

(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2015-502915

(P2015-502915A)

(43) 公表日 平成27年1月29日(2015.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B024
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C085
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4H045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 101	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-534890 (P2014-534890)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月15日 (2012.10.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月29日 (2014.5.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2012/001247
 (87) 国際公開番号 W02013/053021
 (87) 国際公開日 平成25年4月18日 (2013.4.18)
 (31) 優先権主張番号 2011904190
 (32) 優先日 平成23年10月14日 (2011.10.14)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
 (31) 優先権主張番号 61/547, 307
 (32) 優先日 平成23年10月14日 (2011.10.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500468537
 テバ・ファーマシューティカルズ・オーストラリア・ピーティワイ・リミテッド
 オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2113・マクアリー・パーク・エッピング・ロード・37・レヴェル・2
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD1dに対する抗体

(57) 【要約】

本発明は、CD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。これらの抗体およびその抗原結合部分は、NKT細胞エフェクター機能が関与する状態の処置に適用される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2】

抗体401.11.158と、CD1dへの結合について競合する、請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体が結合したものと同一CD1dのエピトープに結合する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

10

【請求項 4】

エピトープが配列番号116の残基141～143を含む、請求項3に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 5】

エピトープが配列番号116の残基87～93および141～143を含む、請求項3または4に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 6】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、配列番号1、3、5、7、8、9、24、25、26、30、33、36、40、41、42、43、44および45からなる群から選択される配列ならびにそれと少なくとも95%同一である配列を有するV_Hドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合部分。

20

【請求項 7】

VHドメインの配列が配列番号148または配列番号150である、請求項6に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 8】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、配列番号2、4、6、46、49および62からなる群から選択される配列ならびにそれと少なくとも95%同一である配列を有するVLドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項 9】

VLドメインの配列が配列番号149または配列番号4である、請求項8に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 10】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むV_Hドメインを含み、CDR1の配列がDYAMH(配列番号124)またはGYYS(配列番号125)である、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 11】

CDR3の配列が、DMCSSSGCPDGYFDS(配列番号126)、DLCSSGGCPEGYFDS(配列番号152)、DMCSSSGCPDGYFDS(配列番号153)、DMCSSGGCPEGYFDS(配列番号154)、GEIYDFWNSYMDV(配列番号127)、GEIYDFWKSYSMDV(配列番号128)、GEIYDFYKSYLDV(配列番号155)、GEIYDFYKSYMDV(配列番号156)、GEIYDFWKSYSLDV(配列番号129)またはGEIYDFYNSYMDV(配列番号130)である、請求項10に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

40

【請求項 12】

CDR2の配列が、TIIWNSAIIIGYADSVKG(配列番号131)、EINHSGSTNYNPSLKS(配列番号132)、EINPSGSTNYNPSLKS(配列番号133)またはEINHAGSTNYNPSLKS(配列番号134)である、請求項10または11に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 13】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、

50

FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むV_Hドメインを含み、CDR1の配列がGFTTFDDY(配列番号135)またはGGSFSGY(配列番号136)である、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項14】

CDR3の配列が、DMCSSSGCPDGYFDS(配列番号126)、DLCSSGGCPEGYFDS(配列番号152)、DMCSSGGCPDGYFDS(配列番号153)、DMCSSGGCPEGYFDS(配列番号154)、GEIYDFWNSYMDV(配列番号127)、GEIYDFWKSYSMDV(配列番号128)、GEIYDFYKSYLDV(配列番号155)、GEIYDFYKSYMDV(配列番号156)、GEIYDFWKSYSLDV(配列番号129)またはGEIYDFYNSYMDV(配列番号130)である、請求項13に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項15】

CDR2の配列がIWNSAI(配列番号137)、NHSGS(配列番号138)、NPSGS(配列番号139)またはNHAGS(配列番号140)である、請求項13または14に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項16】

ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むV_Lドメインを含み、CDR1の配列がRASQHISSWLA(配列番号141)またはASSSGAVSSGNFPN(配列番号142)である、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項17】

CDR3の配列がQQANRFPLT(配列番号143)またはLLYFGDTQLGV(配列番号144)である、請求項16に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項18】

CDR2の配列がAASSLQS(配列番号145)またはSASNKHS(配列番号146)である、請求項16または17に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項19】

配列番号1および配列番号2、配列番号23および配列番号46、配列番号24および配列番号47、配列番号5および配列番号6、配列番号25および配列番号48、配列番号26および配列番号49、配列番号27および配列番号50、配列番号28および配列番号51、配列番号29および配列番号52、配列番号30および配列番号53、配列番号31および配列番号54、配列番号32および配列番号55、配列番号33および配列番号56、配列番号34および配列番号57、配列番号35および配列番号58、配列番号36および配列番号59、配列番号37および配列番号60、配列番号38および配列番号61、配列番号40および配列番号62、配列番号41および配列番号63、配列番号42および配列番号64、配列番号3および配列番号4、配列番号7および配列番号4、配列番号8および配列番号4、配列番号9および配列番号4、配列番号43および配列番号65、配列番号44および配列番号66、ならびに配列番号45および配列番号67からなる群から選択されるV_HおよびV_L配列対を含む、請求項6から18のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項20】

細胞に基づく効力アッセイを用いて測定された0.5ng/ml ~ 20ng/mlのEC50でCD1dに結合する、請求項1から19のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項21】

ヒトカップ鎖定常領域を含む、請求項1から20のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項22】

ヒトラムダ鎖定常領域を含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項23】

IgG1またはIgG4定常領域を含む、請求項1から22のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項24】

10

20

30

40

50

S228P突然変異を含むIgG4定常領域を含む、請求項23に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項25】

抗体である、請求項1から24のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項26】

Fab、F(ab)₂、scFvまたはドメイン抗体である、請求項1から24のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項27】

抗体依存性細胞傷害、補体依存性細胞傷害、血清半減期、生体内分布およびFc受容体への結合からなる群から選択される機能的特徴を調節するように改変される、請求項1から26のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

10

【請求項28】

請求項1から26のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分と、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

【請求項29】

請求項1から26のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分をコードする単離されたDNA分子。

【請求項30】

DNA分子の配列が、配列番号10～18および68～115、またはそれと少なくとも95%同一である配列もしくは中程度から高度のストリンジェンシー条件下でそれにハイブリダイズする配列からなる群から選択される、請求項29に記載の単離されたDNA分子。

20

【請求項31】

請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合部分を生成する形質転換された細胞。

【請求項32】

請求項29または30に記載のDNA分子で形質転換された、請求項31に記載の形質転換された細胞。

【請求項33】

ヒト対象におけるNKT細胞エフェクター機能が関与する状態を処置する方法であって、対象に、請求項1から27のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合部分または請求項28に記載の組成物を投与することを含む、方法。

30

【請求項34】

状態が乾癬、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、アテローム性動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝炎、自己免疫性肝炎、虚血再かん流傷害、鎌状赤血球病に伴う肺の炎症または機能障害、および喘息からなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

NKT細胞エフェクター機能が関与する状態の処置のための薬剤の調製における、請求項1から27のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分の使用。

【請求項36】

試料中のヒトまたはカニクイザルCD1dの存在を検出する方法であって、CD1dを含有することが疑われる試料を、請求項1から27のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分と、抗体またはその抗原結合部分がCD1dに結合して複合体を形成するのを可能にする条件下で接触させるステップと、試料中の複合体の存在を検出するステップとを含む、方法。

40

【請求項37】

試料中のCD1dが細胞膜に結合したCD1dである、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

NKT細胞エフェクター機能が関与する状態の処置における使用のための請求項1から27のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

50

【請求項 39】

細胞試料中のヒトCD1d陽性細胞の存在を検出する方法であって、細胞の集団を、請求項1から27のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分と接触させて、抗体またはその抗原結合部分がCD1d陽性細胞に結合して複合体を形成するのを可能にするステップと、抗体またはその抗原結合部分-細胞複合体の存在を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 40】

細胞試料が末梢血試料または細胞系試料である、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1dに特異的に結合し、401.11、402.8および401.11.158からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合するCD1d結合タンパク質を選択する方法であって、

複数のCD1d結合タンパク質を、配列番号116の位置87～93および141～143に位置するアミノ酸がこれらの位置の対応するマウスアミノ酸で置換されたヒトCD1d突然変異タンパク質と、CD1d結合タンパク質が突然変異タンパク質に結合してCD1d結合タンパク質-ヒトCD1d突然変異タンパク質複合体およびヒトCD1d突然変異タンパク質に結合しない減弱した複数のCD1d結合タンパク質を形成するのを可能にするのに十分な条件下で接触させるステップと、減弱した複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1d突然変異タンパク質に結合しないCD1d結合タンパク質を回収するステップと

を含み、回収されたCD1d結合タンパク質が、ヒトCD1dに特異的に結合し、401.11、402.8および401.11.158からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合する、方法。

【請求項 42】

複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1dに特異的に結合するCD1d結合タンパク質を選択する方法であって、

複数のCD1d結合タンパク質を、ヒトCD1d(配列番号116)の位置87～93および141～143に位置するアミノ酸が、これらの位置の対応するマウス配列で置き換えられたhCD1dmu(配列番号119)と、CD1d結合タンパク質がhCD1dmuに結合してCD1d結合タンパク質-hCD1dmu複合体およびhCD1dmuに結合しない減弱した複数のCD1d結合タンパク質を形成するのを可能にするのに十分な条件下で接触させるステップと、減弱した複数のCD1d結合タンパク質から、hCD1dmuに結合しないCD1d結合タンパク質を回収するステップと

を含み、回収されたCD1d結合タンパク質がヒトCD1d(配列番号116)またはmCD1dmu(配列番号118)に特異的に結合する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

出願データ

本出願は、2011年10月14日に出願された豪州特許出願第2011904190号および2011年10月14日に出願された米国特許出願第61/547,307号と関連し、その優先権を主張し、これらの出願の各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、CD1dに結合し、CD1d拘束性T細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞の活性化などのCD1dにより媒介される生物学的機能を阻害する抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

本明細書において著者らにより言及される刊行物の書誌の詳細は、説明の終わりにアルファベット順に収集される。

【0004】

本明細書における任意の先行技術に対する参照は、この先行技術が任意の国における共通一般知識の一部を形成するという承認または任意の形態の示唆ではなく、またそう取ら

10

20

30

40

50

れるべきではない。

【0005】

CD1dは、NKT細胞などの細胞集団が、いくつかの炎症性疾患と関連する活性である高レベルのサイトカインを放出するのを誘発するために必須の対抗受容体である。従って、CD1dにより媒介される効果の遮断は、治療的に有用である可能性がある。

【0006】

CD1dタンパク質は、ランゲルハンス細胞(皮膚における主な樹状抗原提示細胞)、活性化B細胞、リンパ節中の樹状細胞、および活性化血液単球を含むいくつかの抗原提示細胞(APC)サブセット上に展示される。CD1dを介して刺激される細胞の一集団はNKT細胞であり、これはCD161およびNKG2DなどのNK細胞と典型的に関連する様々な分子マーカーと共に、アルファ/ベータ()T細胞受容体(TCR)を発現するT細胞のサブセットである。NKT細胞は、CD1dが提示する脂質または糖脂質を介して抗原提示細胞(APC)により刺激される。大部分のヒトCD1d拘束性NKT細胞は、V 11と対形成したV 24J 18を含む半不変性(semi-invariant)TCRを発現する(Brigl, Mら、2004 Annu. Rev. Immunol., 22:817~890頁)。CD1d-TCR相互作用は、多くのTh1-またはTh2-様サイトカイン、例えば、インターフェロン(IFN)-および腫瘍壊死因子(TNF)-、ならびにインターロイキン(IL)-4、IL-5およびIL-13を迅速に誘導する。Th1/Th2サイトカイン応答のバランスは、免疫応答特性を調整する重要な役割を果たすことが知られている。

10

【0007】

これまでのところ、5つのCD1遺伝子がヒトにおいて同定されている: CD1a、CD1b、CD1c、CD1dおよびCD1e。CD1タンパク質は、2-ミクログロブリン(2M)と非共有結合した大サブユニット(重鎖)として発現される(Van Agthoven, A., およびTerhorst, C., 1982 J. Immunol. 128:426~432頁; Terhorst, C.ら、1981 Cell 23:771~780頁)。CD1dの細胞外ドメインは、3つのドメインからなる: 1ドメイン(残基20~108)、2ドメイン(残基109~201)、および3ドメイン(残基202~295)(Pellicci, D.G.ら、2009 Immunity 31: 47~59頁)。

20

【0008】

異なる構造を有する様々な脂質が、CD1d分子の2つの疎水性結合ポケット(A'およびF)のそれぞれの中に脂肪酸鎖を収容する独特の様式でCD1d分子に結合することが示されている。CD1d分子に結合することができる脂質種としては、ミコール酸、ジアシルグリセロール、スフィンゴ脂質、ポリイソプレノイド、リポペプチド、ホスホマイコケチドおよび低分子疎水性化合物が挙げられる(Venkataswamy, M. M. およびPorcelli, S.A., 2010 Semin Immunol 22: 68~78頁)。in vitroおよびin vivoでNKT細胞活性化を研究するために用いられる原型的な化合物は、海綿アゲラス・マウリシアヌス(Agelas mauritianus)由来のβ-ガラクトシルセラミド(「β-GalCer」)であるKRN7000である。さらなるアゴニストとしては、限定されるものではないが、内因性スフィンゴ糖脂質であると報告されたイソグロボトリヘキソシルセラミド(「iGb3」)、ならびにあるクラスの微生物由来β-グリクロノシルセラミドのメンバー、および様々なヒト糖脂質、例えば、リゾホスファチジルコリンおよびリゾスフィンゴミエリンが挙げられる(Fox, L. M.ら、2009 Plos Biol 7: e1000228)。C24:1型のβ-D-グルコピラノシルセラミドなどの特定の天然β結合スフィンゴ糖脂質もまた、NKT細胞の弱いアゴニストである(Brennan, P. J.ら、2011 Nat Immunol 12:1202~1211頁)。

30

40

【0009】

NKT細胞による過剰サイトカイン生成は、重症筋無力症(Reinhardt, C.ら、1999 Neurology 52:1485~87頁)、乾癬(Bonish, B.D.ら、2000 J. Immunol. 165:4076~85頁)、潰瘍性大腸炎(Saubermann, L.J.ら、2000 Gastroenterology 119:119~128頁)、原発性胆汁性肝硬変(Kita, H.ら、2002 Gastroenterology 123:1031~43頁)、大腸炎(Heller, F.ら、2002 Immunity 17, 629~638頁)、脂肪性肝炎(Syn, W.ら、(2010) Hepatology, 51(6):1998~2007頁)、自己免疫性肝炎(Santodomingo-Garzon, T.およびSwain, M.G. (2011) Autoimmunity Reviews 10:793~800頁)、アテローム性動脈硬化症(Kyriakakis, E.ら、Eur J I

50

mmunol 2010 40:3268~79頁)および鎌状赤血球病に伴う肺の炎症または機能障害(Wallaceら、2009 Blood 114:667~676頁)などの、特定の自己免疫または炎症性疾患の病状に寄与し得る。喘息における有害な効果を示すNKT細胞に関する多くの証拠がある(Iwamura, C. およびNakayama, T., 2010 Curr Opin Immunol 22:807~13頁)。

【0010】

喘息は、非特異的刺激に応答する慢性局部炎症、粘液閉塞、および気管支痙攣から生じる可逆的気道閉塞を特徴とする慢性炎症性肺障害である(Murdoch, J. R.およびLloyd, C. M. 2010 Mutat Res 690: 24~39頁)。高い喘息有病率、高い発生率および多くの関連する健康管理費用は、喘息を主要な公衆衛生問題に位置づけている(Holgate, S. T.およびPolosa, R. 2008 Nat Rev Immunol 8: 218~30頁;Bahadori, K., Doyle-Waters M. M.ら、2009 BMC Pulm Med 9:24頁)。コルチコステロイド難治性喘息などの重症型の喘息に罹患している患者の処置のための有意な満たされない医学的必要性が存在する。重症喘息を有する患者は、標準治療にはあまり応答せず、全喘息集団の約5~10%を占める。これは、米国だけで約850,000人の患者を含む。

10

【0011】

アレルギー性喘息のマウスモデルにおいて、NKT細胞は疾患を悪化させることが示されている(Akbari, O.ら、2003 Nat Med 9: 582~8頁)。NKT細胞は、CD1d拘束性糖脂質抗原により活性化されるようになり、IFN- γ 、IL-4、IL-5およびIL-13などのサイトカインを放出し、好酸球および喘息において重要な他の細胞サブセットを活性化し得る(Chuang, Y. H.ら、2011 J Immunol 186: 4687~92頁)。NKT細胞を標的化することにより、抗CD1d抗体またはCD1d依存的アンタゴニストの投与は、実験的に誘導された気道炎症を抑制する(Lisbonne, M.ら、2003 J Immunol 171: 1637~41頁;Pichavant, M.ら、2008 J Exp Med, 205: 385~93頁)。NKT細胞はまた、喘息の非ヒト霊長類モデルにおいても有害である(Matngkasombut, P.ら、2008 J Allergy Clin Immunol 121: 1287~9頁)。そのような結果は、肺に存在する少数のNKT細胞がヒト喘息の発症および永続化にとって重要であり得ることを示唆する。

20

【0012】

非アルコール性脂肪肝(NAFLD)は、アルコール乱用歴のない患者において過剰の脂肪が蓄積する状態である。NAFLDは、単純な脂肪症と非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)とに分類される。NASHにおいては、脂肪症、小葉内炎症および肝細胞風船様腫大(ballooning)が存在し、進行性の線維症を伴うことが多い。長年にわたるNASHは肝硬変に進行することがあり、肝細胞がん(HCC)が転帰となり得る。NAFLDは代謝症候群の肝臓兆候と見なされている。NAFLDは、肥満、2型糖尿病、および高脂血症の有病率の増加と一致してここ数十年にわたって世界中で増加している。NAFLD/NASHは、世界中で最も一般的な慢性肝疾患と現在見なされている。全成人の約20%がNAFLDを有し、成人の2~3%がNASHを有すると見積もられている。非アルコール性脂肪肝は、慢性肝疾患の主因である。それは、肝臓脂肪症(脂肪肝)および非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)などの様々な組織病理を包含する。

30

【0013】

肝臓は、自然免疫応答を調節し得るNKT細胞の居住集団を担持する。例えば、不変性T細胞受容体を有するNKT細胞は、マウス肝臓中に最大20%のT細胞を含む。そのような細胞はまた、NKT細胞のより多様なレパートリーを担持するヒト肝臓中で富化されている(最大10%のT細胞)。両種において、NKT細胞は主に肝類洞に居住し、そこでそれらは血管内免疫監視を提供する。NKT細胞は、糖脂質抗原を特異的に認識し、活性化された場合にサイトカインを生成することができる。この細胞サブセットは、NASHの発病に寄与し得る(例えば、Syn, W.ら(2010) Hepatology, 51(6):1998~2007頁を参照されたい)。従って、in vivoでNKT細胞の機能を遮断する抗CD1d抗体の送達は、治療的に有用であり得る。

40

【0014】

自己免疫性肝疾患の3つの主な広いカテゴリーは、自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、および原発性硬化性胆管炎(PSC)である。これらの疾患はそれぞれ、相対的に異なる臨床的、血清学的および組織学的プロフィールを有する。これらの3つの肝疾患

50

はまた、肝臓損傷の組織病理学的パターンにおいても異なる。AIHは、インタフェース肝炎(interface hepatitis)として知られる、肝実質の進行的破壊を特徴とする。他方、PBCは小さい肝内胆管の特異的破壊により区別されるが、PSCは主に大きい胆管の破壊を含む。これらの状態の様々なプロフィールにもかかわらず、これらの自己免疫性肝疾患は全て、肝細胞を認識、破壊するTリンパ球の肝動員を含む免疫媒介性肝臓損傷の共通の経路を共有し、その後、肝線維症を発症する。NKT細胞は、自己免疫性肝疾患の病理に寄与し得る(Santodomingo-Garzon, T.およびSwain, M.G. (2011) Autoimmunity Reviews 10:793~800頁)。活性化NKT細胞は、細胞表面のFasL発現の上方調節ならびに/または腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)およびパーフォリン/グランザイムBの放出を介して直接的に肝細胞死を誘導し得る。NKT細胞は、IFN- γ などの前炎症性サイトカインの放出を介して肝細胞死を間接的に誘導することができる。NKT細胞は、Th2応答および形質細胞によるその後の自己抗体の生成を誘導するIL-4を生成することもできる。NKT細胞の活性化は肝細胞破壊および最終的には肝硬変の発症をもたらし得るので、抗CD1d抗体の送達によるNKT細胞機能の遮断は従って、治療的に有用であり得る。サイトカイン放出に加えて、細胞溶解をもたらすNKT細胞エフェクター機能、例えば、パーフォリン放出およびグランザイム放出ならびにFas-L媒介性細胞死、および他の公知のNKT機能、例えば、IL-2媒介性バースタンダー効果は、NKT細胞が関与する状態においても関連し得る。例えば、抗CD1d抗体の投与を介する、NKT細胞アクチベータCD1dの遮断はまた、これらのNKTエフェクター機能を調節することもできる。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】WO03/092615

【特許文献2】WO90/05144

【特許文献3】米国特許第5,225,539号

【特許文献4】米国特許第6,054,297号

【特許文献5】米国特許第7,566,771号

【特許文献6】米国特許第5,585,089号

【特許文献7】米国特許第7,732,578号

【特許文献8】米国特許第5,565,332号

【特許文献9】米国特許第6,300,064号

【特許文献10】米国特許第6,248,516号

【特許文献11】米国特許第7,083,784号

【特許文献12】米国特許第6,180,370号

【特許文献13】米国特許第6,277,375号

【特許文献14】米国特許第6,821,505号

【特許文献15】米国特許第7,217,797号

【特許文献16】WO2010/42072

【特許文献17】米国特許出願第20090142340号

【特許文献18】米国特許出願第20090068175号

【特許文献19】米国特許出願第20090092599号

【特許文献20】米国特許第6,602,684号

【特許文献21】米国特許第7,326,681号

【特許文献22】米国特許第7,388,081号

【特許文献23】WO2008/006554

【特許文献24】米国特許第4,683,195号

【特許文献25】米国特許第4,683,202号

【特許文献26】米国特許第4,800,159号

【特許文献27】米国特許第4,965,188号

【特許文献28】米国特許第4,795,699号

- 【特許文献 2 9】米国特許第4,921,794号
- 【特許文献 3 0】米国特許第5,142,033号
- 【特許文献 3 1】米国特許第5,122,464号
- 【特許文献 3 2】米国特許第5,091,310号
- 【特許文献 3 3】米国特許第5,066,584号
- 【特許文献 3 4】米国特許第4,889,818号
- 【特許文献 3 5】米国特許第4,994,370号
- 【特許文献 3 6】米国特許第4,766,067号
- 【特許文献 3 7】米国特許第4,656,134号
- 【特許文献 3 8】米国特許第5,130,238号 10
- 【特許文献 3 9】米国特許第4,399,216号
- 【特許文献 4 0】米国特許第4,634,665号
- 【特許文献 4 1】米国特許第4,956,288号
- 【特許文献 4 2】米国特許第5,149,636号
- 【特許文献 4 3】米国特許第5,179,017号
- 【特許文献 4 4】米国特許第5,770,359号
- 【特許文献 4 5】米国特許第5,827,739号
- 【特許文献 4 6】米国特許第5,580,734号
- 【特許文献 4 7】米国特許第5,641,670号
- 【特許文献 4 8】米国特許第5,733,746号 20
- 【特許文献 4 9】米国特許第5,733,761号
- 【特許文献 5 0】米国特許第5,168,062号
- 【特許文献 5 1】米国特許第5,385,839号
- 【特許文献 5 2】米国特許第5,266,491号
- 【非特許文献】
- 【0 0 1 6】
- 【非特許文献 1】Brigl, M.、2004 *Annu. Rev. Immunol.*、22:817 ~ 890頁
- 【非特許文献 2】Van Agthoven, A.、およびTerhorst, C.、1982 *J. Immunol.* 128:426 ~ 432頁
- 【非特許文献 3】Terhorst, C.、1981 *Cell* 23:771 ~ 780頁 30
- 【非特許文献 4】Pellicci, D.G.、2009 *Immunity* 31: 47 ~ 59頁
- 【非特許文献 5】Venkataswamy, M. M.およびPorcelli, S.A.、2010 *Semin Immunol* 22: 68 ~ 78頁
- 【非特許文献 6】Fox, L. M.、2009 *Plos Biol* 7: e1000228
- 【非特許文献 7】Brennan, P. J.、2011 *Nat Immunol* 12:1202 ~ 1211頁
- 【非特許文献 8】Reinhardt, C.、1999 *Neurology* 52:1485 ~ 87頁
- 【非特許文献 9】Bonish, B.D.、2000 *J. Immunol.* 165:4076 ~ 85頁
- 【非特許文献 1 0】Saubermann, L.J.、2000 *Gastroenterology* 119:119 ~ 128頁
- 【非特許文献 1 1】Kita, H.、2002 *Gastroenterology* 123:1031 ~ 43頁
- 【非特許文献 1 2】Heller, F.、2002 *Immunity* 17, 629 ~ 638頁 40
- 【非特許文献 1 3】Syn, W.、(2010) *Hepatology*, 51(6):1998 ~ 2007頁
- 【非特許文献 1 4】Santodomingo-Garzon, T.およびSwain, M.G. (2011) *Autoimmunity R eviews* 10:793 ~ 800頁
- 【非特許文献 1 5】Kyriakakis, E.、*Eur J Immunol* 2010 40:3268 ~ 79頁
- 【非特許文献 1 6】Wallace、2009 *Blood* 114:667 ~ 676頁
- 【非特許文献 1 7】Iwamura, C.およびNakayama, T.、2010 *Curr Opin Immunol* 22:807 ~ 13頁
- 【非特許文献 1 8】Murdoch, J. R.およびLloyd, C. M. 2010 *Mutat Res* 690: 24 ~ 39頁
- 【非特許文献 1 9】Holgate, S. T.およびPolosa, R. 2008 *Nat Rev Immunol* 8: 218 ~ 30 頁 50

- 【非特許文献 2 0】Bahadori, K., Doyle-Waters M. M. 5、2009 BMC Pulm Med 9:24頁
- 【非特許文献 2 1】Akbari, O. 5、2003 Nat Med 9: 582 ~ 8頁
- 【非特許文献 2 2】Chuang, Y. H. 5、2011 J Immunol 186: 4687 ~ 92頁
- 【非特許文献 2 3】Lisbonne, M. 5、2003 J Immunol 171: 1637 ~ 41頁
- 【非特許文献 2 4】Pichavant, M. 5、2008 J Exp Med, 205: 385 ~ 93頁
- 【非特許文献 2 5】Matangkasombut, P. 5、2008 J Allergy Clin Immunol 121: 1287 ~ 9頁
- 【非特許文献 2 6】Metelitsa 5、Leukemia (2003) 17、1068 ~ 1077頁
- 【非特許文献 2 7】Kotsianidis 5、2011;Am J Clin Path 136, 400 ~ 408頁
- 【非特許文献 2 8】Ausubel、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience、ISBN 047 150338、1987、Chapters 8および15 10
- 【非特許文献 2 9】Cunningham 5、1989 Science 244 1081 ~ 5頁
- 【非特許文献 3 0】de Vos 5、1992 Science 255 306 ~ 12頁
- 【非特許文献 3 1】Smith 5、1992 J Mol Biol 224 899 ~ 904頁
- 【非特許文献 3 2】Exley 5、1997 J Exp Med 186、109 ~ 120頁
- 【非特許文献 3 3】Ward 5、1989 Nature 341 544 ~ 6頁
- 【非特許文献 3 4】Bird 5、1988 Science 242 423 ~ 6頁
- 【非特許文献 3 5】Huston 5、1988 Proc Natl Acad Sci U S A 85 5879 ~ 83頁
- 【非特許文献 3 6】Holliger, P. 5、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444 ~ 6448頁 20
- 【非特許文献 3 7】Poljak, R. J. 5、1994、Structure 2:1121 ~ 1123頁
- 【非特許文献 3 8】KontermannおよびDubel(編)、Antibody Engineering 2001 Springer-Verlag、New York、790頁、ISBN 3-540-41354-5
- 【非特許文献 3 9】Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、1987および1991
- 【非特許文献 4 0】Enhanced Chothia Numbering Scheme (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)
- 【非特許文献 4 1】ChothiaおよびLesk J. Mol Biol. 196:901 ~ 917頁、1987
- 【非特許文献 4 2】Chothia 5、Nature 342、877 ~ 883頁、1989
- 【非特許文献 4 3】Al-Lazikani 5、J Mol Biol 273、927 ~ 948頁、1997 30
- 【非特許文献 4 4】HonnegherおよびPlukthun J. Mol. Biol.、309: 657 ~ 670頁、2001
- 【非特許文献 4 5】Giudicelli 5、Nucleic Acids Res.、25: 206 ~ 211頁、1997
- 【非特許文献 4 6】Padlan 5、FASEB J.、9: 133 ~ 139頁、1995
- 【非特許文献 4 7】Holliger 5、1993 Proc Natl Acad Sci U S A 90 6444 ~ 8頁
- 【非特許文献 4 8】Thie H 2009 Methods Mol Biol. 525:309 ~ 22頁
- 【非特許文献 4 9】KolkmanおよびStemmer 2001 Nat Biotechnol. May;19(5):423 ~ 8頁
- 【非特許文献 5 0】Lund、Winter 5、(1991) J Immunology 147: 2657 ~ 2662頁
- 【非特許文献 5 1】Alegre 5(1992) J Immunology 148: 3461 ~ 3468頁
- 【非特許文献 5 2】Nursing 2001 Handbook of Drugs、第21版、Springhouse Corp.、Springhouse, Pa.、2001 40
- 【非特許文献 5 3】Health Professional's Drug Guide 2001、Shannon、Wilson、Stang、Prentice-Hall, Inc(編)、Upper Saddle River、N.J.
- 【非特許文献 5 4】Pharmcotherapy Handbook、Wells 5(編)、Appleton & Lange、Stamford、Conn.
- 【非特許文献 5 5】Gennaro(編)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co. (Easton、Pa.) 1990
- 【非特許文献 5 6】「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」、第19版、Williams & Williams(1995)
- 【非特許文献 5 7】「Physician's Desk Reference」、第52版、Medical Economics、Montvale、N.J. (1998) 40

- 【非特許文献 5 8】Borish LCら、1999 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160(6)、1816 ~ 1823頁
- 【非特許文献 5 9】Innisら、PCR Protocols A Guide to Methods and Applications、Academic Press Inc.(編)、San Diego、Calif. (1990)
- 【非特許文献 6 0】www.atcc.org
- 【非特許文献 6 1】Spragueら、1983 J Virol 45 773 ~ 81頁
- 【非特許文献 6 2】Durocher, Y.ら、2002、Nucleic Acids Res、30、E9
- 【非特許文献 6 3】Marksら (Marks, J.D.およびBradbury, A.、2004、Methods Mol Biol、248、161 ~ 76頁)
- 【非特許文献 6 4】Brigl, M.ら、2006 J Immunol 176: 3625 ~ 34頁 10
- 【非特許文献 6 5】Exleyら、2010 Curr Protoc Immunol、Chapter 14、Unit 14:11
- 【非特許文献 6 6】Exley, M.ら、1997、J. Exp. Med. 186:109 ~ 120頁
- 【非特許文献 6 7】Wangら、2007 Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1 ~ 26頁
- 【非特許文献 6 8】Rajpalら、PNAS 2005 102: 8466 ~ 8471頁
- 【非特許文献 6 9】Hart, T.ら (2001) J Allergy Clin Immunol 108:250 ~ 257頁
- 【非特許文献 7 0】Seshasayee, D.ら、2007 J Clin Invest 117、3868 ~ 78頁
- 【非特許文献 7 1】Wirtzら、Nat Protoc 2: 541 ~ 546頁、2007
- 【非特許文献 7 2】Ostanin, D.V.ら (2009) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296:G135 ~ G146頁
- 【非特許文献 7 3】Takahashiら (2012) World Journal of Gastroenterology 18(19): 23 20
00 ~ 2308頁
- 【非特許文献 7 4】Takeda, K.ら (2000) PNAS 97(10):5498 ~ 5503頁
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 7 】

CD1dにより媒介される細胞活性化を阻害し、次いで、重症のコルチコステロイド難治性喘息などの炎症性疾患の処置において利益を示す療法を同定することが非常に必要とされている。完全ヒト抗体は、治療効果を改善するヒト医薬品を開発する目標に取り組むためのいくつかの利点を有する。それらを、非常に強力な中和エピトープに結合するように、またヒトに投与された場合に良好に許容されるように標的化することができる。CD1dに結合し、それと相互作用するマウス抗体が当技術分野において記載されているが、本発明は、CD1dにより媒介されるNKT細胞活性化および得られるエフェクター機能を阻害する際に強力な効力を示すヒト抗体を記載する。驚くべきことに、いくつかの場合、これらの抗体の効力は、現在の技術水準の抗体よりも数桁規模でより強力である。効力が有意に増強されたそのような抗体は、CD1dにより媒介される疾患の処置を可能にし、優れた臨床効果を示すはずである。 30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 8 】

従って、第1の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合する、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。 40

【 0 0 1 9 】

第2の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体が結合したものと同一CD1dのエピトープに結合する、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【 0 0 2 0 】

第3の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、配列番号1、3、5、7、8、9、24、25、26、30、33、36、40、41、42、43 50

、44および45からなる群から選択される配列ならびにそれと少なくとも95%同一である配列を有するVHドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0021】

第4の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、配列番号2、4、6、46、49および62からなる群から選択される配列ならびにそれと少なくとも95%同一である配列を有するVLドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0022】

第5の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、CDR1の配列がDYAMH(配列番号124)またはGYYS(配列番号125)であるVHドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

10

【0023】

第6の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、CDR1の配列がGFTFDDY(配列番号135)またはGGSFSGY(配列番号136)であるVHドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0024】

第7の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、CDR1の配列がRASQHISWLA(配列番号141)またはASSSGAVSSGNFPN(配列番号142)であるVLドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

20

【0025】

第8の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、細胞に基づく効力アッセイを用いて測定された20ng/ml未満のEC50でCD1dに結合する、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。一実施形態においては、単離された抗体またはその抗原結合部分は、0.5ng/ml ~ 20ng/mlのEC50でヒトCD1dに結合する。

【0026】

第9の態様において、本発明は、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分をコードする単離されたDNA分子を提供する。

30

【0027】

第10の態様において、本発明は、ヒト対象におけるNKT細胞エフェクター機能が関与する状態を処置する方法であって、対象に、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分を投与するステップを含む、前記方法を提供する。

【0028】

第11の態様において、本発明は、試料中のCD1dの存在を検出する方法であって、CD1dを含有することが疑われる試料を、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分と、抗体またはその抗原結合部分がCD1dに結合して複合体を形成するのを可能にする条件下で接触させるステップと、試料中の複合体の存在を検出するステップとを含む、前記方法を提供する。

40

【0029】

第12の態様において、本発明は、細胞試料中のCD1d陽性細胞の存在を検出する方法であって、細胞の集団を、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分と接触させて、抗体またはその抗原結合部分がCD1d陽性に結合して複合体を形成するのを可能にするステップと、抗体またはその抗原結合部分-細胞複合体の存在を検出するステップとを含む、前記方法を提供する。

【0030】

第13の態様において、本発明は、複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1dに特異的に

50

結合し、401.11、402.8および401.11.158からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合するCD1d結合タンパク質を選択する方法であって、

複数のCD1d結合タンパク質を、配列番号116のアミノ酸位置87～93および141～143がこれらの位置の対応するマウスアミノ酸で置換されたヒトCD1d突然変異タンパク質と、CD1d結合タンパク質が突然変異タンパク質に結合してCD1d結合タンパク質-ヒトCD1d突然変異タンパク質複合体およびヒトCD1d突然変異タンパク質に結合しない減弱した複数のCD1d結合タンパク質を形成するのを可能にするのに十分な条件下で接触させるステップと、

減弱した複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1d突然変異タンパク質に結合しないCD1d結合タンパク質を回収するステップと

を含み、回収されたCD1d結合タンパク質が、ヒトCD1dに特異的に結合し、401.11、402.8および401.11.158からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合する、前記方法を提供する。

【0031】

第14の態様において、本発明は、複数のCD1d結合タンパク質から、CD1dに特異的に結合するCD1d結合タンパク質を選択する方法であって、

複数のCD1d結合タンパク質を、ヒトCD1d(配列番号116)の位置87～93および141～143に位置するアミノ酸が、これらの位置の対応するマウス配列で置き換えられたhCD1dmu(配列番号119)と、CD1d結合タンパク質がhCD1dmuに結合してCD1d結合タンパク質-hCD1dmu複合体およびhCD1dmuに結合しない減弱した複数のCD1d結合タンパク質を形成するのを可能にするのに十分な条件下で接触させるステップと、

減弱した複数のCD1d結合タンパク質から、hCD1dmuに結合しないCD1d結合タンパク質を回収するステップと

を含み、回収されたCD1d結合タンパク質がヒトCD1d(配列番号116)またはmCD1dmu(配列番号118)に特異的に結合する、前記方法を提供する。

【0032】

上記態様のいずれかの一実施形態においては、単離された抗体またはその抗原結合部分は、カニクイザルおよびアカゲザルCD1dにも結合する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】抗CD1d抗体による四量体結合の障害を示すアッセイの結果を図示する。抗CD1d抗体401.11および402.8は、 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)脂質充填された、NKT細胞受容体で安定にトランスフェクトされたJ.RT3-T3.5細胞に結合するCD1d四量体を用いるアッセイにおいて、シグナルの平均蛍光強度の低下により決定された場合、抗体42および51.1と比較して改善されたCD1d四量体結合の障害を示した。無関係の特異性の陰性対照抗体は、障害を示さなかった。Table 2(表2)は、試験した全ての抗体のEC50値を列挙する。

【図2】抗CD1d抗体によるIL-2放出の障害を示すアッセイの結果を図示する。抗CD1d抗体402.8および401.11は、 α -GalCer充填されたCD1d陽性U-937細胞およびNKT細胞受容体で安定にトランスフェクトされたJ.RT3-T3.5細胞を用いるアッセイにおいて、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、ELISAにより決定された場合、24時間後に改善されたIL-2放出の障害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体は、IL-2放出の障害を示さなかった。代表的な実験に由来するEC50値を、Table 3(表3)に提示する。

【図3】フローサイトメトリーによる一次末梢血単核細胞(PBMC)への抗CD1d抗体の結合を示すアッセイの結果を図示する。無関係の特異性の陰性対照抗体ではなく、本明細書に記載の抗体の一例としての抗CD1d抗体402.8は、フローサイトメトリーにより決定された場合、一次ヒトPBMC中のCD1d陽性、CD11c陽性の集団に結合した。

【図4A】抗原提示細胞としてTHP-1細胞系を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける、抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の障害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、抗CD1d抗体42と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIFN- γ (A)放出の、それぞれ最大114倍および最大180倍の改善された障害を示した。この結果は、CD1d陽性細胞として α -GalCer拡張NKT細胞および α -GalCer充填THP-1細胞を用いるア

10

20

30

40

50

ッセイに由来するものであった。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 4(表4)に提示する。

【図4B】抗原提示細胞としてTHP-1細胞系を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける、抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、抗CD1d抗体42と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIL-4(B)放出の、それぞれ最大114倍および最大180倍の改善された阻害を示した。この結果は、CD1d陽性細胞として -GalCer 拡張NKT細胞および -GalCer 充填THP-1細胞を用いるアッセイに由来するものであった。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 4(表4)に提示する。

10

【図4C】抗原提示細胞としてTHP-1細胞系を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける、抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、抗CD1d抗体42と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIL-5(C)放出の、それぞれ最大114倍および最大180倍の改善された阻害を示した。この結果は、CD1d陽性細胞として -GalCer 拡張NKT細胞および -GalCer 充填THP-1細胞を用いるアッセイに由来するものであった。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 4(表4)に提示する。

20

【図4D】抗原提示細胞としてTHP-1細胞系を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける、抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、抗CD1d抗体42と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIL-13(D)放出の、それぞれ最大114倍および最大180倍の改善された阻害を示した。この結果は、CD1d陽性細胞として -GalCer 拡張NKT細胞および -GalCer 充填THP-1細胞を用いるアッセイに由来するものであった。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 4(表4)に提示する。

30

【図5A】抗原提示細胞として一次CD14+単球を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、Cd1d陽性細胞として -GalCer 拡張NKT細胞および -GalCer 充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIFN- (A) 放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 5(表5)に提示する。

40

【図5B】抗原提示細胞として一次CD14+単球を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、Cd1d陽性細胞として -GalCer 拡張NKT細胞および -GalCer 充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIL-4(B)放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 5(表5)に提示する。

【図5C】抗原提示細胞として一次CD14+単球を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401.11および402.8は、Cd1d陽性細胞として -GalCer 拡張NKT細胞および -GalCer 充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIL-5(C)放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 5(表5)に提示する。

【図5D】抗原提示細胞として一次CD14+単球を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッセイの結果を図示する。抗体401

50

.11および402.8は、Cd1d陽性細胞として α -GalCer 拡張NKT細胞および α -GalCer 充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIL-13(D)放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体はサイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 5(表5)に提示する。

【図6】非常に強力な抗CD1d抗体が、より低い効力の先行技術の抗体により見られるエピトープとは異なる類似する中和エピトープを共有することを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例7のように、結合したビオチン化された402.8のレベル(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)に対応する450nmでの吸光度読み取り値により示されるように、競合ELISAに基づく手法を用いたヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体402.8は、
10

それ自身および401.11と競合したが、抗CD1d抗体42および51.1とは競合しなかった。
【図7】組換えカニクイザルCD1dとの交差反応性を示すアッセイの結果を図示する。実施例8のように、抗CD1d抗体401.11および402.8はヒトCD1dに結合し(A)、ELISAによりカニクイザルCD1dと交差反応性であった(B)。

【図8】カニクイザル細胞に基づくCD1dとの交差反応性を示すアッセイの結果を図示する。実施例9のように、無関係の特異性の陰性対照抗体ではなく、抗CD1d抗体402.8は、フローサイトメトリーにより示されるように、2つの独立したカニクイザルドナーに由来するPBMC上のCD1dに結合した。データは、ゲート化された生細胞のフローサイトメトリーヒストグラムとして、ヒストグラム中で区切られたCD1d陽性細胞のパーセンテージと共に提示される。
20

【図9】カニクイザルCD1dにより媒介される一次NKT拡張の細胞に基づく阻害を示すアッセイの結果を図示する。実施例10のように、無関係の特異性の陰性対照抗体ではなく、抗Cd1d抗体402.8は、フローサイトメトリーによるCD3+V₂₄+細胞の定量により示されるように、 α -GalCer 充填CD1d陽性PBMCの存在下で、カニクイザルNKT細胞の拡張を阻害した。

【図10】401.11の可変領域の配列を示す配列アラインメントである。囲み領域は、Kabattの番号付け系および改良型Chothia番号付け系により定義されたCDR(示される)を含有する。Kabattの番号付け系により定義されたCDRを太字で示す。改良型Chothia番号付け系により定義されたCDRを下線付きで示す。

【図11】402.8の可変領域の配列を示す配列アラインメントである。囲み領域は、Kabattの番号付け系および改良型Chothia番号付け系により定義されたCDR(示される)を含有する。
30 Kabattの番号付け系により定義されたCDRを太字で示す。改良型Chothia番号付け系により定義されたCDRを下線付きで示す。

【図12】401.11の変異体のアラインメントである。実施例11のように、401.11の重鎖および軽鎖対IGHV3-9.01および401.11の変異体のアミノ酸配列アラインメントが提示される。

【図13】401.11の最適化された変異体のアラインメントである。実施例11のように、401.11の重鎖および軽鎖ならびにその変異体のアミノ酸配列アラインメントが提示される。

【図14】抗CD1d抗体401.11の改良された変異体による一次NKT細胞機能の改善された阻害を示すアッセイの結果を図示する。実施例11のように、401.11およびその変異体を、1 μ g/mLから滴定した。401.11抗体変異体は、CD1d陽性細胞として α -GalCer 拡張NKT細胞および α -GalCer 充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、401.11と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIFN- γ (A)およびIL-4(B)放出の類似するか、または改善された阻害、ならびに10 μ g/mLから滴定した抗CD1d抗体42および51.1と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIFN- γ (A)およびIL-4(B)放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体は、サイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 13(表13)に提示する。
40

【図15】402.8の最適化された変異体のアラインメントである。実施例11のように、402.8の重鎖対402.8の変異体のアミノ酸配列アラインメントが提示される。

【図16】抗CD1d抗体402.8の改良された変異体による一次NKT細胞機能の阻害を示すアッ
50

セイの結果を図示する。実施例11のように、402.8およびその変異体を10 µg/mLから滴定したところ、CD1d陽性細胞として -GalCer拡張NKT細胞および -GalCer充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、10 µg/mLから滴定した抗CD1d抗体42と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にINF- (A)およびIL-13(B)放出の類似する阻害、ならびにELISAにより決定した場合、24時間後にIFN- (A)およびIL-13(B)放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体は、サイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 18(表18)に提示する。

【図17】 -GalCerに対する代替抗原を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体による一次NKT細胞機能の改善された阻害を示すアッセイの結果を図示する。実施例12のように、1 µg/mLから滴定した抗体401.11.158、401.11および402.8は、CD1d陽性細胞として -GalCer拡張NKT細胞およびC24:1 -D-グルコピラノシルセラミド充填CD14+単球由来樹状細胞を用いるアッセイにおいて、10 µg/mLから滴定した抗CD1d抗体42および51と比較して、ELISAにより決定した場合、24時間後にIFN- (A)およびIL-4(B)放出の有意に改善された阻害を示した。全てのアッセイにおいて、無関係の特異性の陰性対照抗体は、サイトカイン放出を阻害しなかった。代表的な実験に由来するEC50値をTable 20(表20)に提示する。

【図18】修正された条件下で、非常に強力な抗CD1d抗体が、先行技術の抗体により見られるエピトープとは異なる類似する中和エピトープを共有することを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13のように、450nmでの吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗体402.8は、それ自身および401.11と競合したが、抗体42および51.1とは競合しなかった。

【図19】401.11の変異体である非常に強力な抗CD1d抗体が、402.8と類似する中和エピトープを共有することを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13のように、450nmでの吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体402.8は、それ自身ならびに401.11抗体変異体の例としての401.11.160、401.11.161および401.11.165と強く競合した。

【図20】402.8から誘導された非常に強力な抗CD1d抗体が、402.8と類似する中和エピトープを共有することを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13のように、450nmでの吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体402.8は、それ自身ならびに402.8抗体変異体の例としての402.8.84、402.8.86および402.8.87と強く競合した。

【図21】モノクローナル抗ヒトCD1d抗体が402.8の中和エピトープと競合しないことを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13のように、吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体402.8は、それ自身と強く競合したが、他のモノクローナル抗ヒトCD1d抗体、例えば、AD58E7、C3D5およびC-9とは競合しなかった。

【図22】モノクローナル抗マウスCD1d抗体が402.8の中和エピトープと競合しないことを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13のように、450nmでの吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体402.8は、それ自身と強く競合したが、モノクローナル抗マウスCD1d抗体、例えば、HB-321、HB-322およびHB-323とは競合しなかった。

【図23】ポリクローナル抗ヒトCD1d抗体が402.8の中和エピトープと競合しないことを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13のように、450nmでの吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体402.8は、それ自身と強く競合したが、ポリクローナル抗ヒトCD1d抗体の例としてのC-19、H70およびAb96515とは競合しなかった。

【図24】非常に強力な抗CD1d抗体が、他の抗CD1d抗体が結合したエピトープとは異なる類似する中和エピトープを共有することを示す競合ELISAの結果を図示する。実施例13に記載のように、450nmでの吸光度読み取り値(A)および変換された競合度(パーセンテージ)

10

20

30

40

50

の値(B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について、抗CD1d抗体401.11.158は、それ自身および402.8と強く競合したが、抗CD1d抗体42および51.1とは競合しなかった。

【図25】 FAbまたは完全長IgGの形態の402.8および401.11.165がヒトCD1dに結合したことを示すELISAの結果を図示する。

【図26】 抗CD1d抗体が結合するヒトCD1d上の位置を解明するために用いられたCD1d構築物の配列アラインメントである。

【図27】 ヒトCD1dおよびヒト配列が導入されたマウスCD1d(mCD1dhu)に結合した抗体402.8(A)および401.11.158(B)の滴定を示すELISAの結果を図示する。両抗体とも、マウスCD1dまたはマウス配列が導入されたヒトCD1d(hCD1dmu)には結合しなかった。

【図28】 抗ヒトCD1d抗体のエピトープを示す水素-重水素交換マッピング実験の結果を図示する。(A)黒色で示されたアミノ酸89~94および141~142を含むヒトCD1d(灰色)。注記:X線構造は、表面表示を含む3HUJである。(B)NKT細胞受容体(および 鎖)との複合体にあるヒトCD1d(-GalCer結合した)。ヒトCD1d上の抗CD1d抗体のエピトープ(アミノ酸89~94および141~142)の原子は暗灰色に着色されている。抗CD1d抗体のエピトープは、NKT細胞受容体 鎖の結合部位のすぐ近くに位置する。

【図29A】 最適化された401.11抗体のV_H領域のアラインメントおよびコンセンサス配列である。囲み領域は、Kabat番号付け系および改良型Chothia番号付け系により定義されたCDR(示される)を含有する。Kabat番号付け系により定義されたCDRを太字で示す。改良型Chothia番号付け系により定義されたCDRを下線付きで示す。

【図29B】 最適化された401.11抗体のV_L領域のアラインメントおよびコンセンサス配列である。囲み領域は、Kabat番号付け系および改良型Chothia番号付け系により定義されたCDR(示される)を含有する。Kabat番号付け系により定義されたCDRを太字で示す。改良型Chothia番号付け系により定義されたCDRを下線付きで示す。

【図30A】 最適化された402.8抗体のV_H領域のアラインメントおよびコンセンサス配列である。囲み領域は、Kabat番号付け系および改良型Chothia番号付け系により定義されたCDR(示される)を含有する。Kabat番号付け系により定義されたCDRを太字で示す。改良型Chothia番号付け系により定義されたCDRを下線付きで示す。

【図30B】 最適化された402.8抗体のV_L領域のアラインメントおよびコンセンサス配列である。囲み領域は、Kabat番号付け系および改良型Chothia番号付け系により定義されたCDR(示される)を含有する。Kabat番号付け系により定義されたCDRを太字で示す。改良型Chothia番号付け系により定義されたCDRを下線付きで示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明は、CD1dの特定のエピトープに結合するヒトおよびヒト化抗体ならびにその抗原結合部分に関する。本発明者らは、CD1dのこのエピトープに結合する抗体が、NKT細胞上でのCD1dの効果を減少させるのに特に有効であることを見出した。この効果のため、これらの抗体およびその抗原結合部分は、NKT細胞によるサイトカインの過剰生成などのNKT細胞エフェクター機能が役割を果たす状態、例えば、喘息の処置において有用であると考えられる。

【0035】

従って、第1の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、CD1dへの結合について、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と競合する、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0036】

第2の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体が結合したのと同じCD1dのエピトープに結合する、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0037】

10

20

30

40

50

第3の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、配列番号1、3、5、7、8、9、24、25、26、30、33、36、40、41、42、43、44および45からなる群から選択される配列ならびにそれと少なくとも95%同一である配列を有するVHドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0038】

第4の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、配列番号2、4、6、46、49および62からなる群から選択される配列ならびにそれと少なくとも95%同一である配列を有するVLドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0039】

第5の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、CDR1の配列がDYAMH(配列番号124)またはGYYS(配列番号125)であるVHドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0040】

本発明のこの態様の一実施形態において、CDR3の配列は、DMCSSSGCPDGYFDS(配列番号126)、DLCSSGGCPEGYFDS(配列番号152)、DMCSSGGCPDGYFDS(配列番号153)、DMCSSGGCPEGYFDS(配列番号154)、GEIYDFWNSYMDV(配列番号127)、GEIYDFWKSMDV(配列番号128)、GEIYDFYKSLDV(配列番号155)、GEIYDFYKSYMDV(配列番号156)、GEIYDFWKSULDV(配列番号129)またはGEIYDFYNSYMDV(配列番号130)である。さらなる実施形態において、CDR2の配列は、TIWNSAIIIGYADSVKG(配列番号131)、EINHSGSTNYPNPSLKS(配列番号132)、EINPSGSTNYPNPSLKS(配列番号133)またはEINHAGSTNYPNPSLKS(配列番号134)である。

【0041】

第6の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、CDR1の配列がGFTFDDY(配列番号135)またはGGSFSGY(配列番号136)であるVHドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0042】

本発明の第6の態様の一実施形態において、CDR3の配列は、DMCSSSGCPDGYFDS(配列番号126)、DLCSSGGCPEGYFDS(配列番号152)、DMCSSGGCPDGYFDS(配列番号153)、DMCSSGGCPEGYFDS(配列番号154)、GEIYDFWNSYMDV(配列番号127)、GEIYDFWKSMDV(配列番号128)、GEIYDFYKSLDV(配列番号155)、GEIYDFYKSYMDV(配列番号156)、GEIYDFWKSULDV(配列番号129)またはGEIYDFYNSYMDV(配列番号130)である。さらなる実施形態において、CDR2の配列は、IWNSAIIIGYADSVKG(配列番号131)、NHSGS(配列番号138)、NPSGS(配列番号139)またはNHAGS(配列番号140)である。

【0043】

第7の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、ヒトFR1、FR2、FR3およびFR4フレームワーク配列ならびにCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、CDR1の配列がRASQHISSWLA(配列番号141)またはASSSGAVSSGNFPN(配列番号142)であるVLドメインを含む、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0044】

本発明の第7の態様の一実施形態において、CDR3の配列は、QQANRFPLT(配列番号141)またはLLYFGDTQLGV(配列番号142)である。さらなる実施形態において、CDR2の配列は、AASSLQS(配列番号145)またはSASNKHS(配列番号146)である。

【0045】

第8の態様において、本発明は、ヒトCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、細胞に基づく効力アッセイを用いて測定された20ng/ml未満のEC50でCD1dに結合する、前記単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。本発明の一実施形態においては、単離された抗体またはその抗原結合部分は、細胞に基づく効力アッセイ

10

20

30

40

50

を用いて測定された0.5ng/ml ~ 20ng/mlのEC50でヒトCD1dに結合する。

【0046】

本発明の一実施形態においては、配列番号1および配列番号2のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0047】

本発明の一実施形態においては、配列番号23および配列番号46のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0048】

本発明の一実施形態においては、配列番号24および配列番号47のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

10

【0049】

本発明の一実施形態においては、配列番号5および配列番号6のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0050】

本発明の一実施形態においては、配列番号25および配列番号48のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0051】

本発明の一実施形態においては、配列番号26および配列番号49のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0052】

本発明の一実施形態においては、配列番号27および配列番号50のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

20

【0053】

本発明の一実施形態においては、配列番号28および配列番号51のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0054】

本発明の一実施形態においては、配列番号29および配列番号52のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0055】

本発明の一実施形態においては、配列番号30および配列番号53のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

30

【0056】

本発明の一実施形態においては、配列番号31および配列番号54のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0057】

本発明の一実施形態においては、配列番号32および配列番号55のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0058】

本発明の一実施形態においては、配列番号33および配列番号56のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

40

【0059】

本発明の一実施形態においては、配列番号34および配列番号57のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0060】

本発明の一実施形態においては、配列番号35および配列番号58のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0061】

本発明の一実施形態においては、配列番号36および配列番号59のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0062】

50

本発明の一実施形態においては、配列番号37および配列番号60のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0063】

本発明の一実施形態においては、配列番号38および配列番号61のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0064】

本発明の一実施形態においては、配列番号40および配列番号62のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0065】

本発明の一実施形態においては、配列番号41および配列番号63のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

10

【0066】

本発明の一実施形態においては、配列番号42および配列番号64のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0067】

本発明の一実施形態においては、配列番号3および配列番号4のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0068】

本発明の一実施形態においては、配列番号7および配列番号4のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

20

【0069】

本発明の一実施形態においては、配列番号8および配列番号4のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0070】

本発明の一実施形態においては、配列番号9および配列番号4のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0071】

本発明の一実施形態においては、配列番号43および配列番号65のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0072】

本発明の一実施形態においては、配列番号44および配列番号66のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

30

【0073】

本発明の一実施形態においては、配列番号45および配列番号67のVHおよびVL配列対を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0074】

上記態様のいずれかの一実施形態においては、抗体またはその抗原結合部分は、ヒトCD1d(配列番号116)には結合するが、hCD1dmu(配列番号119)には結合しない。上記態様のいずれかの一実施形態においては、抗体またはその抗原結合部分は、mCD1dhu(配列番号118)には結合するが、mCD1d(配列番号117)には結合しない。

40

【0075】

第9の態様において、本発明は、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分をコードする単離されたDNA分子を提供する。一実施形態において、単離されたDNA分子は、配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、18、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115のいずれか1つ、またはそれと少なくとも95%同一である配列もしくは中程度から高度のストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズする配列から選択される。一実施形態においては、単離されたDNA分子は、配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、18、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、8

50

7、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114または115のいずれか1つから選択される。

【0076】

第10の態様において、本発明は、ヒト対象におけるNKT細胞エフェクター機能が関与する状態を処置する方法であって、対象に、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分を投与するステップを含む、前記方法を提供する。

【0077】

第11の態様において、本発明は、試料中のCD1dの存在を検出する方法であって、CD1dを含有することが疑われる試料を、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分と、抗体またはその抗原結合部分がCD1dに結合して複合体を形成するのを可能にする条件下で接触させるステップと、試料中の複合体の存在を検出するステップとを含む、前記方法を提供する。

10

【0078】

第12の態様において、本発明は、細胞試料中のCD1d陽性細胞の存在を検出する方法であって、細胞の集団を、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分と接触させて、抗体またはその抗原結合部分がCD1d陽性に結合して複合体を形成するのを可能にするステップと、抗体またはその抗原結合部分-細胞複合体の存在を検出するステップとを含む、前記方法を提供する。

【0079】

第13の態様において、本発明は、複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1dに特異的に結合し、401.11、402.8および401.11.158からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合するCD1d結合タンパク質を選択する方法であって、

20

複数のCD1d結合タンパク質を、配列番号116のアミノ酸位置87~93および141~143がこれらの位置の対応するマウスアミノ酸で置換されたヒトCD1d突然変異タンパク質と、CD1d結合タンパク質が突然変異タンパク質に結合してCD1d結合タンパク質-ヒトCD1d突然変異タンパク質複合体およびヒトCD1d突然変異タンパク質に結合しない減弱した複数のCD1d結合タンパク質を形成するのを可能にするのに十分な条件下で接触させるステップと、減弱した複数のCD1d結合タンパク質から、ヒトCD1d突然変異タンパク質に結合しないCD1d結合タンパク質を回収するステップと

30

を含み、回収されたCD1d結合タンパク質が、ヒトCD1dに特異的に結合し、401.11、402.8および401.11.158からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と、CD1dへの結合について競合する、前記方法を提供する。

【0080】

第14の態様において、本発明は、複数のCD1d結合タンパク質から、CD1dに特異的に結合するCD1d結合タンパク質を選択する方法であって、

複数のCD1d結合タンパク質を、ヒトCD1d(配列番号116)の位置87~93および141~143に位置するアミノ酸が、この位置の対応するマウス配列で置き換えられたhCD1dmu(配列番号119)と、CD1d結合タンパク質がhCD1dmuに結合してCD1d結合タンパク質-hCD1dmu複合体およびhCD1dmuに結合しない減弱した複数のCD1d結合タンパク質を形成するのを可能にするのに十分な条件下で接触させるステップと、減弱した複数のCD1d結合タンパク質から、hCD1dmuに結合しないCD1d結合タンパク質を回収するステップと

40

を含み、回収されたCD1d結合タンパク質がヒトCD1d(配列番号116)またはmCD1dmu(配列番号118)に特異的に結合する、前記方法を提供する。

【0081】

本発明の抗CD1d抗体を用いて、血液からCD1d陽性細胞集団を同定または選択することもできる。抗CD1d抗体を用いて、単球などの骨髄細胞、またはB細胞などのリンパ系細胞を含む、ヒト患者の末梢血中のCD1d陽性細胞の集団を検出することができる。抗体を用いて、そのようなCD1d陽性細胞が疾患、例えば、慢性リンパ球性白血病(CLL)を含む特定の白血病に寄与する状態のこれらの細胞を検出することができる(Metelitsaら、Leukemia (20

50

03) 17、1068～1077頁;Kotsianidisら、2011;Am J Clin Path 136、400～408頁)。

【0082】

抗ヒトCD1d抗体を用いて、当技術分野で周知の方法を用いる免疫組織化学分析のために組織切片を染色することもできる。

【0083】

本発明の特定の実施形態において、単離された抗体またはその抗原結合部分は、ヒトカッパ鎖定常領域またはヒトラムダ鎖定常領域を含んでもよい。特定の実施形態においては、単離された抗体またはその抗原結合部分は、IgG1またはIgG4定常領域を含む。抗体がIgG4定常領域を含む場合、これはS228P突然変異を含んでもよい。

【0084】

本発明はまた、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分をコードするDNA分子も提供する。特定の実施形態においては、DNA分子の配列は、配列番号10～18、配列番号68～115からなる群のいずれか1つまたはそれと少なくとも95%同一である配列もしくは中程度から高度のストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズする配列から選択される。

【0085】

本発明はまた、ヒト対象におけるNKT細胞エフェクター機能が関与する状態を処置する方法であって、対象に、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部分を投与するステップを含む、前記方法も提供する。処置することができる、NKT細胞による過剰のサイトカイン生成などのNKT細胞エフェクター機能が関与する状態の例としては、乾癬、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アテローム性動脈硬化症、虚血再かん流傷害、喘息および鎌状赤血球病に伴う肺の炎症または機能障害が挙げられる。

【0086】

以下の実施例に記載のように、本発明者らは、CD1dの特定のエピトープに結合する強力な抗体を開発した。このエピトープの性質の決定は、抗体と抗原の両方を持っている当業者にとっては日常的である。抗体401.11および402.8が結合するCD1dエピトープを決定するために用いることができる当業者には周知の方法としては、CD1dアラニン走査(alanine scanning)突然変異誘発、水素/重水素交換マッピング、X線結晶学、核磁気共鳴および光親和性標識化が挙げられる。

【0087】

アラニン走査突然変異誘発(例えば、Ausubel、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience、ISBN 047 150338、1987、Chapters 8および15;またはCunninghamら、1989 Science 244 1081～5頁を参照されたい)は、CD1d分子中の全ての残基に単一のアラニン突然変異を導入するものである。次いで、得られた突然変異分子を、401.11および/または402.8抗体に結合するその能力について試験する。結合の喪失は、アラニンに変化した特定の残基がエピトープ中に含まれ得ることを意味する。

【0088】

水素重水素交換を用いるエピトープマッピングにおいて、CD1d中の水素は溶液中の重水素で交換される。次いで、401.11および/または402.8抗体は、CD1dに結合し、次いで交換されてH₂O中に戻る。このプロセスにおいて、エピトープ中に存在する重水素は、抗体の結合により保護される。抗体結合により保護されたCD1dと未保護のものとの交換パターンの比較は、エピトープが重水素を保持するCD1dのアミノ酸残基であることを示す。

【0089】

X線結晶学において、401.11および/または402.8抗体が結合するCD1dを結晶化し、その結晶をX線回折により検査する。この方法は、抗体が結合するCD1dの領域に関する明確な情報を提供する。核磁気共鳴または光親和性標識化を、de Vosら、1992 Science 255 306～12頁;およびSmithら、1992 J Mol Biol 224 899～904頁に記載のように用いることもできる。

【0090】

当業者であれば理解できるように、本発明の抗体またはその抗原結合部分により認識されるエピトープは、直線状のアミノ酸を含んでもよく、または立体的エピトープであってもよい。

【0091】

一態様において、本発明は、ヒトCD1dへの結合について、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と競合する抗体を対象とする。

【0092】

本明細書で用いられる「競合する」とは、抗体またはその抗原結合部分が、濃度依存的様式で、401.11、401.11.28、402.8、402.8.45、402.8.53および402.8.60からなる群から選択される少なくとも1つの抗体の、CD1dへの結合を減少させることを意味する。これを評価することができる方法の一例は、以下に記載の実施例7に提供される。特に、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体の、同じ濃度で用いられた抗体42または51.1よりも、試験抗体との結合における減少が大きい場合、抗体またはその抗原結合部分は、CD1dへの結合について、401.11および402.8からなる群から選択される少なくとも1つの抗体と「競合する」と言われる(先行技術の抗体42および51.1は、Exleyら、1997 J Exp Med 186、109~120頁およびW003/092615に記載されている)。

10

【0093】

本明細書で用いられる場合、「CD1dへの結合について競合する」抗体またはその抗原結合部分は、競合ELISAにおける正規化された結果において少なくとも50%の競合を示し、40 μg/mLの非ビオチン化試験抗体が、固相基質上に固定された1.0 μg/mLの組換えヒトCD1dに結合した0.2 μg/mLのビオチン化抗CD1d抗体402.8または401.11または401.11.158と競合する。

20

【0094】

特定の実施形態においては、本発明は、細胞に基づく効力アッセイを用いて測定された20ng/ml未満のEC50でCD1dに結合する単離された抗体またはその抗原結合部分を提供する。特定の実施形態においては、単離された抗体またはその抗原結合部分は、0.5ng/ml~20 ng/mlのEC50でCD1dに結合する。本明細書で用いられる場合、抗体またはその抗原結合部分のEC50は、以下に記載される実施例4のように評価されるべきである。

【0095】

上記のように、抗体またはその抗原結合部分は、CD1dに特異的に結合する。本明細書で用いられる用語「特異的に」とは、CD1dへの結合が、抗体またはその抗原結合部分のVHおよびVLドメインを介するものであり、Fc領域を介して生じ得るような非特異的結合ではないことを意味する。

30

【0096】

以下の実施例に記載のように、本発明の抗体またはその抗原結合部分は、ヒトおよびカニクイザルまたはアカゲザルの両方のCD1dに結合する。これは、先行技術の抗体42および51.1とは対照的である。

【0097】

ヒトCD1dのアミノ酸配列は、例えば、

MGCLLFLLLWALLQAWGSAEVPQRLFPRLRCLQISSFANSSWTRTDGLAWLGELQTHSWSNDSDTVRSCLKPWSQGTFSQDQQ
WETLQHI FRVYRSSFTRDVKEFAKMLRLSYPLELQVSAGCEVHPGNASNFFHVAFAQGKDI LSFQGTSWEPTQEAPLWVN
LAIQVLNQDKWTRRETQWLLNGTCPQFVSGLLLESGKSELKKQVKPAWLSRGPSPGPRLLLLVCHVSGFYKPKVWVKWMR
GEQEQQGTQPGDILPNADETWYLRATLDVVAGEAAGLSCRVKHSSLEGQDIVLYWGGSYTSMGLIALAVLACLFLLLIVG
FTSRFKRQTSYQGV(L配列番号157)

40

であってもよい。ヒトCD1dのUniProt受託番号は、P15813である。

【0098】

別の態様において、本発明は、401.11および402.8(およびいくつかの実施形態においては、40.11.158)からなる群から選択される少なくとも1つの抗体が結合したものと同一CD1dのエピトープに結合する抗体を対象とする。上記のように、特定の抗体が結合したCD1dのエピトープを、いくつかの方法により評価することができ、次いで、これを特定の抗体

50

が結合したエピトープと比較することができる。

【0099】

一実施形態においては、エピトープは、配列番号116の残基141～143または配列番号116の残基87～93および141～143を含む。

【0100】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、2つの重鎖(H)および2つの軽鎖(L)の4つのポリペプチド鎖から構成される任意の免疫グロブリン(Ig)分子、またはIg分子の必須のエピトープ結合特性を保持する、その任意の機能的断片、突然変異体、変異体、もしくは誘導体を広く指す。そのような突然変異体、変異体、または誘導体抗体形式は、当技術分野で公知である。その非限定的実施形態は以下で考察される。

10

【0101】

完全長抗体において、それぞれの重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではHCVRまたはVHと省略される)および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3から構成される。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではLCVRまたはVLと省略される)および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLから構成される。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域が散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる、超可変領域にさらに細分することができる。それぞれのVHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で整列された、3つのCDRおよび4つのFRから構成される。免疫グロブリン分子は、任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラスのものであってもよい。

20

【0102】

本明細書で用いられる、抗体の「抗原結合部分」という用語は、抗原(例えば、CD1d)に特異的に結合する能力を保持する、抗体またはタンパク質の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能を、完全長抗体の断片により実施させることができることが示されている。そのような抗体の実施形態は、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する、二特異的、二重特異的、または多特異的形式であってもよい。抗体の用語「抗原結合部分」に包含される結合断片の例としては、(i)VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片であるFab断片;(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片;(iii)VHおよびCH1ドメインからなるFd断片;(iv)抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v)単一の可変ドメインを含むドメイン抗体(dAb)(全て参照により本明細書に組み込まれるWardら、1989 Nature 341 544～6頁、Winterら、PCT公開WO90/05144)ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子によりコードされるが、それらを、VLおよびVH領域が対形成して、一価分子を形成する単一のタンパク質鎖(一本鎖Fv(scFv)として知られる)にすることができる合成リンカーにより、組換え方法を用いて、それらを連結することができる(例えば、Birdら、1988 Science 242 423～6頁;Hustonら、1988 Proc Natl Acad Sci U S A 85 5879～83頁を参照されたい)。そのような一本鎖抗体もまた、抗体の用語「抗原結合部分」内に包含されることが意図される。ダイアボディなどの他の形態の一本鎖抗体も包含される。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現される二価の二特異的抗体であるが、同じ鎖上での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を用いることによって、そのドメインを、別の鎖の相補的ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を作出する(例えば、Holliger, P.ら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444～6448頁;Poljak, R. J.ら、1994、Structure 2:1121～1123頁を参照されたい)。そのような抗体結合部分は当技術分野で公知である(KontermannおよびDubel(編)、Antibody Engineering 2001 Springer-Verlag, New York、790頁、ISBN 3-540-41354-5)。

30

40

【0103】

本明細書に記載の抗体は、ヒト化抗体であってもよい。用語「ヒト化抗体」は、ヒト抗

50

体に由来するFR上に移植された、またはその中に挿入された非ヒト種(例えば、マウスまたはラットまたは非ヒト霊長類)に由来する抗体に由来するCDRを含む、ヒト様可変領域を含むタンパク質を指すと理解されるべきである(この型の抗体は「CDR移植抗体」とも呼ばれる)。ヒト化抗体はまた、ヒトタンパク質の1つもしくは複数の残基が1つもしくは複数のアミノ酸置換により改変された、および/またはヒトタンパク質の1つもしくは複数のFR残基が対応する非ヒト残基により置き換えられたタンパク質も含む。ヒト化抗体はまた、ヒト抗体中にも非ヒト抗体中にも見出されない残基を含んでもよい。このタンパク質の任意のさらなる領域(例えば、Fc領域)は一般的にはヒトである。ヒト化は、当技術分野で公知の方法、例えば、米国特許第5,225,539号、米国特許第6,054,297号、米国特許第7,566,771号または米国特許第5,585,089号を用いて実施することができる。用語「ヒト化抗体」はまた、例えば、米国特許第7,732,578号に記載された超ヒト化タンパク質も包含する。

10

【0104】

本明細書に記載の抗体は、ヒトであってもよい。本明細書で用いられる用語「ヒト抗体」とは、ヒトにおいて、例えば、ヒト生殖系列もしくは体細胞において見出される可変および場合により、定常抗体領域を有するか、またはそのような領域を用いて生成されたライブラリーに由来するタンパク質を指す。「ヒト」抗体は、ヒト配列によってはコードされないアミノ酸残基、例えば、*in vitro*で無作為または部位特異的突然変異により導入された突然変異(特に、保存的置換を含む突然変異またはタンパク質の少数の残基、例えば、タンパク質の1、2、3、4もしくは5つの残基における突然変異)を含んでもよい。これらの「ヒト抗体」は、ヒトの免疫応答の結果として生成される必要は必ずしもなく、むしろ、それらを、組換え手段(例えば、ファージ展示ライブラリーのスクリーニング)を用いて、ならびに/またはヒト抗体定常領域および/もしくは可変領域をコードする核酸を含むトランスジェニック動物(例えば、マウス)により、ならびに/またはガイドドセレクション(guided selection)(例えば、米国特許第5,565,332号に記載されている)を用いて作製することができる。この用語はまた、親和性成熟形態のそのような抗体も包含する。本開示の目的のために、ヒトタンパク質はまた、ヒト抗体に由来するFRまたはヒトFRのコンセンサス配列に由来する配列を含むFRを含み、1つまたは複数のCDRが、例えば、米国特許第6,300,064号および/または米国特許第6,248,516号に記載のように無作為または半無作為であるタンパク質を含むと考えられる。

20

【0105】

CDRおよびFRに割り当てられたアミノ酸位置は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、1987および1991に従って定義されたものであってもよい(本明細書では「Kabat番号付け系」とも呼ばれる)。他の実施形態においては、CDRおよびFRに割り当てられたアミノ酸位置は、Enhanced Chothia Numbering Scheme (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)に従って定義される。Kabatの番号付け系によれば、VHのFRおよびCDRは以下の通り位置してもよい:残基1~30(FR1)、31~35(CDR1)、36~49(FR2)、50~65(CDR2)、66~94(FR3)、95~102(CDR3)および103~113(FR4)。Kabatの番号付け系によれば、VLのFRおよびCDRは以下の通り位置してもよい:残基1~23(FR1)、24~34(CDR1)、35~49(FR2)、50~56(CDR2)、57~88(FR3)、89~97(CDR3)および98~107(FR4)。本開示は、Kabatの番号付け系により定義されたFRおよびCDRに限定されるだけでなく、標準的な番号付け系またはChothiaおよびLesk J. Mol Biol. 196:901~917頁、1987;Chothiaら、Nature 342、877~883頁、1989;および/もしくはAl-Azikaniら、J Mol Biol 273、927~948頁、1997の番号付け系;HonnegherおよびPlukthun J. Mol. Biol.、309: 657~670頁、2001の番号付け系;またはGiudicelliら、Nucleic Acids Res.、25: 206~211頁、1997で考察されたIMGT系などのあらゆる番号付け系を含む。一例においては、CDRはKabatの番号付け系に従って定義される。場合により、Kabatの番号付け系による重鎖CDR2は、本明細書に列挙される5つのC末端アミノ酸を含まないか、またはこれらのアミノ酸のいずれか1つもしくは複数、別の天然アミノ酸と置換する。さらなる、または別の選択肢において、軽鎖CDR1は、本明細書に列挙される4つのN末端アミノ酸を含まないか、またはこれらのアミノ酸のいずれか1つもしくは複数、別の天然ア

30

40

50

ミノ酸と置換する。これに関して、Padlanら、FASEB J., 9: 133~139頁、1995は、重鎖CDR2の5つのC末端アミノ酸および/または軽鎖CDR1の4つのN末端アミノ酸が抗原結合に一般的に関与しないことを確立した。

【0106】

本明細書で用いられる用語「抗体構築物」とは、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常ドメインに連結された本発明の1つまたは複数の抗原結合部分を含むポリペプチドを指す。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合により連結された2つ以上のアミノ酸残基を含み、1つまたは複数の抗原結合部分を連結するために用いられる。そのようなリンカーポリペプチドは当技術分野で周知である(例えば、Holligerら、1993 Proc Natl Acad Sci U S A 90 6444~8頁を参照されたい)。

10

【0107】

免疫グロブリン定常ドメインとは、重鎖または軽鎖定常ドメインを指す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は当技術分野で公知であり、その例は以下に表される。

【0108】

ヒト重鎖IgG1定常ドメイン(またはNCBI受託番号P01857のようなその誘導体)
ASTKNPDVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSLSPGK(配列番号158)

20

【0109】

ヒト重鎖IgG4定常ドメイン(NCBI受託番号P01861など)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTGKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGGK(配列番号159)

【0110】

S228P突然変異を組み込むヒト重鎖IgG4定常ドメイン
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTGKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGGK(配列番号160)

30

【0111】

米国特許第7,083,784号に記載のような、S228P突然変異およびYTE突然変異を組み込むヒト重鎖IgG4定常ドメインを用いることもできる。

【0112】

ヒト軽鎖カッパ定常ドメイン(NCBI受託番号P01834など)
TVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFVPEAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号161)

40

【0113】

ヒト軽鎖ラムダ定常ドメイン(NCBI受託番号P01842など)
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSTLPEQWKS
HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(配列番号162)

【0114】

理解されるように、本発明において開発および記載された配列を、当技術分野で周知の方法を用いて改変して、例えば、親和性成熟により結合を増加させるか、または予測されたMHCクラスII結合モチーフを除去することにより免疫原性を低下させることができる。

50

本明細書で開発および記載された配列の治療的有用性を、その機能的特性、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)、血清半減期、生体内分布およびFc受容体への結合またはこれらのいずれかの組合せを調節することによりさらに増強することができる。この調節を、タンパク質工学、糖鎖工学または化学的方法により達成することができる。必要とされる治療適用に応じて、これらの活性のいずれかを増加または低下させることが有利であり得る。

【0115】

抗体の親和性成熟のためのいくつかの方法が当技術分野で公知である。これらの多くは、突然変異誘発、次いで、改善された親和性に関する選択および/またはスクリーニングにより変異体タンパク質のパネルまたはライブラリーを作製する一般的戦略に基づく。突然変異誘発は、例えば、変異性PCR(Thie H 2009 Methods Mol Biol. 525:309~22頁)により、遺伝子シャッフリング(KolkmanおよびStemmer 2001 Nat Biotechnol. May;19(5):423~8頁)により、変異原性化学物質もしくは照射の使用により、変異性複製機構を有する「突然変異誘発因子」株の使用(Greener 1996)により、または天然の親和性成熟機構を利用する体細胞超変異手法(Peled、Kuangら、2008)により、DNAレベルで実施されることが多い。突然変異誘発を、例えば、Qレプリカーゼの使用(Kopsidas、Robertsら、2006)により、RNAレベルで実施することもできる。改善された変異体タンパク質のスクリーニングを可能にするライブラリーに基づく方法は、ファージ、酵母、リボソーム、細菌または哺乳動物細胞などの様々な展示技術に基づくものであってよく、当技術分野で周知である(Benhar 2007)。親和性成熟を、より指向的/予測的方法により、例えば、部位特異的突然変異誘発または3Dタンパク質モデリングからの知見により指導される遺伝子合成により達成することができる(例えば、Queen、Schneiderら、1989または米国特許第6,180,370号または米国特許第5,225,539号を参照されたい)。

10

20

30

40

【0116】

抗体の血清半減期および生体内分布を調節するためのいくつかの方法は、抗体と、異化からIgGを保護する際に重要な役割を有する受容体である新生児Fc受容体(FcRn)との相互作用の改変、および高い血清抗体濃度の維持に基づく。Daill'Acquaらは、FcRnへの結合親和性を増強することによって、血清半減期を増加させるIgG1のFc領域中の置換を記載し(Daill'Acqua、Woodsら、2002)、M252Y/S254T/T256E(YTE突然変異)の三重置換を用いるバイオアベイラビリティの増強およびADCC活性の調節をさらに示している(Daill'Acqua、Kienerら、2006)。また、米国特許第6,277,375号;第6,821,505号;および第7,083,784号も参照されたい。Hintonらは、*in vivo*での半減期の増加を付与する位置250および428での定常ドメインアミノ酸置換を記載した(Hinton、Johlfisら、2004)(Hinton、Xiongら、2006)。また、米国特許第7,217,797号も参照されたい。Petkovaらは、*in vivo*での半減期の増加を付与する位置307、380および434での定常ドメインアミノ酸置換を記載した(Petkova、Akilleshら、2006)。また、Shieldsら(Shields、Namenukら、2001)およびWO2010/42072も参照されたい。抗体定常領域を、エフェクター機能を除去するように改変することもできる。位置297のアスパラギン(N)のグルタミン(Q)への突然変異は、FcのFc受容体への結合を媒介するN結合炭水化物を除去する。そのようなアグリコシル化された抗体は、ヒトFcガンマリに結合せず、補体経路を活性化しない(TaoおよびMorrison、1989)。Fc受容体への結合ならびにFcRn結合および血清半減期を含む、これらの受容体により媒介されるその後の機能を調節する定常ドメインアミノ酸置換の他の例は、米国特許出願第20090142340号;第20090068175号;および第20090092599号に記載されている。

【0117】

Fc領域を含む本発明の分子において、いくつかの実施形態においては、Lund、Winterら、(1991) J Immunology 147: 2657~2662頁およびAlegreら(1992) J Immunology 148: 3461~3468頁に記載のように、置換L235E中でFc結合およびFc関連エフェクター機能を減少させるか、または無効化するように遺伝子操作することが有利であり得る。抗体は、IgG1、およびIgG3またはIgG4であってもよい。

【0118】

50

Fc領域を含む本発明の分子において、いくつかの実施形態においては、C末端リシン(K447)が欠失したFcを遺伝子操作するか、またはさもなければ選択することが有利であり得る。好ましくは、この改変は、発現される分子の異種性を減少させることにより製造可能性を改善する。

【0119】

抗体分子に連結されたグリカンは、抗体と、Fc受容体およびグリカン受容体との相互作用に影響し、それによって、血清半減期などの抗体活性に影響することが公知である(Kaneko、Nimmerjahnら、2006; Jones、Papacら、2007; およびKanda、Yamadaら、2007)。従って、所望の抗体活性を調節する特定の糖型は、治療的利点を付与することができる。遺伝子操作された糖型を作製するための方法は当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、米国特許第6,602,684号;第7,326,681号;第7,388,081号;およびWO2008/006554に記載のものが挙げられる。

【0120】

ポリエチレングリコール(PEG)の添加による半減期の延長は、例えば、Fishburn、2008により概説されたように、タンパク質の血清半減期を延長するために広く用いられている。

【0121】

本発明はまた、本発明の少なくとも1つの単離された抗体またはその抗原結合部分を含む組成物を提供する。この組成物は、典型的には、滅菌水、滅菌緩衝水、および/または水性希釈剤中のフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン、ベンズアルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、もしくはその混合物からなる群から選択される少なくとも1つの保存剤から選択される少なくとも1つの製剤化剤を含み、場合により、タンパク質の濃度は約0.1mg/ml ~ 約200mg/mlであり、少なくとも1つの等張剤または少なくとも1つの生理的に許容されるバッファーをさらに含む。

【0122】

本発明の抗体組成物は、場合により、少なくとも1つの感染防止剤、心血管(CV)系剤、中枢神経系(CNS)剤、自律神経系(ANS)剤、気道剤、胃腸(GI)管剤、ホルモン剤、液体もしくは電解質バランスのための薬剤、血液製剤、抗新生物剤、免疫調節剤、点眼剤、点耳剤もしくは点鼻剤、局所剤、栄養剤などのうちの少なくとも1つから選択される有効量の少なくとも1つの化合物またはタンパク質をさらに含んでもよい。本明細書に提示されるそれぞれに関する製剤、適応症、用量および投与などの、そのような薬剤は当技術分野で周知である(例えば、Nursing 2001 Handbook of Drugs、第21版、Springhouse Corp.、Springhouse, Pa.、2001; Health Professional's Drug Guide 2001、Shannon、Wilson、Stang、Prentice-Hall, Inc(編)、Upper Saddle River, N.J.; Pharmacotherapy Handbook、Wellsら(編)、Appleton & Lange、Stamford、Conn.(それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい)。

【0123】

本発明の組成物は、限定されるものではないが、希釈剤、結合剤、安定剤、バッファー、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバントなどの少なくとも1つの任意の好適な補助剤をさらに含んでもよい。薬学的に許容される補助剤が好ましい。そのような滅菌溶液を調製するための方法の非限定例は当技術分野で周知であり、例えば、限定されるものではないが、Gennaro(編)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co. (Easton、Pa.) 1990が挙げられる。当技術分野で周知であるか、または本明細書に記載される投与の様式、抗体組成物の溶解性および/または安定性にとって好適である薬学的に許容される担体を、常法に従って選択することができる。

【0124】

本発明の組成物において有用な医薬賦形剤および添加物としては、限定されるものではないが、単独で、または組合せ中に1~99.99重量%もしくは体積%を含む、単独で、または組合せ中に存在してもよい、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、および炭水化物(

10

20

30

40

50

例えば、糖、例えば、単糖、ジ、トリ、テトラおよびオリゴ糖；誘導体化された糖、例えば、アルジトール、アルドン酸、エステル化された糖など；ならびに多糖または糖ポリマー）が挙げられる。タンパク質賦形剤の例としては、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、組換えヒトアルブミン(rHA)、ゼラチン、カゼインなどが挙げられる。緩衝能力においても機能することができる代表的なアミノ酸としては、アラニン、グリシン、アルギニン、ペタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどが挙げられる。1つの好ましいアミノ酸は、ヒスチジンである。第2の好ましいアミノ酸は、アルギニンである。

【0125】

本発明における使用にとって好適な炭水化物賦形剤としては、例えば、単糖、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなど；二糖、例えば、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど；多糖、例えば、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストリン、デンプンなど；およびアルジトール、例えば、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール(グルシトール)、ミオイノシトールなどが挙げられる。本発明における使用のための好ましい炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロース、およびラフィノースである。

【0126】

抗体組成物は、バッファーまたはpH調整剤を含んでもよい；典型的には、バッファーは、有機酸または塩基から調製される塩である。代表的なバッファーとしては、有機酸の塩、例えば、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、カルボン酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、またはフタル酸の塩；Tris、トロメタミンヒドロクロリド、またはリン酸バッファーが挙げられる。本発明の組成物における使用のための好ましいバッファーは、有機酸の塩、例えば、クエン酸塩である。

【0127】

さらに、本発明の組成物は、ポリマー賦形剤/添加物、例えば、ポリビニルピロリドン、フィコール(ポリマー糖)、テキストレイト(例えば、シクロデキストリン、例えば、2-ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン)、ポリエチレングリコール、香料、抗微生物剤、甘味料、酸化防止剤、静電気防止剤、界面活性剤(例えば、ポリソルベート、例えば、「TWEEN(登録商標)」および「TWEEN(登録商標)80」)、脂質(例えば、リン脂質、脂肪酸)、ステロイド(例えば、コレステロール)、およびキレート化剤(例えば、EDTA)が挙げられる。

【0128】

本発明による抗体組成物における使用にとって好適なこれらの、およびさらなる公知の医薬賦形剤および/または添加物は、当技術分野で公知であり、例えば、「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」、第19版、Williams & Williams、(1995)、および「Physician's Desk Reference」、第52版、Medical Economics、Montvale、N.J. (1998)に列挙されており、その開示は全体が参照により本明細書に組み込まれる。好ましい担体または賦形剤材料は、炭水化物(例えば、糖およびアルジトール)ならびにバッファー(例えば、クエン酸塩)またはポリマー剤である。

【0129】

本発明はまた、NKT細胞エフェクター機能が関与する状態を処置する方法であって、抗体またはその抗原結合部分を投与するステップを含む前記方法を提供する。本明細書で用いられる用語「NKT細胞エフェクター機能」は、NKT細胞のCD1d拘束性糖脂質活性化から生じるNKT細胞機能を包含することが意図される。そのような機能としては、必ずしも限定されるものではないが、NKT細胞による腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)、IFN- γ 、IL-4、IL-5またはIL-13の放出、NKT細胞表面のFasL発現の上方調節、パーフォリンの放出、およびNKT細胞によるグランザイムBの放出のうちのいずれか1つまたは複数が挙げられる。

【0130】

10

20

30

40

50

投与経路を、非経口、筋肉内、静脈内、ボーラス、腹腔内、皮下、呼吸器、吸入、局所、経鼻、経膈、直腸、頬、舌下、鼻内、真皮下、および経皮を含む様々な投与経路から選択することができる。しかしながら、最も適切な経路は非経口または吸入であると現在考えられている。タンパク質の吸入に関するさらなる情報は、Borish LCら、1999 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160(6)、1816～1823頁に見出すことができる。

【0131】

非経口投与のために、抗体またはその抗原結合部分を、薬学的に許容される非経口ビヒクルと共に、または別々に提供された、溶液、懸濁液、乳濁液または凍結乾燥粉末として製剤化することができる。そのようなビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および1～10%ヒト血清アルブミンである。リボソームおよび非水性ビヒクル、例えば、固定油を用いることもできる。ビヒクルまたは凍結乾燥粉末は、等張性(例えば、塩化ナトリウム、マンニトール)および化学的安定性(例えば、バッファーおよび保存剤)を維持する添加物を含んでもよい。製剤は、公知の、または好適な技術により滅菌される。

【0132】

本発明の単離された核酸分子は、場合により、1つまたは複数のイントロンを含む、オープンリーディングフレーム(ORF)、例えば、限定されるものではないが、それぞれ、少なくとも1つの重鎖または軽鎖のCDR1、CDR2および/またはCDR3としての少なくとも1つのCDRの少なくとも1つの特定の部分を含む核酸分子;抗体またはその抗原結合部分のコード配列を含む核酸分子;ならびに上記のものと実質的に異なるが、遺伝子コードの縮重性により、本明細書に記載の、および/または当技術分野で公知の少なくとも1つの抗体またはその抗原結合部分を依然としてコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含んでもよい。勿論、遺伝子コードは当技術分野で周知である。かくして、本発明の特異的抗体またはその抗原結合部分をコードするそのような縮重核酸変異体を作製することは、当業者にとっては日常的である。例えば、Ausubelら、上掲を参照されたい、そしてそのような核酸変異体は本発明に含まれる。

【0133】

本明細書で示されるように、抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸を含む本発明の核酸分子は、限定されるものではないが、抗体またはその抗原結合部分のアミノ酸配列それだけをコードするもの;抗体またはその抗原結合部分の全体のコード配列;抗体またはその抗原結合部分のコード配列ならびにさらなる配列、例えば、さらなる非コード配列、例えば、限定されるものではないが、非コード5'および3'配列、例えば、転写、mRNAプロセッシング、例えば、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル(例えば、mRNAのリボソーム結合および安定性)において役割を果たす転写される非翻訳配列と共に、上記のさらなるコード配列、例えば、少なくとも1つのイントロンを含むか、または含まない、少なくとも1つのシグナルリーダーまたは融合ペプチド;さらなるアミノ酸、例えば、さらなる官能性を提供するものをコードするさらなるコード配列を含んでもよい。かくして、抗体またはその抗原結合部分をコードする配列を、マーカー配列、例えば、融合された抗体またはその抗原結合部分の精製を容易にするペプチドをコードする配列に融合することができる。

【0134】

本発明は、選択的ハイブリダイゼーション条件下で、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする単離された核酸を提供する。かくして、この実施形態のポリヌクレオチドを、そのようなポリヌクレオチドを含む核酸を単離、検出、および/または定量するために用いることができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドを用いて、寄託されたライブラリー中の部分的または完全長クローンを同定、単離、または増幅することができる。いくつかの実施形態においては、ポリヌクレオチドは、ヒトまたは哺乳動物核酸ライブラリーから単離されたか、またはさもなければそれに由来するcDNAと相補的なゲノムまたはcDNA配列である。

【0135】

好ましくは、cDNAライブラリーは、少なくとも80%の完全長配列、好ましくは、少なくとも85%または90%の完全長配列、より好ましくは、少なくとも95%の完全長配列を含む。cDNAライブラリーを、稀な配列の表示を増加させるように正規化することができる。低い、または中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、典型的には、限定されるものではないが、相補配列と比較して低い配列同一性を有する配列と共に用いられる。中程度および高度のストリンジェンシー条件は、場合により、より高い同一性の配列のために用いることができる。低度のストリンジェンシー条件は、約70%の配列同一性を有する配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オーソログまたはパラログな配列を同定するために用いることができる。

【0136】

10

場合により、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載のポリヌクレオチドによりコードされる抗体またはその抗原結合部分の少なくとも一部をコードする。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドへの選択的ハイブリダイゼーションのために用いることができる核酸配列を包含する(例えば、Ausubel、上掲を参照されたい)。

【0137】

本発明の単離された核酸を、当技術分野で周知のような、(a)組換え方法、(b)合成技術、および(c)精製技術、またはその組合せを用いて作製することができる。

【0138】

核酸は、本発明のポリヌクレオチドに加えた配列を都合良く含んでもよい。例えば、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位を含むマルチクローニング部位を、ポリヌクレオチドの単離に役立つ核酸中に挿入することができる。また、翻訳可能配列を、本発明の翻訳されたポリヌクレオチドの単離に役立つように挿入することができる。例えば、ヘキサヒスチジンマーカ配列は、本発明のタンパク質を精製するための便利な手段を提供する。コード配列を含まない、本発明の核酸は、場合により、本発明のポリヌクレオチドのクローニングおよび/もしくは発現のためのベクター、アダプター、またはリンカーである。

20

【0139】

さらなる配列をそのようなクローニングおよび/または発現配列に付加して、クローニングおよび/もしくは発現におけるその機能を最適化する、ポリヌクレオチドの単離を助ける、または細胞中へのポリヌクレオチドの導入を改善することができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプター、およびリンカーの使用は、当技術分野で周知である(例えば、Ausubel、上掲を参照されたい)。

30

【0140】

本発明の単離された核酸組成物、例えば、RNA、cDNA、ゲノムDNA、またはその任意の組合せを、当業者には公知の任意数のクローニング方法を用いて、生物学的起源から取得することができる。いくつかの実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを用いて、cDNAまたはゲノムDNAライブラリー中の所望の配列を同定する。RNAの単離、ならびにcDNAおよびゲノムライブラリーの構築は、当業者には周知である(例えば、Ausubel、上掲を参照されたい)。

40

【0141】

cDNAまたはゲノムライブラリーを、本明細書に開示されるものなどの本発明のポリヌクレオチドの配列に基づくプローブを用いてスクリーニングすることができる。プローブを用いて、ゲノムDNAまたはcDNA配列とハイブリダイズさせて、同じか、または異なる生物中の相同遺伝子を単離することができる。当業者であれば、アッセイにおいて様々な程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを用いることができ、ハイブリダイゼーションまたは洗浄媒体がストリンジェントであってよいことを理解できるであろう。ハイブリダイゼーションのための条件がよりストリンジェントになるにつれて、二本鎖形成が起こるためには、プローブと標的との相補性の程度がより高くなければならない。ストリ

50

ンジェンシーの程度を、温度、イオン強度、pHおよび部分変性溶媒、例えば、ホルムアミドの存在のうちの1つまたは複数により制御することができる。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば、ホルムアミドの濃度の0%~50%の範囲内での操作により、反応溶液の極性を変化させることにより、都合良く変化する。検出可能な結合にとって必要とされる相補性の程度(配列同一性)は、ハイブリダイゼーション媒体および/または洗浄媒体のストリンジェンシーに応じて変化するであろう。相補性の程度は、最適には100%、または90~100%、またはその中の任意の範囲もしくは値である。しかしながら、プローブおよびプライマー中の小さい配列変化は、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄媒体のストリンジェンシーを低下させることにより相殺することができることが理解されるべきである。

10

【0142】

RNAまたはDNAの増幅方法は当技術分野で周知であり、本明細書に提示される教示および指針に基づいて、過度の実験を行うことなく、本発明に従って用いることができる。DNAまたはRNA増幅の公知の方法としては、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および関連する増幅プロセス(Mullisらの米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号、第4,965,188号;Taborらの米国特許第4,795,699号および第4,921,794号;Innisの米国特許第5,142,033号;Wilsonらの米国特許第5,122,464号;Innisの米国特許第5,091,310号;Gyllenstenらの米国特許第5,066,584号;Gelfandらの米国特許第4,889,818号;Silverらの米国特許第4,994,370号;Biswasの米国特許第4,766,067号;Ringoldの米国特許第4,656,134号を参照されたい)ならびに二本鎖DNA合成のための鋳型としての標的配列に対するアンチセンスRNAを用いるRNA媒介性増幅(Malekらの米国特許第5,130,238号、商標名NASBA)が挙げられ、これらの参考文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる(例えば、Ausubel、上掲を参照されたい)。

20

【0143】

例えば、PCR技術を用いて、ゲノムDNAまたはcDNAライブラリーから直接、本発明のポリヌクレオチドの配列および関連遺伝子を増幅することができる。PCRおよび他のin vitroでの増幅方法はまた、例えば、発現させようとするタンパク質をコードする核酸配列をクローニングするため、核酸配列決定のため、または他の目的のための、試料中の所望のmRNAの存在を検出するためのプローブとして使用するための核酸を作製するためにも有用であり得る。当業者がin vitroでの増幅方法を介して行うのに十分な技術の例は、Ausubel、上掲、ならびにMullisら、米国特許第4,683,202号(1987);およびInnisら、PCR Protocols A Guide to Methods and Applications、Academic Press Inc.(編)、San Diego、Calif. (1990)に見出される。ゲノムPCR増幅のための市販のキットは、当技術分野で公知である。例えば、Advantage(登録商標)-GC Genomic PCRキット(Clontech)を参照されたい。T4遺伝子32タンパク質(Boehringer Mannheim)を用いて、長いPCR産物の収率を改善することができる。

30

【0144】

本発明の単離された核酸を、公知の方法(例えば、Ausubelら、上掲を参照されたい)による直接化学合成により調製することもできる。化学合成は一般に、一本鎖オリゴヌクレオチドを生成し、これを、相補配列とのハイブリダイゼーションによるか、または鋳型としての一本鎖を用いるDNAポリメラーゼを用いる重合により、二本鎖DNAに変換することができる。当業者であれば、DNAの化学合成を約100個以上の塩基の配列に制限することができるが、より長い配列をより短い配列の連結により取得することができることを認識するであろう。重複オリゴヌクレオチドの集合によるより長い配列の合成は、当技術分野で日常的である。

40

【0145】

本発明は、本発明の核酸を含む組換え発現カセットをさらに提供する。本発明の核酸配列、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードするcDNAまたはゲノム配列を用いて、少なくとも1つの所望の宿主細胞中に導入することができる組換え発現カセットを構築することができる。組換え発現カセットは、典型的には、意図される宿主細胞中で

50

のポリヌクレオチドの転写を指令する転写開始調節配列に動作可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含む。異種および非異種(すなわち、内因性)プロモーターの両方を、本発明の核酸の発現を指令するために用いることができる。

【0146】

いくつかの実施形態においては、プロモーター、エンハンサー、または他のエレメントとして働く単離された核酸を、本発明の非異種形態のポリヌクレオチドの適切な位置(上流、下流またはイントロン中)に導入して、本発明のポリヌクレオチドの発現を上方または下方調節することができる。例えば、内因性プロモーターを、突然変異、欠失および/または置換により *in vivo* または *in vitro* で変化させることができる。

【0147】

本発明はまた、当技術分野で周知のような、本発明の単離された核酸分子を含むベクター、組換えベクターを用いて遺伝子工学的に操作された宿主細胞、および組換え技術により少なくとも1つの抗体またはその抗原結合部分の生成にも関する。例えば、Ausubelら、上掲を参照されたい。ポリヌクレオチドは、場合により、宿主中での増殖のための選択マーカーを含有するベクターに連結することができる。一般に、プラスミドベクターを、リン酸カルシウム沈殿などの沈殿中に、または荷電した脂質との複合体中に導入する。ベクターがウイルスである場合、適切なパッケージング細胞系を用いてそれを *in vitro* でパッケージングした後、宿主細胞中に形質導入することができる。

【0148】

DNA挿入物を、適切なプロモーターに動作可能に連結するべきである。発現構築物は、転写開始、終結のための部位、および転写される領域中には、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含む。この構築物により発現される成熟転写物のコード部分は、好ましくは、翻訳されるmRNAの終わりに適切に配置される開始および終止コドン(例えば、UAA、UGAまたはUAG)での翻訳開始を含み、UAAおよびUAGが哺乳動物または真核細胞発現にとって好ましい。

【0149】

発現ベクターは、好ましくは、であるが場合により、少なくとも1つの選択マーカーを含む。そのようなマーカーとしては、例えば、限定されるものではないが、真核細胞培養物に対するメトトレキサート(MTX)、ジヒドロ葉酸リダクターゼ(DHFR、米国特許第4,399,216号;第4,634,665号;第4,656,134号;第4,956,288号;第5,149,636号;および第5,179,017号)、アンピシリン、ネオマイシン(G418)、ミコフェノール酸、またはグルタミン合成酵素(GS、米国特許第5,122,464号;第5,770,359号;および第5,827,739号)耐性、および大腸菌(*E. coli*)および他の細菌もしくは原核生物における培養に対するテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる(上記特許は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および培養条件は、当技術分野で公知である。好適なベクターは、当業者には容易に明らかとなるであろう。宿主細胞中へのベクター構築物の導入を、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の公知の方法により行うことができる。そのような方法は、当技術分野で、例えば、Ausubel、上掲、第1、9、13、15、16章に記載されている。

【0150】

本発明の少なくとも1つの抗体、またはその抗原結合部分を、改変された形態、例えば、融合タンパク質中で発現させることができ、それは分泌シグナルだけでなく、さらなる異種性機能的領域も含んでもよい。例えば、さらなるアミノ酸の領域、特に、荷電アミノ酸を、抗体またはその抗原結合部分のN末端に付加して、宿主細胞中での、精製中の、またはその後の取り扱いおよび保存中の安定性および持続性を改善することができる。また、ペプチド部分を本発明の抗体、またはその抗原結合部分に付加して、精製を容易にすることもできる。そのような領域を、抗体または少なくとも1つのその断片の最終的な調製の前に除去することができる。そのような方法は、Ausubel、上掲、第16、17および18章

10

20

30

40

50

などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。当業者であれば、本発明のタンパク質をコードする核酸の発現のために利用可能な多くの発現系に精通している。

【0151】

あるいは、本発明の核酸を、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードする内因性DNAを含有する宿主細胞中でスイッチを入れる(操作により)ことにより、宿主細胞中で発現させることができる。そのような方法は、当技術分野で周知であり、例えば、米国特許第5,580,734号、第5,641,670号、第5,733,746号および第5,733,761号に記載されており、それらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0152】

抗体、その特定の部分または変異体の生成にとって有用な細胞培養物の例は、哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は、細胞単層の形態にあることが多いが、哺乳動物細胞懸濁液またはバイオリアクタを用いることもできる。無傷のグリコシル化タンパク質を発現することができるいくつかの好適な宿主細胞系が当技術分野で開発されており、例えば、American Type Culture Collection、Manassas、Va.から容易に入手可能である、COS-1(例えば、ATCC CRL 1650)、COS-7(例えば、ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例えば、ATCC CRL-10)、CHO(例えば、ATCC CRL 1610)およびBSC-1(例えば、ATCC CRL-26)細胞系、COS-7細胞、CHOK1SV細胞、hep G2細胞、P3X63Ag8.653、SP2/O-Ag14、293細胞、HeLa細胞などが挙げられる。好ましい宿主細胞としては、骨髄腫細胞およびリンパ腫細胞などの、リンパ起源の細胞が挙げられる。特に好ましい宿主細胞は、CHOK1(ATCC: CRL-9618)またはCHOK1SV(例えば、Lonza Biologics)である。

【0153】

これらの細胞のための発現ベクターは、1つまたは複数の下記発現制御配列、例えば、限定されるものではないが、複製起点;プロモーター(例えば、後期または初期SV40プロモーター、CMVプロモーター;米国特許第5,168,062号;第5,385,839号)、HSV tkプロモーター、pgk(ホスホグリセリン酸キナーゼ)プロモーター、EF-1アルファプロモーター(米国特許第5,266,491号)、少なくとも1つのヒト免疫グロブリンプロモーター;エンハンサー、および/またはプロセッシング情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位(例えば、SV40ラージT AgポリA付加部位)、ならびに転写終結配列を含んでもよい。例えば、Ausubelら、上掲を参照されたい。本発明の核酸またはタンパク質の生成にとって有用な他の細胞は公知であり、および/または例えば、American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org)または他の公知のもしくは商業的起源から入手可能である。

【0154】

真核宿主細胞を用いる場合、ポリアデニル化または転写終結配列は、典型的にはベクター中に組み込まれる。終結配列の一例は、ウシ成長ホルモン遺伝子に由来するポリアデニル化配列である。転写物の正確なスプライシングのための配列を含有させてもよい。スプライシング配列の一例は、SV40に由来するVP1イントロンである(Spragueら、1983 J Virology 45:773-81頁)。さらに、宿主細胞中での複製を制御する遺伝子配列を、当技術分野で公知のように、ベクター中に組み込むことができる。

【0155】

見られるように、本明細書は、いくつかの配列を記載するために用語「%同一」を使用する。理解されるように、用語「%同一」は、特定の領域にわたる2つの配列の比較において、2つの配列が同じ位置に特定数の同一の残基を有することを意味する。同一性のレベルは、デフォルトパラメータを用いるCLUSTALWを用いて決定することができる。

【0156】

また、配列は比較用配列と「少なくとも95%同一」であることにも留意すべきである。特定の実施形態においては、配列は比較用配列と少なくとも96%または少なくとも97%または少なくとも98%または少なくとも99%同一であることが好ましい。

【0157】

本明細書で用いられるハイブリダイゼーション条件に関する用語「中程度のストリンジ

10

20

30

40

50

エンシー」は、45 ~ 65 の範囲の温度での2×SSCバッファー、0.1%(w/v)SDS中で、または同等の条件下で実行されるハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を意味する。本明細書で用いられるハイブリダイゼーション条件に関する用語「高度のストリンジェンシー」は、0.1×SSCバッファー、0.1%(w/v)SDS、またはより低い塩濃度および少なくとも65の温度で、または同等の条件下で実行されるハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を意味する。特定のレベルのストリンジェンシーに対する本明細書における参照は、当業者には公知のSSC以外の洗浄/ハイブリダイゼーション溶液を用いる同等の条件を包含する。例えば、二本鎖核酸の鎖が解離する温度(融点、またはT_mとしても知られる)を算出するための方法は、当技術分野で公知である。核酸のT_mと類似する(例えば、5 以内もしくは10 以内)か、またはそれと等しい温度は、高度のストリンジェンシーであると考えられる。中程度のストリンジェンシーは、核酸の算出されたT_mの10 ~ 20 または10 ~ 15 以内であると考えられる。

10

【0158】

本明細書を通じて、単語「含む(comprise)」、または「含む(comprises)」もしくは「含む(comprising)」などの変形は、記述された要素、整数もしくはステップ、または要素、整数もしくはステップの群の含有を意味するが、任意の他の要素、整数もしくはステップ、または要素、整数もしくはステップの群の排除を意味しないことが理解されるであろう。

【0159】

本明細書に記載の全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれた文献、活動、材料、デバイス、論文などの任意の考察は、単に本発明に関する文脈を提供するためのものである。これらの事柄のいずれかまたは全部が、先行技術ベースの一部を形成するか、または本出願のそれぞれの特許請求の範囲の優先日より前に豪州もしくはその他の国に存在したような本発明に関連する分野における共通一般知識であったとの承認と受け取られるべきではない。

20

【0160】

対象の明細書において用いられる通り、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に別途区別しない限り、複数の態様を含むことに留意しなければならない。かくして、例えば、「a」に対する参照は、1ならびに2以上を含む;「an」に対する参照は、1ならびに2以上を含む;「the」に対する参照は、1ならびに2以上などを含む。

30

【0161】

本発明を一般的に説明してきたが、同じことは、例示によって提供され、限定することを意図されない以下の実施例を参照することによって、より容易に理解されるであろう。

【0162】

(実施例)

一般的方法

HEK293/pTT5発現系

HEK293E/pTT5発現系を含む全てのトランスフェクションについて、HEK293E細胞を、完全細胞増殖培地(1LのF17培地(Invitrogen)、9mLのプルロニックF68(Invitrogen)、20%(w/v)トリプトンNI(Organotechnie)を含有する2mMのグルタミン、50 μL/100mL培養物でゲネチシン(50mg/mL、Invitrogen)を含む)中で培養した。トランスフェクションの前日に、細胞を遠心分離により収穫し、ゲネチシンを含まない新鮮な培地中に再懸濁した。次の日、DNAを市販のトランスフェクション試薬と混合し、DNAトランスフェクション混合物を培養物に滴下しながら添加した。培養物を、ゲネチシンを用いずに37 °Cで一晩、5%CO₂および120rpmでインキュベートした。次の日、培養物500mLあたり12.5mLのトリプトンおよび250 μLのゲネチシンを添加した。培養物を7日間、37 °C、5%CO₂および120rpmでインキュベートした後、上清を収穫し、精製した。

40

【0163】

CD1d/ 2Mタンパク質

C末端に位置するHISタグを含むCD1dの細胞外ドメインをコードするDNA発現構築物(配列

50

番号19)、 2M(配列番号20)をコードするDNA発現構築物で同時トランスフェクトされたDNA発現構築物を用いて、ヒトCD1d/ 2Mを哺乳動物HEK293E/pTT5発現系中で生成させた。分泌されたCD1d/ 2Mタンパク質を含有する培養上清を、2000gで10minの遠心分離により収穫して、細胞を除去した。HisTrap™ HPカラム(GE Healthcare)を用いるHis8親和性タグにより、上清からCD1d/ 2Mタンパク質複合体を精製した。溶出したタンパク質を、HiLoad 16/60 Superdex 200 prep gradeカラム(GE Healthcare)を用いてPBS中でバッファー交換し、約50kDaの画分を、HiLoad 26/60 Superdex 200 prep gradeカラム(GE Healthcare)上でのゲル濾過により分離した。ヒト 2Mのみを生成し、同様の様式で精製した。同様の精製方法を、他種のCD1d(例えば、マウスCD1d)およびCD1dの合成構築物(hCD1dmuおよびmCD1dmuなど)の精製のために採用した。

10

【0164】

カニクイザルCD1dの配列を決定するために、サル脾臓に由来するcDNAを、Biochainから取得した。以下のプライマーを用いて、アカゲザルCD1d mRNA(PubMed受託番号NM_001033114)に基づくCD1d DNAを増幅した:

F1 - GTGCCTGCTGTTTCTGCTG(配列番号120)

R1 - TGCCCTGATAGGAAGTTTGC(配列番号121)

【0165】

1kbのDNA産物を増幅するPCRを設定した。このDNAをpGEM-T Easy(Promega)中に連結し、M13フォワードおよびリバースプライマーを用いて配列決定した。配列をアカゲザルCD1d(UniProt受託番号Q4AD67)のものと整列させたところ、同一であることがわかった。次いで、遺伝子配列を合成し、C末端HISタグを付加し、pTT5ベクター中にサブクローニングし、HEK-293E/pTT5系を用いて発現させた。タンパク質を、導入されたHISタグを介するNiクロマトグラフィーを用いて精製した。

20

【0166】

ファージ展示実験のために、3:1の比のビオチン:CD1d/ 2Mで、組換えヒトCD1d/ 2MをEZ-link Sulfo-NHS-LC-ビオチンキット(Pierce)を用いてビオチン化した。遊離ビオチンを、3.5kDa分子量カットオフを有するSlide-A-Lyzer透析カセットを用いるPBSに対する透析により、タンパク質調製物から除去した。キャンペーン2のために、ビオチン化された組換えカニクイザルCD1d/ 2Mも上記のように調製した。

【0167】

抗体を発現するベクターの構築

VHアミノ酸鎖を、ヒト定常領域(ヒトIgG4重鎖CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメイン(S228Pに置換を有するNCBI受託番号P01861など))と共に発現させた。これを、アミノ酸配列からDNA配列への戻し翻訳、次いで、de novo合成および合成オリゴヌクレオチドの集合により達成した。遺伝子合成の後、全配列を、pTT5重鎖ベクターのマルチクローニング部位にサブクローニングした(Durocher, Y.ら、2002、Nucleic Acids Res、30、E9)。VLアミノ酸鎖を、pTT5軽鎖ベクターのマルチクローニング部位に配列をサブクローニングすることにより、ヒトカッパまたはラムダ軽鎖定常領域(NCBI受託番号AA110395およびC6KXN3など)と共に発現させた。

30

【0168】

抗体の発現および精製

重鎖および軽鎖DNAベクターを、HEK293/pTT5発現系中に同時トランスフェクトし、7日間培養した。これらのトランスフェクションから誘導された上清を、pH7.4に調整した後、HiTrap Protein Aカラム(5mL、GE Healthcare)上に充填した。カラムを、50mLの1×PBS(pH7.4)を用いて洗浄した。溶出を、0.1Mクエン酸pH2.5を用いて実施した。溶出した抗体を、1×PBS(pH7.4)中でZeda Desaltingカラム(Pierce)を用いて脱塩した。抗体を、SDS-PAGEを用いて分析した。抗体の濃度を、BCAアッセイキット(Pierce)を用いて決定した。

40

【0169】

(実施例1)

抗CD1d抗体の作製

50

ファージ展示

ヒトおよびカニクイザルCD1d/ 2Mの両方に結合するFAbを、ナイーブなファージミドライブラリーから単離した。

【0170】

抗CD1d/ 2M FAbを、2つのパンニング「キャンペーン」(すなわち、異なる試薬またはパンニング条件を用いる別個のファージ展示実験)の過程にわたってファージ展示ライブラリーから単離した。一般的なプロトコルは、Marksら (Marks, J.D.およびBradbury, A., 2004, *Methods Mol Biol*, 248, 161~76頁)により概略された方法に従った。

【0171】

それぞれのファージ展示キャンペーンは、3ラウンドのパンニングを含んでいた。それぞれのラウンドについて、約 1×10^{13} 個のファージ粒子を、ブロッキングバッファー(リン酸緩衝生理食塩水pH7.4中の5%スキムミルク)と1:1で混合し、室温で1hインキュベートすることにより遮断した。次いで、遮断されたファージライブラリーを、100 μ Lのストレプトアビジン共役Dynabeads (Invitrogen)と共に45minインキュベートすることによりストレプトアビジン結合剤について予め減少させ、ライブラリーについて記載のように遮断した。ビーズ(およびそれらに結合したストレプトアビジン結合剤)を、インキュベーションステップの後に廃棄した。

【0172】

組換えCD1d/ 2M抗原を、ストレプトアビジン共役Dynabeads (Invitrogen)の表面上での捕捉によるパンニングのために調製した。これを達成するために、10~100pmolのビオチン化CD1d/ 2Mを、100 μ Lのビーズと共に室温で45minインキュベートした。得られたCD1d/ 2Mビーズ複合体をPBSで洗浄して、遊離CD1d/ 2Mを除去した後、その後のパンニング反応において用いた。

【0173】

1.5mLのマイクロ遠心管中で、遮断され、予め減少させたライブラリーをCD1d/ 2Mビーズ複合体とを混合し、室温で2h回転させることにより、ライブラリーパンニングを行った。一連の洗浄を用いて非特異的に結合したファージを除去した。それぞれの洗浄は、磁気ラックを用いて溶液からビーズ複合体をチューブ壁上に引きつけ、上清を吸引した後、新鮮な洗浄バッファー中にビーズを再懸濁するステップを含んでいた。これを、PBS洗浄バッファー(0.5%スキムミルクを含むPBS)またはPBS-T洗浄バッファー(0.05%TWEEN-20(Sigma)および0.5%スキムミルクを含むPBS)を用いて数回繰り返した。洗浄プロセス後に結合したままであったファージを、室温で20min、0.5mLの100mMトリエチルアミン(TEA)(Merck)と共にインキュベートすることによりCD1d/ 2Mビーズ複合体から溶出させた。溶出した「出力」ファージを、0.25mLの1M Tris-HCL pH7.4(Sigma)を添加することにより中和した。

【0174】

第1および第2ラウンドのパンニングの終わりに、出力ファージを、指数増殖期のTG1大腸菌(酵母-トリプトン(YT)増殖培地)の10mLの培養物に添加し、振とうせずに37°Cで30min、次いで250rpmで30minで振とうしながらインキュベートすることにより、細胞に感染させた。次いで、ファージ展示出力をコードするファージミドを、標準的なプロトコルに従ってファージ粒子としてレスキューした(Marks, J.D.およびBradbury, A., 2004, *Methods Mol Biol*, 248, 161~76頁)。第3ラウンドのパンニングの終わりに、TG1細胞を出力ファージに感染させたが、個別の大腸菌コロニーを生成するのに十分な希釈率で、固体YT増殖培地(2%グルコースおよび100 μ g/mLカルベニシリンを添加した)上に細胞を塗布した。これらのコロニーを用いて、1mLの液体培養物に接種して、スクリーニング実験における使用のためにFAb断片の発現を可能にした。

【0175】

CD1d結合に関するFAbのELISAに基づくスクリーニング

それぞれ個々の大腸菌コロニーを用いて、FAbを発現させ、CD1d/ 2M結合活性についてスクリーニングした。コロニーを96穴ディープレット(Costar)中、1mLのYT開始

10

20

30

40

50

培養物(100 µg/mLカルベニシリンおよび2%グルコースを添加した)中に接種し、650rpmで振とうしながら30 で一晩インキュベートした。これらの開始培養物を、1mL発現培養物(100 µg/mLカルベニシリンのみを添加したYT)中で1:50に希釈し、600nmで0.8~1.0の光密度まで増殖させた。FAb発現を、1mMの最終濃度でイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを添加することにより誘導した。培養物を20 で16hインキュベートした。

【0176】

遠心分離(2500g、10min)により細胞を収穫し、ペリプラズム抽出を実施することにより、FAb試料を調製した。細胞ペレットを75 µLの抽出バッファー(30mM Tris-HCl、pH8.0、1 mM EDTA、20%スクロース)中に再懸濁し、1000rpm、4 で10min振とうした。225 µLのH₂Oを添加し、1000rpmで1h振とうし、2500gで10minの遠心分離により抽出物を明澄化することにより、抽出物調製を完了させた。上清を回収し、Acroprep 100kDa分子量カットオフプレート(Pall Corporation)を通して濾過し、さらなる実験に必要となるまで4 で保存した。

10

【0177】

ELISAによるファージ展示により得られた潜在的なヒトCD1d結合剤をスクリーニングするために、ヒトCD1d/ 2M(HEK293E細胞中で生成され、上記のようにビオチン化されたもの)を、1 µg/mLでストレプトアビジン被覆ELISAプレート(Pierce)上に捕捉した。次いで、プレートを洗浄し、別々のFAb試料(上記のように調製された)を、ELISAプレート上の個々のウェルに添加した。FAbを、室温で2時間、捕捉されたCD1d/ 2Mに結合させた後、PBS-Tで3回およびPBSで3回洗浄した。結合したFAbを、FAb重鎖のC末端に融合させたV5親和性タグ(Sigma)に対するHRPコンジュゲート抗体を用いて検出した。検出抗体を、室温で1.5hインキュベートした。プレートを洗浄して、未結合の抗体を除去し、50 µLの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KPL)と共にインキュベートすることによりアッセイシグナルを生じさせ、50 µLの1M HClでクエンチした。マイクロプレートリーダー(Bio-Tek)を用いてA450nmでアッセイシグナルを読み取った。結果を生々のA450nm値として表し、平均アッセイバックグラウンドよりも2倍多いシグナルを「陽性」として定義した。

20

【0178】

後の方のアッセイにおいて、非ビオチン化ヒトCD1d/ 2M、カニクイザルCD1d/ 2Mまたは 2Mのみで被覆されたMaxisorp ELISAプレート(Nunc)を調製して、FAb試料の結合を試験した。洗浄および検出ステップは、上記の通りであった。

30

【0179】

CD1d/ 2M結合に関するFAbのSPRに基づくスクリーニング

単一濃度分析物通過アッセイにおいて、BIAcore 4000 Biosensor(GE Healthcare)を用いて、SPRスクリーニングを行った。約10,000RUの抗V5抗体(Invitrogenカタログ番号R960CUS)を、未改変の4つのフローセル脱離スポット3のそれぞれのスポット1、2、4および5上のpH5.5での標準的なアミンカップリング化学を用いて、CM5 Series S Sensorチップ上に固定した。用いたランニングバッファーはHBS-EP+(GE Healthcare)であり、全ての相互作用を25 で測定し、データ収集速度を10Hzに設定した。V5タグ付FAbの粗ペリプラズム調製物を、ランニングバッファー中で2倍に希釈した後、それぞれのフローセルのスポット1または5上で10 µL/minの流速で100sec捕捉した(典型的には、約200RUのFAbを捕捉した)。短い安定化期間の後、ヒトまたはカニクイザルCD1d/ 2Mを、30 µL/minの流速で100sec、同時に4つ全部のフローセルの全スポット上を通過させた。相互作用の解離を100sec測定した後、30secのパルスの100mMリン酸を用いて抗V5抗体に再生し戻した。作製されたセンサーグラムを、それぞれのフローセルについて隣接する抗V5抗体スポットに対して参照し、1:1のLangmuir式を用いて適合させ、ka、kdおよびKDを決定した。

40

【0180】

ファージ展示キャンペーンの結果

4400個を超えるクローンを、SPRアッセイによりヒトおよびカニクイザルのCD1d/ 2Mへの結合についてスクリーニングした。合計51個のFAbが、ヒトおよびカニクイザルのCD1dに対する高い選択性を有することがわかった。

50

【 0 1 8 1 】

(実施例2)

CD1dへのIgG結合の確認

ヒト-カニクイザルCD1d反応性FAbを、IgG4形式に変換し、一般的方法に記載のように発現させ、精製した。実施例1に記載のアッセイの改変型を用いてELISAおよびSPRによりヒトおよびカニクイザルCD1dへの結合について、精製された抗体を試験した。簡単に述べると、ELISAアッセイのためにMaxisorp ELISAプレート(Nunc)を、1 μ g/mLの適切な抗原で被覆した。次いで、プレートを洗浄し、精製されたIgG試料を、ELISAプレート上の個々のウェルに添加した。IgGを、室温で1時間、捕捉されたCD1d/ 2Mに結合させた後、PBS-Tで3回およびPBSで3回洗浄した。結合したIgGを、ヒトFc(Sigma)に対するHRPコンジュゲート化抗体を用いて検出した。検出抗体を室温で30分間インキュベートした。プレートを洗浄して、未結合の抗体を除去し、50 μ Lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KPL)と共にインキュベートすることによりアッセイシグナルを生じさせ、50 μ Lの1M HClでクエンチした。マイクロプレートリーダー(Bio-Tek)を用いてA450nmでアッセイシグナルを読み取った。結果を生々のA450nm値として表し、平均アッセイバックグラウンドよりも2倍多いシグナルを「陽性」として定義した。

10

【 0 1 8 2 】

また、精製された抗体を、Biacore T100バイオセンサ(GE Healthcare)を用いる完全動的特性評価にかけた。約10,000RUの抗ヒトIgG(Invitrogenカタログ番号H10500)を、Biacore T100 Biosensorのフローセル(FC)1およびFC2(またはあるいは、FC3およびFC4)中で標準的なアミンカップリング化学を用いて、CM5 Series S Sensorチップ上に固定した。用いたランニングバッファはHBS-EP+(GE Healthcare)であり、相互作用を25 で測定した。精製されたIgGのピークを、ランニングバッファ中で10nMに希釈し、10 μ L/minの流速でFC2(またはあるいは、FC4)上に捕捉して、50~80RUのIgGを捕捉した。適切な安定化期間の後、標的であるヒトまたはカニクイザルのCD1d/ 2Mを、33.3nM~0.4nMの範囲の濃度で60 μ L/minの流速でFC1およびFC2(またはあるいは、FC3およびFC4)上に通過させた(CD1d/ 2Mの3倍希釈液を用いる)。会合のための接触時間は120secであり、最も高い濃度については20minおよびシリーズ中の全ての他の濃度については240sec、解離を測定した。FC2に由来するセンサーグラムデータを、FC1およびバッファーのみの対照から差し引いた。1:1のLangmuir式を用いて曲線を適合させて、ka、kdおよびKD値を生成した(Table 1(表1))

20

30

【 0 1 8 3 】

【表 1】

Table 1:ファージ展示抗体の ELISA および SPR の結果

IgG	ELISA hCD1d	ELISA cCD1d	SPR ヒト CD1d		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
401.1	+	+	3.30E+05	6.10E-05	1.85E-10
401.3	+	-	1.55E+05	4.61E-03	2.98E-08
401.9	+	+	1.69E+05	2.21E-02	1.31E-07
401.11	+	+	1.80E+05	4.79E-04	2.66E-09
401.12	+	+	7.84E+05	4.59E-03	5.85E-09
401.14	+	+	1.37E+05	2.88E-03	2.10E-08
401.22	+	+	1.92E+05	2.70E-03	1.40E-08
401.24	+	+	9.02E+05	1.19E-03	1.32E-09
401.26	+	+	3.75E+05	6.02E-03	1.60E-08
401.28	+	-	5.10E+05	3.30E-03	6.47E-09
401.30	+	+	7.51E+05	3.42E-03	4.55E-09
401.33	+	+	1.16E+05	1.09E-03	9.40E-09
402.1	+	+	3.15E+05	7.01E-03	2.23E-08
402.2	+	-	8.31E+04	4.51E-04	5.43E-09
402.4	+	-	3.05E+05	2.89E-03	9.51E-09
402.5	+	-	1.80E+05	3.17E-03	1.76E-08
402.6	+	+	1.58E+05	3.12E-04	1.98E-09
402.7	+	+	1.71E+05	5.05E-03	2.95E-08
402.8	+	+	5.30E+05	1.61E-04	3.04E-10
402.9	+	+	2.56E+05	1.55E-03	6.04E-09
402.11	+	+	9.46E+04	5.22E-03	5.52E-08
402.12	+	+	1.18E+06	8.29E-04	7.01E-10
402.15	+	+	1.99E+05	4.31E-03	2.17E-08
402.16	+	+	1.96E+05	8.89E-04	4.54E-09
402.17	+	+	4.61E+05	2.88E-03	6.24E-09
402.18	+	+	1.25E+05	4.08E-04	3.27E-09

10

20

30

【 0 1 8 4 】

(実施例3)

細胞に基づくCD1d四量体阻害効力アッセイ
 安定なNKTCRを発現する細胞系の作出

抗CD1d抗体の生物学的効力を特性評価するための細胞に基づくアッセイを開発するために、NKT細胞受容体(NKTCR)を発現する安定な細胞系が必要であった。細胞系J.RT3-T3.5 (ATCC: TIB-153)を、安定なNKT細胞受容体発現細胞系の作出のために選択した。J.RT3-T3.5は、T細胞抗原受容体の鎖を欠くJurkat (ATCC: TIB152)のE6-1クローンに由来する。この細胞は、その表面上にCD3もT細胞受容体ヘテロ二量体も発現しない。J.RT3-T3.5細胞を、一方はJ3N.5 NKTCRの鎖(配列番号21)を含み、他方はJ3N.5NKTCRの鎖(配列番号22)を含む2つのベクターを用いて同時にエレクトロポレーションを行った(Brigl, M.ら、2006 J Immunol 176: 3625~34頁)。このNKT細胞受容体は、糖脂質抗原-GalCerと反応する。NKTCRの鎖および鎖をコードするこれらのベクターは、それぞれゲネチシンおよびプラスチジンに対する耐性遺伝子も発現する。これらのベクターの安定な組み込みを、所定の濃度のゲネチシンおよびプラスチジンを含む培養培地中でのこれらの細胞の増殖により達成した。

40

50

【 0 1 8 5 】

クローン系を誘導するために、ゲネチシンおよびプラスチジン選択下で対数期までRP MI1640(Gibco)中でトランスフェクトされたJ.RT3-T3.5細胞を増殖させ、96穴平底プレート(Corning)中、ウェルあたり平均1個の細胞で限界希釈した。トランスフェクトされたNK TCRの安定な発現を決定するために、生きているクローンを、24穴プレート中でより大きい容量にサブクローニングし、多パラメータフローサイトメトリーによりスクリーニングした。クローンを、CD1d四量体(ProImmune)への結合、V_{24J18}の発現、ヒトiNKTCRの連結領域、およびTCRのコレセプターであるCD3の発現についてスクリーニングした。これらのマーカーの高く発現するクローンを、それぞれのマーカーの高い平均蛍光強度(MFI)により選択した。T25フラスコ中での複数回の継代後のクローンのフローサイトメトリーおよび凍結培地(90%熱不活化ウシ胎仔血清および10%DMSO)中、-180℃で推定クローンを減らした後の回復により、安定性を確認した。安定なクローンを同定し、細胞に基づくアッセイにおいて用いて、抗Cd1d抗体の機能的効力を特性評価した。

10

【 0 1 8 6 】

CD1d四量体阻害効力アッセイ

抗CD1d抗体の効力を特性評価するための細胞に基づくアッセイは、フローサイトメトリーに基づくCD1d四量体阻害アッセイにおいて、上記のクローンNKT細胞系を用いた。このアッセイは、J.RT3-T3.5細胞中に安定にトランスフェクトされたNKTCRに結合する、 α -GalCerを充填したCD1d四量体の能力に依っていた。抗CD1d抗体の効力を、安定にトランスフェクトされたJ.RT3-T3.5系上に存在するNKTCRに結合するCD1d四量体を阻害する抗体の能力により決定した。阻害抗体は、CD1d四量体と、J.RT3-T3.5細胞上に安定にトランスフェクトされたNKTCRとの相互作用を防止する四量体内のCD1d分子上の特異的エピトープに結合する。アッセイの読み取りは、フルオロクロムコンジュゲート化CD1d四量体の平均蛍光強度(MFI)の低下であった。CD1d四量体濃度を一定に保ちながら、抗CD1d抗体の滴定により、およそそのEC50値を生成した。アッセイの再現性および信頼性を確保するために、様々なCD1d四量体濃度での最適化実験を行って、最良の動的範囲を決定した。CD1d四量体の最適濃度は、1:1000希釈率であると決定されたが、これは約10nMに相当する。

20

【 0 1 8 7 】

アッセイを実施するために、pH7.4の冷1×PBS中の0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)中で10μg/mLから減少する濃度で抗体を調製した。これらの抗体を、暗室、室温で、1:1の比で10nMの最終濃度の抗CD1d四量体と共に最大40分間、同時インキュベートした。このCD1d四量体/抗CD1d抗体混合物を用いて、96穴丸底プレート中に 1×10^5 細胞/ウェルで播種したJ.RT3-T3.5細胞のNKTCR安定トランスフェクタントを染色した。洗浄ステップを1×PBS中の0.1%BSA中で行った。データをフローサイトメトリーにより獲得し、フローサイトメトリー分析ソフトウェア(FlowJo)を用いて分析した。

30

【 0 1 8 8 】

抗CD1d抗体401.1、401.9、401.11、401.12、401.14、401.28、401.30、402.1、402.6、402.7、402.8、402.16、402.17および402.18を、このアッセイにおいて試験した。無関係の特異性の陰性対照抗体(ヒトIgG1)を、陰性対照として選択した。抗CD1d抗体42(BD Biosciences)および51.1(eBioscience)を、陽性対照として選択した。これらの抗体のうち、401.11、401.28、402.1、402.6、402.7、402.8、402.16および402.18のみが、抗体42と類似するか、またはそれより優れた、このアッセイにおける効力を示した(Table 2(表2))。比較して、陰性対照抗体は、細胞系への四量体結合の無視できる程度の阻害を示した。複数回の実験からの代表的なデータを、図1に提示する。この結果は、CD1dへの抗体の直接的結合を測定するアッセイによっては予測することができなかった。これは、CD1d-NKT相互作用を機能的に阻害することができる抗体を選択およびスクリーニングする必要性を示している。

40

【 0 1 8 9 】

【表 2】

Table 2:四量体阻害アッセイに関する EC50 値

抗体名	EC50 (ng/mL)
401.11	283.9
402.1	387.5
402.6	601.6
402.7	791.3
402.8	164.7
402.16	351.6
402.17	無視できる程度の阻害
402.18	88.2
42	1435.0
51.1	775.4
陰性対照	無視できる程度の阻害

10

20

【 0 1 9 0 】

(実施例4)

NKT細胞系 IL-2放出アッセイ

細胞系に基づく機能的効力アッセイを用いて、抗CD1d抗体をさらに特性評価した。U-937細胞系(ATCC: CRL 1593.2)は、CD1d陽性である骨髓単球系である。GalCerを充填したU-937細胞は、実施例3に記載された安定なNKTCR細胞系によるIL-2の生成を誘導することができる。阻害的抗CD1d抗体は、これらのGalCer充填U-937細胞に応答してNKTCR細胞系によるIL-2の放出を低下させる。IL-2レベルは、標準的なELISA技術(R&D Systems)により測定した。

30

【 0 1 9 1 】

アッセイを実施するために、約 1.5×10^5 個のU-937細胞に、RPMI1640(Gibco)中、96穴平底プレート中100ng/mLの最終濃度でGalCerを充填させた。GalCerの添加後60分で、10 μ g/mLから出発して減少する濃度で抗CD1d抗体を細胞に添加した。抗体充填後60分で、 1.5×10^5 個の安定なNKTCRでトランスフェクトされたJ.RT3-T3.5細胞を各ウェルに添加した。NKTCRでトランスフェクトされたJ.RT3-T3.5細胞の添加の24時間後、無細胞培養上清を用いるELISA(R&D Systems)により、IL-2レベルを試験した。

40

【 0 1 9 2 】

抗CD1d抗体401.1、401.9、401.11、401.12、401.14、401.28、402.1、402.6、402.7、402.8、402.16および402.18を、このアッセイにおいて試験した。抗CD1d抗体42および51.1を、陽性対照として選択した。無関係の特異性の陰性対照抗体(ヒトIgG1)を、陰性対照として選択した。これらの抗体のうち、401.11、402.1、402.6、402.7、402.8および402.16のみが、EC50値により決定された場合、抗体42と比較して同等か、またはより強いIL-2放出の阻害を示した(Table 3(表3)および図2中の代表的データ)。さらに、401.11および402.8は、抗体51.1と比較してより優れたIL-2放出の阻害を示した(図2)。比較して、陰性対照抗体は、IL-2放出の無視できる程度の阻害を示した。驚くべきことに、401.11は、抗体42より約20倍強力であり、51.1よりも約15倍強力であった。同様に、402.8は、抗体42よりも約25倍強力であり、51.1よりも約17倍強力であった(図2)。総合すると、これらのデ

50

ータは、当技術分野で記載されたものと比較して生物学的効力が有意に改善された新規完全ヒト抗CD1d抗体を示した。

【 0 1 9 3 】

【表 3】

Table 3:EC50 値・NKT 細胞系 IL-2 アッセイ

抗体名	EC50 (ng/mL)
401.1	無視できる程度の阻害
401.9	286.0
401.11	5.3
401.12	576.3
401.14	無視できる程度の阻害
401.28	112.4
401.30	無視できる程度の阻害
402.8	4.5
42	110.7
51.1	77.3
(陰性対照)	無視できる程度の阻害

10

20

【 0 1 9 4 】

(実施例5)

一次PBMCへの抗CD1d抗体の結合の試験

一次ヒト体細胞上に展示されるCD1dに結合する能力について、抗CD1d抗体を特性評価した。抗CD1d抗体402.8、401.11.158および無関係の特異性の陰性対照抗体を、2mg/mLの濃度に調整し、製造業者の説明書に従って蛍光色素Pacific Blue(Invitrogen)にコンジュゲートさせた。

30

【 0 1 9 5 】

CD1dはヒト血液中に存在する特定のヒト細胞集団上で発現されることが知られているため、末梢血単核細胞(PBMC)を用いて、一次CD1d+細胞への抗CD1d抗体402.8の結合を確認した。PBMCを、標準的なプロトコルに従うlymphoprep勾配(Nycomed)上での密度遠心分離により軟膜から単離した。次いで、細胞を1×PBS中で数回洗浄し、抗CD1d抗体402.8(10 µg/mL)または陰性対照抗体IgG1(10 µg/mL)で染色し、抗ヒトCD11c(Biolegend)で同時染色した。抗CD1d抗体402.8は、異なるCD1d陽性集団に結合したが、これはCD11c陽性であった(図3)。対照的に、陰性対照抗体は、無視できる程度の結合を示した(図3)。抗CD1d抗体401.11.158(10 µg/mL)はまた、このCD1d陽性集団にも結合した(示さず)。これらのデータは、402.8および401.11から誘導された抗CD1d抗体が一次ヒト細胞中のCD1d+集団に結合したことを明確に示している。

40

【 0 1 9 6 】

(実施例6)

一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体の効果の試験

ヒトNKT細胞は、CD1dの文脈で提示される脂質または糖脂質抗原に応答して迅速なエフ

50

エクター機能を惹起することができる。この迅速なエフェクター機能を、IFN- γ 、IL-4、IL-5、およびIL-13などのサイトカインの放出により実証することができる。阻害的抗CD1d抗体は、細胞上に存在するCD1dに結合し、NKT細胞と、CD1dと糖脂質とのその同族複合体との相互作用を防止することにより、これらのNKT細胞の機能を阻害することができる。好適な抗原提示細胞としては、不死化骨髄細胞系または一次ヒト樹状細胞が挙げられる。ヒトドナーの末梢血内のNKT細胞の希少性を考慮すると、アッセイの成功には、最初の例におけるそのような一次NKT細胞の単離および拡張が必要である。

【0197】

NKT細胞の単離および拡張

PBMCを、Lymphoprep(Nycomed)勾配上で軟膜から単離した。次いで、NKT細胞を、標準的な磁気関連細胞選別(MACS)法(Exleyら、2010 Curr Protoc Immunol, Chapter 14, Unit 14:11)により富化した。簡単に述べると、NKT細胞を、V α 24-J β 18 iNKTマーカー(Miltenyi Biotec)に対するMACSマイクロビーズと共にインキュベートした。冷PBS中で細胞懸濁液を2回洗浄することにより、過剰のマイクロビーズを除去した。次いで、細胞懸濁液をMACSカラムに通過させ、富化されたNKT細胞を含有する陽性画分を保持した。陰性画分からの細胞は、単球および樹状細胞などのCD1d陽性細胞を含有してもよく、富化されたNKT細胞を刺激するための供給体として用いることができる。最初に、供給細胞を、有糸分裂の阻害剤であるマイトマイシンCで、37°Cで30min処理した。次いで、これらの細胞を組織培養培地で数回洗浄した後、100ng/mLの最終濃度で α -GalCerを充填し、96穴丸底プレート中、 1×10^4 個のNKT細胞/ウェルと共に1:1の比で同時培養した。37°Cおよび5%CO₂で16時間インキュベートした後、IL-2を10ng/mLの最終濃度で培地に添加した。細胞を約14日間培養させた。NKT細胞集団の純度を、蛍光色素コンジュゲート化CD1d四量体(ProImmune)、蛍光色素コンジュゲート化抗V α 24J β 18(Miltenyi Biotec)および蛍光色素コンジュゲート化抗CD3(BD Biosciences)を用いる、多パラメータフローサイトメトリーにより決定した。細胞に基づくアッセイにおける使用のための好適なNKT集団の純度は、常法に従って、フローサイトメトリー分析により70%を超えるNKT細胞であった。

【0198】

アッセイ方法

別途記述しない限り、全ての一次細胞に基づくアッセイを、37°Cおよび5%CO₂で行った。THP-1細胞を、 2×10^4 細胞/ウェルの濃度で96穴平底プレート中に分配した。10分後、 α -GalCerを、100ng/mLの最終濃度で細胞上に充填した。 α -GalCerの添加後45分で、抗CD1d阻害抗体を、10 μ g/mLから減少する濃度で添加した。次いで、抗体の添加の30分後、NKT細胞をウェルあたり 2×10^4 個の細胞で添加した。無細胞培養上清を、インキュベーション後24時間で回収した。ヒトサイトカインに関するELISAを、培養上清上で実施した:ヒトIFN- γ 、IL-4、IL-5およびIL-13(全てR&D Systems)。

【0199】

一次NKT細胞を用いる機能的アッセイの結果

抗CD1d抗体401.1、401.9、401.11、401.12、401.14および402.8を、このアッセイにおいて試験した。無関係の特異性の陰性対照抗体(ヒトIgG1)を、陰性対照として用いた。抗体42および51.1を、陽性対照として用いた。実施例4に記載のIL-2細胞系アッセイの結果と同様、抗体401.11および402.8のみが、細胞CD1dの文脈で一次ヒトNKT細胞による糖脂質抗原に誘導されたサイトカイン放出の強力な阻害を示した(図4およびTable 4(表4); IFN- γ アッセイのEC50値を参照されたい)。比較により、陰性対照抗体は、無視できる程度の阻害を示した。抗体42は、高用量(10 μ g/mL)でNKT細胞によるサイトカイン放出の阻害を示したが、この効果は、より低濃度では持続しなかった(図4)。抗体42は、in vitroではNKT細胞活性の強力な中和因子であると考えられ、そのようなものとして広く公開されている(Exley, M.ら、1997, J. Exp. Med. 186:109~120頁; WO03/092615)。抗体42と比較して、抗体401.11および402.8は、それぞれ最大で114倍および最大で180倍改善された効力を示した。

【0200】

非不死化ヒト細胞上に存在するCD1dに対する抗体401.11および402.8の阻害効力を確立するために、一次ヒト単球由来樹状細胞を用いる機能的アッセイを開発した。CD1d抗原を発現する細胞の割合を拡張し、それによって、CD1d応答性NKT細胞への抗原提示のレベルを増加させることにより、アッセイの動的範囲を増加させることができる。標準的なプロトコルに従って、CD14+細胞の磁気活性化細胞選別(MACS)単離ならびにGM-CSFおよびIL-4中でのこれらの細胞の培養により、単球をPBMCから単離した。樹状細胞を 2×10^4 個の細胞/ウェルで96穴平底プレート中で培養し、100ng/mLでGalCerを1h充填した。阻害抗体を1h培養物に添加した後、樹状細胞と共に1:1の比で拡張されたNKT細胞を添加した。24時間後、無細胞上清を、IFN- γ 、IL-4、IL-5およびIL-13放出についてアッセイした。抗CD1d抗体401.11および402.8を、このアッセイにおいて試験した;無関係の特異性のヒトIgG1を陰性対照として使用し、抗体42(BD Biosciences)および51.1(eBioscience)を陽性対照として使用した。抗体401.11および402.8のみが、この一次細胞に基づくアッセイにおける一次ヒトNKT細胞による糖脂質抗原誘導性サイトカイン放出の強力な阻害を示した(図5およびTable 5(表5))。比較して、陰性対照抗体は、無視できる程度の阻害を示した。抗CD1d抗体42および51.1は、高用量(10 μ g/mL)ではNKT細胞によるサイトカイン放出のいくらかの阻害を示したが、この効果はより低用量では持続しなかった。抗体42と比較して、抗体401.11および402.8は、それぞれ、最大で200倍および最大で50倍改善された効力を示した(図5およびTable 5(表5);IFN- γ アッセイのEC50値を参照されたい)。抗体51.1と比較して、抗体401.11および402.8は、有意に改善された効力を示した。従って、この結果は、抗CD1d抗体が、CD1d抗原を天然に発現するヒト体細胞の文脈において強力な中和活性を示すことを実証している。

10

20

【0201】

まとめると、完全ヒト抗CD1d抗体402.8および401.11が同定され、NKT細胞活性の非常に強力な阻害を示した。これらの抗体は、抗CD1d抗体42および51.1と比較した場合、100倍改善された効力を示した。

【0202】

【表4】

Table 4:EC50 値・THP-1 細胞系を用いる一次 NKT 細胞系アッセイ

抗体名	IFN- γ EC50 (ng/mL)	IL-4 EC50 (ng/mL)	IL-5 EC50 (ng/mL)	IL-13 EC50 (ng/mL)
401.11	3.8	1.9	1.7	2.5
402.8	2.4	1.7	1.2	1.5
42	429.1	76.1	64.7	153.8
陰性対照	無視できる程度の 阻害	無視できる程 度の阻害	無視できる程 度の阻害	無視できる程度 の阻害

30

40

【0203】

【表5】

Table 5: EC50 値-一次 CD14+細胞を用いる一次 NKT 細胞系アッセイ

抗体名	IFN- γ EC50 (ng/mL)	IL-4 EC50 (ng/mL)	IL-5 EC50 (ng/mL)	IL-13 EC50 (ng/mL)
401.11	6.8	5.9	6.2	12.1
402.8	28.6	4.0	6.9	39.9
51.1	168.2	DNI	DNI	221.7
42	1388.0	185.7	108.4	844.0
陰性対照	無視できる程度の阻害	無視できる程度の阻害	無視できる程度の阻害	無視できる程度の阻害

DNI-阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には 1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった。

【0204】

抗体401.11および402.8のVHおよびVLドメインの配列は以下の通りである：

401.11 VH 配列番号1
 401.11 VL 配列番号2
 402.8 VH 配列番号3
 402.8 VL 配列番号4

【0205】

(実施例7)

402.8および401.11はCD1d上の共通のエピトープを共有する

上記の結果に示されるように、ファージ展示キャンペーンは、先行技術の抗CD1d抗体と比較して優れた生物学的効力を示す抗CD1d抗体401.11および402.8を作製した。この有意に改善された効力は、抗CD1d抗体が結合すると、CD1d分子と、その同族受容体、例えば、NKT細胞上に存在するNKT細胞受容体との相互作用を防止する非常に中和的なエピトープの認識に起因するものであると仮定された。従って、CD1dとこの相互作用の遮断は、NKT細胞の活性化および前炎症性サイトカインの放出などの下流の生物学的効果を阻害するのに必要十分であった。作製された非常に強力な抗CD1d抗体が、中和的抗CD1d抗体と比較して異なるエピトープ特異性を有するかどうかを調査するために、競合結合ELISAを開発した。

【0206】

アッセイ方法

抗CD1d抗体402.8を、3:1の比のビオチン:402.8でEZ-link Sulfo-NHS-LC-ビオチンキット(Pierce)を用いてビオチン化した。PBSを用いる複数回の洗浄および30kDaカットオフを有する遠心分離フィルターユニット(Millipore)を介する遠心分離(3000rpm)による濃縮により、タンパク質調製物から遊離ビオチンを除去した。Maxisorp ELISAプレート(Nunc)を、0.5 μ g/mLヒトCD1dで被覆し、4 \times で一晩インキュベートさせた。次いで、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回、プレートを洗浄した後、プレートを室温で1h、1%BSA中で遮断した。次いで、ビオチン化された402.8を、1:1の比で非ビオチン化抗CD1d抗体(402.8、401.11、42および51.1)と5分間同時平衡化させた。これらの抗体を、50 μ g/mLから減少する濃度で(すなわち、0.1 μ g/mLのビオチン化された402.8と比較して最大で500倍過剰)、室温で1h、プレートに添加した。次いで、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回、プレートを洗浄した。暗室中、室温で1h、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲ

10

20

30

40

50

ート(BD Biosciences)をプレートに添加した。プレートを洗浄して、未結合のストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを除去した。50 μ Lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KPL)と共にインキュベートすることによりアッセイシグナルを生じさせ、50 μ Lの1M HClでクエンチした。マイクロプレートリーダー(FluoStar Galaxy)を用いてA450nmでアッセイシグナルを読み取った。結果を、生のA450nm値として表し、生データから、0パーセントの阻害に対応する読み取り値を差し引くことにより競合度(パーセンテージ)の値に変換した。

【0207】

上記の方法を用いて、401.11および402.8は、450nmでの吸光度の値(図6A)および402.8との競合度(図6B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について互いに競合し、従って、重複するか、または共通のエピトープを共有することが示された。対照的に、402.8は、42または51.1のいずれかと重複するか、または共通のエピトープを共有しない。総合すると、これらのデータは、非常に強力な抗CD1d抗体401.11および402.8が、抗CD1d抗体42および51.1によって共有されない類似する高親和性中和エピトープに結合することを示している。

【0208】

(実施例8)

カニクイザルCD1dとの交差反応性

抗CD1d抗体401.11および402.8を、実施例1に記載のアッセイの改変型を用いるELISAによりカニクイザルCD1dへの結合について試験した。Maxisorp ELISAプレート(Nunc)を、1 μ g/mLのヒトまたはカニクイザルCD1dで被覆し、4 で一晩インキュベートさせた。次いで、プレートを、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回洗浄した後、室温で1h、1%BSA中でプレートを遮断した。次いで、プレートを、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回洗浄した。次いで、抗CD1d抗体を、10 μ g/mLから減少する濃度で添加した。次いで、プレートを、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回洗浄した。結合した抗体の検出を、HRPコンジュゲート化Fc特異的抗体(Sigma)を用いて可能にした。次いで、プレートを、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回洗浄して、未結合の西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化抗Fcを除去した。50 μ Lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KPL)と共にインキュベートすることによりアッセイシグナルを生じさせ、50 μ Lの1M HClでクエンチした。マイクロプレートリーダー(FluoStar Galaxy)を用いてA450nmでアッセイシグナルを読み取った。その結果は、抗体401.11および402.8が、ヒトCD1dに結合し(図7A)、またカニクイザルCD1dと交差反応する(図7B)ことを示している。非ヒト霊長類CD1dとの交差反応性は、ヒト疾患の非ヒト霊長類モデルにおける試験を可能にするために望ましい。

【0209】

(実施例9)

カニクイザルCD1dとの細胞に基づく交差反応性

細胞に基づく形式で非ヒト霊長類CD1dとの交差反応性を実証するために、ヒトおよびカニクイザルのPBMCを、交差反応性抗CD1d抗体402.8を用いて染色した。この抗体を、実施例8に記載のように3:1倍の比のビオチンとIgGでビオチン化した。陰性対照抗体(ヒトIgG1)を同様の様式でビオチン化した。結合したビオチン化抗CD1d抗体の検出を、細胞をフィコエリトリンコンジュゲート化ストレプトアビジンと共にインキュベートすることにより達成した。抗CD1d抗体は、ヒト(図3)およびカニクイザル種(図8)の両方においてCD1d陽性一次単球由来DCに結合した。これらの結果は、402.8が細胞に基づく文脈におけるヒトおよびカニクイザルの交差反応性を示し、ヒト疾患の非ヒト霊長類モデルにおける試験にとって重要であることを示している。

【0210】

(実施例10)

カニクイザルCD1d媒介性一次NKT機能の細胞に基づく機能的阻害

細胞に基づく効力アッセイのために、カニクイザルPBMCに、0日目で GalCer(100ng/mL)を、抗CD1d抗体と共に、またはそれを用いずに充填した。培養物を、37 、5%CO₂で加湿

10

20

30

40

50

インキュベータ中、24穴プレート中で調製した。7日目に、IL-2(10U/mL)を7日目に添加し、培養物を、さらに96時間、37℃、5%CO₂でインキュベートさせた。最終的な読み取りは、抗CD3および抗T細胞受容体V α 24抗体(BD Biosciences)を用いるNKT細胞の列挙であった。抗CD1d抗体の非存在下で、またはアソタイプ対照抗体を添加して、NKT細胞はGalCerの存在下で約10倍拡張した。抗CD1d抗体401.11および402.8は、抗体を用いないか、またはヒトIgG陰性対照抗体を用いる培養物の処理と比較して、CD1d拘束性カニクイザルNKT細胞のGalCerにより媒介される拡張を強力に阻害した(図9)。

【0211】

(実施例11)

401.11および402.8の最適化変異体

401.11および402.8抗体を、その効力に対する無視できる程度または正の影響を有しながら、抗体の生物物理学的特性に対する正の効果を得ることを目的として抗体の配列に対する変更を介してさらに最適化することができる。第1に、抗体の発現レベルを増強し、同時に生成レベルを増加させる変更が望ましい。第2に、アミノ酸置換による、溶媒に露出したシステイン残基またはN結合グリコシル化部位などの潜在的に望ましくない配列特性の除去は、潜在的な生成物異種性を低下させ、これらの抗体をさらに増強することができる。第3に、精製または保存の間の酸化または異性化により抗体の安定性に影響する可能性を有するアミノ酸残基の置換を、そのような転移を受けないアミノ酸と置き換えて(Wangら、2007 Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1~26頁)、これらの抗体をさらに改善することができる。最後に、免疫原性に潜在的に寄与し得る稀な、または非生殖系列401.11および402.8のアミノ酸残基を、予測される免疫原性を低下させることを目的として他のアミノ酸と置換し、これらの抗体をさらに改善することができる。以下は、抗体401.11および402.8に関するこれらの最適化戦略の実施を記載する。

【0212】

抗体401.11の増強

401.11の可変重鎖および軽鎖配列を、MegAlign(DNAstar)により対応するヒト生殖系列配列と比較した。最も相同な生殖系列重鎖可変領域(IGHV3-9*01)は、7つのフレームワークアミノ酸で401.11と異なっていた。IGKV1-12*01は、401.11の軽鎖と最も高い配列相同性を共有し、2つのフレームワークアミノ酸で異なっていた(図12)。この情報を用いて、対応する生殖系列フレームワーク残基で置換されたフレームワーク残基を含有する401.11変異体のパネルを作製した(図12)。

【0213】

抗体401.11および401.11.15~401.11.28(図12)を、HEK-293E細胞中への重鎖および軽鎖の同時トランスフェクションにより生成した。SPR(Biacore)を用いて、平衡解離定数(KD)により測定された場合のそれぞれの抗体の相対発現レベルおよびヒトCD1dへのその対応する結合を測定した。得られたデータを、Table 6(表6)に提示する。

【0214】

10

20

30

【表6】

Table 6

IgG	発現レベル (プロテイン A 捕捉) SPR	KD (pM)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	DNE	N/A	3.754	0.857
401.11.14	144	791	N/D	N/D
401.11.15	44	507	N/D	N/D
401.11.16	150	DNB	N/D	N/D
401.11.17	DNE	N/A	N/D	N/D
401.11.18	185	9970	N/D	N/D
401.11.19	385	667	N/D	N/D
401.11.20	109	977	N/D	N/D
401.11.21	534	951	N/D	N/D
401.11.22	553	754	N/D	N/D
401.11.23	227	1980	N/D	N/D
401.11.24	359	644	4.263	0.360
401.11.25	292	932	N/D	N/D
401.11.26	358	855	3.245	1.304
401.11.27	23	DNB	N/D	N/D
401.11.28	176	722	1.417	0.294

注記:DNE・発現しなかった;DNB・結合しなかった;N/D・決定せず;THP-1・抗原提示細胞として用いた THP-1 細胞;moDC・抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。データは3回の独立した実験の代表である。

【0215】

この実験で試験した15の抗体のうち13が、トランスフェクトされたHEK-293E細胞の上清中に測定可能なレベルの抗体を有していた。これらの13の抗体のうち10が、1nM未満の平衡解離定数(KD)でCD1dに結合した(Table 6(表6))。

【0216】

抗体401.11、401.11.24、401.11.26および401.11.28を作製し、細胞に基づく効力アッセイを用いてCD1d媒介性NKT細胞サイトカイン放出の機能的阻害について試験した(Table 6(表6))。抗体401.11.24、401.11.26および401.11.28は、THP-1細胞または一次CD14+樹状細胞をCD1d陽性抗原提示細胞(APC)として用いた場合、401.11と比較して同様か、または改善された効力を示した。

【0217】

401.11重鎖のCDR3の位置97から(100B)までは、配列CSSSGCからなる。CDR3中に存在するシステインの役割を決定するために、それぞれのシステインを、アミノ酸の異なるクラスの側鎖を表す9個のアミノ酸のうちの1個で置換した(Rajpalら、PNAS 2005 102: 8466~8471頁)。HEK293E細胞中へのトランスフェクション後、これらの変異体のいずれについても抗体発現は検出されず、SPRにより測定した場合、CD1dへの検出可能な結合をもたらさなかった。両システインのセリン残基への置換(401.11.164)により、抗体の発現が得られたが、401.11と比較して低い親和性でヒトCD1dに結合し、これは、401.11の重鎖のCDR3のシステインが抗体発現およびCD1dへの高親和性結合にとって望ましいことを示唆している(Table 7(表7))。

【0218】

【表 7】

Table 7

IgG	可変重鎖に おける 401.11 から の置換	軽鎖	KD (M)
401.11 WT	N/A	401.11	9.97 E-10
モック	N/A	401.11	N/D
401.11.51	C97S	401.11	N/D
401.11.52	C97T	401.11	N/D
401.11.53	C97G	401.11	N/D
401.11.54	C97L	401.11	N/D
401.11.55	C97V	401.11	N/D
401.11.56	C97K	401.11	N/D
401.11.57	C97Y	401.11	N/D
401.11.58	C97R	401.11	N/D
401.11.59	C97H	401.11	N/D
401.11.92	C(100B)S	401.11	N/D
401.11.93	C(100B)T	401.11	N/D
401.11.94	C(100B)G	401.11	N/D
401.11.95	C(100B)L	401.11	N/D
401.11.96	C(100B)V	401.11	N/D
401.11.97	C(100B)K	401.11	N/D
401.11.98	C(100B)Y	401.11	N/D
401.11.99	C(100B)R	401.11	N/D
401.11.100	C(100B)H	401.11	N/D
401.11.164	C97S および C(100B)S	N45K	6.56E-08

N/D-決定せず

10

20

30

【 0 2 1 9 】

401.11の重鎖CDR3配列をさらなる変異のために標的化して、401.11の発現レベルおよび親和性を改善することを試みた。この分析のために、401.11の重鎖のCDR3中のそれぞれのアミノ酸を、異なるクラスのアミノ酸の側鎖を表す9個のアミノ酸のうちの1個で置換した。それぞれの得られた抗体の発現レベルおよびCD1dへのその結合を、Table 8(表8)およびTable 9(表9)に示す。

【 0 2 2 0 】

【表 8】

Table 8

IgG	VH における置換	発現レベル	KD (M)
401.11	N/A	36	<0.1E-10*
モック	N/A	-8	DNB
401.11.36	D95K	DNE	N/A
401.11.37	D95R	DNE	N/A
401.11.38	D95S	105	DNB
401.11.39	D95G	34	N/A
401.11.40	D95L	DNE	N/A
401.11.41	D95Y	DNE	N/A
401.11.42	D95F	DNE	N/A
401.11.43	D95Q	DNE	N/A
401.11.44	M96K	85	4.31E-10
401.11.45	M96R	63	2.49E-10
401.11.46	M96F	DNE	3.03E-10
401.11.47	M96Y	DNE	N/A
401.11.48	M96Q	DNE	N/A
401.11.49	M96S	47	4.01E-10
401.11.50	M96G	29	1.87E-10
401.11.60	S98D	DNE	N/A
401.11.61	S98T	57.85	2.42E-18
401.11.62	S98W	DNE	N/A
401.11.63	S98L	23.76	1.89E-10
401.11.64	S98V	84.5	2.30E-10
401.11.65	S98K	38.36	1.67E-09
401.11.66	S98R	75.87	1.56E-10
401.11.67	S98Y	DNE	4.85E-11
401.11.68	S98G	84.81	1.17E-09
401.11.69	S99D	57.92	1.44E-10
401.11.70	S99T	20.14	5.49E-10
401.11.71	S99W	63.04	<0.1E-10*
401.11.72	S99L	11.43	6.49E-10
401.11.73	S99V	61.56	5.27E-10
401.11.74	S99K	56.91	9.33E-11
401.11.75	S99R	14.06	DNB
401.11.76	S99Y	DNE	N/A
401.11.77	S99G	20.18	2.72E-10
401.11.78	S99D	DNE	N/A
401.11.79	S100T	16.81	DNB
401.11.80	S100W	29.03	2.34E-09
401.11.81	S100L	24.65	5.52E-10
401.11.82	S100V	20.35	DNB
401.11.83	S100K	45.84	1.55E-09
401.11.84	S100R	51.11	1.12E-09
401.11.85	S100Y	9.87	8.23E-08

Kabat による残基番号付け。<0.1E-10*は、構築物の KD が検出限界未満であったことを示す。DNE・発現しなかった(10RU 未満);DNB・結合しなかった;N/A・適用せず

【表 9】

Table 9

IgG	VH における置換	発現レベル	KD (M)
401.11	N/A	103	1.75E-10
モック	N/A	3	DNB
401.11.86	S100G	337	1.39E-10
401.11.87	G(100A)S	24	7.13E-09
401.11.88	G(100A)A	103	1.89E-09
401.11.89	G(100A)D	40	5.30E-09
401.11.90	G(100A)K	21	<0.1E-10*
401.11.101	P(100C)S	95	<0.1E-10*
401.11.102	P(100C)T	130	4.57E-10
401.11.103	P(100C)G	115	<0.1E-10*
401.11.104	P(100C)L	44	4.87E-10
401.11.105	P(100C)F	34	1.52E-03
401.11.106	P(100C)K	64	1.93
401.11.107	P(100C)Y	38	9.96E-10
401.11.108	P(100C)R	49	<0.1E-10*
401.11.109	P(100C)W	16	DNB
401.11.110	D(100D)K	59	2.47E-10
401.11.111	D(100D)R	19	<0.1E-10*
401.11.112	D(100D)S	95	2.43E-09
401.11.113	D(100D)G	59	6.79E-10
401.11.114	D(100D)L	121	1509.04
401.11.115	D(100D)Y	86	6.67E-10
401.11.116	D(100D)F	96	3.77E-08
401.11.117	D(100D)Q	164	1.33E-09
401.11.118	G(100E)S	68	<0.1E-10*
401.11.119	G(100E)A	24	8.77E-10
401.11.120	G(100E)V	DNE	N/A
401.11.121	G(100E)D	DNE	N/A
401.11.122	G(100E)K	30	1.30E-10
401.11.123	G(100E)R	22	2.39E-10
401.11.124	Y(100F)W	DNE	1.38E-09
401.11.125	Y(100F)F	33	5.35E-10
401.11.126	Y(100F)S	38	3.13E-11
401.11.127	Y(100F)Q	26	2.70E-09
401.11.128	Y(100F)E	DNE	N/A
401.11.129	Y(100F)R	DNE	N/A
401.11.130	Y(100F)K	DNE	N/A
401.11.131	S102D	38	2.00E-10
401.11.132	S102T	55	5.69E-10
401.11.133	S102W	53	1.67E-10
401.11.134	S102L	73	5.32E-10
401.11.135	S102V	85	4.21E-10
401.11.136	S102K	22	<0.1E-10*
401.11.137	S102R	49	9.38E-10
401.11.138	S102Y	48	1.71E-10
401.11.139	S102G	44	5.94E-10

Kabat による残基番号付け。<0.1E-10*は、構築物の KD が機械の検出限界未満であったことを示す。DNE-発現しなかった(10RU 未満);DNB-結合しなかった;N/A-適用せず

抗体401.11.86は、3倍を超えるレベルの401.11を発現し、401.11と比較してより高いCD1dに対する親和性を有していた。この抗体を精製し、細胞に基づく効力アッセイを用いてCD1d媒介性NKT細胞サイトカイン放出の機能的阻害について試験した(Table 10(表10))。このアッセイは、CD1d陽性抗原提示細胞および GalCer 拡張NKT細胞の起源として一次ヒト単球由来樹状細胞またはTHP-1細胞を用いた。プロトコルは実施例6に記載された通りであった。

【0223】

【表10】

Table 10

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL)(THP-1)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL)(THP-1)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	3.754	0.857	2.885	6.862
401.11.86	1.289	0.359	0.509	1.74

注記:THP-1-抗原提示細胞として用いた THP-1 細胞;moDC-抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。データは5回の独立した実験の代表である。

【0224】

位置100のセリンからグリシンへの置換によって401.11とは異なる401.11.86は、401.11と比較してより強力であった。次いで、上記の最も強力な抗体から同定された置換を含む抗体を作製した(図13)。

【0225】

401.11の可変重鎖配列のアミノ酸分析により、酸化または異性化を受ける可能性があるいくつかのアミノ酸が同定された。これらのアミノ酸への任意の変化は、時間と共に、抗体の結合プロフィールに影響し得るため、抗体のCDR配列中に存在するアミノ酸上に特定の強調が置かれた。可変重鎖において、M96が潜在的な酸化部位として同定され、D(100D)が潜在的な異性化部位として同定された。半保存的または保存的アミノ酸置換を、これらの潜在的に問題となるアミノ酸残基を除去する試みにおいて用いた(図13)。得られる抗体の結合親和性に対するこれらの置換の影響を、Table 11(表11)に示す。

【0226】

10

20

30

【表 1 1】

Table 11

抗体	親和性 K_D (μM) SPR
401.11	752
401.11.151	1750
401.11.152	2830
401.11.154	1770
401.11.155	2420
401.11.156	223
401.11.157	173
401.11.158	189
401.11.159	30
401.11.160	109
401.11.161	255
401.11.165	168
401.11.166	173
401.11.167	170
401.11.177	507
401.11.178	468
401.11.179	274
401.11.180	312
401.11.181	427

10

20

【 0 2 2 7 】

試験した抗体の多くは、元の抗体401.11と比較して改善された親和性を有していた。次いで、これらの抗体を、CD1d媒介性NKT細胞サイトカイン放出の機能的阻害を測定する細胞に基づく効力アッセイにおいて試験した。プロトコルは、実施例6に記載の通りであった。試験した19の抗体のうち、14の抗体が、401.11抗体と比較して類似するか、または改善された効力を一貫して示した。これらの抗体変異体は、抗CD1d抗体42および51.1と比較して有意に改善された効力を有し、その両方とも、10 $\mu g/mL$ の最も高い濃度でいくらかの阻害活性を示したが、より低い抗体濃度では阻害を示すことができなかった。代表的な実験からのEC50値を、以下のTable 12~16(表12~16)に提示する。

30

【 0 2 2 8 】

【表 1 2】

Table 12

抗体	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	7.633	6.545	22.75	19.55
401.11.151	12.89	N/D	57.49	N/D
401.11.152	10.2	N/D	78.49	N/D
401.11.154	4.159	N/D	17.73	N/D
401.11.155	27.64	N/D	74.72	N/D
401.11.156	1.948	N/D	5.217	N/D
401.11.157	N/D	0.799	N/D	3.871
401.11.158	N/D	0.58	N/D	3.844
401.11.159	N/D	1.694	N/D	10.47
401.11.160	N/D	1.564	N/D	6.519
401.11.161	N/D	5.244	N/D	8.381
陰性対照	DNI	DNI	DNI	DNI

N/D・決定せず;陰性対照・無関係の特異性の IgG1:moDC・抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞;DNI・阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には 1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった。

【 0 2 2 9】

【表 1 3】

Table 13

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-5 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT TNF EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	39.38	17.33	47.48	83.08	16.91
401.11.156	7.763	2.716	5.856	9.528	4.507
401.11.157	9.112	3.437	8.492	20.6	5.589
401.11.158	8.165	2.187	6.13	9.823	4.3
42	>1000	136.9	286.5	DNI	DNI
51.1	>1000	DNI	DNI	DNI	DNI

注記:moDC・抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞;DNI・阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には 1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった。

【 0 2 3 0】

【表 1 4】

Table 14

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-5 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL- 13 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT TNF EC50 (ng/mL) (THP-1)
401.11	55.16	2.977	6.961	27.25	9.179
401.11.156	5.811	1.993	4.446	6.909	3.846
401.11.157	5.449	1.807	4.476	6.98	3.545
401.11.158	6.404	2.662	4.502	7.776	4.141
401.11.165	6.153	1.112	3.730	5.762	3.043
401.11.166	6.983	2.745	5.379	7.253	4.022
401.11.167	6.510	2.889	4.979	7.465	4.000
アイソタイプ対 照	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI

注記:アイソタイプ対照-無関係の特異性の IgG4;DNI-阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には、1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった ;THP-1-抗原提示細胞として用いた THP-1 細胞;moDC-抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。

10

20

【 0 2 3 1】

【表 1 5】

Table 15

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-5 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)
401.11	12.44	1.98	2.251	2.361
401.11.158	2.797	0.4322	0.7043	0.5981
401.11.177	7.556	0.7306	1.398	1.271
401.11.178	15.06	0.9685	1.381	1.764
401.11.179	30.2	0.7301	2.097	2.431
401.11.180	49.55	1.312	3.353	4.092
42	DNI	DNI	DNI	DNI
51.1	DNI	DNI	DNI	DNI
アイソタイプ対照	DNI	DNI	DNI	DNI

注記:アイソタイプ対照-無関係の特異性の IgG4;DNI-阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には、1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった ;THP-1-抗原提示細胞として用いた THP-1 細胞;moDC-抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。

30

40

【 0 2 3 2】

【表 16】

Table 16

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (THP-1)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (THP-1)
401.11	23.5	2.335	12.83	1.36	3.286
401.11.158	3.004	2.602	1.160	2.203	4.354
401.11.181	2.634	3.255	1.102	3.195	5.04
42	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI
51.1	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI
アイソタイプ 対照	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI

注記:アイソタイプ対照-無関係の特異性の IgG4;DNI-阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には、1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった;THP-1-抗原提示細胞として用いた THP-1 細胞;moDC-抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。

【0233】

抗原提示細胞としてCD14+単球由来樹状細胞を用いる一次NKT細胞に基づく効力アッセイにおいて、401.11から誘導された抗体は、親抗体401.11と比較して改善された阻害活性を示した。これは、401.11から誘導された抗体がNKT細胞媒介性サイトカイン放出の同じ阻害を達成するためにより低濃度を必要とした、阻害曲線の左側へのシフトにより明確に示される(図14)。例えば、1 μ g/mLから滴定された、抗体401.11.156および401.11.158は、1 μ g/mLから滴定された、401.11と比較して、それぞれ約5.1倍の改善および4.8倍の改善を示した(図14およびTable 13(表13)、IFN- γ のEC50値を参照されたい)。いくつかの実験において、抗CD1d抗体42および51.1は、真のEC50値を算出することができないような最少の阻害を示した。EC50値を決定することができる実験において、1 μ g/mLから滴定された、401.11から誘導された抗体は、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、有意に改善された効力を示した。これらの抗体は、10 μ g/mLの最も高い濃度では阻害活性を示したが、より低い抗体濃度では阻害を示すことができなかった(図14およびTable 13(表13);IFN- γ のEC50値を参照されたい)。

【0234】

まとめると、401.11から誘導された完全ヒト最適化抗CD1d抗体が同定され、CD1d抗原を天然に発現する一次ヒト細胞の文脈においてNKT細胞活性の非常に強力な阻害を示した。これらの抗体は、抗CD1d抗体42および51.1と比較して、有意に改善された効力を示した。

【0235】

402.8抗体の最適化

402.8の可変重鎖および軽鎖配列のアミノ酸分析により、重鎖中に存在する酸化、異性化または脱アミド化(deamidation)を受ける可能性があるいくつかのアミノ酸が同定された(Wangら、2007 Journal of Pharmaceutical Sciences 96:1~26頁)。これらのものは、重鎖中のN(100B)に潜在的な脱アミド化部位、D101に潜在的な異性化部位ならびにW(100A)およびM(100E)に潜在的な酸化部位を含む。重鎖中のN52で潜在的なN結合グリコシル化部位が同定された。潜在的な脱アミド化、酸化および異性化部位を除去するために、アミノ酸置換:W(100A)Y、N(100B)K、M(100E)L、D(101)Eを作製した。N結合グリコシル化モチーフNX(S/T)(式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である)を破壊するN54Aを導入することにより、潜在的なN結合グリコシル化部位を除去した。図15に示される可変重鎖中でのこれらのアミノ酸置換の組合せを用いて抗体を作製した。それぞれの抗体重鎖を、HEK-293E細胞中に402.8軽鎖(配列番号4)で同時トランスフェクトし、プロテインAクロマトグラフィーにより精製し、SPRを用いてそれぞれの抗体の親和性を測定した(Table 17(表17))

。次いで、これらの抗体を、一次ヒト単球由来樹状細胞および自己 GalCer 拡張NKT細胞を用いて細胞に基づく効力アッセイにおいて試験した (Table 18(表18)およびTable 19(表19))。

【 0 2 3 6 】

【表 1 7 】

Table 17

IgG	K _D (pM)
402.8	145
402.8.53	578
402.8.54	870
402.8.55	878
402.8.60	198
402.8.84	587
402.8.86	357
402.8.87	344

10

【 0 2 3 7 】

【表 1 8 】

Table 18

IgG	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-13 EC50 (ng/mL) (moDC)
402.8	0.105	0.154
402.8.53	0.658	1.524
402.8.60	0.244	0.189
402.8.84	0.516	0.663
42	116.0	17.54
陰性対照	DNI	DNI

20

注記:陰性対照・無関係の特異性の IgG1;DNI・阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には、1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった;THP-1-抗原提示細胞として用いた THP-1 細胞;moDC-抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。

30

【 0 2 3 8 】

【表 19】

Table 19

抗体	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IFN- γ EC50 (ng/mL) (moDC)	NKT IL-4 EC50 (ng/mL) (moDC)
402.8	14.96	22.45	4.358	0.273
402.8.53	277.2	105.4	ND	ND
402.8.54	137.6	109.1	ND	ND
402.8.55	444.6	175	ND	ND
402.8.60	24.68	26.8	ND	ND
402.8.84	ND	ND	30.64	0.593
402.8.86	ND	ND	14.31	0.721
402.8.87	ND	ND	25.91	1.008
42	DNI	DNI	DNI	DNI
51.1	DNI	DNI	DNI	DNI
陰性対照	DNI	DNI	ND	ND

注記:陰性対照-無関係の特異性の IgG1;DNI-阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には、1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった; moDC-抗原提示細胞として用いた一次単球由来樹状細胞。

【0239】

402.8から誘導されたこれらの変異体抗体は、一次NKT細胞による GalCer媒介性サイトカイン放出の強力な阻害を示した。NKT細胞誘導性サイトカイン放出の用量依存的阻害により決定した場合、いくつかの変異体抗体は402.8と比較して低下した効力を示したが、他の抗体は類似する効力を保持していた。いくつかの実験において、抗CD1d抗体42および51.1は、真のEC50値を算出することができないような最少の阻害を示した(Table 19(表19))。EC50値を決定することができる実験においては、402.8から誘導された抗体は、抗CD1d抗体42と比較して有意に改善された効力のものであり、10 μ g/mLの最も高い濃度でいくつかの阻害活性を示したが、より低い抗体濃度では阻害活性を保持していなかった(図16およびTable 18(表18))。従って、この結果は、親抗体402.8に基づく最適化された抗CD1d抗体が、抗CD1d抗体42および51.1と比較して強力な中和活性およびCD1d抗原を天然に発現する一次ヒト細胞の文脈における402.8と比較して類似する中和活性の有意な改善を示した。

【0240】

(実施例12)

- ガラクトシルセラミドに対する代替抗原を用いる一次NKT細胞に基づくアッセイにおける抗CD1d抗体の効果の試験

実施例6に記載の細胞に基づく効力アッセイは、糖脂質抗原として GalCerを用いた。抗CD1d抗体が GalCerに対する代替的な糖脂質抗原の文脈における阻害活性を有することを実証することは、そのような非常に強力な中和抗CD1d抗体が、脂質および/または糖脂質を提示することができる領域から遠い位置でCD1dに結合するという概念を支持する。天然に見出されるCD1d拘束性脂質および糖脂質抗原は、化学的構造に関して GalCerとは異なっているにもかかわらず、結果として、本発明で記載される抗CD1d抗体が異なる化学構造を有する糖脂質抗原の文脈における阻害活性を保持することを実証することが有用であり得る。さらに、潜在的な自己抗原、すなわち、哺乳動物の文脈で見出されるものの阻害活性を特性評価することが有用である。

【0241】

ヒトNKT細胞に対する活性を有するいくつかの糖脂質抗原のみが特性評価された。これ

らのものは、iGb3およびリゾホスファチジルコリンを含むが、そのような抗原はNKT細胞の弱い活性化のみを有する。内因性脂質、 α -D-グルコピラノシルセラミドのC24:1 N-アシル変異体(以後、C24:1 α -GluCerとして知られる)は、ヒトNKT細胞に対する活性を有すると記載された。GalCerに対するこの代替抗原の文脈における特許で守られた抗CD1d抗体の阻害活性を特性評価するために、細胞に基づく効力アッセイが開発された(Brennan, P. J.ら、2011 Nat Immunol 12:1202~1211頁)。

【0242】

アッセイ方法および結果

α -D-グルコピラノシルセラミドのC24:1 N-アシル変異体(Avanti; α -D-グルコシル- β -1,1'-N-(15Z-テトラコセノイル)-D-エリスロ-スフィンゴシンN-(15Z-テトラコセノイル)-1- α -グルコシル-スフィンガ-4エン)を、37℃で2時間、5mg/mLでDMSO中に溶解した後、小アリコート中で保存した。

10

【0243】

C24:1 α -GluCerを用いる細胞に基づく効力アッセイを実施するために、実施例6に記載のようにNKT細胞をGalCerを用いて拡張した。GalCerの存在下で刺激されるにもかかわらず、これらのNKT細胞は、C24:1 α -GluCerに対する機能的活性を保持したが、これは、作製されたNKT細胞系のTCR特異性がヒトCD1dの文脈におけるC24:1 α -GluCer認識に対しても許容性であることを示唆している。NKT細胞をフローサイトメトリーにより表現型決定し、NKT細胞の純度が70%を超える場合、細胞に基づく効力アッセイにおいてのみ用いた。

20

【0244】

単球由来樹状細胞を、実施例6に記載のように作製した。これらの細胞を、ウェルあたり 2×10^4 個の細胞で96穴平底プレート中で培養し、 $10 \mu\text{g/mL}$ で24時間、C24:1 α -GluCerを充填した。阻害的抗CD1d抗体401.11.158、401.11および402.8を、 $1 \mu\text{g/mL}$ から減少する濃度で調製し、42、51.1および陰性対照抗体を $10 \mu\text{g/mL}$ から減少する濃度で調製した後、C24:1 α -GluCer充填樹状細胞培養物に1h添加した。その後、NKT細胞を、樹状細胞と共に1:1の比で添加した。24時間後、無細胞上清を、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-13およびTNF放出についてアッセイした。一例として、401.11、401.11.158および402.8を、このアッセイにおいて試験した。無関係の特異性の陰性対照抗体を陰性対照として使用し、抗CD1d抗体42(BD Biosciences)および51.1(eBioscience)を陽性対照として使用した。42および51.1抗体ならびに抗体401.11、401.11.158および402.8は、この一次細胞に基づくアッセイにおいて一次ヒトNKT細胞によるC24:1 α -GluCer誘導性サイトカイン放出の阻害を示した(IFN- γ およびIL-4の曲線を図17に示す)。比較して、陰性対照抗体は、NKT細胞によるサイトカイン放出の無視できる程度の阻害を示した。

30

【0245】

抗体42および51.1は、高用量($10 \mu\text{g/mL}$)ではNKT細胞によるサイトカイン放出のいくらかの阻害を示したが、この効果は、より低用量では持続しなかった。抗体42と比較して、抗体401.11.158、401.11および402.8は、それぞれ最大で216倍、最大で58倍および最大で139倍改善された効力を示した(図17およびTable 20(表20))。抗体51.1と比較して、抗体401.11.158、401.11および402.8は、それぞれ最大で175倍、最大で47倍および最大で112倍改善された効力を示した(図17およびTable 20(表20); IFN- γ アッセイのEC50値を参照されたい)。

40

【0246】

【表 20】

Table 20

	IFN- γ EC50 (ng/mL)	IL-4 EC50 (ng/mL)	IL-5 EC50 (ng/mL)	IL-13 EC50 (ng/mL)	TNF- α EC50 (ng/mL)
401.11	2.376	1.452	1.231	5.549	1.793
402.8	0.9945	0.6364	0.9292	2.938	1.507
401.11.158	0.6397	0.6822	0.8679	1.439	0.8422
42	138.5	133.1	81.89	52.33	5.692
51.1	111.8	113.1	86.43	66.77	29.72
陰性対照	DNI	DNI	DNI	DNI	DNI

陰性対照:CD1d 以外の標的を指向する IgG4 アイソタイプの抗体;DNI-阻害しなかった、この場合、抗体の阻害活性は、典型的には、1 μ g/mL のヒト NKT 細胞による最大応答の 50%未満であった。

【 0 2 4 7 】

(実施例13)

402.8および401.11から誘導された抗体は、抗CD1d抗体によっては共有されないCD1d上の共通のエピトープを共有する

402.8および401.11の変異体、ならびに商業的に供給される抗CD1d抗体を、実施例7に基づいて競合に基づくELISAにおいて試験した。第1に、ビオチン化型の402.8は非ビオチン化抗体401.11と競合するが、抗体42および51.1とは競合しないことが示された。この研究は以下に記載される。

【 0 2 4 8 】

アッセイ方法

3:1の比のビオチン:402.8でEZ-link Sulfo-NHS-LC-ビオチンキット(Pierce)を用いて、抗CD1d抗体402.8をビオチン化した。PBSを用いる複数回の洗浄および30kDaカットオフを有する遠心分離フィルターユニット(Millipore)を介する遠心分離(3000rpm)による濃縮により、タンパク質調製物から遊離ビオチンを除去した。Maxisorp ELISAプレート(Nunc)を、1.0 μ g/mLのヒトCD1dで被覆し、4 で一晩インキュベートした。次いで、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回、プレートを洗浄した後、室温で1h、1%BSA中でプレートを遮断した。次いで、ビオチン化された402.8を、非ビオチン化抗CD1d抗体と共に1:1の比で5分間同時平衡化させた。これらの抗体を、40 μ g/mLから2倍減少濃度で(すなわち、0.2 μ g/mLのビオチン化された402.8と比較して最大で200倍過剰)、室温で1h、プレートに添加し、空のウェルには最終希釈液を添加した(すなわち、ビオチン化された402.8抗体のみを含有する)。次いで、0.1%Tween20を含有するPBS中で3回、プレートを洗浄した。ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(BD Biosciences)を、暗室中、室温で1h、プレートに添加した。プレートを洗浄して、未結合のストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを除去した。50 μ Lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KPL)と共にインキュベートすることによりアッセイシグナルを生じさせ、50 μ Lの1M HClでクエンチした。マイクロプレートリーダー(FluoStar Galaxy)を用いてA450nmでアッセイシグナルを読み取った。結果を生じたA450nm値として表し、生データから、0パーセントの阻害に対応する読み取り値を差し引くことにより競合度(パーセンテージ)の値に変換した。

【 0 2 4 9 】

この方法が実施例7に記載のように類似する結果をもたらしたことを確立するために、ビオチン化された抗体402.8を、ヒトCD1dへの結合について、401.11、ならびに抗CD1d抗体42および51.1と競合させた。これらのアッセイ条件下で、450nmでの吸光度の値(図18A)および402.8との競合度(図18B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について402.8

および401.11は競合し、結果として、これらの抗体がhCD1d上で重複するか、または共通のエピトープを共有することが明らかであった。対照的に、402.8は、42または51.1のいずれかと重複するか、または共通のエピトープを共有しなかった。総合すると、このアッセイは、非常に強力な抗CD1d抗体402.8および401.11が、抗体42および51.1によっては共有されないCD1d上の類似する高親和性中和エピトープに結合することを実証した。

【0250】

この改変されたアッセイを用いて、ビオチン化された抗体402.8を、組換えヒトCD1dへの結合について、以下の抗体(実施例11に記載された)と競合させた:401.11.24、401.11.26、401.11.28、401.11.86、401.11.151、401.11.152、401.11.154、401.11.155、401.11.156、401.11.157、401.11.158、401.11.159、401.11.160、401.11.161、401.11.165、401.11.166、401.11.167、401.11.179、401.11.180、401.11.181、402.8.45、402.8.53、402.8.60、402.8.84、402.8.86および402.8.87。これらの抗体は全て、450nmでの吸光度の値および402.8との変換された競合パーセンテージにより示されるように、ヒトCD1dへの結合について、ビオチン化された402.8と競合した。特に、抗体401.11.160、401.11.161および401.11.165は、450nmでの吸光度の値(図19A)および競合度(図19B)を示す図により示されるように、ビオチン化された402.8と強く競合し、450nmでの吸光度の値(図20A)および競合度(図20B)を示す図により示されるように、抗体402.8.84、402.8.86および402.8.87とも同様であった。

10

【0251】

さらなる抗CD1d抗体との競合の試験

20

402.8または401.11から誘導された抗体が他の抗CD1d抗体と競合するかどうかを調査するために、合計23の商業的に供給される抗CD1d抗体を試験した。これらの抗体は、抗ヒトCD1dモノクローナル抗体、抗マウスCD1dモノクローナル抗体、およびポリクローナル抗ヒトCD1d抗体を含んでいた。これらの抗体の詳細は、Table 21(表21)に記載されている。ラット抗マウス抗体ハイブリドーマHB-321、HB-322、HB-323、HB-326およびHB-327は、American Type Culture Collectionから供給されたものであり、供給業者の説明書に従って継代した。これらの細胞系から誘導された抗体を、プロテインGアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、マウスCD1dへの結合について検証した(示さず)。

【0252】

Table 21(表21)に記載の23の抗CD1d抗体はいずれも、450nmでの吸光度の値および402.8との競合パーセンテージにより示されるように、ヒトCD1dへの結合について402.8と競合しなかった。これらの結果の例を、図21~図23に提示する。抗ヒトCD1d抗体AD58E7、C3D5およびC-9は、450nmでの吸光度の読み取り値(図21A)および変換された競合度の値(図21B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について402.8と競合しなかった。これらの結果の別の例として、抗マウスCD1d抗体HB-321、HB-322およびHB-323は、450nmでの吸光度の読み取り値(図22A)および変換された競合度の値(図22B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について402.8と競合しなかった。同様に、一例として、ポリクローナル抗ヒトCD1d抗体C-19、H70およびAb96515は、450nmでの吸光度の読み取り値(図23A)および変換された競合度の値(図23B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について402.8と競合しなかった。試験したポリクローナル抗CD1d抗体はいずれも、ヒトCD1dへの結合について402.8と競合しなかったことに留意されたい。これらのデータは、試験した非常に強力な新規抗CD1d抗体の一例として、非常に強力な抗CD1d抗体402.8が、試験した抗CD1d抗体の広範な一覧により共有されない類似する高親和性中和エピトープに結合したことを示している。

30

40

【0253】

【表 2 1】

Table 21

抗体番号	クローン または カタログ番号	アイソタイプ	特異性	起源
1	NOR3.2	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Pierce
2	AD5-8E7	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Miltenyi Biotec
3	C3D5	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Santa Cruz Biotechnology
4	C-9	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Santa Cruz Biotechnology
5	G10	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Santa Cruz Biotechnology
6	3H649	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Santa Cruz Biotechnology
7	LS-C122839	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Lifespan Biosciences, Inc.
8	LS-C4448	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Lifespan Biosciences, Inc.
9	LS-C4449	マウスモノクローナル	ヒト CD1d	Lifespan Biosciences, Inc.
10	LS-C122840	ラットモノクローナル	マウス CD1d	LifeSpan Biosciences, Inc.
11	1B1	ラットモノクローナル	マウス CD1d	BD Biosciences
12	HB-321 (clone 19F8)	ラットモノクローナル	マウス CD1d	American Type Culture Collection
13	HB-322 (clone 15F7)	ラットモノクローナル	マウス CD1d	American Type Culture Collection
14	HB323 (clone 20H2)	ラットモノクローナル	マウス CD1d	American Type Culture Collection
15	HB-326 (clone 15C6)	ラットモノクローナル	マウス CD1d	American Type Culture Collection
16	HB-327 (clone 4C4)	ラットモノクローナル	マウス CD1d	American Type Culture Collection
17	3C11	ラットモノクローナル	マウス CD1d	BD Biosciences
18	K253	マウスモノクローナル	マウス CD1d	Biolegend
19	C-19	ヤギポリクローナル	ヒト CD1a, CD1b, CD1d	Santa Cruz Biotechnology
20	H70	ウサギポリクローナル	ヒト CD1d	Santa Cruz Biotechnology
21	Ab96515	ウサギポリクローナル	ヒト CD1d	AbCam
22	GTX104898	ウサギポリクローナル	ヒト CD1d	GeneTex
23	1401052	マウスポリクローナル	ヒト CD1d	Sigma Aldrich

【 0 2 5 4 】

上記実施例の付属物として、ビオチン化型の401.11から誘導された抗体を用いて拡張実験を行った。この実験は、ヒトCD1dへの結合について402.8と競合する抗体を修正されたアッセイにおけるビオチン化試薬として用いることもできることを実証し、同じ結果を示すために行われたものである。以下の説明において、アッセイは、401.11由来抗体の一例である401.11.158がビオチン化され、402.8ならびに他の抗CD1d抗体42および51.1と競合するように修正された。

【 0 2 5 5 】

アッセイ方法

3:1の比のビオチン:401.11.158でEZ-link Sulfo-NHS-LC-ビオチンキット(Pierce)を用いて、抗CD1d抗体401.11.158をビオチン化した。PBSを用いる複数回の洗浄および30kDaカットオフを有する遠心分離フィルターユニット(Millipore)を介する遠心分離(3000rpm)による濃縮により、タンパク質調製物から遊離ビオチンを除去した。抗CD1d抗体Maxisorp E

LISAプレート(Nunc)を、 $1.0 \mu\text{g/mL}$ のヒトCD1dで被覆し、4 で一晩インキュベートした。次いで、プレートを、 0.1% Tween20を含有するPBS中で3回洗浄した後、室温で1h、 1% BSA中で遮断した。次いで、ビオチン化された401.11.158を、非ビオチン化抗CD1d抗体(401.11.158、402.8、401.11、42および51.1)と1:1の比で5分間同時平衡化させた。これらの抗体を、 $40 \mu\text{g/mL}$ から減少する濃度(すなわち、 $0.2 \mu\text{g/mL}$ のビオチン化された401.11.158と比較して最大で200倍過剰)で室温で1時間、プレートに添加した。次いで、プレートを、 0.1% Tween20を含有するPBS中で3回洗浄した。ストレプトアビジンペルオキシダーゼコンジュゲート(BD Biosciences)を、暗室中、室温で1時間プレートに添加した。プレートを除去して、未結合のストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを除去した。 $50 \mu\text{L}$ の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KPL)と共にインキュベートすることによりアッセイシグナルを生じさせ、 $50 \mu\text{L}$ の1M HClでクエンチした。マイクロプレートリーダー(FluoStar Galaxy)を用いて 450nm でアッセイシグナルを読み取った。結果を生々の 450nm 値として表し、生データから、0パーセントの阻害に対応する読み取り値を差し引くことにより競合度(パーセンテージ)の値に変換した。

10

【0256】

上記の方法を用いると、401.11.158および402.8は、 450nm での吸光度の値(図24A)および401.11.158との競合度(図24B)により示されるように、ヒトCD1dへの結合について競合し、従って、重複するか、または共通のエピトープを共有する。対照的に、401.11.158は、41または51.1のいずれかと重複するか、または共通のエピトープを共有しない。総合すると、これらのデータは、非常に強力な抗CD1d抗体401.11.158および402.8が、より低い効力を有する先行技術の抗体42および51.1によっては共有されない類似する高親和性中和エピトープに結合し得ることを示している。

20

【0257】

(実施例14)

エピトープマッピング実験

方法

FAbの調製

製造業者の説明書に従ってFAb調製キット(Pierce)を用いて、パパイン消化により抗CD1d抗体402.8および401.11.165のFAbを調製した。リン酸緩衝生理食塩水($1 \times \text{PBS}$) $\text{pH}7.0$ で平衡化させたプロテインAカラム上で試料を泳動させ、流出液を回収することにより、Fc(結晶性断片)を含有するタンパク質から、無傷のFAbを除去した。次いで、TSKゲルG3000SWx1カラム(TOSO)を 0.5ml/min で使用し、泳動バッファーとして $1 \times \text{PBS}$ を用いるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により、FAbを分析した。その結果は、FAbが95%を超えて純粋であることを示していた。

30

【0258】

FAb-CD1d結合ELISA

ヒトCD1dへのFAbの結合を確認するために、ヒトCD1dをMaxisorpプレート(NUNC)上でPBS中の $1 \mu\text{g/mL}$ で4 で一晩被覆するELISAを実施した。次いで、 0.05% Tween-20(Sigma)を含む $1 \times \text{PBS}$ を用いて個別に3回、ウェルを洗浄した。室温で1時間、PBS中の 1% BSAでウェルを遮断した。次いで、上記のように $1 \times \text{PBS}$ でウェルを洗浄した。次いで、FAbまたは完全長抗体の滴定を、 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度から出発して実施し、プレートにわたって1:4で希釈を実施した。PBSのみの対照を含有させた。プレートを室温で1時間インキュベートした後、以前に記載のようにウェルを洗浄した。ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ の二次抗体(ヤギ抗ヒトカップF+B HRPOコンジュゲート、Invitrogen)を、 $1 \times \text{PBS}$ 中1:2000の希釈率で添加し、室温で1時間インキュベートした後、以前に記載のようにウェルを洗浄した。 $50 \mu\text{L}$ のTMB(Sigma)を添加し、発色するまでプレートをインキュベートした。各ウェルに $50 \mu\text{L}$ の1M HClを添加することにより反応を停止させた。吸光度を 450nm で読み取った(620nm で参照した)。

40

【0259】

H/D交換実験

ヒトCD1dを、 $1 \times \text{PBS}$ ($\text{pH}7$)中で $12.8 \mu\text{M}$ の濃度に希釈した。次いで、それを $14.1 \mu\text{M}$ の濃

50

度の402.8または401.11.165のFAb断片と混合した。14 μ Lのこの溶液を、D20(Dは重水素である)中の26 μ Lの50mMリン酸pH7と混合した。別の溶液を調製し、23 で30、100、300または1000sインキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、20 μ Lの2M尿素、1M TCEP pH3.0を各溶液に添加した。次いで、試料を、H2O中の0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)中で200 μ L/minで固定化ペプシンカラム上に通過させた。ペプシン断片を逆相捕捉カラム上に充填し、H2O中の0.05%TFAで3min脱塩した。95%アセトニトリル、5%H2O、0.0025%TFAを含む13%~35%のバッファの線状勾配を用いて23minにわたってC18カラムによりペプチドを分離した。次いで、プロファイルモードでの質量分析により、ペプチドを分析した。32.2 μ Lの0.615mg/mLのCD1dと、59.8 μ Lの100mM TCEPとをD20中で混合することにより、完全に重水素化された対照試料を調製し、60 で3時間インキュベートした。

10

【0260】

CD1d突然変異タンパク質ELISA

全ての溶液を50 μ L/ウェルで添加した。CD1d(野生型)および関連構築物(突然変異タンパク質またはアミノ酸置換を有するCD1dなど)を、PBS中の1 μ g/mLで4 で一晚、96穴Maxisorp ELISAプレート(NUNC)上に被覆した。次いで、ウェルを洗浄バッファ(PBS + 0.05% Tween-20)で3回洗浄した。プレートをブロッキングバッファ(PBS + 1%BSA)中、室温で1h遮断した後、3回洗浄した。抗体希釈液(PBS + 1%BSA + 0.05%Tween-20)中の抗体を、10 μ g/mlから出発する半対数滴定においてウェルに添加し、陰性対照として抗体を含有させなかった(0 μ g/mL)。次いで、プレートを室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートを上記のように洗浄した。二次抗体(HRP-ヤギ抗ヒトIgG(H+L)、Invitrogen)を、抗体希釈液中の1:2000希釈率で添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、50 μ LのTMB(Sigma)を各ウェルに添加した。50 μ Lの1M HClを添加した後、発色させて反応を停止させた。プレートの各ウェルの吸光度を、450nmで読み取った(620nmで参照した)。

20

【0261】

結果:

402.8および401.11.165のFAbの生成

パイン消化を用いて、402.8および401.11.165のFAbを単離した。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により測定した場合、構築物は95%を超える純度を有していた。ELISAにおいて試験した場合、FAbはヒトCD1dへの結合を保持していた(図25)。

30

【0262】

H/D交換実験

上記のH/D交換のための方法を用いて、FAbとしての抗体402.8および401.11.165をヒトCD1dと複合体化させた後、D20中でインキュベートした。これは、抗体がCD1dに結合し、D2Oが接近しない位置を除いて、CD1d分子上の水素を重水素に交換する。別に、ヒトCD1dを抗体の非存在下でD20と共にインキュベートした。両試料に由来するCD1dはトリプシン消化を受け、次いで、質量分析により分析した。FAb 402.8および401.11.165を含む、および含まない交換実験上でのCD1dの各セグメントにおける重水素化レベルの差異を、以下のTable 22(表22)およびTable 23(表23)にそれぞれ示す。これらの実験において用いられたCD1dの細胞外ドメインの配列を、以下に列挙する:

40

EVPQRLFPLRCLQISSFANSSWTRTDGLAWLGELQTHSWSNDSDTVRSCLKPWSQGTFSQQWETLQHFVYRSSFTRDVK
KEFAKMLRRLSYPLELQVSAGCEVHPGNASNNFFHVAFAQGKDI LSFQGTSEPTQEAPLWVNLAIQVLNQDKWTRETVQWL
LNGTCPQFVSGLLESGKSELKKQVKPKAWLSRGPSPGPRLLLLVCHVSGFYKPKVWVKWMRGEQEQQGTQPGDILPNADE
TWYLRATLDVVAGEAAGLSCRVKHSSLEGQDIVLYWGGSYTSGSLVPRGSGSKRVHHHHHHHH(配列番号19)

【0263】

【表 2 2】

Table 22:FAb402.8 を用いる、および用いない交換実験時の CD1d の各セグメントにおける重水素化レベルの差異

ペプチド		インキュベーション時間(s)					ペプチド		インキュベーション時間(s)				
開始	終了	30	100	300	1,000	平均	開始	終了	30	100	300	1,000	平均
3	11	-3%	-1%	-2%	0%	-2%	204	216	1%	0%	2%	0%	1%
3	16	-3%	-3%	0%	-3%	-2%	206	216	2%	1%	4%	0%	2%
12	16	-2%	-6%	4%	-8%	-3%	219	224	1%	1%	1%	2%	1%
16	18	5%	-12%	-18%	-9%	-9%	219	239	1%	2%	-2%	1%	0%
16	28	-3%	-9%	-15%	-10%	-9%	219	242	0%	1%	-1%	1%	0%
19	28	-6%	-8%	-13%	-10%	-9%	225	242	0%	1%	-2%	0%	0%
31	34	-2%	0%	-1%	2%	0%	244	248	1%	0%	-2%	0%	0%
31	36	1%	-4%	-1%	1%	-1%	245	248	1%	1%	-1%	0%	0%
35	36	7%	-12%	0%	-1%	-2%	251	259	3%	-1%	0%	4%	1%
48	61	-2%	1%	-1%	2%	0%	251	271	0%	3%	-2%	-1%	0%
48	62	-1%	2%	2%	2%	1%	261	271	-3%	-4%	-2%	2%	-2%
64	76	3%	-2%	2%	-1%	1%	274	303	-3%	0%	-2%	0%	-1%
65	76	4%	-2%	0%	-1%	0%	277	303	-5%	0%	-2%	0%	-2%
79	86	-1%	-6%	-14%	-22%	-11%	326	332	-2%	1%	-2%	0%	-1%
89	94	-50%	-46%	-44%	-44%	-46%	326	345	0%	0%	-2%	0%	-1%
89	95	-58%	-61%	-58%	-52%	-57%	335	345	-1%	0%	-2%	1%	-1%
114	119	0%	-9%	-19%	-16%	-11%	348	359	0%	-1%	0%	-1%	-1%
114	123	-3%	-6%	-12%	-10%	-8%	351	359	1%	-2%	0%	1%	0%
115	123	-5%	-11%	-15%	-12%	-11%	360	362	1%	4%	1%	1%	1%
120	123	-7%	-2%	-1%	-2%	-3%	360	377	0%	1%	-4%	-3%	-1%
126	139	-7%	-3%	-3%	-3%	-4%	365	377	0%	0%	-2%	2%	0%
126	142	-13%	-9%	-10%	-9%	-10%	380	385	-3%	-4%	-4%	-1%	-3%
141	142	-43%	-45%	-36%	-25%	-37%	382	385	-5%	-3%	-3%	-2%	-3%
145	155	-7%	-8%	-9%	-10%	-9%	388	389	0%	0%	0%	-1%	0%
146	155	-7%	-5%	-16%	-13%	-10%	388	390	0%	0%	-1%	-1%	0%
158	172	-3%	-5%	-6%	-7%	-5%	392	401	3%	1%	-2%	1%	1%
175	188	2%	1%	-2%	-1%	0%	392	402	3%	1%	-3%	0%	0%
175	190	2%	2%	-3%	1%	0%	404	422	-1%	0%	-2%	0%	-1%
191	201	-1%	1%	-3%	1%	-1%	406	422	0%	0%	-3%	-2%	-1%
193	201	2%	-1%	-4%	3%	0%							

【 0 2 6 4 】

平均 ± 標準偏差 (S.D.) 重水素%差を、最も低い重水素%差を用いてペプチドの50%にわたって算出した。平均-3S.D.よりも低い値は有意であると考えられた。データセットにわたる平均(50%)-3S.D.重水素%差は0%であった。402.8との複合体化の際に最も多い保護された領域を有していたCD1d配列は、

10

20

30

40

50

配列番号116の89～95-LSYPLEL

配列番号116の141～142-NL

であった。

【0265】

【表23】

Table 23: FAb401.11.165 を用いる、および用いない交換実験時の CD1d の各セグメントにおける重水素化レベルの差異

ペプチド		インキュベーション時間(s)					ペプチド		インキュベーション時間(s)				
開始	終了	30	100	300	1,000	平均	開始	終了	30	100	300	1,000	平均
3	11	1%	-1%	-1%	-1%	0%	193	201	4%	2%	-4%	-2%	0%
3	16	2%	-3%	2%	-2%	0%	204	216	1%	2%	1%	0%	1%
12	16	3%	-6%	5%	-3%	0%	206	216	3%	2%	2%	-1%	2%
16	18	3%	-1%	4%	3%	2%	219	224	2%	2%	2%	2%	2%
16	28	1%	0%	0%	0%	0%	219	239	-1%	2%	0%	-1%	0%
19	28	1%	0%	-1%	-1%	0%	219	242	2%	1%	0%	-1%	0%
31	34	1%	0%	0%	1%	1%	225	242	2%	0%	-1%	-2%	0%
31	36	1%	0%	1%	-1%	0%	244	248	1%	0%	-1%	0%	0%
35	36	1%	-1%	1%	-6%	-1%	245	248	2%	1%	-1%	-1%	0%
48	61	-	-	-	-	-	251	259	6%	0%	2%	-1%	2%
48	62	4%	0%	0%	-4%	0%	251	271	0%	4%	0%	-4%	0%
64	76	6%	2%	5%	2%	4%	261	271	1%	-2%	3%	4%	1%
65	76	4%	2%	3%	-1%	2%	274	303	1%	0%	0%	-1%	0%
79	86	2%	2%	-3%	-5%	-1%	277	303	0%	0%	-1%	-1%	0%
89	94	-14%	-10%	-12%	-19%	-14%	326	332	2%	1%	-1%	-2%	0%
89	95	-	-	-	-	-	326	345	2%	0%	-1%	-1%	0%
114	119	-	-	-	-	-	335	345	2%	-1%	-1%	-1%	0%
114	123	6%	9%	6%	6%	7%	348	359	3%	-1%	1%	-3%	0%
115	123	11%	10%	9%	10%	10%	351	359	2%	0%	1%	-2%	0%
120	123	-	-	-	-	-	360	362	2%	4%	2%	-1%	2%
126	139	-13%	-14%	-10%	-10%	-12%	360	377	2%	1%	0%	-1%	1%
126	142	-23%	-19%	-19%	-22%	-20%	365	377	3%	0%	-1%	0%	1%
141	142	-69%	-70%	-61%	-67%	-67%	380	385	-2%	-5%	-4%	-4%	-4%
145	155	0%	4%	-2%	-6%	-1%	382	385	-3%	-3%	-3%	-3%	-3%
146	155	-	-	-	-	-	388	389	0%	0%	0%	-1%	0%
158	172	4%	6%	5%	1%	4%	388	390	1%	0%	0%	-1%	0%
175	188	1%	3%	1%	0%	1%	392	401	5%	1%	-1%	-1%	1%
175	190	2%	1%	-3%	-2%	0%	392	402	4%	1%	-3%	-1%	0%
191	201	1%	1%	-1%	0%	0%	404	422	2%	0%	0%	-1%	0%
							406	422	3%	1%	-1%	-1%	0%

10

20

30

40

【0266】

401.11.165についても同様に、平均±標準偏差(S.D.)重水素%差を、最も低い重水素%差を用いてペプチドの50%にわたって算出した。平均-3S.D.より低い値は有意であると考えられた。データセットにわたる平均(50%)-3S.D.重水素%差は-5%であった。401.11.165との複合体化の際に最も多い保護された領域を有していたCD1d配列は、配列番号116の89～94-LSYPLEL

50

配列番号116の126～142-QGTSWEPTQEAPLWVNL
であった。

【0267】

異なる一次アミノ酸配列を有するが、401.11.165と402.8は両方とも、ヒトCD1dに結合した場合、分子の類似する領域を保護する。これらの領域は、集合的にエピトープとして知られ、配列LSYPLE(配列番号116の89～94)の周囲のCD1dの領域を含む。領域QGTSWEPTQEAPLWVNL(配列番号116の126～142)はまた、上記のH/D交換実験において保護され、このより大きい領域内のいくつかのアミノ酸NL(配列番号116の141～142)は高度に保護される。

【0268】

ヒトCD1d上の配列LSYPLE(配列番号116の89～94)およびNL(配列番号116の141～142)が記載された抗CD1d抗体の結合にとって重要であったかどうかを確認するために、一連のCD1d構築物を生成した。これらの構築物は、図26に列挙され、以下に記載される：

- hCD1dmu(配列番号119)-位置87～93(LRLSYPL)と141～143(NLA)との間に位置するアミノ酸が、ヒトCD1d(配列番号116)に従って番号付けられた位置を有するマウスCD1d配列(それぞれ、MSPKEDYPIおよびDLP)で置き換えられたヒトCD1d。

- mCD1dhu(配列番号118)-位置85～93(MSPKEDYPI)と141～143(DLP)との間に位置するアミノ酸が、マウスCD1d(配列番号117)に従って番号付けられた位置を有するヒトCD1d配列(それぞれ、LRLSYPLおよびNLA)で置き換えられたマウスCD1d。

【0269】

全てのCD1d構築物をHEK-293E細胞中で発現させ、ELISA形式でヒトまたはマウスCD1dに対するポリクローナル抗体により検出した。ヒトCD1d、マウスCD1d、mCD1dhuおよびhCD1dmuを、ELISAプレート上に被覆し、これらのCD1d構築物への抗体402.8および401.11.158の結合を決定した。両抗体ともヒトCD1dに結合したが、マウスCD1dには結合しなかった(図27)。それらは両方とも、ヒト配列が導入されたマウスCD1d(mCD1dhu)に結合したが、これは、これらのヒト配列アミノ酸がヒトCD1dへの抗体の結合にとって重要であることを示している(図27)。同様に、ヒトCD1d上のこれらのアミノ酸を、対応する位置でマウス配列により置き換えた場合(hCD1dmu)、抗体はこのCD1d構築物に最早結合しなかった(図27)。総合すると、これらの結果は、89～95と141～143との間のヒトCD1dの配列が、これらの抗CD1d抗体が結合するエピトープ内にあることを示している。

【0270】

集合的に、これらの領域は、ヒトCD1dに結合する抗CD1d抗体に対する可能な結合部位、またはエピトープを形成する。この領域をヒトCD1dのX線結晶構造に関して分析した場合(3HUJ: PBDデータベースなど)、これらの個々の領域は一次アミノ酸配列に関して離れているが、タンパク質の三次構造においては、それらは互いにすぐ近くに位置していることができる(図28A)。LSYPLE(89～94)とNL(141～142)は両方とも、CD1d内に存在し、NKT細胞受容体への脂質の提示を容易にするアルファヘリックス上に、またはその周囲に位置する。このエピトープは、ヒトCD1d上のNKT細胞受容体鎖の結合部位のすぐ近くに位置する(図28B)。CD1d上でこの位置に結合する抗体は、CD1d-NKT細胞受容体鎖相互作用と競合し、これを阻害することができる。そのような阻害は、CD1dとNKT細胞受容体との複合体の形成を防止し、かくして、NKT細胞の下流の活性化を防止する。

【0271】

(実施例15)

カニクイザルにおける喘息のブタ回虫(*Ascaris suum*)モデル

抗CD1d抗体の効果を、喘息のカニクイザルモデルにおいて試験する。このプロトコルでは、寄生線虫であるブタ回虫に対して感作された動物を、エアロゾル化されたブタ回虫抽出物でチャレンジして、ヒトにおける急性喘息増悪の原因を密接に模倣する様式で急性気管支収縮、次いで、肺好酸球性炎症および気道過活動を誘導する。そのようなプロトコルは記載されている(Hart, T.ら(2001) J Allergy Clin Immunol 108:250～257頁)。このモデルは、粘液細胞過形成、上皮下線維症、基底細胞膜肥厚、およびメトコリンに対する持続的ベースライン過敏などの、慢性ヒト喘息の多くの特徴を特徴とする。抗体処置を与え

10

20

30

40

50

た後、ブタ回虫抽出物でチャレンジし、気道抵抗およびコンプライアンスに対する処置の効果、PC50、PCO2およびO2レベル、血清IgEおよび気管支肺胞洗浄(BAL)測定値、例えば、IL-4、IL-5およびIL-13濃度ならびに白血球サブセット、例えば、好中球、好酸球、脂肪細胞、好塩基球およびリンパ球の相対頻度を評価することができる。

【0272】

(実施例16)

肺炎症の代替的動物モデル

気道過敏症のアカゲザルモデル

抗CD1d抗体の効果および安全性を、気道過敏症のモデルにおいて試験することができる。例えば、イエダニ抗原(デルマトファゴイデス・ファルニナエ(*Dermatophagoides farninae*)由来)を用いる連続チャレンジにより、気道過敏症をアカゲザル(マカカ・ムラッタ(*Macaca mulatta*))において誘導することができる(Seshasayee, D.ら、2007 *J Clin Invest* 117、3868~78頁)。咳、速く浅い呼吸および気道抵抗の増加を特徴とする喘息増悪は、イエダニ抽出物を用いるチャレンジにより誘導される。アルブテロールエアロゾル処置などの薬学的介入により、症状を逆転させることができる。メトコリンチャレンジに応答する肺機能、例えば、気道抵抗および動的コンプライアンスを測定することができる。抗体処置を与えた後、イエダニ抗原で再チャレンジし、メトコリンチャレンジにより決定される肺機能を評価する。

【0273】

-GalCerにより誘導される気道過敏症のカニクイザルモデルにおける抗CD1d抗体の評価
抗CD1d抗体の効果および安全性を、気道過敏症の開示されたカニクイザルモデルを用いて試験することができる(Matangkasombut, P.ら、2008 *J Allergy Clin Immunol*、121、1287~9頁)。このモデルにおいて、ブタ回虫に対して感作されたカニクイザルに、肺ネブライザーにより、特異的NKT細胞アゴニストである -ガラクトシルセラミド(-GalCer)を投与する。 -GalCer処置は、上記のメトコリンチャレンジにより決定した場合、気道過敏症を誘導する。

【0274】

抗体処置を与えた後、 -GalCerで再チャレンジし、メトコリンチャレンジにより肺機能を評価する。さらに、気管支肺胞洗浄(BAL)液試料を、気道炎症と関連するメディエータの存在について分析する、例えば、BAL中のIL-4、IL-5およびIL-13の濃度を評価することができる。さらに、BAL中の細胞浸潤を、標準的な臨床病理技術、例えば、自動血液分析器(例えば、Adviaシステム)を用いる細胞分析により検査して、主な白血球サブセット、例えば、好中球、リンパ球、好酸球、脂肪細胞および好塩基球の相対頻度を決定する。

【0275】

(実施例17)

NKT細胞により誘導された炎症の代替的動物モデル

潰瘍性大腸炎

抗CD1d抗体の効果および安全性を、様々な開示されたヒト炎症性腸疾患のモデルにおいて試験する(Wirtzら、*Nat Protoc* 2: 541~546頁、2007)。例えば、オキサゾロンの直腸内投与は、ヒト潰瘍性大腸炎と組織学的に類似し、また下痢、潜血、体重減少および時には直腸脱も特徴とする局所潰瘍形成および炎症を誘導する。オキサゾン誘導性大腸炎の病理は、NKT細胞により、特に、IL-13のNKT細胞に誘導される分泌を介して媒介され、かくして、抗CD1d抗体を用いる処置によって疾患を改善することができる(Heller, F.ら、2002 *Immunity* 17、629~638頁)。このモデルにおいて、大腸炎誘導の開始時に抗体処置を開始し、体重、便の硬さ、潜血および大腸構造に対する効果を評価する。

【0276】

さらに、抗CD1d抗体を、活性化された(CD4+CD45RB^{high})T細胞の養子免疫伝達により誘導されたマウス大腸炎のモデルにおいて試験する(Ostanin, D.V.ら(2009) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G135~G146頁)。このモデルにおいては、CD4+CD45RB^{high} T細胞を、免疫欠損マウス中に導入し、体重減少および下痢、全体的大腸浸潤および炎

10

20

30

40

50

症、杯細胞の喪失ならびに大腸上皮の過形成をもたらす。抗体を、体重減少および下痢を軽減する、ならびに結腸の炎症および組織学的変化を改善するその能力について試験する。

【0277】

さらに、抗CD1d抗体を、飲用水中へのデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の投与により誘導された大腸炎のマウスモデルにおいて試験する(Wirtzら、*Nat Protoc* 2: 541~546頁、2007)。DSS投与は、びらん性病変および炎症性浸潤を特徴とする腸管の強固な全体的炎症を誘導する。症状は通常、下痢、潜血、体重減少および時には直腸脱を含む。DSS誘導性大腸炎モデルは、7日間にわたるDSSの投与を含む急性的なもの、またはより長期間にわたるDSSの投与を含む慢性的なものであってよい。

10

【0278】

抗体を、予防的または治療的に試験する。予防的モデルにおいては、DSSの投与の開示時に抗体処置を開始する。治療的モデルにおいては、誘導の開始の数日後に抗体処置を開始する。体重および便の硬さに対する処置の効果、ならびに上皮の完全性および炎症性浸潤の程度に対する顕微鏡的效果を決定する。

【0279】

非アルコール性脂肪性肝炎

例えば、Takahashiら(2012) *World Journal of Gastroenterology* 18(19): 2300~2308頁に記載された、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)のげっ歯類モデルにおいて、抗CD1d抗体をさらに試験する。例えば、C57BL/6マウスにおいては、肝毒性化合物であるストレプトゾトシン(STZ)の新生児送達、次いで、高脂肪食は、NASHの主要な特徴の発達をもたらす。別の例として、C57BL/6またはob/obマウスにおける高脂肪食の提供は、NASHの誘導および維持をもたらし得る。さらに別の例においては、高脂肪食と、反復的および間欠的低酸素ストレスとにより、NASHをラットにおいて生成させることができる。これらのモデルの1つまたはいくつかににおいて、処置されたげっ歯類における抗CD1d抗体の効果、総肝臓重量、血清アミノトランスフェラーゼレベル、血清トリグリセリドレベル、血中グルコースレベル、肝臓組織病理の改善および遺伝子発現パターンの変化に対する効果により決定する。

20

【0280】

自己免疫性肝疾患

抗CD1d抗体を、自己免疫性肝疾患の動物モデルにおいてさらに試験する。例えば、マウスにおいては、コンカナバリンA(conA)の静脈内注射により誘導された肝炎が記載されている(Takeda, K.ら(2000) *PNAS* 97(10):5498~5503頁)。ConAを、尾静脈を介してマウスに注射する。血清試料を、ConA注射の20h後に取得する。標準的な測光技術を用いて、血清アミノトランスフェラーゼ[アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)]レベルを測定する。さらに、肝臓形態の巨視的および顕微鏡的検査により、肝臓病理を評価する。血清ALTおよびASTに対する効果、ならびに肝臓組織病理について、抗体を評価する。

30

【0281】

(実施例18)

結合タンパク質を作製する方法

402.8または401.11抗体を用いる抗体ライブラリーからの選択

以前に記載されたような約100pmolの抗原密度(すなわち、ビオチン化されたCD1d)およびTEAに基づく溶出ステップを用いて1回目のパンニングラウンドを行うファージ展示プロトコルを用いる。2回目および3回目のラウンドは、低下した抗原密度(例えば、約50pmol)を用いる。10倍モル過剰量で402.8または401.11(または関連抗体)IgGを添加し、反応物を室温で2、5、10または20minインキュベートすることにより、ファージを溶出させる。IgGは、402.8/401.11エピトープに結合したFAbを発現するファージを特異的に置き換え、溶出すると予想される。非特異的結合剤およびCD1d表面上の他の領域に結合したファージは、これらの条件下ではあまり溶出しないと考えられる。

40

50

【0282】

洗浄レジメンは、ラウンド1および2についてはM-PBSを用いる6回の洗浄を含む。ラウンド3については、洗浄は、PBSTを用いる3回の洗浄、次いで、PBSを用いる3回の洗浄である。

【0283】

ファージミドレスキューまたは他のファージ展示実験について記載されたスクリーニングのためのコロニーの作製のために、溶出したファージを用いて、TG1大腸菌を感染させる。

【0284】

合成CD1d構築物を用いる抗体の選択/生成

10

ファージ展示のためのパンニング試薬としてhCD1dmuまたはmCD1dhuなどの合成CD1d構築物を用いて、402.8および401.11のものと類似するエピトープを認識する抗体を取得することができる。ファージ展示ライブラリーから、hCD1dmu(配列番号119)などの構築物を含むCD1d(エピトープを含む重要なアミノ酸を、その対応するマウスアミノ酸により置き換えたヒトCD1d)を認識する抗体を減少させることができる。次いで、ライブラリーをヒトCD1dに対してパンニングすることができる。得られた単離された抗体は、ヒトCD1d(配列番号16)の89~94と141~142との間のアミノ酸に結合する可能性がある。

【0285】

免疫化手法

20

CD1d上の402.8/401.11抗体エピトープのペプチドまたはタンパク質模倣体を、ライブラリー展示技術または免疫化/ハイブリドーマ手法においてCD1dの代わりに抗原として用いる。例えば、さもなければマウスCD1d(例えば、mCD1dhu(配列番号118))であるフレームワーク中にヒトCD1dの402.8/401.11エピトープを含むように、キメラCD1d分子を構築する。そのような構築物をマウスにおける免疫原として用いる場合、免疫応答は、非マウス配列に焦点を向けると予想される。

【0286】

抗体配列IDコンコードانس

【0287】

【表 2 4】

抗体	VH アミノ酸 (配列番号)	VH ヌクレオチド (配列番号)	VL アミノ酸 (配列番号)	VL ヌクレオチド (配列番号)
401.11	1	10	2	11
401.11.24	23	68	46	91
401.11.26	24	69	47	92
401.11.28	5	14	6	15
401.11.86	25	70	48	93
401.11.151	26	71	49	94
401.11.152	27	72	50	95
401.11.154	28	73	51	96
401.11.155	29	74	52	97
401.11.156	30	75	53	98
401.11.157	31	76	54	99
401.11.158	32	77	55	100
401.11.159	33	78	56	101
401.11.160	34	79	57	102
401.11.161	35	80	58	103
401.11.165	36	81	59	104
401.11.166	37	82	60	105
401.11.167	38	83	61	106
401.11.179	40	85	62	107
401.11.180	41	86	63	108
401.11.181	42	87	64	109
402.8	3	12	4	13
402.8.45	7	16	4	110
402.8.53	8	17	4	111
402.8.60	9	18	4	112
402.8.84	43	88	65	113
402.8.86	44	89	66	114
402.8.87	45	90	67	115

10

20

30

40

他の配列の説明

【 0 2 8 9 】

【表 2 5 A】

配列番号	説明
19	ヒト CD1d 合成構築物
20	ヒトベータ-2-ミクログロブリン
21	TCR アルファ鎖クローン J3N.5
22	TCR ベータ鎖クローン J3N.5
117	マウス CD1d 細胞外ドメイン構築物
118	mCD1dhu CD1d 合成構築物
119	hCD1dmu CD1d 合成構築物
120	フォワードプライマー
121	リバースプライマー
122	89-94 の CD1d
123	126-142 の CD1d
124	VH CDR1 (401.11)
125	VH CDR1 (402.8)
126	VH CDR3 (401.11)
127	VH CDR3 (402.8)
128	VH CDR3 (402.8)
129	VH CDR3 (402.8)
130	VH CDR3 (402.8)
131	VH CDR2 (401.11)
132	VH CDR2 (402.8)
133	VH CDR2 (402.8)
134	VH CDR2 (402.8)
135	VH CDR1 (401.11)
136	VH CDR1 (402.8)
137	VH CDR2 (401.11)
138	VH CDR2 (402.8)
139	VH CDR2 (402.8)
140	VH CDR2 (402.8)
141	VL CDR1 (401.11)
142	VL CDR1 (402.8)
143	VL CDR3 (401.11)
144	VL CDR3 (402.8)
145	VL CDR2 (401.11)
146	VL CDR2 (402.8)
147	89-95 の CD1d
148	401.11 VH コンセンサス配列
149	401.11VL コンセンサス配列
150	402.8 VH コンセンサス配列
151	402.8 VL コンセンサス配列
152	VH CDR3 (401.11)
153	VH CDR3 (401.11)
154	VH CDR3 (401.11)
155	VH CDR3 (402.8)
156	VH CDR3 (402.8)
157	ヒト CD1d

10

20

30

40

【表 2 5 B】

158	ヒト重鎖 IgG1 定常ドメイン
159	ヒト重鎖 IgG4 定常ドメイン
160	ヒト重鎖 IgG4 定常ドメイン (S228P)
161	ヒト軽鎖 カッパ 定常ドメイン
162	ヒト軽鎖 ラムダ 定常ドメイン

【 0 2 9 1 】

(参考文献)

- ALEGRE, M. L., COLLINS, A. M., PULITO, V. L., BROSIUS, R. A., OLSON, W. C., ZIVIN, R. A., KNOWLES, R., THISTLETHWAITE, J. R., JOLLIFFE, L. K. & BLUESTONE, J. A. (1992) Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody. *J Immunol*, 148, 3461-8.
- AL-LAZIKANI, B., LESK, A. M. & CHOTHIA, C. (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 273, 927-48.
- ANGULO, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346, 1221-31.
- AUSUBEL IN: CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. WILEY INTERSCIENCE, ISBN 047 150338, 1987; CHAPTERS 8 AND 15 10
- AKBARI, O., STOCK, P., MEYER, E., KRONENBERG, M., SIDOBRE, S., NAKAYAMA, T., TANIGUCHI, M., GRUSBY, M. J., DEKRUYFF, R. H. & UMETSU, D. T. (2003) Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 9, 582-8.
- BAHADORI, K., DOYLE-WATERS, M. M., MARRA, C., LYND, L., ALASALY, K., SWISTON, J. & FITZGERALD, J. M. (2009) Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med*, 9, 24.
- BENHAR, I. (2007) Design of synthetic antibody libraries. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 763-79.
- BIRD, R. E., HARDMAN, K. D., JACOBSON, J. W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B. M., LEE, S. M., LEE, T., POPE, S. H., RIORDAN, G. S. & WHITLOW, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242, 423-6. 20
- BONISH, B., JULLIEN, D., DUTRONC, Y., HUANG, B. B., MODLIN, R., SPADA, F. M., PORCELLI, S. A. & NICKOLOFF, B. J. (2000) Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol*, 165, 4076-85.
- BORISH, L. C., NELSON, H. S., LANZ, M. J., CLAUSSEN, L., WHITMORE, J. B., AGOSTI, J. M. & GARRISON, L. (1999) Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, 1816-23.
- BRENNAN, P. J., TATITURI, R. V., BRIGL, M., KIM, E. Y., TULI, A., SANDERSON, J. P., GADOLA, S. D., HSU, F. F., BESRA, G. S. & BRENNER, M. B. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol*, 12, 1202-11. 30
- BRIGL, M. & BRENNER, M. B. (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*, 22, 817-90.
- BRIGL, M., VAN DEN ELZEN, P., CHEN, X., MEYERS, J. H., WU, D., WONG, C. H., REDDINGTON, F., ILLARIANOV, P. A., BESRA, G. S., BRENNER, M. B. & GUMPERZ, J. E. (2006) Conserved and heterogeneous lipid antigen specificities of CD1d-restricted NKT cell receptors. *J Immunol*, 176, 3625-34.
- CHOTHIA, C. & LESK, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 196, 901-17.
- CHOTHIA, C., LESK, A. M., TRAMONTANO, A., LEVITT, M., SMITH-GILL, S. J., AIR, G., SHERIFF, S., PADLAN, E. A., DAVIES, D., TULIP, W. R. & ET AL. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342, 877-83. 40

- CHUANG, Y. H., WANG, T. C., JEN, H. Y., YU, A. L. & CHIANG, B. L. (2011) α -Galactosylceramide-Induced Airway Eosinophilia Is Mediated through the Activation of NKT Cells. *J Immunol*, 186, 4687-92.
- CUNNINGHAM, B. C. & WELLS, J. A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, 244, 1081-5.
- DALL'ACQUA, W. F., WOODS, R. M., WARD, E. S., PALASZYNSKI, S. R., PATEL, N. K., BREWAH, Y. A., WU, H., KIENER, P. A. & LANGERMANN, S. (2002) Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J Immunol*, 169, 5171-80.
- DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. (2006) Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*, 281, 23514-24. 10
- DE VOS, A. M., ULTSCH, M. & KOSSIAKOFF, A. A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255, 306-12.
- DUROCHER, Y., PERRET, S. & KAMEN, A. (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*, 30, E9.
- EXLEY, M., GARCIA, J., BALK, S. P. & PORCELLI, S. (1997) Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med*, 186, 109-20.
- EXLEY, M. A., WILSON, B. & BALK, S. P. (2010) Isolation and functional use of human NKT cells. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14 11. 20
- FISHBURN, C. S. (2008) The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *J Pharm Sci*, 97, 4167-83.
- FOX, L. M., COX, D. G., LOCKRIDGE, J. L., WANG, X., CHEN, X., SCHARF, L., TROTT, D. L., NDONYE, R. M., VEERAPEN, N., BESRA, G. S., HOWELL, A. R., COOK, M. E., ADAMS, E. J., HILDEBRAND, W. H. & GUMPERZ, J. E. (2009) Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol*, 7, e1000228.
- GENNARO, ED., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18 TH EDITION, MACK PUBLISHING CO. (EASTON, PA.) 1990.
- GIUDICELLI, V., CHAUME, D., BODMER, J., MULLER, W., BUSIN, C., MARSH, S., BONTROP, R., MARC, L., MALIK, A. & LEFRANC, M. P. (1997) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 25, 206-11. 30
- GREENER, A., CALLAHAN, M. AND JERPSETH, B. (1996) IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS. HUMANA PRESS, NJ
- HART, T. K., COOK, R. M., ZIA-AMIRHOSSEINI, P., MINTHORN, E., SELLERS, T. S., MALEEFF, B. E., EUSTIS, S., SCHWARTZ, L. W., TSUI, P., APPELBAUM, E. R., MARTIN, E. C., BUGELSKI, P. J. & HERZYK, D. J. (2001) Preclinical efficacy and safety of mepolizumab (SB-240563), a humanized monoclonal antibody to IL-5, in cynomolgus monkeys. *J Allergy Clin Immunol*, 108, 250-7.
- HEALTH PROFESSIONAL'S DRUG GUIDE 2001, ED., SHANNON, WILSON, STANG, 40
PRENTICE-HALL, INC, UPPER SADDLE RIVER, N.J.;
- HELLER, F., FUSS, I. J., NIEUWENHUIS, E. E., BLUMBERG, R. S. & STROBER, W. (2002) Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*, 17, 629-38.
- HINTON, P. R., JOHLFS, M. G., XIONG, J. M., HANESTAD, K., ONG, K. C., BULLOCK, C., KELLER, S., TANG, M. T., TSO, J. Y., VASQUEZ, M. &

- TSURUSHITA, N. (2004) Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J Biol Chem*, 279, 6213-6.
- HOLGATE, S. T. & POLOSA, R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 8, 218-30.
- HOLLIGER, P., PROSPERO, T. & WINTER, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6444-8.
- HONEGGER, A. & PLUCKTHUN, A. (2001) Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. *J Mol Biol*, 309, 657-70.
- HUSTON, J. S., LEVINSON, D., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M. S., NOVOTNY, J., MARGOLIES, M. N., RIDGE, R. J., BRUCCOLERI, R. E., HABER, E., CREA, R. & ET AL. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5879-83. 10
- INNIS, ET AL., PCR PROTOCOLS A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, EDS., ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CALIF. (1990).
- IWAMURA, C. & NAKAYAMA, T. (2010) Role of NKT cells in allergic asthma. *Curr Opin Immunol*, 22, 807-13.
- JONES, A. J., PAPAC, D. I., CHIN, E. H., KECK, R., BAUGHMAN, S. A., LIN, Y. S., KNEER, J. & BATTERSBY, J. E. (2007) Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys. *Glycobiology*, 17, 529-40. 20
- KANDA, Y., YAMADA, T., MORI, K., OKAZAKI, A., INOUE, M., KITAJIMA-MIYAMA, K., KUNI-KAMOCHI, R., NAKANO, R., YANO, K., KAKITA, S., SHITARA, K. & SATOH, M. (2007) Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*, 17, 104-18.
- KANEKO, Y., NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313, 670-3.
- KITA, H., NAIDENKO, O. V., KRONENBERG, M., ANSARI, A. A., ROGERS, P., HE, X. S., KONING, F., MIKAYAMA, T., VAN DE WATER, J., COPPEL, R. L., KAPLAN, M. & GERSHWIN, M. E. (2002) Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology*, 123, 1031-43. 30
- KOLKMAN, J. A. & STEMMER, W. P. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat Biotechnol*, 19, 423-8.
- KONTERMANN AND DUBEL EDS., ANTIBODY ENGINEERING 2001 SPRINGER-VERLAG. NEW YORK. 790 PP., ISBN 3-540-41354-5
- KOPSIDAS, G., ROBERTS, A. S., COIA, G., STRELTSOV, V. A. & NUTTALL, S. D. (2006) In vitro improvement of a shark IgNAR antibody by Qbeta replicase mutation and ribosome display mimics in vivo affinity maturation. *Immunol Lett*, 107, 163-8.
- KOTSIANIDIS, I., NAKOU, E., SPANOUDAKIS, E., BOUCHLIOU, I., MOUSTAKIDIS, E., MILTIADES, P., VADIKOLIA, C. M., SZYDLO, R., KARADIMITRIS, A. & TSATALAS, C. The diagnostic value of CD1d expression in a large cohort of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. (2011) *Am J Clin Pathol*, 136, 400-8. 40
- KYRIAKAKIS, E., CAVALLARI, M., ANDERT, J., PHILIPPOVA, M., KOELLA, C., BOCHKOV, V., ERNE, P., WILSON, S. B., MORI, L., BIEDERMANN, B. C.,

- RESINK, T. J. & DE LIBERO, G. (2010) Invariant natural killer T cells: Linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis. *Eur J Immunol*.
- LISBONNE, M., DIEM, S., DE CASTRO KELLER, A., LEFORT, J., ARAUJO, L. M., HACHEM, P., FOURNEAU, J. M., SIDOBRE, S., KRONENBERG, M., TANIGUCHI, M., VAN ENDERT, P., DY, M., ASKENASE, P., RUSSO, M., VARGAFTIG, B. B., HERBELIN, A. & LEITE-DE-MORAES, M. C. (2003) Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol*, 171, 1637-41.
- LUND, J., WINTER, G., JONES, P. T., POUND, J. D., TANAKA, T., WALKER, M. R., ARTYMIUK, P. J., ARATA, Y., BURTON, D. R., JEFFERIS, R. & ET AL. (1991) Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG. *J Immunol*, 147, 2657-62. 10
- MARKS, J. D. & BRADBURY, A. (2004) Selection of human antibodies from phage display libraries. *Methods Mol Biol*, 248, 161-76.
- MATANGKASOMBUT, P., PICHAVANT, M., YASUMI, T., HENDRICKS, C., SAVAGE, P. B., DEKRUYFF, R. H. & UMETSU, D. T. (2008) Direct activation of natural killer T cells induces airway hyperreactivity in nonhuman primates. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 1287-9.
- METELITSA, L. S., WEINBERG, K. I., EMANUEL, P. D. & SEEGER, R. C. (2003) Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia*, 17, 1068-77. 20
- MORRISON, S. L. (1985) Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science*, 229, 1202-7.
- MURDOCH, J. R. & LLOYD, C. M. (2010) Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res*, 690, 24-39.
- NURSING 2001 HANDBOOK OF DRUGS, 21 ST EDITION, SPRINGHOUSE CORP., SPRINGHOUSE, PA., 2001;
- OSTANIN, D. V., BAO, J., KOBOZIEV, I., GRAY, L., ROBINSON-JACKSON, S. A., KOSLOSKI-DAVIDSON, M., PRICE, V. H. & GRISHAM, M. B. (2009) T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G135-46.
- PADLAN, E. A., ABERGEL, C. & TIPPER, J. P. (1995) Identification of specificity-determining residues in antibodies. *Faseb J*, 9, 133-9. 30
- PELED, J. U., KUANG, F. L., IGLESIAS-USSEL, M. D., ROA, S., KALIS, S. L., GOODMAN, M. F. & SCHARFF, M. D. (2008) The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*, 26, 481-511.
- PELLICCI, D. G., PATEL, O., KJER-NIELSEN, L., PANG, S. S., SULLIVAN, L. C., KYPARISSOUDIS, K., BROOKS, A. G., REID, H. H., GRAS, S., LUCET, I. S., KOH, R., SMYTH, M. J., MALLEVAEY, T., MATSUDA, J. L., GAPIN, L., MCCLUSKEY, J., GODFREY, D. I. & ROSSJOHN, J. (2009) Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity*, 31, 47-59.
- PETKOVA, S. B., AKILESH, S., SPROULE, T. J., CHRISTIANSON, G. J., AL KHABBAZ, H., BROWN, A. C., PRESTA, L. G., MENG, Y. G. & ROOPENIAN, D. C. (2006) Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int Immunol*, 18, 1759-69. 40
- PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 52 ND ED., MEDICAL ECONOMICS, MONTVALE, N.J. (1998)

- PICHAVANT, M., GOYA, S., MEYER, E. H., JOHNSTON, R. A., KIM, H. Y., MATANGKASOMBUT, P., ZHU, M., IWAKURA, Y., SAVAGE, P. B., DEKRUYFF, R. H., SHORE, S. A. & UMETSU, D. T. (2008) Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med*, 205, 385-93.
- POLJAK, R. J. (1994) Production and structure of diabodies. *Structure*, 2, 1121-3.
- QUEEN, C., SCHNEIDER, W. P., SELICK, H. E., PAYNE, P. W., LANDOLFI, N. F., DUNCAN, J. F., AVDALOVIC, N. M., LEVITT, M., JUNGHANS, R. P. & WALDMANN, T. A. (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 10029-33. 10
- REINHARDT, C. & MELMS, A. (1999) Elevated frequencies of natural killer T lymphocytes in myasthenia gravis. *Neurology*, 52, 1485-7.
- SANTODOMINGO-GARZON, T. & SWAIN, M. G. Role of NKT cells in autoimmune liver disease. *Autoimmun Rev*, 10, 793-800.
- SAUBERMANN, L. J., BECK, P., DE JONG, Y. P., PITMAN, R. S., RYAN, M. S., KIM, H. S., EXLEY, M., SNAPPER, S., BALK, S. P., HAGEN, S. J., KANAUCHI, O., MOTOKI, K., SAKAI, T., TERHORST, C., KOEZUKA, Y., PODOLSKY, D. K. & BLUMBERG, R. S. (2000) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*, 119, 119-28.3
- SESHASAYEE, D., LEE, W. P., ZHOU, M., SHU, J., SUTO, E., ZHANG, J., DIEHL, L., AUSTIN, C. D., MENG, Y. G., TAN, M., BULLENS, S. L., SEEBER, S., FUENTES, M. E., LABRIJN, A. F., GRAUS, Y. M., MILLER, L. A., SCHELEGLE, E. S., HYDE, D. M., WU, L. C., HYMOWITZ, S. G. & MARTIN, F. (2007) In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest*, 117, 3868-78. 20
- SHIELDS, R. L., NAMENUK, A. K., HONG, K., MENG, Y. G., RAE, J., BRIGGS, J., XIE, D., LAI, J., STADLEN, A., LI, B., FOX, J. A. & PRESTA, L. G. (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*, 276, 6591-604.
- SMITH, L. J., REDFIELD, C., BOYD, J., LAWRENCE, G. M., EDWARDS, R. G., SMITH, R. A. & DOBSON, C. M. (1992) Human interleukin 4. The solution structure of a four-helix bundle protein. *J Mol Biol*, 224, 899-904. 30
- SPRAGUE, J., CONDRA, J. H., ARNHEITER, H. & LAZZARINI, R. A. (1983) Expression of a recombinant DNA gene coding for the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein. *J Virol*, 45, 773-81.
- SYN, W. K., OO, Y. H., PEREIRA, T. A., KARACA, G. F., JUNG, Y., OMENETTI, A., WITEK, R. P., CHOI, S. S., GUY, C. D., FEARING, C. M., TEABERRY, V., PEREIRA, F. E., ADAMS, D. H. & DIEHL, A. M. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51, 1998-2007.
- TAKAHASHI, Y., SOEJIMA, Y. & FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 18, 2300-8.
- TAKEDA, K., HAYAKAWA, Y., VAN KAER, L., MATSUDA, H., YAGITA, H. & OKUMURA, K. (2000) Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5498-503. 40
- TAO, M. & MORRISON, S. (1989) Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunology*, 143, 2595-2601

TERHORST, C., VAN AGTHOVEN, A., LECLAIR, K., SNOW, P., REINHERZ, E. & SCHLOSSMAN, S. (1981) Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9 and T10. *Cell*, 23, 771-80.

THIE, H., VOEDISCH, B., DUBEL, S., HUST, M. & SCHIRRMANN, T. (2009) Affinity maturation by phage display. *Methods Mol Biol*, 525, 309-22, xv.

VAN AGTHOVEN, A. & TERHORST, C. (1982) Further biochemical characterization of the human thymocyte differentiation antigen T6. *J Immunol*, 128, 426-32.

VENKATASWAMY, M. M. & PORCELLI, S. A. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol*, 22, 68-78.

WALLACE, K. L., MARSHALL, M. A., RAMOS, S. I., LANNIGAN, J. A., FIELD, J. J., STRIETER, R. M. & LINDEN, J. (2009) NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood*, 114, 667-76.

WANG, W., SINGH, S., ZENG, D. L., KING, K. & NEMA, S. (2007) Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci*, 96, 1-26

WARD, E. S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A. D., JONES, P. T. & WINTER, G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341, 544-6.

WELLS et al., ed., 1990; *Pharmacotherapy Handbook*, Appleton & Lange, Stamford, Conn.,

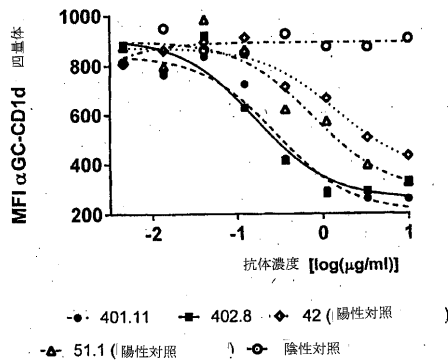
WILLIAMS & WILLIAMS, (1995), *Remington: The Science & Practice of Pharmacy*, 19th ed.,

WIRTZ, S., NEUFERT, C., WEIGMANN, B. & NEURATH, M. F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2, 541-6.

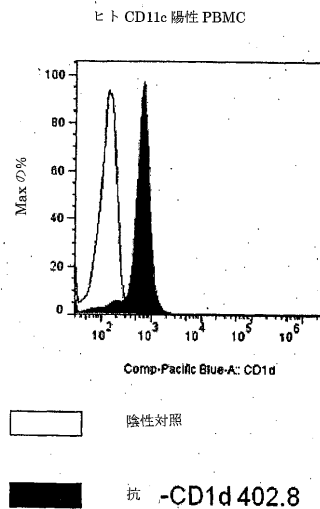
10

20

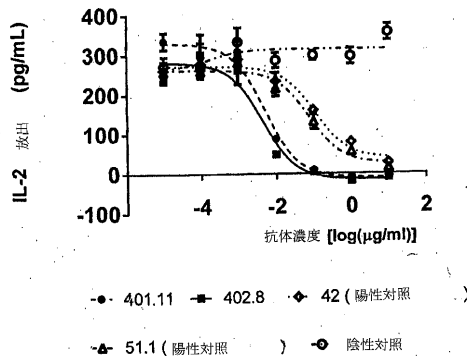
【 図 1 】



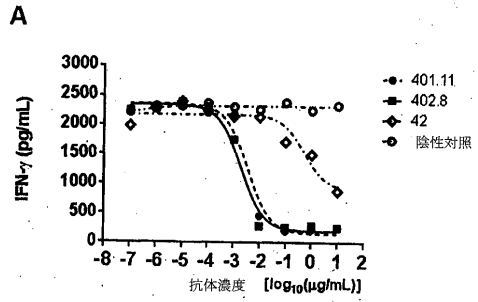
【 図 3 】



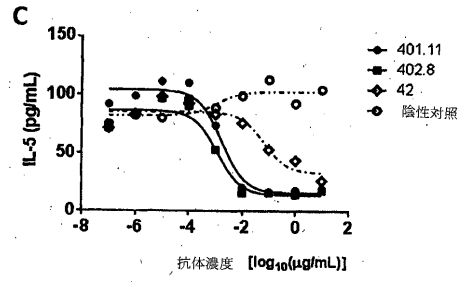
【 図 2 】



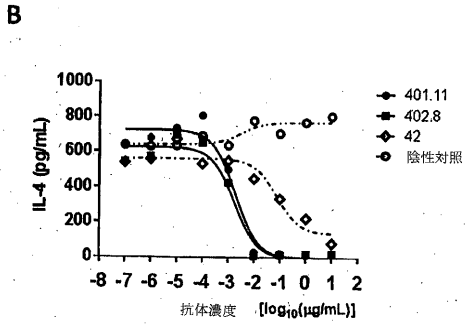
【 图 4 A 】



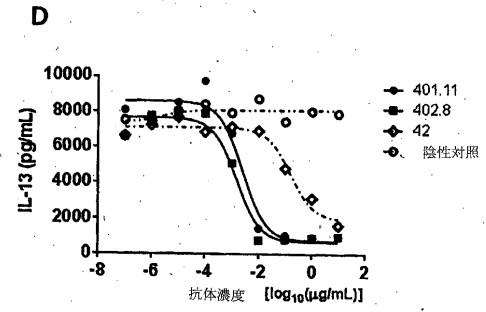
【 图 4 C 】



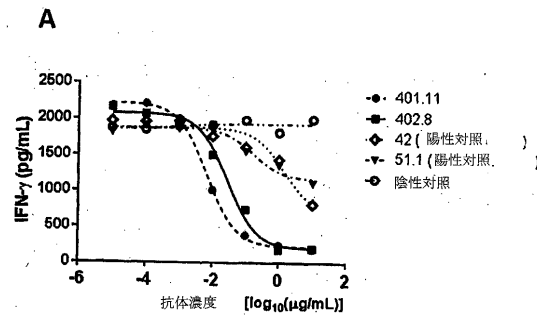
【 图 4 B 】



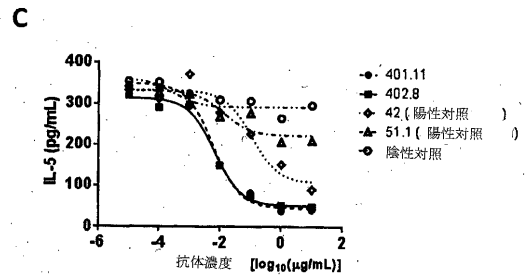
【 图 4 D 】



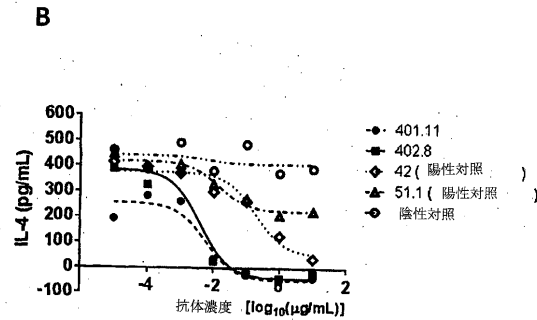
【 图 5 A 】



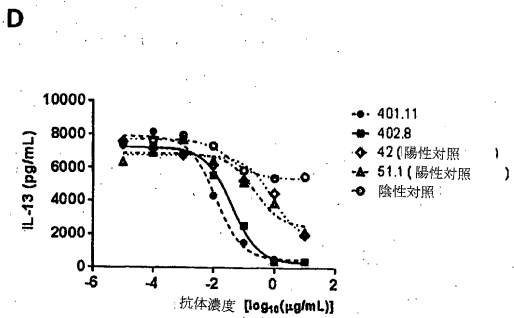
【 图 5 C 】



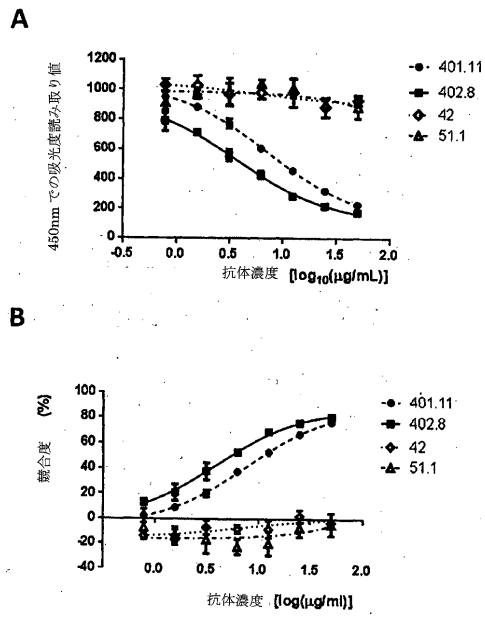
【 图 5 B 】



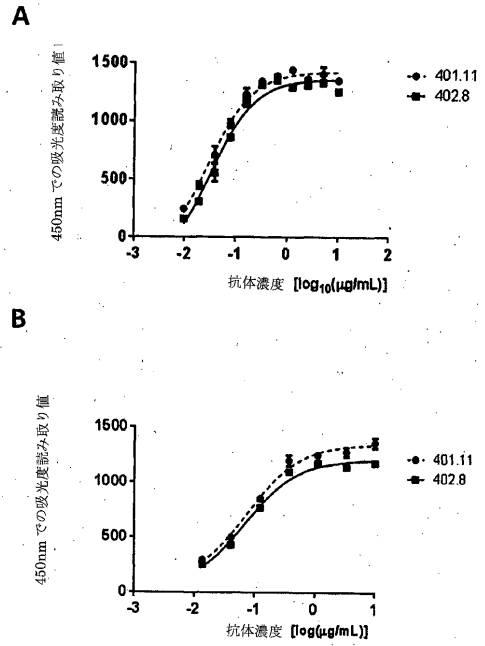
【 图 5 D 】



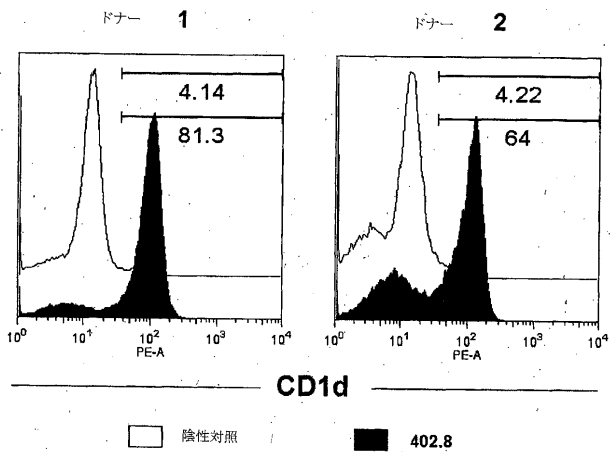
【 図 6 】



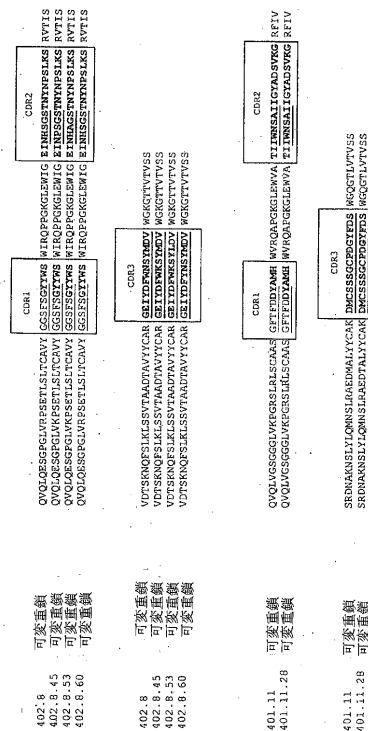
【 図 7 】



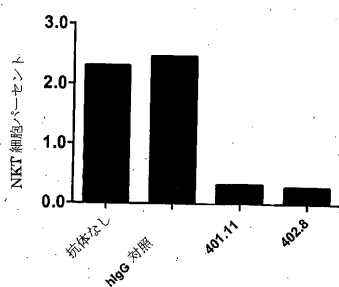
【 図 8 】



【 図 10 】



【 図 9 】



【 1 1 】

401.11.151 可変領域
401.11.26 可変領域

401.11.152 可変領域
401.11.28 可変領域

402.9 可変領域

402.8 可変領域

CDR1
CDR2
CDR3

【 1 2 】

重鎖

401.11.151
401.11.152
401.11.153
401.11.154
401.11.155
401.11.156
401.11.157
401.11.158
401.11.159
401.11.160
401.11.161
401.11.162
401.11.163
401.11.164
401.11.165
401.11.166
401.11.167
401.11.168
401.11.169
401.11.170
401.11.171
401.11.172
401.11.173
401.11.174
401.11.175
401.11.176
401.11.177
401.11.178
401.11.179
401.11.180
401.11.181

軽鎖

401.11.151
401.11.152
401.11.153
401.11.154
401.11.155
401.11.156
401.11.157
401.11.158
401.11.159
401.11.160
401.11.161
401.11.162
401.11.163
401.11.164
401.11.165
401.11.166
401.11.167
401.11.168
401.11.169
401.11.170
401.11.171
401.11.172
401.11.173
401.11.174
401.11.175
401.11.176
401.11.177
401.11.178
401.11.179
401.11.180
401.11.181

【 1 3 】

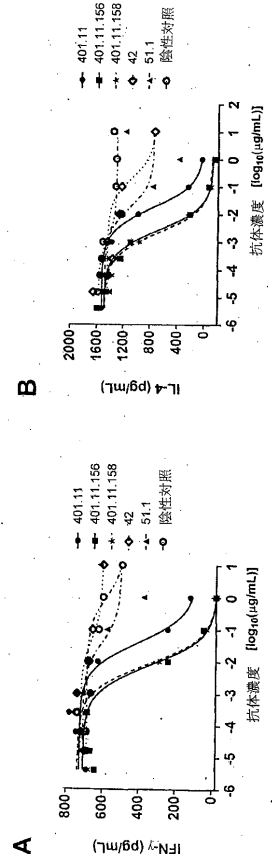
重鎖

401.11.151
401.11.152
401.11.153
401.11.154
401.11.155
401.11.156
401.11.157
401.11.158
401.11.159
401.11.160
401.11.161
401.11.162
401.11.163
401.11.164
401.11.165
401.11.166
401.11.167
401.11.168
401.11.169
401.11.170
401.11.171
401.11.172
401.11.173
401.11.174
401.11.175
401.11.176
401.11.177
401.11.178
401.11.179
401.11.180
401.11.181

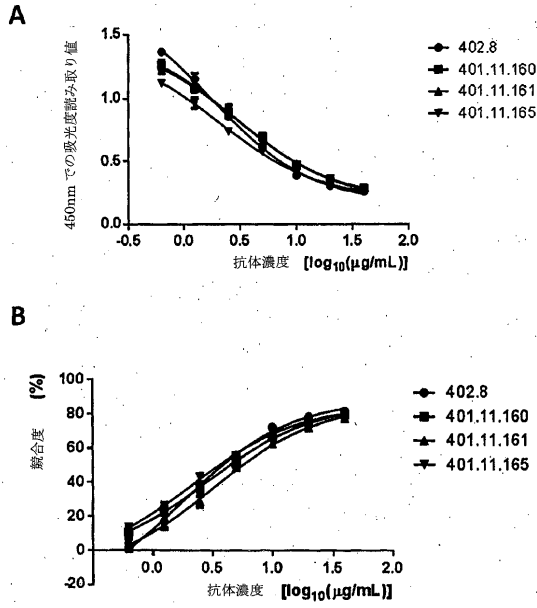
軽鎖

401.11.151
401.11.152
401.11.153
401.11.154
401.11.155
401.11.156
401.11.157
401.11.158
401.11.159
401.11.160
401.11.161
401.11.162
401.11.163
401.11.164
401.11.165
401.11.166
401.11.167
401.11.168
401.11.169
401.11.170
401.11.171
401.11.172
401.11.173
401.11.174
401.11.175
401.11.176
401.11.177
401.11.178
401.11.179
401.11.180
401.11.181

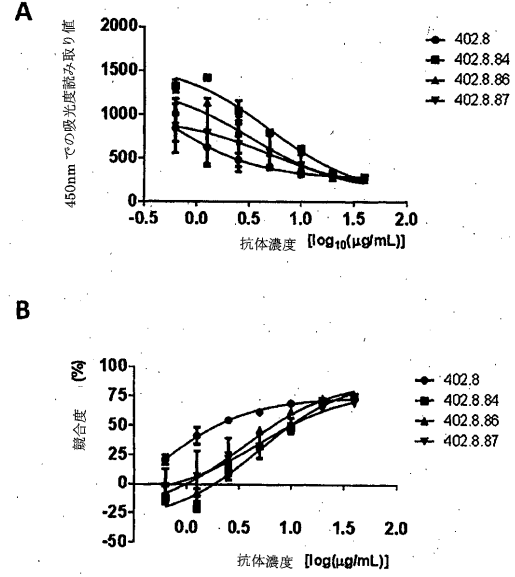
【 1 4 】



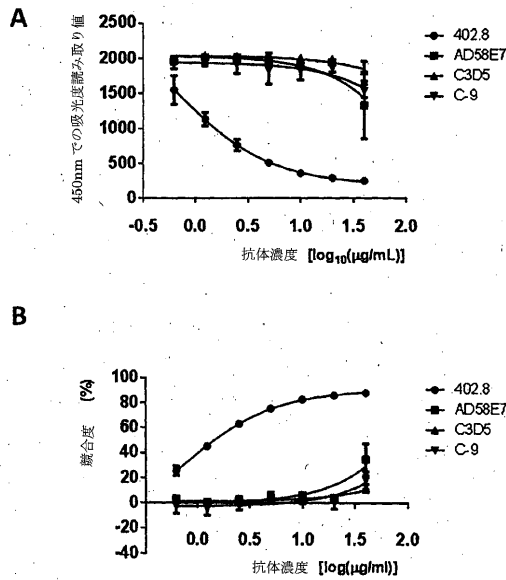
【 図 1 9 】



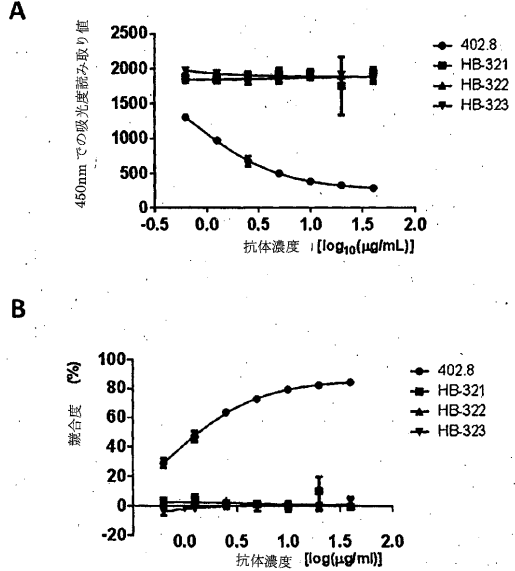
【 図 2 0 】



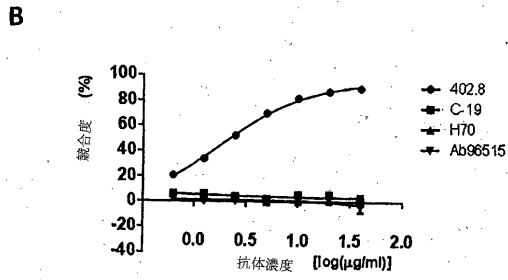
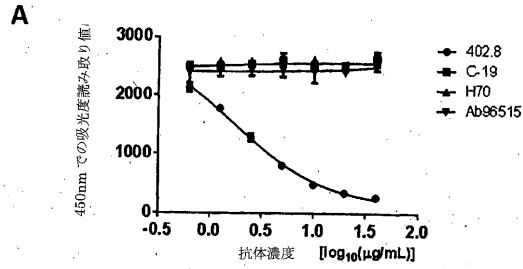
【 図 2 1 】



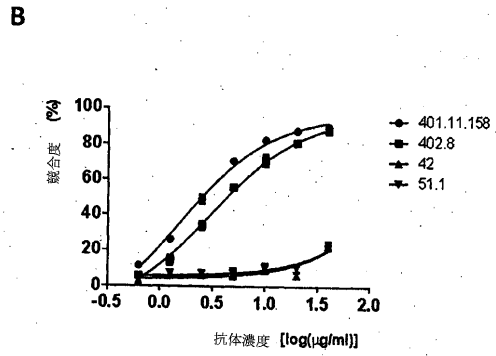
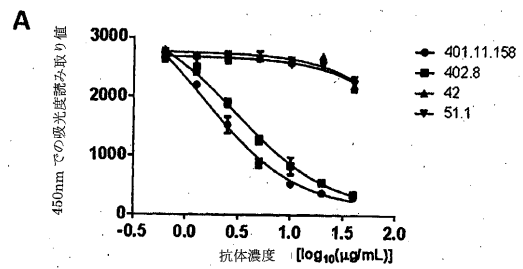
【 図 2 2 】



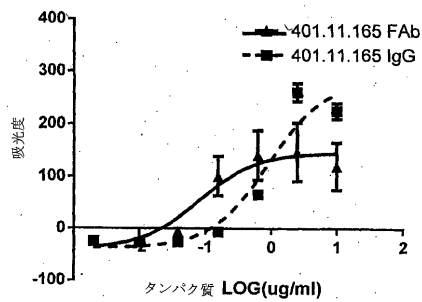
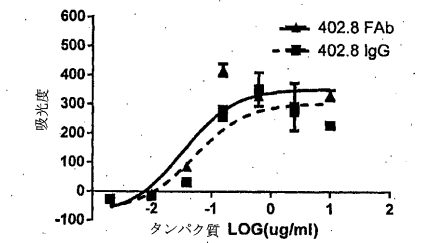
【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

```

EVPGRLEFLKLGISFANSSWTFDGLAWLGELOHSHNSDSITVSLKPSQGTFSQDMETLQHPFVYRSSFTRDV
--Q-KNYTF...M...R...S...SVV...D...R...K...A...ISFT...KL.N...K...M...Q...V...I
--Q-KNYTF...M...R...S...SVV...D...R...K...A...ISFT...EL.N...K...M...Q...V...I
REFRSM LRLS--YFL ELQVSAQCEVHNSMNPFFVAPGKEDLSFGQTSWPTQEAFLRV NLA IQVLRQDKWRETVO
Q-LV...MSPIED...I...L...L...MY...ES...L...YVVR...H...QTVES...S...L...D...P...K...A...GG...SA...
Q-LV...MSPIED...I...L...L...MY...ES...L...YVVR...H...QTVES...S...L...D...P...K...A...GG...SA...
NLLNGTQFVSGLLSCKELKQVPEKALSKRGSFGKFRLLLVCHVSGFPEKPVYVWKRSGEQGQKQGHLLPNA
M...D...L...R...A...D...E...E...V...SV...SAD...HQ...M...D...HR...F...
M...D...L...R...A...D...E...E...V...SV...SAD...HQ...M...D...HR...F...
DETPLYRATLIVAGEAGLSRVKHSLSKQDILVYGGSYTS
...Q...E...E...A...G...I...DARQAPVG
...Q...E...E...A...G...I...DARQAPVG

```

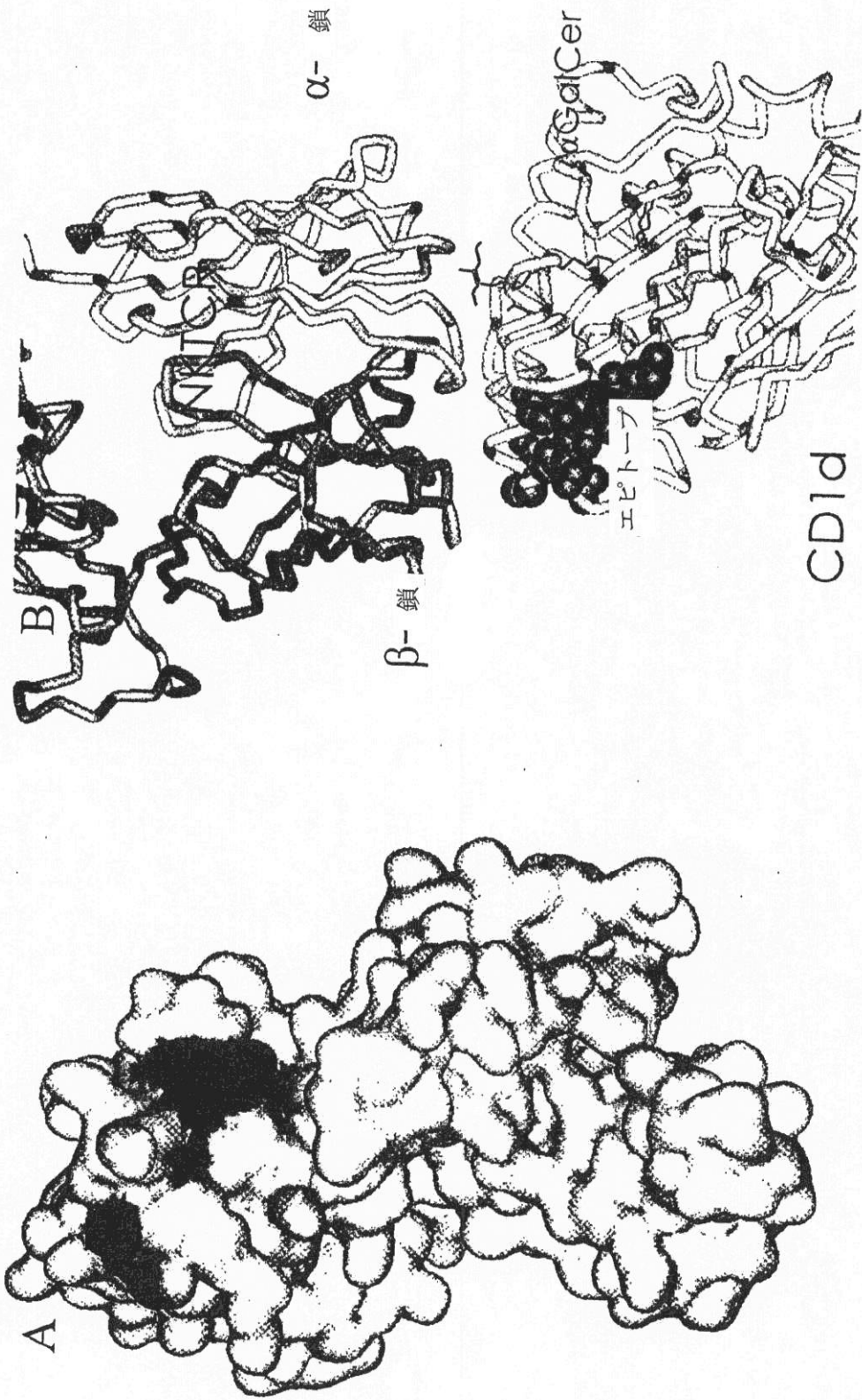
E_H CD1d
マウス CD1d
mCD1dhu
hCD1dmu

E_H CD1d
マウス CD1d
mCD1dhu
hCD1dmu

E_H CD1d
マウス CD1d
mCD1dhu
hCD1dmu

E_H CD1d
マウス CD1d
mCD1dhu
hCD1dmu

【 図 2 8 】



【 配列表 】

[2015502915000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2012/001247
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01) A61P 17/06 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)		
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)		
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 practicable, search terms used)		
GenomeQuest (nucleotide and protein databases): All sequences of the claims searched		
WPI, EPODOC and MEDLINE databases searched with keywords: CD1d, R3G1, antibody, immunoglobulin, Ab, Ig, psoriasis, atherosclerosis, ulcerative colitis, ischemia reperfusion injury, sickle cell, asthma, primary biliary cirrhosis.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 November 2012	Date of mailing of the international search report 15 November 2012	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	Authorised officer Shawn Lyons AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832081	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2012/001247
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FAIS F et al., 'CD1d is expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells and mediates alpha-galactosylceramide presentation to natural killer T lymphocytes', International Journal of Cancer, 2004, Vol. 109, pages 402-411. Page 403, column 1, paragraph 5; page 406, column 2, paragraph 3; page 407, column 2, paragraph 3	1-42
A	KIM HY et al., 'The development of airway hyperreactivity in T-bet-deficient mice requires CD1d-restricted NKT cells', The Journal of Immunology, 2009, Vol. 182, pages 3252-3261. Abstract; page 3253, column 1, lines 9-13; page 3253, column 2, paragraph 3; page 3256, column 2, line 14- page 3257, column 1, lines 1-14	1-42
A	LAPPAS CM et al., 'Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation', Journal of Experimental Medicine, 2006, Vol. 203, No.12, pages 2639-2648. Page 2640, column 1, lines 47-55; page 2642, column 1, lines 4-11; Figure 4; page 2646, column 1, paragraph 5	1-42
A	US 2008/0254037 A1 (LINDEN JM et al.) 16 October 2008 Paragraph [0020]-[0021]; paragraph [0073]	1-42
A	WO 2000/002583 A1 (NICKOLOFF BJ) 20 January 2000 Example 3; page 37, lines 5-23; claim 5	1-42
A	PICHAVANT M et al., 'Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17', Journal of Experimental Medicine. 2008, Vol. 205, No. 2, pages 385-393 Page 387, column 1, lines 6-12; page 391, column 1, paragraph 4	1-42
A	WALLACE KL et al., 'NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines', Blood. 2009, Vol. 114, pages 667-676 Abstract; page 669, column 1, paragraph 2; page 673, column 1, paragraph 2; Figure 6	1-42
A	LISBONNE M. et al., 'Cutting Edge: Invariant Va14 NKT Cells Are Required for Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperreactivity in an Experimental Asthma Model', The Journal of Immunology. 2003, Vol. 171, pages 1637-1641 Page 1638, column 1, paragraph 5; Figure 4; page 1640, column 1 line 14-column 2 line 4	1-42
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2012/001247	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2008/0254037 A1	16 Oct 2008	US 2008254037 A1	16 Oct 2008
		US 8012484 B2	06 Sep 2011
WO 2000/002583 A1	20 Jan 2000	AU 4837499 A	01 Feb 2000
		AU 5092699 A	01 Feb 2000
		EP 1095062 A1	02 May 2001
		EP 1095062 B1	13 Sep 2006
		JP 2003524146 A	12 Aug 2003
		WO 0002583 A1	20 Jan 2000
		WO 0002923 A1	20 Jan 2000
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. <small>Form PCT/ISA/210 (Family Annex) July 2009</small>			

フロントページの続き

(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	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
	A 6 1 P 17/06	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	Y

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

(72)発明者 ジョナサン・カンナン・ナンビア
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 0 7 5・セント・アイブス・ボントウ・ロード
・6

(72)発明者 リン・ドロシー・ポルトン
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 1 1 3・マッコリー・パーク・エッピング・ロ
ード・3 7・レベル・2

(72)発明者 アダム・クラーク
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 1 3 1・ファイヴ・ドック・バーンステイブル
・ロード・2 9

(72)発明者 アンドリュー・ジェームズ・パウ
オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 4 4・パスコー・ヴェイル・ヘルス・ストリート・1 C

(72)発明者 デブラ・タンヴァキス
オーストラリア・ヴィクトリア・3 1 2 4・キャンバーウェル・ヘーゼル・ストリート・1 5・ユ
ニット・1

(72)発明者 ジョージ・コブシダス
オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 7 2・プレストン・クレイマー・ストリート・1 2 9

(72)発明者 アンソニー・ゲラルド・ドイル
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 0 4 7・ドラモイン・ギップス・ストリート・
1 0 0

(72)発明者 マシュー・ポラード
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 1 5 8・デュラル・ミルストリーム・グローヴ
・3

(72)発明者 フセイン・ムスタファ
オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 4 0・エッセンドン・テニソン・ストリート・1 2 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA53 DA02 EA04 HA14

4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 BB15 BB37

CA25	CA44	CA46								
4C085	AA13	AA14	CC01	DD62	EE01	GG02	GG03	GG04	GG06	GG10
4H045	AA11	DA76	EA20	EA50	FA74					

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015502915A5	公开(公告)日	2015-12-03
申请号	JP2014534890	申请日	2012-10-15
申请(专利权)人(译)	梯瓦制药澳大利亚Pitiwai有限公司		
[标]发明人	ジョナサンカンナンナンビア リンドロシーポールトン アダムクラーク アンドリュージェームズパウ デブラタンヴァキス ジョージコブシダス アンソニーゲラルドドイル マシューポラード フセインムスタファ		
发明人	ジョナサン・カンナン・ナンビア リン・ドロシー・ポールトン アダム・クラーク アンドリュー・ジェームズ・パウ デブラ・タンヴァキス ジョージ・コブシダス アンソニー・ゲラルド・ドイル マシュー・ポラード フセイン・ムスタファ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 A61K39/395 A61P1/04 A61P1/16 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 C07K16/2833 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K16/2803		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/04 A61P1/16 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 G01N33/53.D G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA14 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB15 4B065/BB37 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC01 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2011904190 2011-10-14 AU 61/547307 2011-10-14 US		
其他公开文献	JP2015502915A		

摘要(译)

本发明提供了结合CD1d的分离的抗体或其抗原结合部分。这些抗体及其抗原结合部分用于治疗涉及NKT细胞效应子功能的病症。

