まれ、又は、結合分子が急速に吸収される場合には、リポソーム自身が受容体を介したエンドサイトーシスにより標的細胞に取り込まれ、薬剤は細胞内で徐々に放出される。

20

30

【0068】

他の態様において、本発明のヒト結合分子は例えばヒドロキシプロピルメタクリルアミン(HPPMA)のような水溶性で生分解性ポリマーに結合してもよい。ポリマーは、適当な分解可能なスペーサーを用いて、ポリマーの分離部位に結合した毒性物質を有しており、毒性物質を放出できるようになっている。上記ポリマーは免疫ポリマーとも称される。

【0069】

他の観点において、本発明のヒト結合分子は1つ以上の抗原に結合/接着していてもよい。好ましくは、これらの抗原は結合分子-抗原複合体を投与された被験者の免疫システムにより認識される抗原である。抗原は同じものであってもよいが、異なるものであってもよい。抗原と結合分子とを接着するための結合方法は当該技術分野において周知であり、架橋試薬の利用が含まれるが、これに限定されるものではない。ヒト結合分子はヒトCD1aを有する細胞に結合し、結合分子に接着した抗原が複合体に対する強力なT細胞の攻撃を開始させ、最終的に細胞の破壊が起きる。

40

【0070】

或いは又、本発明に記載されたヒト結合分子は、タグに結合しており、検出及び/又は分析及び/又は診断の目的に用いることができる。これらの目的で結合分子を標識するための用いるタグは、特定の検出/分析/診断技術、及び/又は、とりわけ組織標本の免疫組織染色、scanning laser cytometric detection、蛍光免疫分析、酵素結合免疫吸着分析(ELISA法)、放射性免疫測定法、生物測定法(例えば、成長阻害測定法)、ウェ

50

スタンプロット装置などで用いられる方法に依存している。組織標本の免疫組織染色については、好ましい標識は検出可能な産物を生成して局所に沈着するような酵素である。一般に結合分子に結合し免疫組織化学的に可視化を可能にする酵素は周知であり、アルカリフォスファターゼ、P-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ウレアーゼが含まれるが、これらに限定されるものではない。視覚的に検出可能な産物を生成し沈着する一般的な基質には、o-ニトロフェニル-ベータ-D-ガラクトピラノシド(ONPG)、o-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(OPD)、p-ニトロフェニルリン酸(PNPP)、p-ニトロフェニル-ベータ-D-ガラクトピラノシド(PNPG)、3',3'-ジアミノベンジジン(DAB)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、4-クロロ-1-ナフトール(CN)、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸(BCIP)、ABTS、BluoGal、インドニトロテトラゾリウム(INT)、ニトロブルーテトラゾリウムクロライド(NBT)、フェナジメトサルフェート(PMS)、フェノールフタレインモノフォスフェート(PMP)、トトラメチルベンジジン(TMB)、テトラニトロブルーテトラゾリウム(TNBT)、X-Gal、X-Gluc及びX-グルコシドが含まれるが、これらに限定されるものではない。局所に沈着する産物を生成するのに用いることのできる他の基質は発光物質である。例えば、過酸化水素存在下では、ホースラディッシュペルオキシダーゼはルミノールのようなサイクリックジアシルヒドラジドの酸化反応を触媒することができる。その次に、本発明の免疫複合体の結合分子はコロイド金を用いて標識することもでき、又は例えば³³P、³²P、³⁵S、³H及び¹²⁵Iのような放射性同位体により標識することもできる。本発明の結合分子をフローサイトメトリーによる検出に用いるときには、結合分子を蛍光プローブで効果的に標識できる。本発明の結合分子を蛍光で標識するのに有用な蛍光プローブは多種多様であり、アレキシアフルオル(Alexia Fluor)及びアレキシアフルオル・アンド・コマット色素(Alexa Fluor & commat dyes)、BODIPY色素、カスケードブルー、カスケードイエロー、ダンシル、リサミンローダミンB、マリナブルー、オレゴングリーン488、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、フルオロセインイソチオシアネート(FITC)、アロフィコシアニン(APC)、R-フィコエリトリン(PE)、ペリジニククロフィルタンパク質(PerCP)、テキサスレッド、PerCP-Cy5.5、PE-CY5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-テキサスレッド及びAPC-Cy7のような蛍光共鳴エネルギー直列蛍光プローブが含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の結合分子を標識したアビジン、ストレプトアビジン、キャプタビジン又はネウトラビジンを用いて2次的な検出に用いる場合には、結合分子はビオチンにより標識してもよい。

【0071】

次に、本発明のヒト結合分子を蛍光及び他の色原体若しくは色素のような光感受性薬剤若しくは色素に結合し、そのようにして得られた免疫複合体を光線照射、光線療法又は光線力学療法で用いることができる。光感受性薬剤又は色素には、フォトフリンRTM、合成シジボルフィリン及びジクロリン、金属置換基を有する又は有しないフタロシアニン、O-置換テトラフェニルポルフィリン、3,1-メソテトラキス(o-プロピオンアミドフェニル)ポルフィリン、ベルジン、プルプリン、オクタエチルプルプリンのスズ及び亜鉛誘導体、エチオプルプリン、ヒドロポルフィリン、テトラ(ヒドロキシフェニル)ポルフィリン系のバクテリオクロリン、クロリン、クロリン_{e6}、クロリン_{e6}のモノ-1-アスパルチル誘導体、スズ(IV)クロリン_{e6}、メタテトラヒドロキシフェニルクロリン、ベンゾポルフィリン誘導体、ベンゾポルフィリン-酸誘導体、ベンゾポルフィリンのテトラシアノエチレン付加化合物、ベンゾポルフィリンのジメチルアセチレンジカルボキシレート付加化合物、ディールス・アルダー付加化合物、ベンゾポルフィリンの-酸環状"a"誘導体、硫酸アルミニウムPC、硫酸ALPc、ジスルホン酸化、テトラスルホン酸化誘導体、硫酸アルミニウムナフトロシアニン、金属置換基を有する又は有しない

10

20

30

40

50

並びに様々な置換基を有する又は有しないナフトロシアニン、アントラセネジオン、アントラピラゾール、アミノアンソラキノン、フェノキサジン色素、フェノシアジン誘導体、カルコゲナピリリウム色素、カチオニックセレナ及びテルラピリリウム誘導体、環状置換カチオニックPC、フェオフォルビド誘導体、天然ポルフィリン、ヘマトポルフィリン、ALA-誘導プロトポルフィリンIX、内因性代謝前駆体、5-アミノレブリン酸、ベンゾナフトポルフィラジン、カチオニックイミニウム塩、テトラサイクリン、ルテチウムテキサフィリン、スズ-エチオ-ブルプリン、ポルフィセン、ベンゾフェノチアジニウム及びこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0072】

本発明の免疫複合体を生体内診断用途に用いる場合には、ヒト結合分子を例えばガドリニウムジエチレントリアミネペンタアセト酸のような磁気共鳴画像(MRI)造影剤、超音波造影剤若しくはX線造影剤と結合することによって、又は放射性同位体標識によって検出可能とすることができる。

10

【0073】

更に、本発明のヒト結合分子又は免疫複合体は固体支持体に接着することもでき、これは特に免疫分析又は結合パートナーの精製に有用である。固体支持体は、多孔性であっても無孔性であってもよく、平面であっても非平面であってもよく、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニル又はポリプロピレン支持体が含まれるが、これらに限定されるものではない。結合分子はまた、免疫親和性クロマトグラフィーの目的で、例えばNH₂-活性化セファロース又はCNBr-活性化セファロースのようなフィルター媒体に効果的に結合させることもできる。結合分子は又、一般にはビオチン-ストレプトビジン相互作用により、常磁性マイクロスフェアに効果的に接着することもできる。マイクロスフェアは、ヒトCD1a又はその断片を発現又は表面に有する細胞を単離するためにも用いることができる。他の例として、本発明のヒト結合分子はELISA用マイクロタイタープレートの表面にも効果的に接着することができる。

20

【0074】

本発明の他の態様は、本発明のヒト結合分子をコードする本願明細書に定義された核酸分子に関する。更に他の態様において、本発明はヒトCD1aに特異的に結合するヒト結合分子を少なくともコードする核酸分子を提供する。好ましい態様において、核酸分子は単離又は精製されている。

30

【0075】

当業者は、これらの核酸分子の機能的変異体もまた本発明の一部であると意図されていることを理解するであろう。機能的変異体は、通常のゲノムコードを用いて直接に翻訳され、親核酸分子から翻訳されたものと同じのアミノ酸配列を生成する核酸配列である。好ましくは、核酸分子は、CDR3領域、好ましくは重鎖CDR3領域を含み、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するヒト結合分子をコードしている。

【0076】

更に好ましくは、核酸分子は配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する可変重鎖を有するヒト結合分子をコードする。

40

【0077】

更に他の態様において、核酸分子は配列番号8のアミノ酸配列を有する可変重鎖と配列番号20のアミノ酸配列からなる可変軽鎖を有する結合分子をコードするか、又は核酸分子は配列番号10のアミノ酸配列を有する可変重鎖と配列番号20のアミノ酸配列からなる可変軽鎖を有する結合分子をコードするか、又は核酸分子は配列番号12のアミノ酸配列を有する可変重鎖と配列番号22のアミノ酸配列からなる可変軽鎖を有する結合分子をコードするか、又は核酸分子は配列番号14のアミノ酸配列を有する可変重鎖と配列番号20のアミノ酸配列からなる可変軽鎖を有する結合分子をコードするか、又は核酸分子は配列番号16のアミノ酸配列を有する可変重鎖と配列番号20のアミノ酸配列からなる可

50

変軽鎖を有する結合分子をコードするか、又は核酸分子は配列番号 18 のアミノ酸配列を有する可変重鎖と配列番号 20 のアミノ酸配列からなる可変軽鎖を有する結合分子をコードする。

【0078】

本発明の特殊な態様において、本発明のヒト結合分子をコードする核酸分子は配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15 及び配列番号 17 からなるグループより選択されたヌクレオチド配列を有する。

【0079】

本発明の更に他の特殊な態様において、本発明のヒト結合分子をコードする核酸配列は、配列番号 7 及び配列番号 19 の核酸配列、配列番号 9 及び配列番号 19 の核酸配列、配列番号 11 及び配列番号 21 の核酸配列、配列番号 13 及び配列番号 19 の核酸配列、配列番号 15 及び配列番号 19 の核酸配列、又は配列番号 17 及び配列番号 19 の核酸配列を有する。

10

【0080】

本発明の他の観点はベクター、例えば本発明による核酸分子を 1 つ以上の有する核酸コンストラクトなどを提供するものである。ベクターは、とりわけ F、R1、RP1、Col、pBR322、TOL、Ti などのようなプラスミド；コスミド；ラムダ、ラムドイド、M13、Mu、P1、P22、Q、T-偶数、T-奇数、T2、T4、T7 などのようなファージ；とりわけアルファルファモザイクウイルス、プロモウイルス、キャピロウイルス、カルラウイルス、カルモウイルス、カウリウイルス、クロスターウイルス、コモウイルス、クリプトウイルス、ククモウイルス、ジアンソウイルス、ファバウイルス、フィジウイルス、フロウイルス、ジェミニウイルス、ホルデイウイルス、イラルウイルス、ルテオウイルス、マクロウイルス、マラフィウイルスネクロウイルス、ネポウイルス、フィトレブウイルス、植物ラポドウイルス、ポテックスウイルス、ポチウイルス、ソベモウイルス、テヌイウイルス、トバモウイルス、トブラウイルス、トマト黄化えそウイルス、トムブスウイルス、チモウイルスなどの植物ウイルス；とりわけアデノウイルス、アレナウイルス科、パキウロウイルス科、ビルナウイルス科、ブニアウイルス科、カルシウイルス科、カルジオウイルス科、コロナウイルス科、コルチコウイルス科、シストウイルス科、エプスタイン-パールウイルス科、エンテロウイルス科、フィロウイルス科、フラビウイルス科、手足口病ウイルス科、ヘパドナウイルス科、肝炎ウイルス科、ヘルペスウイルス科、免疫不全ウイルス科、インフルエンザウイルス科、イノウイルス科、イリドウイルス科、オルソミクソウイルス科、パポバウイルス属、ポリドナウイルス科、ポックスウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、ラポドウイルス科、ライノウイルス科、セムリキ森林ウイルス、テトラウイルス、トガウイルス科、トロウイルス科、ワクチニアウイルス、水疱性口炎ウイルスなどのような動物ウイルスに由来するものであってよい。ベクターは本発明の結合分子をクローニング及び/又は発現に用いることができ、更に遺伝子治療の目的で使うことができる。1 つ以上の本発明による核酸分子を有し、1 つ以上の発現調節核酸分子に機能を有して結合しているベクターもまた本発明の範囲内である。ベクターの選択はその後の組換え工程及び用いるホストに依存する。ベクターのホスト細胞への導入は、とりわけリン酸カルシウム形質転換法、ウイルス感染法、DEAE-デキストララン媒介形質転換法、リポフェクション形質転換法又はエレクトロポレーション法により行うことができる。ベクターは自律的に複製してもよいし、又はベクターが統合された染色体と一緒に複製してもよい。好ましくは、ベクターは 1 つ以上の選択マーカーを有する。マーカーの選択は選択したホスト細胞に依存するが、この選択が本発明に重要でないことは当業者に周知である。マーカーには、カナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ヒグロマイシン、ゼオシン、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (HSV-TK)、マウス由来のジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) が含まれるが、これらに限定されるものではない。上記結合分子をコードする 1 つ以上の核酸分子を有し、結合分子を単離するのに用いることのできるタンパク質又はペプチドをコードする 1 つ以上の核酸分子と機能を有して結合したベクターもまた本発明の範囲である。これらのタン

20

30

40

50

パク質又はペプチドには、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、金属結合ポリヒスチジン、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ及びガラクトシダーゼが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0081】

上記ベクターを1コピー以上有するホストは本発明の更なる対象である。好ましくはホストとはホスト細胞である。ホスト細胞には、哺乳類、植物、昆虫、真菌又は細菌由来の細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。細菌細胞には、バチルス属、ストレプトコッカス属及びスタフィロコッカス属のいくつかの種のようなグラム陽性細菌由来の細胞、エシェリキア属及びシュードモナス属のいくつかの種のようなグラム陰性細菌由来の細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。真菌細胞のグループでは、好ましくは酵母細胞が用いられる。酵母細胞における発現は、とりわけピキンデ・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 及びハンセニウラ・ポリノルファ (*Hansenula polynorpha*) のような酵母株を用いることにより得られる。更に、ショウジョウバエ由来の細胞及び Sf 9 のような昆虫細胞をホスト細胞として用いることができる。そのほかに、ホスト細胞はとりわけ森林植物のような農業植物由来の細胞のような植物細胞、又は食物若しくは穀物植物のような原材料を提供する植物由来の細胞、又は薬用植物、又は観賞植物由来の細胞、又は球根穀物由来の細胞であってもよい。形質転換 (トランスジェニック) 植物又は植物細胞は、例えば、アグロバクテリウム媒介遺伝子トランスファー、葉片の形質転換、ポリエチレングリコール誘導 DNA トランスファーによるプロトプラスト形質転換、エレクトロポレーション法、超音波処理、マイクロインジェクション又はボリスティック (bolistic) 遺伝子導入のような既知の方法により生成することができる。加えて、好適な発現系はバキュロウイルス系であってもよい。チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、COS 細胞、BHK 細胞又は Bowes メラノーマ細胞のような哺乳類細胞を用いた発現系が本発明で好ましい。哺乳類細胞は発現した翻訳後修飾を受けたタンパク質を提供し、これは哺乳類由来の天然の分子にもっとも類似している。本発明はヒトに投与しなければならないことがありうる分子を取り扱うものであるから、完全にヒト発現系であることが特に好ましい。従って、更に好ましくは、ホスト細胞はヒト細胞である。ヒト細胞の例は、とりわけ HeLa、911、AT1080、A549、293 及び HEK293T 細胞である。好ましい哺乳類細胞は 911 細胞のようなヒト胎児網膜芽細胞、即ち欧州細胞カルチャーコレクション (ECC: 英国ウィルトシャー SP4 OJG ソールズベリーにある CAMR) に 1996 年 2 月 29 日に第 96022940 番で保管され PER.C6 (登録商標) の登録商標で市販されている細胞株 (PER.C6 はクルーセルオランダ社 (Crucell Holland B.V.) の係属中の登録商標である。) である。好ましい態様において、ヒト生成細胞は発現可能フォーマットにおけるアデノウイルス E1 領域をコードする核酸配列の少なくとも機能的部分を有する。更に好ましい態様において、前記ホスト細胞は、ヒト網膜に由来し、アデノウイルス E1 配列を含む核酸配列により不死化されており、それには例えば、欧州細胞カルチャーコレクション (ECC: 英国ウィルトシャー SP4 OJG ソールズベリーにある CAMR) に 1996 年 2 月 29 日に第 96022940 番で保管され PER.C6 (登録商標) の登録商標で市販されている細胞株及びその誘導株がある。ホスト細胞における組換えタンパク質の生成は当該技術分野において周知の方法に従って得ることができる。登録商標 PER.C6 で市販されている細胞を関心のあるタンパク質を生成するプラットフォームとして用いる方法は WO 00/63403 に記載されており、その全体を本願明細書に参照として組み込んだ。

【0082】

更に他の態様において、本発明のヒト結合分子はまた、とりわけウサギ、ヤギ又はウシのような、トランスジェニック非ヒト哺乳類において生成され、例えばその乳汁中に分泌されてもよい。

【0083】

本発明の他の態様は、本発明によるヒト結合分子又はその機能的変異体を生成する方法

を提供することである。この方法は、a) 本発明に記載されたホストをヒト結合分子の発現を誘導する条件下で培養する工程、及び任意で、b) 発現したヒト結合分子を回収する工程を有する。発現したヒト結合分子は、無細胞抽出液から回収することができるが、好ましくは培地から回収する。結合分子のようなタンパク質を無細胞抽出液又は培地から回収する方法は、当業者に周知である。上記方法により得ることのできるヒト結合分子もまた本発明の一部である。

【0084】

或いは又、ホスト細胞のようなホストにおける発現に続いて、本発明のヒト結合分子は従来のペプチド合成系により、又は本発明によるDNA分子に由来するRNAを用いた無細胞翻訳系により合成することができる。上記の合成方法及び無細胞翻訳系により得ることのできるヒト結合分子もまた本発明の一部である。

10

【0085】

更に他の態様において、本発明によるヒト結合分子は、例えばトランスジェニックマウス又はウサギのような、ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳類により生成することができる。好ましくは、トランスジェニック非ヒト哺乳類は、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を有し、上記ヒト結合分子の全長又は一部をコードするゲノムを有する。トランスジェニック非ヒト哺乳類は、精製若しくは濃縮調製したヒトCD1a若しくはその断片、及び/又はヒトCD1a分子を発現している細胞により免役することができる。非ヒト哺乳類を免役する手順は当該技術分野において十分に確立されている。本願明細書に参考として組み込んだ、Using Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York and Current Protocols in Immunology, Edited by: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., New Yorkを参照されたい。免役する手順にはしばしば、完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバントのようなアジュバントあり又はなしで複数回免疫を行うことを含むが、そのまま(naked)のDNAで免疫を行ってもよい。他の態様において、ヒト結合分子はトランスジェニック動物由来のB細胞又は形質細胞により産生される。更に他の態様において、ヒト結合分子は、上記トランスジェニック非ヒト哺乳類から得たB細胞を不死化した細胞に融合することにより調製したハイブリドーマにより産生される。上記トランスジェニック非ヒト哺乳類から得られるB細胞、形質細胞及びハイブリドーマ並びに上記トランスジェニック非ヒト哺乳類、B細胞、形質細胞及びハイブリドーマから得られるヒト結合分子もまた本発明の一部である。

20

30

【0086】

更なる態様において、本発明は、本発明による結合分子又は本発明による核酸分子を同定する方法を提供し、該方法は、a) ヒト結合分子のファージライブラリーをヒトCD1a又はその一部を有する材料と接触させる工程、b) ヒトCD1a又はその一部を有する材料に結合するファージを少なくとも1回選択する工程、及びc) ヒトCD1a又はその一部を有する材料に結合するファージを分離して回収する工程を有する。ヒトCD1a又はその一部を有する材料は、例えば、CD1a発現プラスミドを形質転換した細胞、単離ヒトCD1a、ヒトCD1aの細胞外部分、ヒトCD1a又はその一部を有する融合タンパク質などでよい。抗体などの結合分子を同定して得るファージディスプレイ法は現在までに十分に確立した方法であり、当業者に知られている。これらは例えば、米国特許第5,696,108号明細書、Burton and Barbas(1994)、de Kruif et al(1995b)に記載されている。ファージディスプレイライブラリーを構成するために、ヒトモノクローナル抗体重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子をバクテリオファージ、好ましくはフィラメント状バクテリオファージ、粒子の表面に、例えば単鎖Fv(scFv)にて又はFabフォーマット(de Kruif et al., 1995b)にて発現させる。抗体断片発現ファージの巨大なライブラリーには、一般に 1.0×10^9 種類以上の抗体特異性が含まれており、免役した又は免役していない個体のBリンパ球に発現した免疫グロブリンV領域から組み立てることができる。或いは又は、ファージディスプレイライブラリーは部分的には試験管内で組み立てら

40

50

れた免疫グロブリン可変領域から構成され、ライブラリー（半合成ライブラリー）に更なる抗体多様性を加えることができる。例えば、試験管内で組み立てられ可変領域は、例えばCDR領域のような分子の抗体特異性に重要な領域に、合成したランダム又は部分的にランダムなDNAの配列を有する。抗体特異的ファージ抗体は、ヒトCD1a分子又はその断片のような標的抗原を固体相上に固定した後、標的抗原をファージライブラリーに暴露して固体相結合抗原に特異的な抗体断片を発現したファージを結合させることにより、ライブラリーから選択できる。結合しなかったファージは洗浄して除去し、結合したファージは固体相から抽出して、大腸菌（*E. coli*）に感染させて増殖させる。通常、標的抗原に特異的に結合するファージを十分に濃縮するには選択及び増殖を複数回繰り返すことが必要となる。ファージは又、タンパク質の複合混合物のような複合抗原又はヒトCD1a発現プラスミドを形質転換した又はヒトCD1aを天然に発現しているような全細胞に結合することで選択することもできる。全細胞上の抗体を選択することには、標的抗体がその天然の構造で提示されている、即ち、抗原を固体相に固定した場合に導入される構造変化により乱されない、という利点がある。抗原特異的ファージ抗体は、既知の又は未知の抗原を発現している、関心のある細胞集団をファージ抗体ライブラリーと共に培養し、ファージの例えばscFv又はFab部分を細胞表面の抗原に結合させることによりライブラリーから選択することができる。培養し、結合していない又はゆるく接着したファージを洗浄して除去した後、対象とする細胞を特異的な蛍光標識抗体で染色し、蛍光活性化細胞選択装置（FACS）により分離する。scFv又はFab部分によりこれらの細胞に結合したファージを抽出し、大腸菌に感染させるのに用い、新たな特異性を増幅することができる。一般に、対象とするファージを大過剰量の非結合ファージから分離するには1回以上の選択が必要となる。モノクローナルファージ調製液は特異的染色パターンから分析することができ、認識された抗原を同定することができる（de Kruijff et al., 1995a）。ファージディスプレイ法は、スクリーニング中に標的分子に類似するが同一ではない非標的分子を過剰量加えることで該当しない結合分子を除去することにより拡張及び改善することができ、これにより該当する結合分子を見つける可能性を非常に高めることができる（この工程はMabstract（登録商標）工程と呼ばれる。Mabstract（登録商標）はCruceCell Holland B.V.の係属中の登録商標であり、本願明細書に参考として組み込んだ米国特許第6,265,150号明細書も参照されたい。）。或いは又、スクリーニング前又は後に1回以上の除去工程を行うことができる。

【0087】

また更なる態様において、本発明は本発明によるヒト結合分子又は核酸分子を得る方法を提供するものであって、この方法は、a)本発明によるヒト結合分子又は本発明による核酸分子を同定する上記方法を実施する工程と、b)回収したファージからヒト結合分子及び/又はヒト結合分子をコードする核酸分子を分離するステップとを有する。一度新たなモノクローナルファージ抗体が、ヒト結合分子又はヒト結合分子をコードする核酸を同定する上記方法により確立又は同定されれば、scFv又はFabをコードするDNAを細菌又はファージから単離することができ、通常の方法を組み合わせることで所望の特異性（例えば、IgG、IgA又はIgM）を有する二価scFv又は完全なヒト免疫グロブリンをコードするコンストラクトを作成することができる。これらのコンストラクトは好適な細胞株に形質転換することができ、完全なヒトモノクローナル抗体を生成することができる（Huls et al., 1999、Boel et al., 2000）。

【0088】

更なる態様において、本発明は、本発明によるヒト結合分子を少なくとも1種類、本発明による機能的変異体又はその断片を少なくとも1種類、本発明による免疫複合体を少なくとも1種類、又はこれらの組み合わせを含有する組成物を提供する。これに加え、この組成物は、とりわけ、アルブミン、ポリエチレングリコール、又は塩のような安定化分子を含有する。好ましくは、用いる塩はヒト結合分子の所望の生物学的活性を有し、所望し

10

20

30

40

50

ない如何なる毒性効果も有しない塩である。そのような塩の例には、酸付加塩及び塩基付加塩が含まれるが、これらに限定されるものではない。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、塩化臭素酸、塩化ヨウ素酸、亜リン酸などのような非毒性の無機酸に由来するもの、並びに脂肪族モノ及びジカルボン酸、フェニル基置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族及び芳香族スルホン酸などのような非毒性の有機酸に由来するものが含まれるが、これらに限定されるものではない。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのようなアルカリ土類金属に由来するもの、並びにN, N' - ジベンジルエチレンジアミン、N - メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどのような非毒性の有機アミンに由来するものが含まれるが、これらに限定されるものではない。必要ならば、本発明の結合分子は材料中又は材料上に被覆され、ヒト結合分子を不活性化しうる酸又は他の自然若しくは非天然条件の作用から結合分子を保護することができる。

10

【0089】

更なる態様において、本発明は本発明に定義された核酸分子を少なくとも1種類含有する組成物を提供する。組成物は、塩（例えば、塩化ナトリウム又は上記塩）、界面活性剤（例えば、SDS）、及び/又は他の好適な成分を含有する水溶液のような水溶液からなることができる。

【0090】

更に、本発明は、本発明による少なくとも1種類のヒト結合分子、少なくとも1種類のその機能的変異体若しくは断片、本発明による少なくとも1種類の免疫複合体、本発明による少なくとも1種類の組成物又はその組み合わせを含有する医薬組成物に関連する。本発明の医薬組成物は、更に少なくとも1種類の薬学的に許容される賦形剤を有する。本発明による薬剤組成物は更に、少なくとも1種類の他の治療薬剤、予防薬剤及び/又は診断薬剤を有することができる。

20

【0091】

一般に、薬剤組成物は無菌的であり製造及び貯蔵の条件下で安定でなければならない。本発明のヒト結合分子、その機能的変異体又は断片、免疫複合体、核酸分子又は組成物は、配送前又は配送時に適当な薬学的に許容される賦形剤中で再構成するために粉状にすることができる。無菌的な注射溶液を調製するための無菌的な粉末の場合には、好ましい調製方法は吸引乾燥又はフリーズドライ（凍結乾燥）であり、すでに無菌的にフィルターを通じた溶液から活性成分及び任意の追加的な所望の成分の粉末を生じる。

30

【0092】

或いは又、本発明のヒト結合分子、その機能的変異体又は断片、免疫複合体、核酸分子又は組成物は溶液中に溶解していてもよく、配送前又は配送時に適当な薬学的に許容される賦形剤の追加及び/又は混合を行い、注射可能な形状の単位投与量を提供することができる。好ましくは、本発明に用いられる適当な薬学的に許容される賦形剤は高薬剤濃度に好適であり、適度な流動性を保つことが可能であり、必要ならば、吸収を遅らせることができる。

【0093】

薬剤組成物の最適な投与経路の選択はいくつかの要素の影響を受けるが、この中には、組成物中での活性分子の生理化学的特性、臨床症状の緊急性及び活性分子の血清中の濃度の所望の治療効果に対する関係が含まれる。例えば、必要な場合には、本発明のヒト結合分子は制御放出製剤のような急速な放出を防ぐキャリアを用いて調製され、これにはインプラント、経皮パッチ及びマイクロカプセル化した薬物送達システムが含まれる。生分解性、生体適合性ポリマーをとりわけ用いることができ、例えば、エチレンビニル酢酸、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステル及びポリ乳酸などがある。更に、ヒト結合分子を、ヒト結合分子の不活性化を防ぐ材料又は化合物で被覆するか、あるいは同時投与する必要がある。例えば、ヒト結合分子は例えばリポソームのような適当なキャリア又は希釈剤に入れて被験者に投与することができる。

40

【0094】

50

投与経路は経口及び非経口の2つの主要なカテゴリーに分けられる。これらのカテゴリーには、ポラス投与、口腔投与、表皮投与、硬膜外投与、吸入投与、腹腔内投与、動脈内投与、関節内投与、気管内投与、関節包内投与、心腔内投与、軟骨内投与、腔内投与、腔内投与、小脳内投与、脳室内投与、結腸内投与、頸管内投与、皮内投与、胃内投与、肝内投与、髄内投与、筋内投与、心筋内投与、鼻腔内投与、眼内投与、眼窩内投与、骨内投与、骨盤内投与、心膜内投与、腹腔内投与、ブランク内投与、胸膜内投与、前立腺内投与、肺内投与、直腸内投与、腎内投与、網膜内投与、髄腔内投与、胸骨内投与、滑膜内投与、クモ膜下投与、胸腔内投与、腫瘍内投与、子宮内投与、静脈内投与、脳室内投与、膀胱内投与、直腸投与、脊髄投与、クモ膜下投与、被膜下投与、皮下投与、表皮下投与、舌下投与、局所性投与、経皮投与、経粘膜投与、経気管投与及び腔内投与が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい投与経路は経静脈投与である。

10

【0095】

経口投与形態はとりわけ、錠剤、トローチ、薬用キャンデー、水性若しくは油性懸濁液、分散性粉末又は顆粒、乳濁液、硬カプセル剤、軟ゼラチンカプセル剤、シロップ若しくはエリキシル剤、丸薬、糖衣錠、液体、ゲル又はスラリーとして製剤することができる。これらの製剤には薬学的な賦形剤を含むことができ、賦形剤には炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウムのような不活性希釈剤；コーンスターチ又はアルギニン酸のような造粒剤及び崩壊剤；でんぷん、ゼラチン又はアカシアのような結合剤；ステアリン酸カルシウム、ベヘン酸グリセリン、硬化植物油、ステアリン酸マグネシウム、鉱物油、ポリエチレングリコール、ステアリン酸ナトリウム、フマル酸、ステアリン酸、滑石、ステアリン酸亜鉛のような潤滑剤；n-メチル-p-ヒドロキシ安息香酸のような保存料；スクロース、サッカリン、グリセロール、プロピレングリコール又はソルビトールのような着色料、香料又は甘味料；ラッカセイ油、オリーブ油、ごま油又はココナツ油のような植物油；液体パラフィンのような鉱物油；塩化ベンザルコニウム、ドキュセートナトリウム、レシチン、ポロキサマー、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンエステルのような湿潤剤；並びにアガー、アルギニン酸、蜜蝋、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カラギーナン、デキストリン又はゼラチンのような増粘剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0096】

本発明の薬剤組成物は非経口投与のためにも製剤することができる。非経口投与の製剤はとりわけ、水性又は非水性の等張性無菌性非毒性注射液又は輸液又は懸濁液の形態であってもよい。好ましい非経口投与経路には、静脈内、腹腔内、硬膜外、筋肉内及び腫瘍内への注射又は注入が含まれる。溶液又は懸濁液は、用いる投与量及び濃度では被投与者に非毒性である薬剤を含有することができ、これには1,3-ブタネジオール、リンガー液、ハンクス液、塩化ナトリウム等張溶液、合成モノ若しくはジグリセリド又はオレイン酸のような脂肪酸のような油、局所麻酔薬、保存料、緩衝剤、粘度又は溶解性を高める薬剤、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどのような水溶性抗酸化薬、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)レシチン、プロピルガレート、アルファトコフェロールなどのような脂溶性抗酸化薬、並びにクエン酸、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などのような金属キレート剤のようなものがある。

30

40

【0097】

本発明によるヒト結合分子、その変異体又は断片、本発明による免疫複合体、本発明による核酸分子、本発明による組成物、又は本発明による薬剤組成物は、医薬として使うことができる。これらはとりわけ、腫瘍性疾患又は疾病の診断、予防、治療又はそれらの組み合わせに用いることができる。好ましくは、腫瘍性疾患又は疾病は、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性骨髄性白血病の急性転化(CML-BC)、慢性骨髄単球性白血病、急性前骨髄球性白血病、骨髄異形成症候群、若年性骨髄単球性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性非リンパ性白血病(ANLL)、T

50

細胞性急性リンパ芽球性白血病（T - A L L）、大型顆粒球性リンパ球性白血病（L G L L）、B細胞性慢性リンパ性白血病（B - C L L）及びランゲルハンス細胞組織球症からなる群から選択される。本発明のヒト結合分子は、上記疾患及び疾病のいずれかに罹患した未治療の患者、治療を受けた又は治療中で寛解している又は寛解していない患者、及び再発性 / 難治性疾患又は疾患を有する患者の治療に好適である。

【0098】

上記分子又は組成物は、診断、予防及び / 又は治療に有用な他の分子と組み合わせて用いることができる。これらは、試験管内、生体外又は生体内で用いることができる。本分子は一般に、本発明の組成物又は薬剤組成部に治療又は診断に有効な量だけ製剤される。用法は最適な所望の反応（例えば、治療反応）が得られるように調製することができる。例えば、1回のポースで投与することができ、数回の分割投与を時間をかけて行ってもよく、又は治療状況の要求に応じて減量又は増量してよい。本発明に従う分子及び組成物は好ましくは無菌的である。これらの分子及び組成物を無菌的にする方法は当該技術分野において周知である。診断、予防及び / 又は治療に有用な他の分子を本発明のヒト結合分子に提案されていると同様の用法で投与することができる。他の分子を別々に投与する場合には、腫瘍性疾患又は疾患を有する被投与者に対して、1種類以上の本発明のヒト結合分子又は医薬組成物の投与前（例えば、2分、5分、10分、15分、30分、45分、60分、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、2日、3日、4日、5日、7日、2週、4週又は6週前）、投与と同時に、又は投与後（例えば、2分、5分、10分、15分、30分、45分、60分、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、2日、3日、4日、5日、7日、2週、4週又は6週後）に投与することができる。用法は通常、ヒト患者での臨床試験を通じて決定される。

10

20

【0099】

ヒト結合分子及びヒト結合分子を有する医薬組成物は、ヒトに生体内診断用又は治療用の薬物として投与されるときに特に有用であり、いつも好まれる。この理由は、投与した抗体に対する被投与者の免疫反応が、モノクローナルマウス、キメラ又はヒト化結合分子を投与した場合に引き起こされるものと比べてかなり少ないからである。

【0100】

或いは又、遺伝子工学により本発明のヒト結合分子を発現している細胞を患者に生体内で投与する。このような細胞は、動物又は植物又はMHC適合性ドナーから得ることができ、骨髄細胞、血液細胞（例えば、リンパ球）、含脂肪細胞、筋肉細胞、上皮細胞などを含むことができるが、これらに限定されるものではない。細胞は組換えDNA技術を用いて遺伝子工学により試験管内で本発明の核酸分子を細胞に導入してある。好ましくは、ヒト結合分子は細胞から分泌される。本願明細書に記載のヒト結合分子を発現、好ましくは分泌する改変細胞を患者に、例えば循環器系内など全身的に、又は腹腔内に導入することができる。他の態様において、細胞は基質に組み込むことも、又はカプセル化して体内に埋め込むこともできる。遺伝子治療の場面において該ヒト結合分子は、ホストの細胞に感染することが可能であり、本発明によるヒト結合分子をコードするベクターの形態で投与することができる。

30

40

【0101】

他の態様において、本発明はヒト結合分子、その断片及び変異体、本発明による免疫複合体、本発明による核酸分子、本発明による組成物又は医薬組成物を腫瘍性疾患又は疾病の診断、予防、治療又はこれらの組み合わせのための薬剤を調製するために使用することに関する。腫瘍性疾患又は疾患は好ましくは上記グループから選択される。

【0102】

次に、本発明による少なくとも1種類のヒト結合分子、少なくとも1種類のその変異体又は断片、本発明による少なくとも1種類の免疫複合体、本発明による少なくとも1種類の核酸分子、本発明による少なくとも1種類の組成物、本発明による少なくとも1種類の

50

医薬組成物、本発明による少なくとも1種類のベクター、本発明による少なくとも1種類の宿主又はその組み合わせを有するキットもまた本発明の一部である。任意で、本発明のキットの上記構成成分は好適な容器に収納され、指示された状態の診断、予防及び/又は治療のためのものであることを表示することができる。上記構成成分は例えば密閉アンブル、バイアル、ボトル、シリンジ及びテストチューブのような1ユニット又は複数回投与量の容器に入れて、水性の、好ましくは無菌的な溶液として、又は再構成するために凍結乾燥した、好ましくは無菌的な製剤として保存することができる。容器はガラスやプラスチックのような様々な材料から形成することができ、無菌的な採取口を有することができる(例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを有する輸液バッグ又はバイアルでよい。)。キットは更に、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液のような薬学的に許容されるバッファーを入れた更なる容器を有することができる。キットは更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、1種類以上の好適な宿主のための培地のような、商業的観点及び使用者側の観点から望ましい他の材料を含むことができる。キットと共に、治療、予防及び/又は診断の製品の商品パッケージには取扱説明書が通常含まれ、その取扱説明書には、そのような治療、予防及び/又は診断の製品の使用方法に関して、例えば、適応、使用、用量、製造、投与、禁忌及び/又は注意事項に関する情報は含まれている。

10

【0103】

更なる態様において、本発明はヒトCD1a又はその変異体又は断片を検出する方法を提供するのであって、この方法は、a)標本を本発明の診断に有効な量の本発明のヒト結合分子若しくはその機能的変異体若しくは断片、又は本発明の免疫複合体に接触させる工程、及びb)ヒト結合分子若しくはその機能的変異体若しくは断片又は免疫複合体が特異的に標本の化合物に結合するかを測定する工程を有する。検出法は当該技術分野において知られているものであり、ウエスタンブロット法、RIA法、ELISA法及び免疫組織化学的方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【実施例】

【0104】

実施例1

試験管内における樹状細胞の生成

培養樹状細胞(DC)は軟膜から単球を分離することによって得られるものであり、フィコール密度勾配円心を用いて顆粒球を除去し、ヒツジ赤血球ロゼット形成(SRBC-resetting)によりT細胞を除去し、次にプラスチックに2時間37℃で接着させて他の細胞を除去し、単球を得た。得られた単球をGM-CSF及びIL-4存在下で5日間培養してこれらの細胞を未成熟DC細胞に分化させた(主に、CD1a⁺/CD83⁻の表現形により特徴づけられる。)。更に、GM-CSF、IL-4、PGE2、IL-1、IL-6及びTNF-アルファ存在下で2日間培養することにより、成熟DCが得られる(主に、CD1a⁺/CD83⁺の表現形により特徴づけられる。)(Jonuleit et al., 1997)(図1参照)

30

【0105】

実施例2

細胞分類による樹状細胞上の単鎖Fv断片を有するファージ抗体の選択

5日及び7日間培養したあとで、約 1.5×10^7 個のDC由来の未成熟及び成熟単球がそれぞれ組織培養フラスコから得られ、これを0.5mlの半合成ファージscFv抗体ディスプレイライブラリーと混合した。このヒト単鎖抗体断片ライブラリーはde Kruijff et al., (1995b)に記載されているとおりに構成された。短くいえば、49種類の生殖細胞系列VH遺伝子を有するライブラリーを $\sim 10^8$ 種類の合成重鎖CDR3領域及び7種類の軽鎖と融合した。CDR3領域の長さは6~15アミノ酸であった。軽鎖はV₁~V₄及びV₁~V₃ファミリーの一員によりコードされていた。最終的なライブラリーには約 4×10^8 種類の個別クローンが含まれていた。

40

【0106】

50

1 mlあたり約 10^{13} のファージ粒子を含有する上記ライブラリー0.5 mlを、20%のウシ胎児血清及び5 mMのEDTAを含有するRPMI培地中で4にて15分間ブロッキングした。この後に、約 1.5×10^7 個の未成熟DC又は約 7.3×10^6 個の成熟DCをサブトラクター細胞として作用する 7.5×10^7 個の新鮮末梢血白血球(PBL)存在下にブロッキングしたライブラリーに加え、最終的な液量は5 mlであった。この今後液を4で一晩ゆっくり回転させた。翌日、この細胞を20%のウシ胎児血清及び5 mMのEDTAを含有する氷冷したRPMI培地50 mlで2回洗浄し、PE結合抗CD83抗体(BD Pharmingen)100 μ l及びFITC結合抗CD1a抗体(BD Pharmingen)にて染色し、フローサイトメトリーにて樹状細胞集団を可視化した。これらの抗体はPBLを認識しないので、従って、純粋なDC集団が得られた。1時間氷上で培養した後、細胞を上記培地15 mlで1回洗浄し、同培地4~6 ml中に再懸濁した。分離する直前に、細胞をセルストレーナー(BD)にて分離した。細胞分類は、FACSstar PLUF 蛍光活性化細胞分類機にてCD83⁻CD1a⁺未成熟DC又はCD83⁺CD1a⁺成熟DCをゲートセットとして行った。各々の細胞群について、ファージがまだ接着した細胞が $10^4 \sim 10^5$ 個分類された。

10

20

30

40

50

【0107】

特異的に結合したファージを溶出するために、細胞を10分間1200 rpmにて沈殿させた。その後、これらを得られた上清100 μ lに再懸濁し、76 mMクエン酸ナトリウム150 μ lが入った50 mlチューブに入れた。室温に10分おいた後、1 Mトリス塩酸バッファー(pH 7.4)を200 μ l加えてpHを中性化した。最後に2TY培地1 ml及び対数期にある大腸菌XL-1ブルー1 mlを加えた。37 10分間で感染を進行させた。次に、細菌を2800 rpmで10分間遠心分離し、2TY0.5 mlに懸濁し、テトラサイクリン25 μ g/ml、アンピシリン100 μ g/ml及びグルコース5%を含んだ寒天プレートにプレートした。37で一晩培養した後、プレートをはがし、細菌をストックバイアル中で凍結するか、あるいはVC5M13ヘルパーファージを用いて次の制限ライブラリーを調製するのに用いた。1回の選択で、成熟DCの選択から 7.6×10^4 個のコロニーが、未成熟DCの選択から 2.5×10^4 個のコロニーがそれぞれ得られた。

【0108】

上記の選択を更に2回繰り返したが、但し、このとき2回目と3回目では細菌を単一のコロニーが分離できるような適切な濃度で蒔いた。20個の単一クローンが各々成長し、VC5M13ヘルパーファージを用いてレスキューし、ファージ抗体溶液を調製した。次に、20個のクローンそれぞれを未成熟及び成熟DC集団に特異的に結合するか試験した(SC02-113と称する代表的な単鎖ファージ抗体の未成熟及び成熟DCに対する結合については図2の上部パネルを参照されたい。)

【0109】

実施例3

CD1aが選択したscFvファージ抗体により認識される抗原と同一であることの確認

全体で3回の選択を行い、2回目と3回目の後にはファージ抗体について、様々な細胞種に特異的に結合するかについて試験した。細胞は、例えば、培養DC、PBL、扁桃及び滑液細胞懸濁液、K562、U266、IM9、U937、THP、CEM、Fravel、HL60、Raji、RPMI8226、HepgII、HELA、HT29及びJurkattを含むいくつかの細胞株、CD1a分子で形質転換したC1R細胞株、並びにCD80、CD83及びCD86分子で形質転換したA431細胞株であった。細胞の染色のために、ファージ抗体100 μ lを、4%粉乳を含有するPBS50 μ lを添加することにより15分室温でブロッキングした。次に、1%BSAを含有するPBS50 μ l中の細胞 5×10^5 個をブロッキングしたファージ抗体に加え、得られた混合液を1時間氷上にて培養した。この後、得られた混合液を1%BSAを含有するPBS200 μ lにて3回洗浄した。細胞に結合したファージ抗体を検出するために、細胞を800倍希

積したヒツジ抗 M 1 3 ポリクローナル抗体 2 0 μ l にて 2 0 分氷上で培養した。その後、細胞を 1 % B S A を含有する P B S で洗浄し、7 0 0 倍希釈した P E 結合口バ抗ヒツジポリクローナル抗体にて 2 0 分氷上で培養した。

【 0 1 1 0 】

D C 細胞を可視化するために、1 % B S A を含有する P B S で再び洗浄し、1 0 倍希釈した F I T C 結合抗 C D 1 a 抗体 (B D P h a r m i n g e n) 1 0 μ l にて染色し、1 % B S A を含有する P B S 2 0 0 μ l 中に懸濁した。F A C S a n (B e c t o n D i c k i n s o n) を用いてフローサイトメトリー分析を行った。

【 0 1 1 1 】

上記の選択過程により得られた 2 0 種類の s c F v ファージのみが C D 1 a を形質転換した細胞株に結合した (S C 0 2 - 1 1 3 と称する代表的な単鎖ファージ抗体の C D 1 a 形質転換細胞に対する結合については図 2 の右下のパネルを参照されたい。) 。ファージ抗体により染色すると、C D 1 a インサートを含むベクターを形質転換した C 1 R 細胞は明らかに陽性であったが、C D 1 a インサートを含まないベクターを形質転換した (モックを形質転換した) C 1 R 細胞は陰性であった (S C 0 2 - 1 1 3 と称する代表的な単鎖ファージ抗体のモックを形質転換した細胞に対する結合については図 2 の左下のパネルを参照されたい。) 。ファージ抗体により染色すると、C D 8 0 、 C D 8 3 及び C D 8 6 分子を形質転換した A 4 3 1 細胞株は陰性であった (データは示していない) 。

10

【 0 1 1 2 】

実施例 4

ヒト C D 1 a 特異的 s c F v の特性

ヒト C D 1 a を形質転換した細胞株にだけ結合した 2 0 種類のファージ抗体 (s c F v) クローンから、プラスミド D N A を取り出し、ヌクレオチド配列を標準的な技術に従い決定した。短く言えば、2 0 種類のクローンすべての V H 及び V L のヌクレオチド配列を、プライマー M 1 3 R E V (5 ' - A A C A G C T A T G A C C A T G (配列番号 2 3)) 及び f d S e q (5 ' - G A A T T T T C T G T A T G A G G (配列番号 2 4)) を用いて、T a q シークエンスキットにより以下のサイクリングプロトコール (2 5 サイクル) に従ってシークエンス反応で決定した。サイクリング反応 : 9 4 1 0 分間 (変性) 、 5 0 5 秒間 (アニリング反応) 及び 6 0 4 分間 (伸長反応) 。沈殿した D N A をサンプルバッファーに溶解し、A B I P R I S M 自動蛍光シーケンサーに流して解析した。得られたヌクレオチド配列を、抗体に関する通常の当業者に周知の V B A S E データベースと比較し、各々の鎖の遺伝子ファミリーを決定した。2 0 種類のクローンには 6 種類の異なった s c F v が含まれていることがわかった。これらは S C 0 2 - 1 1 3 、 S C 0 2 - 1 1 4 、 S C 0 2 - 1 1 5 、 S C 0 2 - 1 1 6 、 S C 0 2 - 1 1 7 及び S C 0 2 - 1 1 8 と呼ぶ (表 1 参照) 。 S C 0 2 - 1 1 3 、 S C 0 2 - 1 1 4 、 S C 0 2 - 1 1 5 、 S C 0 2 - 1 1 6 、 S C 0 2 - 1 1 7 及び S C 0 2 - 1 1 8 のヌクレオチド配列は各々、配列番号 2 5 、配列番号 2 7 、配列番号 2 9 、配列番号 3 1 、配列番号 3 3 及び配列番号 3 5 に示した (表 1 参照) 。 S C 0 2 - 1 1 3 、 S C 0 2 - 1 1 4 、 S C 0 2 - 1 1 5 、 S C 0 2 - 1 1 6 、 S C 0 2 - 1 1 7 及び S C 0 2 - 1 1 8 のアミノ酸配列は各々、配列番号 2 6 、配列番号 2 8 、配列番号 3 0 、配列番号 3 2 、配列番号 3 4 及び配列番号 3 6 に示した (表 1 参照) 。ヒト C D 1 a 特異的 s c F v の V H 及び V L 遺伝子特性並びに重鎖 C D R 3 配列もまた表 1 に示した。

20

30

40

【 0 1 1 3 】

実施例 5

選択した抗 C D 1 a 単鎖 F v から完全ヒト免疫グロブリン分子 (ヒトモノクローナル抗 C D 1 a 抗体) の構築

S C 0 2 - 1 1 3 、 S C 0 2 - 1 1 4 、 S C 0 2 - 1 1 5 、 S C 0 2 - 1 1 6 、 S C 0 2 - 1 1 7 及び S C 0 2 - 1 1 8 と呼ばれる s c F v の重鎖及び軽鎖可変領域を、オリゴヌクレオチドを用いて P C R にて増幅し、制限酵素部位及び / 又は I g G 発現ベクター p S y n - C 0 3 - H c 1 (配列番号 3 7 を見よ) 、 p S y n - C 0 5 - C (配列番号

50

38を見よ)及びpSyn-C04-C (配列番号39を見よ)の中で発現させるための配列を付加した。SC02-113、SC02-114、SC02-115、SC02-116、SC02-117及びSC02-118と呼ばれるscFvの重鎖可変領域をベクターpSyn-C03-HC 1にクローニングした。SC02-113、SC02-114、SC02-115、SC02-116、SC02-117及びSC02-118と呼ばれるscFvで共通している軽鎖可変領域をベクターpSyn-C05-C にクローニングした。SC02-115と呼ばれるscFv軽鎖可変領域をベクターpSyn-C04-C にクローニングした。scFvSC02-113、SC02-114、SC02-116、SC02-117及びSC02-118の間で共通しているVL遺伝子をまずオリゴヌクレオチド5K-I (配列番号40)及びsy3K-C (配列番号41) (下記参照)を用いて増幅し、PCR産物をベクターpSyn-C05-C にクローニングした。scFvSSC02-115のVL遺伝子をまずオリゴヌクレオチドsy5L-A (配列番号42)及び3L-B (配列番号43) (下記参照)を用いて増幅し、PCR産物をベクターpSyn-C04-C にクローニングした。すべてのコンストラクトのヌクレオチド配列を当業者に知られる標準的技術により確認した。

10

20

30

40

50

【0114】

VH遺伝子を、以下のオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて最初に増幅し：SC02-113、5H-Fshort (配列番号44)とsy3H-A (配列番号45)；SC02-114、SC02-116とSC02-117、5H-B (配列番号46)とsy3H-A (配列番号45)；SC02-118、5H-B**65 (配列番号47)とsy3H-A (SEQ ID NO:45)；SC02-115；最初に5H-A (配列番号48)と115int68 (配列番号49)で、次に得られたPCR産物をプライマー5H-A (配列番号48)とsy3H-A (配列番号45)で再増幅した。その後、PCR産物をpSyn-C03-HC 1にクローニングし、そのヌクレオチド配列を当業者に知られる標準的技術により確認した。

【0115】

5H-B**65

acctgtcttgaattctccatggccgaggtgcagctggaggagtctggggaggccttggtacatcc

5H-B

acctgtcttgaattctccatggccgaggtgcagctggaggagtctg

115int68

caccagggtgccctggccccagtagtcaaagtaactcggcatctgcgacctgacacagtaatacacgg

5H-A

acctgtcttgaattctccatggcccaggtgcagctgggtgcagctctgg

5H-Fshort

acctgtcttgaattctccatggcccaggtgcagctgcaggagtccggcc

sy3H-A

gccctgggtgctagcgtggagacggtcaccagggtgccctggcccc

5K-I

acctgtctcgagttttccatggctgacatccagatgaccaggtctccatcctcc

sy3K-C

gggaccaaggtggagatcaaacggaccgtggccgccccagc

sy5L-A

acctgtctcgagttttccatggcttctccgagctgaccaggacctgctg

3L-B

ttttccttagcggccgcgactcacctaggacggtcagcttggtc

【0116】

得られた発現コンストラクトpgG102-114C03、pgG102-115C03、pgG102-116C03、pgG102-117C03及びpgG102-118C03 (アクセッション番号03102801、03102802、03102803

、03102804、03102805及び03102806として登録)は抗CD1aヒトIgG1重鎖をコードしており、それらをpSyn-C05-V I (アクセション番号03102807として登録)を組み合わせ一過性に発現させ、pSyn-C04-V13コンストラクト(アクセション番号03102808として登録)によりトランスフェクトされたコンストラクトpgG102-115C03以外は、293T細胞において軽鎖をコードしており、IgG1抗体を含有する上清が得られた。02-113、02-114、02-115、02-116、02-117及び02-118(これらの抗体は本願明細書において各々CR2113、CR2114、CR2115、CR2116、CR2117及びCR2118とも称されている。)と称する抗体の重鎖の核酸配列は、各々配列番号50、52、54、56、58及び60として示されている。02-113、02-114、02-115、02-116、02-117及び02-118(これらの抗体は本願明細書において各々CR2113、CR2114、CR2115、CR2116、CR2117及びCR2118とも称されている。)と称する抗体の重鎖のアミノ酸配列は、各々配列番号51、53、55、57、59及び61として示されている。

10

【0117】

02-113、02-114、02-116、02-117及び02-118と称する抗体のヌクレオチド配列は配列番号62として示されており、02-115と称する抗体のヌクレオチド配列は配列番号64として示されている。02-113、02-114、02-116、02-117及び02-118と称する抗体のアミノ酸配列は配列番号63として示されており、02-115と称する抗体のアミノ酸配列は配列番号65として示されている。その後抗体を、免疫グロブリンで一般的に用いられる通常の精製方法を用いてプロテインAカラム及びサイズ排除カラムで精製した(例えば、WO 00/63403を参照のこと)。

20

【0118】

ヒト抗CD1aIgG1抗体が、scFvについて記載したもの(実施例3参照)と実質的に同じCD1aを形質転換した細胞株に結合する能力を有することを示した。精製した抗CD1a抗体を様々な濃度に希釈し(図に記載)、FITC標識マウス抗ヒトIgG又はビオチン化したヒト抗CD1a抗体の場合にはFITC標識ストレプトアビジンにて検出した。実施例3に記載のC1R-CD1a細胞株及びモック形質転換C1R解剖株に加えて、C1R-CD1b、C1R-CD1c、C1R-CD1d及びB16-CD1a並びにモック形質転換B16を試験した。各染色は3回繰り返し、コルモゴロフ-シミルノフテストを用いてCR2027と呼ばれる関係のないアイソタイプコントロール抗体と比較した。K-S統計量を計算するために、アイソタイプコントロール抗体及び抗CD1a抗体でのヒストグラムの重ね合わせを作成した。ヒストグラムのピークのログシフトを測定し、D値の計算に用いた。アイソタイプコントロール抗体の反応ピークから抗CD1a抗体の反応ピークへのログシフトが大きければ大きいほど、D値が大きくなる。

30

【0119】

完全なIgGに変換した後、すべての6種類の抗体がB16-CD1a形質転換体に10µg/mlの濃度で結合したが、6種類のうち4種類だけが、即ちCR2113、CR2114、CR2117、CR2118と呼ばれる抗体だけがC1R-CD1a形質転換体に結合した(図3の左図を参照)。その抗体も、モックを形質転換したC1R又はB16に優位に結合しなかった(図3の右図を参照)。

40

【0120】

6種類のヒト抗CD1aモノクローナル抗体のいずれも、C1R-CD1b又はC1R-CD1d形質転換体において非特異的な染色を検出しなかった(図4参照)。わずかが有意性はない($p < 0.05$)染色が、CR2114及びCR2117の2種類の抗体でC1R-CD1c形質転換体について検出された(図4参照)。これらの結果は、高度に保存されたヒトCD1遺伝子ファミリーのなかでもとりわけヒトCD1aに対する抗体の結合が特異性を有することを示している。加えて、マウスCD1a及びCD1dを低い

50

レベルで発現している、新たに調製したマウス胸腺細胞についても染色を行った。6種類のヒト抗CD1aモノクローナル抗体のいずれについても非特異的な染色は観察されず、これらの抗体の種特異性を示している(表2参照)。

【0121】

抗体CR2113、CR2114、CR2117及びCR2118について、結合曲線を、0.01~10 μ g/mlの範囲の抗体の濃度を用いて、上記の通りFACSでB16-CD1a形質転換細胞への結合を測定することにより作成した。標識していない及びビオチン化した抗体を用いたがこれら2つの形態の間では染色パターンは区別できなかった(図5A-D参照)。CR2113は1 μ g/mlで結合が飽和し、CR2114は10 μ g/mlでも飽和せず、CR2117及びCR2118の形質転換体の染色はCR2113及びCR2114と比較して強くはなかった。

10

【0122】

これらの抗体が異なった抗原決定基を認識するか決定するために競合実験を行った。ヒトCD1aを発現したB16マウスメラノーマ細胞を、標識されていないCR2113、CR2114、CR2117、CR2118又はネガティブコントロールCR2027により異なった濃度(0.1、0.3、1、3、10、30、50、100 μ g/ml)で30分間染色し、上記のようにビオチンで標識した上記抗体の1種類で5分間2.5 μ g/mlの濃度で染色する。検出はFITC標識ストレプトビジンで20分間培養して行った。更に、染色を上記の通りに行った(実施例3参照)。核染色は3回連続で行い、D値をK-S統計量で計算した(上記参照)。標識していないコントロール抗体CR2027の染色は点線で示し、試験抗体を用いた染色は実線で示した。CR2113は用量依存的にそれ自身と競合したが、他の抗体でビオチン化CR2113に競合して結合できるものはなかった(図6A参照)。これはCR2113が他の抗体と比べてヒトCD1aに対してよりすぐれた結合親和性を有するためであるらしい。対照的に、標識していないCR2113はCR2114(図6B参照)、CR2117(図6参照C)及びCR2118(図6D参照)のB16-CD1a形質転換体に対する結合と用量依存的に競合することができた。CR2117又はCR2118はCR2114のCD1aへの結合に競合することができなかった。これは不十分な親和性によるためかもしれない。

20

【0123】

結論として、試験した4種類の抗体はすべて重複した抗原決定基を共有するようであるが、CR2113及びCR2114の場合には、図3に見られる特異性の違いから、同一ではないようである。

30

【0124】

実施例6

ヒトモノクローナル抗CD1a抗体による免疫組織化学

ヒトモノクローナル抗CD1a抗体が正常組織に対して結合する能力について、免疫組織化学により分析した。この目的で、副腎、膀胱、脳(小脳及び大脳)、血管(大動脈及び冠動脈)、卵管、食道、胃(前庭及び胃体)、十二指腸、回腸、直腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、卵巣、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、脊髄、脾臓、横紋筋、精巣、扁桃、甲状腺、尿管及び子宮(頸部及び内膜)の正常組織の凍結切片を切り出し、スライドガラスにマウントして室温で乾燥させた。切片を過酸化水素0.03%を含有するアジ化ナトリウム50mMで内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし、次に所定のプロトコールに従って内因性ビオチンをブロッキングした(X0590、Dako)。次に、ビオチン化した抗ヒトCD1aヒトIgGにより60分間室温で培養する前に、切片をBSA4%及び正常ヒト血清10%を含有するPBSでブロッキングした。結合したIgG分子を検出するために、切片をストレプトアビジン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼ(Dako)で培養し、次にジアミノベンジン(Sigma)で培養し、褐色結晶の局所沈着を得た。切片をヘマトキシリンにより対比染色し、切片中の有核細胞を可視化した。分析する前に、切片を脱水し、スライドをオイキット(BDH)により封止した。

40

50

【 0 1 2 5 】

実施例 7

新鮮腫瘍標本及び腫瘍細胞株におけるCD1a分子発現のヒトモノクローナル抗CD1a抗体によるフローサイトメトリー分析

抗ヒト抗CD1a IgG1抗体パネルを、新鮮腫瘍サンプルである急性骨髄性白血病(AML)、急性非リンパ性白血病(ANLL)、慢性骨髄性白血病の急性転化(CML-B C)、大型顆粒球性リンパ球性白血病(LGLL)、B細胞性慢性リンパ性白血病(B-CLL)及び細胞株SUP-T1でのCD1aの発現を評価するために用いた。この目的のために、 2×10^5 個の単核球をフィコールブランク勾配分離法(新鮮標本について)又は提供者の説明書に従った培養(細胞株について)により調製し、本発明のヒトモノクローナル抗CD1a IgG1抗体により4で0~50 μ g/1dlの範囲の濃度で染色した。02-113、02-114、02-115、02-116、02-117及び02-118と称する抗体の結合はビオチン化したヤギ抗ヒトIgG(Fc特異的、Caltag)、次にストレプトアビジンフィコエリトリン(Caltag)を用いて可視化した。染色した細胞はフローサイトメトリーにより分析した。抗CD1aマウスモノクローナル抗体で確立されている表現形に従って、中程度から高度の染色レベルが腫瘍細胞の亜集団で予想される。ヒト抗CD1aモノクローナル抗体が治療分子として有用であるためには中程度から高度の染色レベルが必要であることが予想される。

10

【 0 1 2 6 】

実施例 8

ヒト抗CD1aモノクローナル抗体の内在化(internalisation)研究

ヒトモノクローナル抗ヒトCD1a IgG1抗体の内在化能を測定するために、Jurkat細胞のようなCD1a発現細胞株により内在化分析を行った。抗ヒトCD1a IgG1抗体を以下の染料により標識したオレゴングリーン-480-SEにより染色した。染料0.1mgをDMSO 10 μ lに溶解し、抗体0.4mgを加えてPBSで最終容量を0.4mlにして1時間室温で培養した。次に、この混合液をPBSで平衡化したセファデックスG25カラムに搭載した。標識した抗体をPBSで溶出し、着色した分画を集めた。 5×10^5 個のJurkat細胞を飽和濃度の適当な抗体とともに氷上で30分間搭載した。結合しなかった抗体を氷冷したFBS10%含有RPMI 1640培地で3回洗浄して除いた。次に、細胞を培地50 μ l中に再懸濁し、4(内在化しない)又は抗体が内在化することのできる37で1時間培養した。氷冷したPBSで3回洗浄した後、細胞表面に結合した抗体を2.5 μ g/dlサブチリシンにより41時間で剥がした。細胞を氷冷した1%BSA含有PBSで再び洗浄し、標本をフローサイトメトリーで分析した。4(内在化の生じない温度)で培養した細胞については、細胞に結合したIgGは細胞からはがされており、これは蛍光が失われたことにより示されている。他方で、細胞を抗体が内在化することのできる37で培養した場合には、サブチリシンを用いて細胞表面のCD1a分子に結合した抗体を除去した後も細胞には蛍光が残った。このことは抗CD1抗体が細胞内に内在化してプロテアーゼ処理に対して抵抗性となったことを示している。対照的に、ネガティブコントロール抗体である抗CD20抗体(これは内在化することはない。Ghetie et al.(2001)参照)は両方の温度で剥がれており、これは、この抗体が標的には結合するが細胞内には内在化しないことを示している。他方で、抗CD1a抗体の内在化により、抗CD1a抗体に結合したある毒性分子を有する免疫複合体について、その毒性分子が十分な機能/活性を示すために細胞膜を通過する必要がある場合にその効果が高められる。他方で、内在化することのできない抗CD1抗体は放射性複合体には有用でない可能性がある。このような複合体は細胞傷害性を発揮するのに細胞膜を通ることは必要ない。加えて、標的細胞の表面に結合する抗体はナチュラルキラー細胞(ADCC)のような細胞傷害性白血球を誘導するか、又は補体(CDC)の沈着を招く。抗体が結合することによる急速なCD1aの内在化はこれらの過程に干渉しうる。

20

30

40

【 0 1 2 7 】

50

実施例 9

腫瘍細胞におけるヒト抗CD1a抗体を用いた抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び補体依存性細胞障害(CDC)の誘導

ヒトモノクローナルヒト抗CD1a抗体が抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び補体依存性細胞障害(CDC)を誘導する能力を測定するために、通常の ^{51}Cr 放出分析を行った。ADCCの実験にはHL60又はU937腫瘍標的細胞を $100\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr (英国バッキンガムシャー州にあるAmersham社)で37℃、1時間標識した。何回も洗浄した後、標的細胞をUボトムマイクロタイタープレートに 5×10^3 個/ウェルの濃度でプレートした。単離したヒト末梢血単核球を次に加え、いくつかのエフェクターと標的の比が80:1~10:1になるようにした。細胞混合液を3連で37℃で培養し、その培養にあたり様々な濃度のヒトモノクローナル抗CD1a抗体を存在させ、最終容量を $150\mu\text{l}$ とした。4時間培養した後、上清の一部を採取し、 ^{51}Cr 濃度を測定した。特異的溶解の割合を、数式： $\% \text{特異的溶解} = ([\text{実験的cpm} - \text{基礎cpm}] / [\text{最大cpm} - \text{基礎cpm}]) \times 100\%$ を用いて計算した。最大溶解は標的細胞を1%トライトンX-100により標的細胞を溶解して測定し、基礎放出量は標的細胞を培地のみで培養して測定した。

10

【0128】

CDCの実験は、エフェクター細胞を補体供給源としてのヒト血清 $50\mu\text{l}$ に変えた以外は同じ工程で行った。

20

【0129】

もしADCC及び/又はCDCによる標的細胞の特異的溶解が、細胞をコントロール抗体と共に培養した場合よりも抗CD1a抗体と共に培養した場合に有意に多いならば、抗CD1a抗体が生体内の場面において単独の(naked)抗体に比べて効果的である可能性が高い。

【0130】

実施例 10

CD1aで形質転換したマウス腫瘍モデルにおけるヒト抗CD1a抗体の生体内での抗腫瘍有効性

ヒト抗CD1a抗体の生体内での抗腫瘍有効性を調べるために、ヒトCD1aで形質転換したマウスB16腫瘍モデルを用いた動物実験を行った。この腫瘍は腫瘍学の文献(Fidler et al. (1976)を参照)では膨大な記載があり、例えば同系のC57B1/6では急速に成長する。抗CD1a治療の効果を試験するために、C57B1/6、C57B1/6ヌード、SCID又はNOD-SCIDマウスに第0日目に 1×10^6 個のB16腫瘍細胞を皮下に接種した。CD1aのcDNAを1つの隣接部位(flan k)にセンス方向(即ち、正常に発現する)に形質導入したB16細胞を、各々のマウスに接種した。アンチセンス方向(即ち、発現しない)でCD1aのcDNAを形質導入したB16細胞を、逆の隣接部位(flan k)でマウスに接種し、ネガティブコントロールとした。いくつかの実験では、腫瘍の成長をリアルタイムで検出するためにCD1a-B16細胞にルシフェラーゼを共に形質導入した。動物には第1日目にヒト抗CD1a抗体 $240\mu\text{g}$ を腹腔内に(i.p.)投与し、その後抗体 $80\mu\text{g}$ を更に3回、第3日目、第6日目及び第9日目に投与した。28日間にわたって動物の腫瘍の成長をモニターし、腫瘍の大きさが 2cm^3 を超えた時点又は腫瘍の潰瘍ができた後に殺した。腫瘍の大きさは、蛍光像により(ルシフェラーゼを形質転換したB16細胞の場合)又は直接キャリバーによりモニターした。抗体治療を受けた動物における腫瘍の成長を、賦形剤である生理食塩水で治療した又はヒトIgG1コントロール抗体により治療したコントロールグループと比較することにより、抗体の抗腫瘍有効性を分析した。

30

40

【0131】

CD1aに特異的に結合することのできる全ての抗CD1aモノクローナル抗体を生体内モデルで試験することができた。ADCC及び/又はCDCの分析における有効性は生体内研究に含むか否かの基準とはしなかった。アイソタイプ抗体コントロールと比較して

50

腫瘍の成長を有意に阻害することをもって、抗CD1aモノクローナル抗体がヒトにおけるCD1a発現腫瘍の成長の阻害に有効であることを強く示唆するものと考えた。

【0132】

実施例11

抗CD1a抗体のBIACORE分析

BIACORE3000はリアルタイム表面プラズモン共鳴の技術に適用されるものであるが、上記のように調製した抗CD1a抗体及びマウス抗CD1aコントロール抗体についての親和性測定を実施するのに用いた。まず、リガンド、即ちCD1aタンパク質(Abnova社)を研究グレードCM54フローチャンネル(Fc)センサーチップ上にアミノカップリングを用いてリガンドとして固定した。簡潔には、CM5チップ(BIACORE)のデキストラン基質をN-ヒドロキシサクシニミド(NHS)及びN-エチル-N'- (ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)の混合物により活性化した。次に、CD1aタンパク質(好ましくは30µg/ml)を基質上の活性化カルボキシル基にカップリングさせた。カップリングした後、エタノールアミン-HCL(pH8.5)を加え、残っている活性化カルボキシル基を不活性化する。4つのチャンネルのうち1つを活性化し、CD1aタンパク質のカップリングなしで不活性化してコントロールフローチャンネルとした。その後、動態分析を行った。この目的のために、抗CD1a抗体の会合速度(K_a)、解離速度(K_d)及び親和性(K_D)を調べた。0.01~1000nMまでの一連の濃度に25を適用した(希釈因子2、希釈バッファはHBS-EP)。4つのチャンネルのうち1つを参照用フローセルとして用い、HBS-EPバッファの注入をコントロール注入とした。各抗体50µlを20µl/分の一定の流速で注入した。注入の最後に、HBS-EPを750秒用いて、その後に製造者の取扱説明書に従い再生バッファ(例えばグリシン、pH2)のパルスによりCM5チップを再生する。この実験を3回繰り返し、分析のばらつきを測定する。次に、BIACORE評価ソフトを用いて一連の濃度における濃度の会合及び解離カーブを適合させる。これらの適合に基づいて、親和性を決定する。2価抗体の考え得る親和性効果を最小にするために、1)0.1-10xKDの濃度範囲、2)Ka及びKd率の低い標準誤差値、3)低い残余カイ2乗(χ^2)値、4)高い精度(好ましくは20%未満)、の4つの重要なパラメータを評価に含めた。抗CD1a抗体は0.1-50nMの範囲の高い親和性で優先的に結合する。

【0133】

10

20

30

【表 1】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列、重鎖CDR3アミノ酸配列およびCD1a特異的s c F vのVH及びVL遺伝子の同一性

| s c F vの 名称 | HCDR3 のアミノ酸 配列 | s c F vの ヌクレオチ ド配列の配 列番号 | s c F vの アミノ酸配 列の配列番 号 | VHファミ リー | VLファミ リー |
|----------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------|----------------|
| SC02- 113 | APYMM YFDS (配列番号 1) | 配列番号 25 | 配列番号 26 | VH4:DP -66 | Vκ1:DP K-9 |
| SC02- 114 | ETWWQ SFDY (配列番号 2) | 配列番号 27 | 配列番号 28 | VH3:DP -51 | Vκ1:DP K-9 |
| SC02- 115 | SQMPS YFDY (配列番号 3) | 配列番号 29 | 配列番号 30 | VH1:DP -14 | Vλ3:DP K-16 |
| SC02- 116 | DALWL AFDY (SEQ ID N O:4) | 配列番号 31 | 配列番号 32 | VH3:DP -47 | Vκ1:DP K-9 |
| SC02- 117 | STPWF SFDY (配列番号 5) | 配列番号 33 | 配列番号 34 | VH3:DP -48 | Vκ1:DP K-9 |
| SC02- 118 | SAWWL SFDS (配列番号 6) | 配列番号 35 | 配列番号 36 | VH3:DP -48 | Vκ1:DP K-9 |

10

20

30

40

【0134】

【表 2】

フローサイトメトリーにより測定したヒト抗CD1aモノクローナル抗体のマウス胸腺細胞に対する結合

| 抗体 | マウス胸腺細胞 (D値) |
|-------------------------------|--------------|
| CR2113 | 0 |
| CR2114 | 0 |
| CR2115 | 0 |
| CR2116 | 0 |
| CR2117 | 0 |
| CR2118 | 0 |
| ポジティブコントロール (マウス抗ヒトCD1a-FITC) | 0.03 |
| ネガティブコントロール (抗GBSIII抗体) | 0 |
| ネガティブコントロール (マウスIgGκ-FITC) | 0 |

10

20

30

【0135】

参考文献

- Amiot M., Bernard A., Raynal B., Knapp W., Deschildre C. and Bousseuil L. (1986), J. Immunol. 136: 1752-1757.
- Boel E., Verlaan S., Poppelier M.J., Westerdal N. A., Van Strijp J. A. and Logtenberg T. (2000), J. Immunol. Methods 239: 153-166.
- Burton D. R. and Barbas C. F. (1994), Adv. Immunol. 57: 191-280.
- De Kruif J., Terstappen L., Boel E. and Logtenberg T. (1995a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3938-3942.
- De Kruif J., Boel E. and Logtenberg T. (1995b), J. Mol. Biol. 248: 97-105.
- Fidler I. J., Gersten D. M. and Budmen M. B. (1976), Cancer Research 36: 3610-3665.
- Furie M., Nindl M., Kawabe K., Nakamura K., Ishibashi Y. and Sagawa K. (1992), J. Am. Acad. Dermatol. 27: 419-426.
- Ghetie M. A., Bright H. and Vitetta E. S. (2001), Blood 97: 1392-1398.
- Huls G., Heijnen I. J., Cuomo E., van der Linden J., Boel E., van de Winkel J. and Logtenberg T. (1999), Cancer Res. 59: 5778-5784.
- Jonuleit H., Kuhn U., Muller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk A. H. (1997), Eur. J. Immunology 27: 3135-3142.
- Kelly K. M., Beverly P. C., Chu A. C., Davenport V., Gordon I. Smith M. and Prit

40

50

chard J. (1994), J. Pediatr. 125: 717-722.

Merle-Beral H., Boumsell L., Michel A. and Debre P. (1989), Br. J. Haematol. 72: 209-212.

Salomone M. C., Roisman F. R., Santiago J., Satz M.L. and Fainboim L. (1990a), Dis. Markers 8: 265-274.

Salomone M. C., Roisman F. R., Santiago J., Satz M. L. and Fainboim L. (1990b), Dis. Markers 8: 275-281.

Teunissen M. B. (1992), Histochem. J. 24: 697-716.

Van Kroonenburgh M. J. and Pauwels E. K. (1988), Nucl. Med. Commun. 9: 919-930.

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】単球の分離並びに、IL-4及びGM-CSFによる単球の未成熟樹状細胞(DC)への分化、及びIL-1、IL-6、TNF- α 、PGE2を含む追加の混合液(カクテル)による成熟樹状細胞への分化。FACSの図に示されているのは、フェージの選択でサブトラクター細胞として用いた、混合PBL、及び培養DC(四角囲み)であり、PBL量はDC量の約10倍であった。

【図2】代表的なモノクローナルフェージ抗体(SC02-113)の、培養未成熟(上段左)及び成熟(上段右)DCへの結合、およびC1R細胞のCD1a形質転換体(下段右)への結合のFACS分析であり、C1Rモック形質転換体のネガティブコントロールと比較している。

【図3】ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体(CR2113、CR2114、CR2115、CR2116、CR2117及びCR2118)及び市販のマウス抗ヒトCD1a抗体、マウス抗ヒトCD1b抗体、マウス抗ヒトCD1c抗体及びマウス抗ヒトCD1d抗体の、CR1-CD1a及びB16-CD1a形質転換体、及びCR1及びB16モック形質転換体への結合。ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体のCD1a形質転換体に対する結合がモック形質転換体と比較して有意な場合には**にて示した。有意性は対応のない(unpaired)両側t検定($p < 0.05$)にて検定した。

【図4】ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体(CR2113、CR2114、CR2115、CR2116、CR2117及びCR2118)及び市販のマウス抗ヒトCD1a抗体、マウス抗ヒトCD1b抗体、マウス抗ヒトCD1c抗体及びマウス抗ヒトCD1d抗体の、CR1-CD1a、CR1-CD1b、CR1-CD1d及びCR1-CD1d形質転換体への結合。ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体のCR1-CD1a、CR1-CD1b、CR1-CD1d及びCR1-CD1d形質転換体に対する結合が、CR1モック形質転換体と比較して有意な場合には**にて示した。有意性は対応のない(unpaired)両側t検定($p < 0.05$)にて検定した。

【図5A】図5Aは、非標識及びビオチン標識ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体CR2113のB16-CD1a形質転換体に対する結合曲線を示す。

【図5B】図5Bは、非標識及びビオチン標識ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体CR2114のB16-CD1a形質転換体に対する結合曲線を示す。

【図5C】図5Cは、非標識及びビオチン標識ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体CR2117のB16-CD1a形質転換体に対する結合曲線を示す。

【図5D】図5Dは、非標識及びビオチン標識ヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体CR2118のB16-CD1a形質転換体に対する結合曲線を示す。

【図6A】図6Aは、CR2113のヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体に対する競合曲線を示す。

【図6B】図6Bは、CR2114のヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体に対する競合曲線を示す。

【図6C】図6Cは、CR2117のヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体に対する競合曲線を示す。

【図6D】図6Dは、CR2118のヒト抗ヒトCD1aモノクローナル抗体に対する競

10

20

30

40

50

合曲線を示す。

【 図 1 】

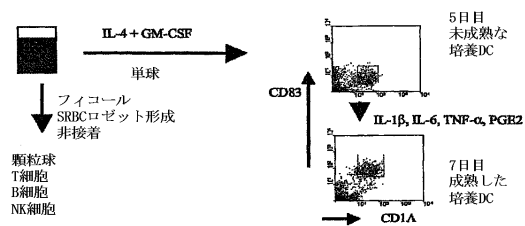


FIGURE 1

【 図 2 】

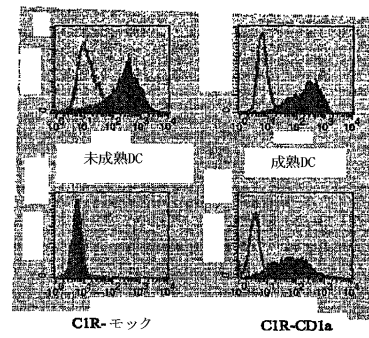


FIGURE 2

【 図 3 】

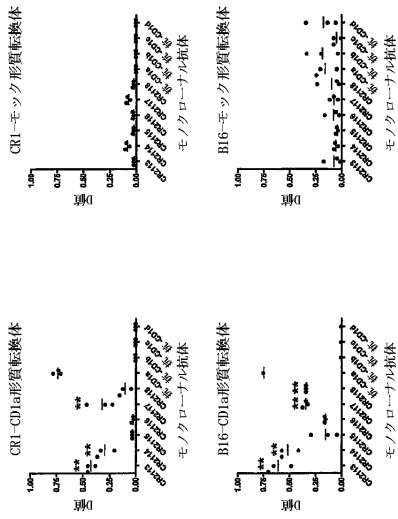


FIGURE 3

【 図 4 】

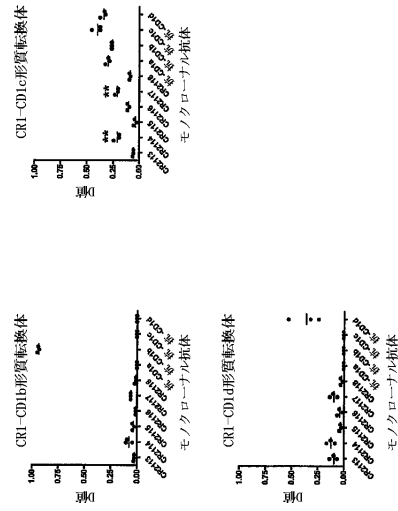


FIGURE 4

【 図 5 A 】

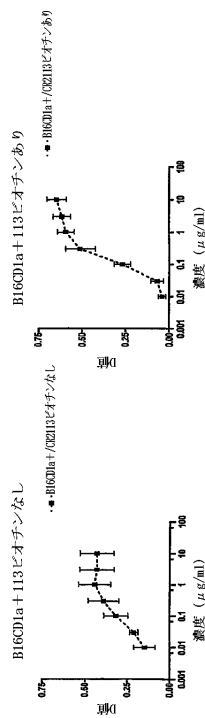


FIGURE 5A

【 図 5 B 】

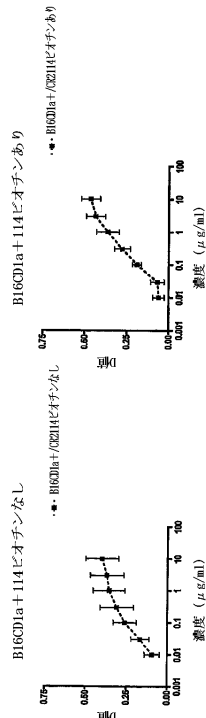


FIGURE 5B

【 図 5 C 】

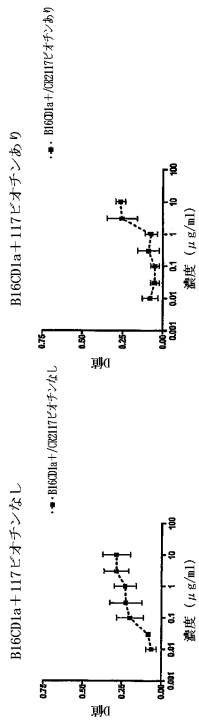


FIGURE 5C

【 図 5 D 】

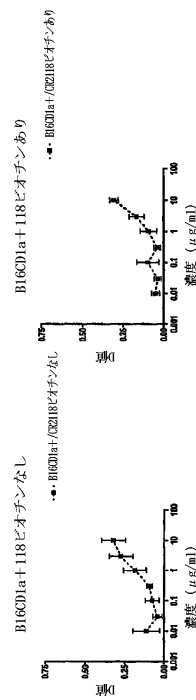


FIGURE 5D

【 図 6 A 】

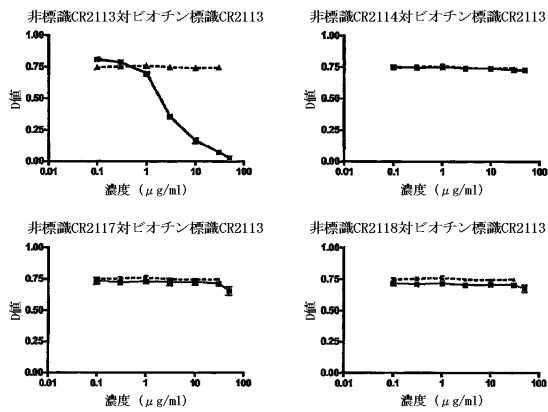


FIGURE 6A

【 図 6 B 】

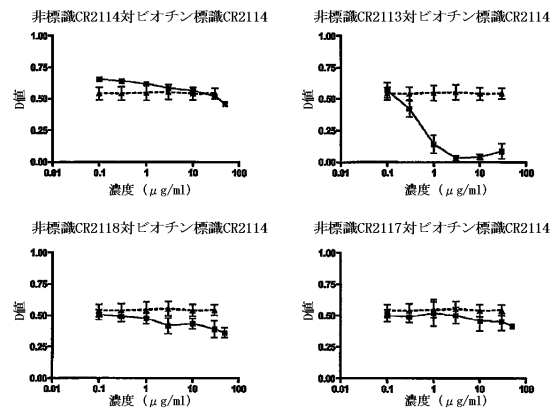


FIGURE 6B

【 図 6 C 】

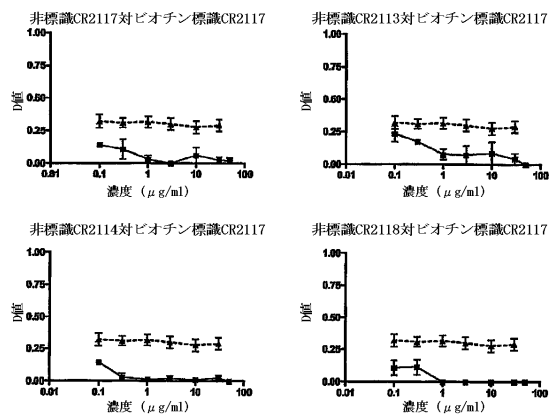


FIGURE 6C

【 図 6 D 】

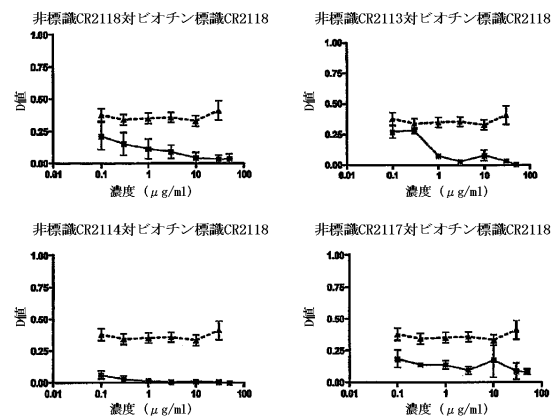


FIGURE 6D

【 配列表 】

2008505605000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成18年8月24日(2006.8.24)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

A P Y M M Y F D S (配列番号 1) 及び E T W W Q S F D Y (配列番号 6) からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 領域を少なくとも有するという特徴を持つ、ヒト C D 1 a に特異的に結合可能なヒトモノクローナル抗体。

【 請求項 2 】

配列番号 8 及び配列番号 1 8 からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する重鎖を有するという特徴を持つ、請求項 1 に記載のヒトモノクローナル抗体。

【 請求項 3 】

前記抗体が I g G 1 であるという特徴を持つ、請求項 1 又は 2 に記載のヒトモノクローナル抗体。

【 請求項 4 】

前記抗体が、抗体依存性細胞毒性、補体依存性細胞毒性及び内在化(インターナリゼーション)からなる群から選択された活性を少なくとも有するという特徴を持つ、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体。

【 請求項 5 】

機能的変異体が、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体と競合してヒト CD 1 a に特異的に結合できるという特徴を持つ、請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体の機能的変異体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体又は請求項 5 に記載の機能的変異体を有し、更に少なくとも 1 つのタグを有する免疫複合体。

【請求項 7】

前記タグが、毒性物質、放射性物質、リポソーム、酵素及びこれらの組み合わせからなる群から選択されているという特徴を持つ、請求項 6 に記載の免疫複合体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体又は請求項 5 に記載の機能的変異体をコードする核酸分子。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸分子を少なくとも 1 つ有するベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを少なくとも 1 つ有する宿主。

【請求項 11】

前記宿主がヒト細胞に由来する細胞であるという特徴を持つ、請求項 10 に記載の宿主。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体又は請求項 5 に記載の機能的変異体を製造する方法であって、以下の、

a) 請求項 10 又は 11 に記載の宿主を、モノクローナル抗体又は機能的変異体の発現を誘導する条件下で培養する工程、および、任意であるが、

b) 発現したヒトモノクローナル抗体又は機能的変異体を回収する工程、を有する方法。

【請求項 13】

ヒト CD 1 a に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又は CD 1 a に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体をコードする核酸分子を同定する方法であって、以下の、

a) ヒトモノクローナル抗体のファージライブラリーを、ヒト CD 1 a を有する材料に接触させる工程、

b) ヒト CD 1 a を有する該材料に結合しているファージを少なくとも 1 回選択する工程、および、

c) ヒト CD 1 a を有する材料に結合しているファージを分離して回収する工程、を有する方法。

【請求項 14】

ヒト CD 1 a に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はヒト CD 1 a に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体をコードする核酸分子を得る方法であって、以下の、

a) 請求項 13 に記載の方法を実施する工程、および

b) 回収したファージから、ヒトモノクローナル抗体及び/又は該ヒトモノクローナル抗体をコードする核酸分子を単離する工程、を有する方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体、請求項 5 に記載の機能的変異体、又は請求項 6 若しくは 7 に記載の免疫複合体を含有する組成物。

【請求項 16】

請求項 8 に記載の核酸分子を含有する組成物。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載のヒトモノクローナル抗体、請求項 5 に記載の機能的変異体、請求項 6 若しくは 7 に記載の免疫複合体、又は請求項 15 若しくは 16 に記載

の組成物を含有し、更に少なくとも1種類の薬学的に許容される賦形剤を有する医薬組成物。

【請求項18】

更に少なくとも1種類の他の治療薬剤を含有する、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項19】

医薬として用いるための、請求項1から4のいずれか1つに記載のヒトモノクローナル抗体、請求項5に記載の機能的変異体、請求項6若しくは7に記載の免疫複合体、請求項15若しくは16に記載の組成物、又は請求項17若しくは18に記載の医薬組成物。

【請求項20】

腫瘍性疾患又は疾病の診断、予防、治療、又はこれらの組み合わせに用いるための、請求項1から4のいずれか1つに記載のヒトモノクローナル抗体、請求項5に記載の機能的変異体、請求項6若しくは7に記載の免疫複合体、請求項15若しくは16に記載の組成物、又は請求項17若しくは18に記載の医薬組成物。

【請求項21】

腫瘍性疾患又は疾病の診断、予防、治療、又はこれらの組み合わせのための医薬の調製において、請求項1から4のいずれか1つに記載のヒトモノクローナル抗体、請求項5に記載の機能的変異体、請求項6若しくは7に記載の免疫複合体、請求項15若しくは16に記載の組成物、又は請求項17若しくは18に記載の医薬組成物を使用する方法。

【請求項22】

前記腫瘍性疾患又は疾病が、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病の急性転化、慢性骨髄単球性白血病、急性前骨髄球性白血病、骨髄異形成症候群、若年性骨髄単球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性非リンパ性白血病、T細胞性急性リンパ芽球性白血病、大型顆粒球性リンパ球性白血病、B細胞性慢性リンパ性白血病及びランゲルハンス細胞組織球症からなる群から選択されるという特徴を有する、請求項21に記載の使用する方法。

【請求項23】

a) 診断上有効な量の請求項1から4のいずれか1つに記載のヒトモノクローナル抗体、請求項5に記載の機能的変異体又は請求項6若しくは7に記載の免疫複合体を標本と接触させる工程、および

b) ヒトモノクローナル抗体、機能的変異体又は免疫複合体が、該標本の化合物と特異的に結合するかどうかを測定する工程、
を有する、ヒトCD1aを検出する方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/053639

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/28 A61K39/395 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | AMIOT M ET AL: "HLA CLASS I MOLECULES ARE ASSOCIATED WITH CD1A HEAVY CHAINS ON NORMAL HUMAN THYMUS CELLS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 85, no. 12, June 1988 (1988-06), pages 4451-4454, XP001146191 ISSN: 0027-8424 page 4451, left-hand column page 4452 - page 4453 | 1,4-11, 14-20,22 |
| X | US 2001/051156 A1 (ZENG DEFU ET AL) 13 December 2001 (2001-12-13) claims 1-10 | 1,4-11, 14-18,22 |
| ----- | | |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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 *G* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 16 August 2005 | | Date of mailing of the international search report 30/08/2005 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer van Klompenburg, W |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/053639

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | <p>PRITCHARD K K ET AL: "CD1 antibody immunolocalisation in Langerhans' cell histiocytosis." LANCET. 7 AUG 1993, vol. 342, no. 8867, 7 August 1993 (1993-08-07), pages 367-368, XP002340733 ISSN: 0140-6736 page 368, left-hand column</p> | 1-22 |
| Y | <p>WO 02/06347 A (CRUCCELL HOLLAND B.V; LOGTENBERG, TON; CILENTI, LUCIA) 24 January 2002 (2002-01-24) page 1, line 26 - page 2, line 26</p> | 1-22 |
| A | <p>ARCECI ROBERT J ET AL: "Atypical cellular disorders." HEMATOLOGY / THE EDUCATION PROGRAM OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY. AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY. EDUCATION PROGRAM. 2002, 2002, pages 297-314, XP002340734 ISSN: 1520-4391 page 303, right-hand column</p> | 1-22 |
| A | <p>FURUE M ET AL: "EPITOPES FOR CD1A, CD1B, AND CD1C ANTIGENS ARE DIFFERENTIALLY MAPPED ON LANGERHANS CELLS, DERMAL DENDRITIC CELLS, KERATINOCYTES, AND BASEMENT MEMBRANE ZONE IN HUMAN SKIN" JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY, C.V. MOSBY, ST. LOUIS, MO, US, vol. 27, no. 3, 1992, pages 419-426, XP009007440 ISSN: 0190-9622 table 1</p> | 1-22 |
| A | <p>VAUGHAN T J ET AL: "HUMAN ANTIBODIES BY DESIGN" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUB. CO, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 535-539, XP000941675 ISSN: 1087-0156 the whole document</p> | 1-22 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/053639

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2001051156 | A1 | AU 5923001 A | 12-11-2001 |
| | | WO 0182960 A1 | 08-11-2001 |
| WO 0206347 | A | EP 1174440 A1 | 23-01-2002 |
| | | AU 8267501 A | 30-01-2002 |
| | | WO 0206347 A1 | 24-01-2002 |
| | | US 2003211553 A1 | 13-11-2003 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|------------------|------------|
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 K 35/76 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 35/76 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/574 A | |
| | G 0 1 N 33/53 D | |

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

- (74)代理人 100114292
弁理士 来間 清志
- (74)代理人 100119530
弁理士 富田 和幸
- (72)発明者 マーク スロスビー
オランダ国 3 5 8 1 エルベー ユトレヒト カークストラート 3 7
- (72)発明者 マリア ヴァン マイヤー
オランダ国 1 0 6 6 ウェーエス アムステルダム デンダーホフ 1 4
- (72)発明者 ウィルフレッド トーマス ヴィンセント ジャーマード
オランダ国 6 2 4 7 イェアー グロンスヴェルド アーン ヘット ベールジェ 5 6
- (72)発明者 ロバート ジョン アーセシ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 2 バルチモア セイント アルバンス ウェイ 5 3 1 5
- (72)発明者 アダ マリア クルイスピーク
オランダ国 1 0 6 6 エーハー アムステルダム オスドーパーウェグ 1 3
- F ターム(参考) 4B024 AA01 AA15 BA31 BA53 CA02 EA03 HA01 HA11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ10 QQ46 QR48 QR55 QS33
4B064 AG26 AG31 CA10 CA12 DA01 DA13
4B065 AA90Y AA98X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 MA01 NA14 ZB26 ZB27 ZC02
4C085 AA13 AA14 BB01 CC03 CC22 DD61
4C086 AA01 AA02 EA17 EA18 MA02 MA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC02
4C087 BC83 CA12 MA01 NA14 ZB26 ZB27 ZC02
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA50 DA75 EA20 EA54 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | CD1a的人类结合分子 | | |
| 公开(公告)号 | JP2008505605A | 公开(公告)日 | 2008-02-28 |
| 申请号 | JP2006546178 | 申请日 | 2004-12-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 克鲁塞尔荷兰公司 约翰霍普金斯大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 基于荷兰 - KLUCEL Weserblick 约翰·霍普金斯盐湖城 | | |
| [标]发明人 | マークスロスビー マリアヴァンマイヤー ウィルフレッドトーマスヴィンセントジャーマード ロバートジョンアーセシ アダマリアクルイスピーク | | |
| 发明人 | マーク スロスビー マリア ヴァン マイヤー ウィルフレッドトーマス ヴィンセント ジャーマード ロバート ジョン アーセシ アダ マリア クルイスピーク | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K16/28 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 A61K39/395 A61K31/7088 A61K48/00 A61K35/76 A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 G01N33/574 G01N33/53 A61K39/00 A61K47/48 | | |
| CPC分类号 | A61K47/6849 A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/2833 C07K2317/21 C07K2317/52 C07K2317/622 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/77 C07K2317/92 C07K2319 /00 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N5/00.B C12P21/02.C C12Q1/68.A A61K39/395.N A61K39/395.D A61K31/7088 A61K48/00 A61K35/76 A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 G01N33/574.A G01N33/53.D | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/EA03 4B024/HA01 4B024 /HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QQ46 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B064/AG26 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065 /AA90Y 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZC02 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/CC22 4C085/DD61 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086 /ZC02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045 /EA20 4H045/EA54 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 藤四郎 克利马清 | | |
| 优先权 | PCT/EP2003/051096 2003-12-23 WO PCT/EP2004/052110 2004-09-09 WO | | |
| 其他公开文献 | JP4712724B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供特异性结合CD1a的人结合分子，编码人结合分子的核酸分子，包含人结合分子的组合物和鉴定或产生人结合分子的方法。人结合分子可用于诊断，预防和治疗肿瘤性疾病和疾病。

| scFvの名称 | HCDR3のアミノ酸配列 | scFvのヌクレオチド配列の配列番号 | scFvのアミノ酸配列の配列番号 | VHファミリー | VLファミリー |
|----------|----------------------------|--------------------|------------------|-----------|------------|
| SC02-113 | APYMMYFDY (配列番号1) | 配列番号25 | 配列番号26 | VH4:DP-66 | Vκ1:DPK-9 |
| SC02-114 | ETWWQSFDY (配列番号2) | 配列番号27 | 配列番号28 | VH3:DP-51 | Vκ1:DPK-9 |
| SC02-115 | SQMPSYFDY (配列番号3) | 配列番号29 | 配列番号30 | VH1:DP-14 | Vλ3:DPK-16 |
| SC02-116 | DALWLAFDY (SEQ ID NO:4) | 配列番号31 | 配列番号32 | VH3:DP-47 | Vκ1:DPK-9 |
| SC02-117 | STPWFYFDY (配列番号5) | 配列番号33 | 配列番号34 | VH3:DP-48 | Vκ1:DPK-9 |
| SC02-118 | SAWWLSFDS (配列番号6) | 配列番号35 | 配列番号36 | VH3:DP-48 | Vκ1:DPK-9 |