

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6018361号  
(P6018361)

(45) 発行日 平成28年11月2日(2016.11.2)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z N A D
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	

請求項の数 5 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-544716 (P2010-544716)	(73) 特許権者	591100596
(86) (22) 出願日	平成21年1月30日(2009.1.30)		アンスティチュ ナショナル ドウ ラ
(65) 公表番号	特表2011-510953 (P2011-510953A)		サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ
(43) 公表日	平成23年4月7日(2011.4.7)		ディカル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/051078		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開番号	W02009/095478		ユ・ドウ・トルビアック 101
(87) 国際公開日	平成21年8月6日(2009.8.6)	(74) 代理人	110001508
審査請求日	平成23年8月3日(2011.8.3)		特許業務法人 津国
審査番号	不服2014-21654 (P2014-21654/J1)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成26年10月24日(2014.10.24)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	08300061.2	(74) 代理人	100116528
(32) 優先日	平成20年1月31日(2008.1.31)		弁理士 三宅 俊男
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100146031
(31) 優先権主張番号	08162683.0		弁理士 柴田 明夫
(32) 優先日	平成20年8月20日(2008.8.20)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制御性T細胞活性を抑制するための、ヒトCD39に対する抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

制御性T細胞 (Treg) の免疫抑制活性を阻害するCD39抗体を含む、増大した制御性T細胞 (Treg) 活性に関連付けられる疾病を治療または予防するための、医薬組成物であって、

前記疾病は癌および感染症からなる群から選択される、医薬組成物。

【請求項2】

前記疾病は、V I H、H B V、H C V、熱帯熱マラリア原虫、または結核菌による感染症からなる群から選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記CD39抗体が、A T P a s e 活性を抑制する、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記抗体は、

可変ドメインが、C D R - H 1として配列番号2と、C D R - H 2として配列番号3と、C D R - H 3として配列番号4とからなる群から選択された1つの配列を有する少なくとも1つのC D Rを含む重鎖、および/または、

可変ドメインが、C D R - L 1として配列番号6と、C D R - L 2として配列番号7と、C D R - L 3として配列番号8とからなる群から選択された1つの配列を有する少なくとも1つのC D Rを含む軽鎖を含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の医薬組成物

## 【請求項5】

前記抗体は、

配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

〔発明の分野〕

本発明は、制御性T細胞(Treg)活性を抑制するための、ヒトCD39に対する抗体に関する。

## 【0002】

〔発明の背景〕

制御性T細胞(Treg細胞)は、現在、それらの起源および抑制活性に応じて、2つの主要な部分集合に分類されている(Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nature Rev. Immunol. 3, 253-257 (2003))。内在性Treg細胞は、T-細胞受容体(TCR)と、胸腺ストロマにおいて発現した抗原との高親和性の相互作用によって、胸腺において発生する。これら内在性Treg細胞は、従来から、インビトロで、エフェクターT細胞の増殖を、接触依存的、かつ、サイトカイン非依存的に、抑制するものとして説明されている。内在性Treg細胞は、活性化リンパ球を特徴とする分子である、CD25、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA4)、グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子(TNF)受容体(GITR)およびOX40を構成的に発現する。しかしながら、少なくともマウス系では、転写因子FOX P3(フォークヘッドボックスp3)の高レベルの発現は、制御系統における最も際立ったマーカーである。今まで、不完全にしか特徴付けられていないが、内在性Treg細胞の抑制機構のネットワークは、CTLA4、膜結合性のトランスフォーミング成長因子(TGF)、および細胞周囲のアデノシンの産生といった表面分子を含む。

## 【0003】

通常の宿主において自然発生のTreg細胞が減少すると、様々な自己免疫疾患が引き起こされる。これは、宿主免疫系が抑制されず、宿主の体の自己組織を攻撃するようになるからである。齧歯類では、CD25+CD4+制御性T細胞の減少または機能的変化が、甲状腺炎、胃炎、および1型糖尿病を含む様々な臓器特異的自己免疫疾患の自然発生を引き起こすことが示されている。制御性T細胞はまた、環境抗原に対する制御された応答にも重要な意味を持っており、炎症性腸疾患(IBD)およびアレルギーを予防することが示されている。

## 【0004】

ここで、多数の系のTregについて説明する。Tregは、自己(免疫)寛容を維持し、自己免疫疾患から保護するための主要な機構として発現するものである。Tregは、自己免疫を制限する一方、これらはまた、抗腫瘍免疫および抗ウイルス免疫の効力を弱める。例えば、癌の場合、Treg細胞は、通常望まれる抗腫瘍免疫応答を妨げるため、悪影響を及ぼし得る。そして実際、癌患者は、その血中において、および腫瘍自体の内部において、増大した数の、腫瘍タンパク質に特有の活性Treg細胞を示すことを示唆する証拠も既にある。実際、ヒトにおける最近の幾つかの研究は、肺癌、乳癌、卵巣癌、黒色腫、肝臓癌、胃癌、およびリンパ腫を含む様々な癌において、CD4+CD25+Treg細胞の割合が増加していることを報告している。ウイルス感染の場合、慢性的にC型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスに感染した個体、およびヒト免疫不全ウイルスに感染した患者において、Treg細胞の数がより多いことが報告されている。

## 【0005】

従って、Treg活性を抑制または排除するための方法および組成物が、増大したTreg

10

20

30

40

50

e g 活性によって特徴付けられる疾病および疾患、例えば癌、感染症、および免疫応答の治療に役に立つであろう。

【 0 0 0 6 】

最新の研究では、C D 3 9 が、T r e g 活性に関連付けられる疾病を治療するために有効な新規の治療法の開発の標的となり得ることが論証されている (Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med. 2007 Jun 1;204(6): 1257-65. Epub 2007 May 14)。この著者らは、実際、C D 3 9 が、アデノシンの下流の産生によって免疫T細胞の抑制を制御し得るF o x p 3 T r e g 細胞の細胞表面マーカーであることを記載している。

10

【 0 0 0 7 】

〔 発明の概要 〕

本発明は、増大した制御性T細胞 ( T r e g ) 活性に関連付けられる疾病を治療または予防するためのC D 3 9 抗体に関する。

【 0 0 0 8 】

特に、本発明は、癌および感染症を治療または予防するためのC D 3 9 抗体に関する。

【 0 0 0 9 】

本発明はまた、C D 3 9 抗体を含む、増大した制御性T細胞 ( T r e g ) 活性に関連付けられる疾病を治療または予防するための薬学的組成物に関する。

20

【 0 0 1 0 】

〔 発明の詳細な説明 〕

定義

「C D 3 9」という語は、エクトヌクレオシド三リン酸塩ジホスホヒドロラーゼ - 1 ( E N T P D 1 ) と呼ばれるC D 3 9 タンパク質を指す。C D 3 9 は、A T P / U T P およびA D P / U D P を、それぞれ、A M P などのヌクレオシドに加水分解する外酵素である。

【 0 0 1 1 】

「C D 3 9 抗体」という語は、ヒトC D 3 9 に対する抗体を意味している。

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、「抗体」または「免疫グロブリン」は、同じ意味を有しており、本発明では同等に用いられる。ここで用いられる「抗体」という語は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に有効な部分、つまり、ある抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。そのようなものとして、抗体という語は、全ての抗体分子だけでなく、抗体フラグメント、並びに、抗体および抗体フラグメントの変異体 (誘導体を含む) をも包含するものである。内在性抗体では、2つの重鎖が、ジスルフィド結合によって互いにつながっており、各重鎖は、ジスルフィド結合によって1つの軽鎖につながっている。2種類の軽鎖、ラムダ (  $\lambda$  ) およびカッパ (  $\kappa$  ) が存在する。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス (またはイソタイプ)、I g M、I g D、I g G、I g A、およびI g E が存在する。各鎖は、固有の配列ドメインを含んでいる。軽鎖は、2つのドメイン、すなわち、可変ドメイン ( V L ) および定常ドメイン ( C L ) を含んでいる。重鎖は、4つのドメイン、すなわち、1つの可変ドメイン ( V H ) および3つの定常ドメイン ( C H 1、C H 2、およびC H 3 (これらは、集合的にC H と呼ばれる) ) を含んでいる。軽鎖の可変領域 ( V L ) および重鎖の可変領域 ( V H ) は、結合認識を決定すると共に、抗原に対する特異性を決定する。軽鎖の定常領域ドメイン ( C L ) および重鎖の定常領域ドメイン ( C H ) が、抗体の鎖会合、分泌、経胎盤移行、補体結合、およびF c 受容体 ( F c R ) への結合といった、重要な生物学的特性を与える。F v フラグメントは、免疫グロブリンのF a b フラグメントのN - 末端部であり、1つの軽鎖および1つの重鎖の可変部分から構成されている。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の構造的補完性において存在している。抗体結合部位は、主に超可変領域ま

30

40

50

たは相補性決定領域（CDR）からの残基から形成されている。時折、非超可変領域またはフレームワーク領域（FR）からの残基が、全体的なドメイン構成、従って結合部位に影響を及ぼすこともある。相補性決定領域すなわちCDRは、自然免疫グロブリン結合部位の内在性Fv領域の結合親和力および特異性をともに規定するアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖は、L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3と示される3つのCDRを有し、免疫グロブリンの重鎖は、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3と示される3つのCDRを有している。従って、抗原結合部位は、重鎖および軽鎖の各V領域からのCDRのセットを含む6つのCDRを含む。フレームワーク領域（FR）とは、CDRの間に挿入されたアミノ酸配列のことを指す。

【0013】

本発明によれば、「キメラ抗体」という語は、任意の種、好ましくはマウスからのCD39抗体のVHドメインおよびVLドメインと、ヒト抗体のCHドメインおよびCLドメインとを含む抗体のことを指す。

【0014】

本発明によれば、「ヒト化抗体」という語は、ヒト抗体からの可変領域フレームワークおよび定常領域を有する抗体のことを指すが、任意の種、好ましくはマウスからのCD39抗体のCDRを保持している。

【0015】

「Fab」という語は、分子量が約50,000であると共に抗原結合活性を有する抗体フラグメントを示している。ここで、IgGをプロテアーゼ、パパインで処理することによって得られるフラグメントのうち、H鎖のNターミナルの約半分およびL鎖の全ては、ジスルフィド結合によって結合されている。

【0016】

「F(ab')<sub>2</sub>」という語は、分子量が約100,000であると共に抗原結合活性を有する抗体フラグメントのことを指す。「F(ab')<sub>2</sub>」は、IgGをプロテアーゼ、ペプシンで処理することによって得られるフラグメントのうち、ヒンジ部のジスルフィド結合によって結合されたFabよりもわずかに大きい。

【0017】

「Fab'」という語は、分子量が約50,000であると共に抗原結合活性を有する抗体フラグメントのことを指す。「Fab'」は、F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ部のジスルフィド結合を切断することによって得られる。

【0018】

単一の鎖Fv（「scFv」）ポリペプチドは、共有結合されたVH::VLヘテロ二量体である。このVH::VLヘテロ二量体は、通常、ペプチドエンコーディングリンカーによってつながれたVHコード遺伝子およびVLコード遺伝子を含む遺伝子融合から発現する。「dsFv」は、ジスルフィド結合によって安定化されたVH::VLヘテロ二量体である。二価抗体フラグメントおよび多価抗体フラグメントは、一価scFvsの会合によって自然発生的に形成されるか、または二価sc(Fv)<sub>2</sub>などのペプチドリンカーによって一価scFvsを結合させることによって、生成可能である。

【0019】

「二重特異性抗体」という語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントのことを指す。この抗体フラグメントは、重鎖可変ドメイン（VH）を備えており、この重鎖可変ドメイン（VH）は、同じポリペプチド鎖（VH-VL）内の軽鎖可変ドメイン（VL）につながっている。短すぎて同じ鎖上の2つのドメインを対にすることができないリンカーを用いることによって、これらのドメインは、別の鎖の相補ドメインと、強制的に対にされ、このため、2つの抗原結合部位が生成される。

【0020】

「精製された」および「単離された」という語は、これらがポリペプチド（つまり、本発明に係る抗体）またはヌクレオチド配列に関する場合、示される分子が、同じ種類の他の生体高分子がほとんど存在しない中に、存在していることを意味する。ここで用いられ

10

20

30

40

50

る「精製された」という語は、同じ種類の生体高分子が、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、さらにより好ましくは少なくとも95重量%、最も好ましくは少なくとも98重量%で存在していることを意味している。特定のポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、実質的に、ポリペプチドをコードしない他の核酸分子を有していない核酸分子のことを指す。しかしながら、この分子は、この組成の基本的特徴に悪影響を与えない幾つかのさらなる塩基または構成成分を含んでいてよい。

【0021】

「増大したTreg活性に関連付けられる疾病」という表現は、増大したTreg活性に関連付けられる、増大したTreg活性によって引き起こされる、増大したTreg活性に起因する全ての疾患を包含する。

10

【0022】

本発明の意味するところでは、ここに用いられるような「治療すること」または「治療」という表現は、この表現が適用される疾患または状態、あるいはこのような疾患または状態の1つまたは複数の症状の進行を逆行させる、緩和する、抑制すること、または、これを予防することを意味するものである。「治療的に有効な量」とは、治療上の利点を被験体に与えるために必要な、活性剤（例えばCD39抗体）の最小量のことである。例えば、哺乳類にとって「治療的に有効な量」とは、疾患で死亡することに関連付けられるか、またはこれに抵抗する、病態、疾病の増悪、または生理的状态の改善を誘導する、改善する、または前記改善を引き起こすような量である。

20

【0023】

ここで用いるように、「予防」という語は、疾病または状態を有しているとまだ診断されていない被験体に、この疾病または状態が生じることを予防することを意味している。

【0024】

ここで用いるように、「被験体」という語は、齧歯類、ネコ科動物、犬科動物、および霊長類といった哺乳類を指す。本発明に係る被験体はヒトであることが好ましい。

【0025】

ここで用いるように、「癌」、「高増殖性」、および「悪性」という語は、自律的増殖性、つまり、急速な細胞増殖によって特徴付けられる異常な状態または状況を有する細胞のことを指す。高増殖性疾患および悪性疾患の状態は、病的として、つまり病状を特徴付けるまたは構成するものとして分類されるか、または、非病的として、つまり標準状態からは外れているが病状とは関連付けられないものとして分類され得る。この語は、組織病理学的な種類または侵襲性のステージに関係なく、全ての種類の、癌性増殖または発癌プロセス、転移性組織、あるいは、悪性形質転換された細胞、組織、または臓器を含むことを意味している。「癌」または「新生物」という語は、様々な臓器系の悪性腫瘍、例えば、肺、胸、甲状腺、リンパ、胃腸、および尿生殖路を冒すような悪性腫瘍、および腺癌を含む。腺癌には、大部分の結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌および/または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌、小腸癌、および、食道癌といった悪性腫瘍が含まれる。

30

【0026】

CD39抗体の治療的使用

40

本願発明者は、BY40と呼ばれるCD39抗体を含む、CD39に対する抗体が、Treg活性を抑制することができることを証明した。ここに、本願発明者は、Treg活性を抑制するため、つまり、増大したTreg活性に関連付けられる疾病の治療または予防のための、CD39抗体の使用を提案する。

【0027】

従って、本発明の第1の態様は、増大したTreg活性に関連付けられる疾病を治療または予防する方法および薬学的組成物を提供する。

【0028】

これにより本発明は、増大したTreg活性に関連付けられる疾病を治療または予防するためのCD39抗体に関する。

50

## 【 0 0 2 9 】

本発明はまた、増大した T r e g 活性に関連付けられる疾病を治療または予防する方法に関する。この方法は、前記疾病の治療または予防を必要としている被験体に C D 3 9 抗体を投与するステップを含む。

## 【 0 0 3 0 】

増大した T r e g 活性に関連付けられる疾病の例には、癌および感染症が含まれるが、これらに限定されない。癌の例には、肺癌、乳癌、卵巣癌、黒色腫、肝臓癌、胃癌、およびリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。感染症には、ヒト免疫不全ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなどのウイルスによる感染症、熱帯熱マラリア原虫（マラリアの病原因子）などの寄生虫による感染症、または結核菌などの細菌による感染症が含まれるが、これらに限定されない。

10

## 【 0 0 3 1 】

また、C D 3 9 抗体は、癌を発症した患者に再投与する前に、腫瘍特異的細胞毒性のリンパ球が生体外で拡大する間に、制御性 T 細胞を抑制または減少させるために用いてもよい。つまり、T r e g の抑制を、養子細胞療法のために、抗原特異的 T 細胞を生体外で生成するための手法として用いる。

## 【 0 0 3 2 】

C D 3 9 抗体は、ワクチン組成物の補助剤として用いてもよい。実際、ワクチン組成物は、癌または感染症の治療に適している。しかし、それらの治療効果は、T r e g が誘導されるため、制限され得る。従って、C D 3 9 抗体の投与を、ワクチン組成物の投与と組み合わせて行うことは、前記ワクチン組成物の効率を高めるために有用であり得る。

20

## 【 0 0 3 3 】

本発明は、任意の C D 3 9 抗体、またはそのフラグメントの使用を想定するものである。この使用には、C D 3 9 キメラ抗体（好ましくはキメラマウス抗体 / ヒト抗体）またはヒト化 C D 3 9 抗体も、これらの抗体が、T r e g 活性を抑制すると仮定するならば、含まれる。

## 【 0 0 3 4 】

具体的な一実施形態では、前記 C D 3 9 抗体は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られたものであり得る。

## 【 0 0 3 5 】

他の一実施形態では、前記 C D 3 9 抗体は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体の V L 鎖と、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体の V H 鎖とを含んでいてよい。

30

## 【 0 0 3 6 】

他の一実施形態では、前記 C D 3 9 抗体は、可変の軽鎖（V L）および可変の重鎖（V H）を含んでいてよい。前記可変の軽鎖（V L）は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体の V L 鎖の C D R を含んでおり、前記可変の重鎖（V H）は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体の V H 鎖の C D R を含んでいる。

## 【 0 0 3 7 】

他の一実施形態では、前記 C D 3 9 抗体は、配列番号 2 に示される第 1 の重鎖 C D R の配列、配列番号 3 に示される第 2 の重鎖 C D R 配列、および配列番号 4 に示される第 3 の重鎖 C D R 配列、並びに、配列番号 6 に示される第 1 の軽鎖 C D R 配列、配列番号 7 に示される第 2 の軽鎖 C D R 配列、および配列番号 8 に示される第 3 の軽鎖 C D R 配列を含んでいてよい。具体的な一実施形態では、前記 C D 3 9 抗体の重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 1 に示されるアミノ酸配列を有している、および / または、前記 C D 3 9 抗体の軽鎖可変ドメインは、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む。

40

## 【 0 0 3 8 】

具体的な一実施形態では、前記 C D 3 9 抗体は、キメラ抗体、好ましくはキメラマウス / ヒト抗体である。

50

## 【 0 0 3 9 】

特に、上記キメラマウス/ヒト抗体は、CNCM-1-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体の可変ドメインを含んでいてよい。

## 【 0 0 4 0 】

他の一実施形態では、前記CD39抗体は、ヒト化抗体である。

## 【 0 0 4 1 】

特に、前記ヒト化抗体では、可変ドメインは、ヒトアクセプターフレームワーク領域、および存在するならば適宜ヒト定常ドメイン、並びに、非ヒトドナーCDR（例えば、CNCM-1-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体のマウスCDR）を含む。

## 【 0 0 4 2 】

本発明は、前記CD39抗体のフラグメントの使用を想定するものである。前記CD39抗体のフラグメントには、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、および二重特異性抗体、並びに、抗体フラグメントから形成される多特異的抗体が含まれるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 4 3 】

CD39抗体は、従来から公知の任意の技術によって産生され得る。これらの技術の例は、任意の化学的技術、生物学的技術、遺伝子工学、または酵素による技術が挙げられ、これらの技術を単独で用いてもよいし、または組み合わせ用いてもよいが、これらに限定されない。

## 【 0 0 4 4 】

例えば、CD39抗体を、公知の方法に従って、例えば、数ある中でも、豚、牛、馬、ウサギ、ヤギ、羊、およびマウスのうちから選択された宿主動物に、適切な抗原またはエピトープを投与することによって、上昇させることが可能である。

## 【 0 0 4 5 】

従来から公知の様々な補助剤を用いて、抗体産生を増進させることが可能である。本発明を実施するために有用な抗体は、ポリクローナル抗体であってよいが、モノクローナル抗体が好ましい。CD39に対するモノクローナル抗体は、培養液中の連続継代細胞系によって抗体分子の生成を行う任意の技術を用いて、調製および単離させることが可能である。

## 【 0 0 4 6 】

精製および単離させるための技術には、当初はKohlerおよびMilstein (1975)の「the human B-cell hybridoma technique (Cote et al., 1983)」および「the EBV- hybridoma technique (Cole et al. 1985)」に記載されたハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 4 7 】

所望の抗体のアミノ酸配列を知ることによって、当業者は、ポリペプチドを産生するための標準的な技術によって、前記抗体を容易に産生することが可能である。例えば、ポリペプチドは合成可能であり、この合成は、公知の固相法を用いて、好ましくは市販のペプチド合成装置（Applied Biosystems, Foster City, Californiaによって製造された装置）を用いると共に当該製造者の説明書に従って、行うことが可能である。あるいは、従来から公知の組み換えDNA技術によって、CD39抗体を合成してもよい。例えば、抗体をコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、このようなベクターを、所望の抗体を発現する好適な真核生物または原核生物の宿主に導入した後、抗体をDNA発現産物として得ることが可能である。この抗体は、後に、前記真核生物または原核生物の宿主から、公知の技術を用いて単離される。

## 【 0 0 4 8 】

特に、本発明はさらに、本発明の抗体を産生する方法に関する。本方法は、(i) CD39抗体を発現する細胞を、前記抗体の発現を可能にするために適した条件下で培養するステップと、(ii) 発現された抗体を回復するステップとを含む。

## 【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

他の具体的な一実施形態では、本方法は、

( i ) C D 3 9 抗体を発現するハイブリドーマ ( 例えばCNCM-1-3889として寄託されたハイブリドーマ ) を、抗体の発現を可能にするために適した条件下で培養するステップと、  
( i i ) 発現された抗体を回復するステップとを含む。

【 0 0 5 0 】

C D 3 9 抗体は、従来の免疫グロブリン精製法によって、培地から分離されることが都合がよい。従来の免疫グロブリン精製法の例には、タンパク質 A - セファロース、水酸燐灰石クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析法、または親和性クロマトグラフィーが挙げられる。

【 0 0 5 1 】

具体的な一実施形態では、ヒトキメラ C D 3 9 抗体の発明は、上述の V L ドメインおよび V H ドメインをコードする核酸配列を得ることと、前記核酸配列を、ヒト抗体 C H およびヒト抗体 C L をコードする遺伝子を有する動物細胞用の発現ベクターの中に挿入することによってヒトキメラ抗体発現ベクターを構成することと、前記ヒトキメラ抗体発現ベクターを動物細胞の中に導入することによってコード配列を発現することとによって、産生可能である。

【 0 0 5 2 】

ヒトキメラ抗体の C H ドメインとして、これは、ヒト免疫グロブリンに属する任意の領域であってよいが、I g G クラスの領域が好ましく、I g G クラスに属する下位クラスのいずれか 1 つ、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 を用いてもよい。また、ヒトキメラ抗体の C L として、これは、I g に属する任意の領域であってよく、カッパクラスまたはラムダクラスの領域を用いてよい。

【 0 0 5 3 】

キメラ抗体を産生する方法は、従来の組み換え D N A 技術や遺伝子導入技術を含み、従来から公知である (Morrison SL. et al. (1984)、並びに特許文献である米国特許第 5,202,238 号明細書および米国特許第 5,204,244 号明細書参照)。

【 0 0 5 4 】

C D 3 9 ヒト化抗体は、上述のように、C D R ドメインをコードする核酸配列を得ることと、前記核酸配列を、( i ) ヒト抗体の重鎖定常領域と同一の重鎖定常領域、および ( i i ) ヒト抗体の軽鎖定常領域と同一の軽鎖定常領域をコードする遺伝子を有する動物細胞用の発現ベクターの中に挿入することによってヒト化抗体発現ベクターを構成することと、前記ヒト化抗体発現ベクターを動物細胞の中に導入することによって前記遺伝子が発現することとによって、産生可能である。

【 0 0 5 5 】

ヒト化抗体発現ベクターは、抗体重鎖をコードする遺伝子および抗体軽鎖をコードする遺伝子が、別々のベクター上に存在している種類のものであってもよいし、または、これらの両遺伝子が、同一のベクター上に存在している種類のもの ( タンデム式 ) であってもよい。ヒト化抗体発現ベクターの構築が容易である点、動物細胞の中に導入することが容易である点、および、動物細胞内の抗体 H 鎖の発現量と抗体 L 鎖の発現量との間のバランスの点で、タンデム式のヒト化抗体発現ベクターが好ましい ( Shitara K et al. 1994 )。タンデム式のヒト化抗体発現ベクターの例には、p K A N T E X 9 3 ( 国際公開第 97/10354 号パンフレット )、pEE18 などが含まれる。

【 0 0 5 6 】

従来の組み換え D N A 技術および遺伝子導入技術に基づいた、ヒト化抗体の産生方法が、従来から知られている ( 例えば、Riechmann L. et al. 1988、Neuberger MS. et al. 1985 参照 )。例えば、C D R グラフト法 ( 欧州特許第 239,400 号明細書、国際公開第 91/09967 号パンフレット、米国特許第 5,225,539 号明細書、米国特許第 5,530,101 号明細書、および米国特許第 5,585,089 号明細書 )、ベニアリング、または再表面化法 ( 欧州特許第 592,106 号明細書、欧州特許第 519,596 号明細書、Padlan EA (1991)、Studnicka GM et al. (1994)、Roguska MA. et al. (1994))、および、鎖シャフリング法 ( 米国特許第 5,565,332 号

10

20

30

40

50

明細書)を含む、従来から知られた様々な技術を用いて、抗体をヒト化することが可能である。このような抗体を調製するための一般的な組み換えDNA技術も知られている(欧州特許出願第125023号および国際公開第96/02576号パンフレット参照)。

【0057】

Fabは、ヒトCD39に特異的に反応する抗体をプロテアーゼ、パパインで処理することによって得ることが可能である。また、このFabは、抗体のFabをコードするDNAを、原核生物の発現系用または真核生物の発現系用のベクターに挿入して、前記ベクターを(相応しい方である)原核生物または真核生物の中に導入してFabを発現することによって、産生可能である。

【0058】

F(ab')<sub>2</sub>は、ヒトCD39に特異的に反応する抗体をプロテアーゼ、ペプシンで処理することによって得ることが可能である。また、F(ab')<sub>2</sub>は、以下に説明するFab'を、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介して結合することによって産生可能である。

【0059】

Fab'は、ヒトCD39に特異的に反応するF(ab')<sub>2</sub>を還元剤、ジチオスレイトールで処理することによって得ることが可能である。また、Fab'は、抗体のFab'フラグメントをコードするDNAを、原核生物用の発現ベクターまたは真核生物用の発現ベクターの中に挿入すると共に、このベクターを(相応しい方である)原核生物または真核生物の中に導入して、その発現を行うことによって、産生可能である。

【0060】

scFvは、上述のVHドメインおよびVLドメインをコードするcDNAを得ること、scFvをコードするDNAを構築すること、前記DNAを原核生物用の発現ベクターまたは真核生物用の発現ベクターの中に挿入すること、およびその後、この発現ベクターを(相応しい方である)原核生物または真核生物の中に導入して、scFvを発現することによって、産生可能である。ヒト化scFvフラグメントを生成するために、CDRグラフト法と呼ばれる公知の技術を用いてよい。この技術は、ドナーscFvフラグメントから相補性決定領域(CDR)を選択して、これらの相補性決定領域(CDR)を既知の3次元構造のヒトscFvフラグメントフレームワーク上にグラフトすることを含む(例えば、WO第98/45322号、WO第87/02671号、US第5,859,205号、US第5,585,089号、US第4,816,567号、EP第0173494号参照)。

【0061】

ここに記載する抗体のアミノ酸配列を修飾することも想定可能である。例えば、抗体の、結合親和力および/または他の生物学的特性を向上させることが望ましい。単に、人間でない動物に由来する抗体のVHおよびVL内のCDRだけをヒト抗体のVHおよびVLのFRにおいてグラフトすることによって、ヒト化抗体を産生する場合、抗原結合活性は、元の、人間でない動物に由来する抗体の抗原結合活性よりも、減少することが知られている。非ヒト抗体のVHおよびVLの幾つかのアミノ酸残基が、CDRだけでなくFRにおいても、抗原結合活性に直接的または間接的に関連付けられていると考えられる。従って、これらのアミノ酸残基を、ヒト抗体のVHおよびVLのFRに由来する別のアミノ酸残基と置き換えると、結合活性が低減されることになる。この問題を解決するために、ヒトCDRでグラフトされた抗体において、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列から、抗体に結合することに直接関連するか、またはCDRのアミノ酸残基と相互作用するか、または抗体の三次元構造を維持する1つのアミノ酸残基であって、抗原に結合することに直接関連付けられるアミノ酸残基を特定する試みが為された。特定されたアミノ酸を、元の、人間でない動物に由来する抗体のアミノ酸残基と置換することによって、抗原結合活性の低減をさらに助長することができた。

【0062】

本発明の抗体の構造に、および、本発明の抗体をコードするDNA配列に、修飾および

10

20

30

40

50

変異を行ってもよい。この修飾および変異によっても、依然として、所望の特徴を有する抗体をコードする機能分子が得られる。

【0063】

アミノ酸配列の変異においては、アミノ酸のハイドロパシクインデックスが想定され得る。一般的に、相互作用的な生物学的機能をタンパク質に与える際に、ハイドロパシクアミノ酸インデックスが重要である点は、従来から理解されている。アミノ酸の相対的なハイドロパシク特性が、結果として生じるタンパク質の二次構造に貢献することが認められる。この二次構造は、タンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定する。各アミノ酸には、それらの疎水性、および電荷特性に基づいて、1つのハイドロパシクインデックスが割当てられている。これらのアミノ酸は、イソロイシン(+4.5)、バリン(+4.2)、ロイシン(+3.8)、フェニルアラニン(+2.8)、システイン/シスチン(+2.5)、メチオニン(+1.9)、アラニン(+1.8)、グリシン(-0.4)、トレオニン(-0.7)、セリン(-0.8)、トリプトファン(-0.9)、チロシン(-1.3)、プロリン(-1.6)、ヒスチジン(-3.2)、グルタミン酸塩(-3.5)、グルタミン(-3.5)、アスパラギン酸塩(-3.5)、アスパラギン(-3.5)、リジン(-3.9)、およびアルギニン(-4.5)である。

10

【0064】

また、本発明のさらなる対象は、本発明の抗体の機能保存的変異体を含む。

【0065】

「機能保存的変異体」とは、タンパク質または酵素内の所定のアミノ酸残基が、ポリペプチドの全体的な構成および機能を変化させることなく、変異されている変異体である。この変異には、1つのアミノ酸を、類似の特性(例えば、極性、水素結合性、酸性、塩基性、疎水性、芳香性など)を有するアミノ酸と置換することが含まれるが、これに限定されない。ここに示したアミノ酸以外の保存されたアミノ酸は、タンパク質において異なっており、そのため、機能が類似した任意の2つのタンパク質の間の、タンパク質配列相同性またはアミノ酸配列相同性の割合が異なり、クラスタ法によるようなアラインメント法に従って測定すると、例えば70%から99%までであり、類似性は、MEGALIGNアルゴリズムに基づいている。また、「機能保存的変異体」は、BLASTアルゴリズムまたはFASTAアルゴリズムによって測定すると、アミノ酸の少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、およびより一層好ましくは少なくとも95%が同一であるポリペプチドであって、比較される天然タンパク質または親タンパク質と同一または実質的に類似した特性または機能を有するポリペプチドを含む。

20

30

【0066】

2つのアミノ酸配列は、より短い配列の全長さにわたって、アミノ酸の80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上が同一であるか、または約90%以上、好ましくは95%以上が類似している(機能的に同一である)場合に、「ほぼ相同」または「ほぼ類似」していることになる。好ましくは、類似配列または相同配列は、例えばGCG(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin)パイルアッププログラム、またはBLAST、FASTAなどの任意の配列比較アルゴリズムを用いたアラインメントによって、特定される。

40

【0067】

例えば、感知できる活性損失なしに、タンパク質構造において、所定のアミノ酸を他のアミノ酸と置換することが可能である。タンパク質の相互作用性および性質が、タンパク質の生物学的機能活性を規定するため、所定のアミノ酸の置換は、タンパク質配列において、および当然ながらそのDNAコード配列において行われ得るが、それにもかかわらず、同様の特性を有するタンパク質が得られる。従って、本発明の抗体配列において、または前記抗体をコードする、対応するDNA配列において、それらの、感知できる生物活性損失なしに、様々な変化を行うことが可能であると、想定される。

50

## 【0068】

所定のアミノ酸を、類似のヒドロパシクインデックスまたはスコアを有する他のアミノ酸に置換してもよく、こうすることによっても、依然として、類似の生物活性を有するタンパク質が生じる、すなわち、生物学的機能が同一なタンパク質が得られることが、従来から知られている。

## 【0069】

従って、以上にまとめたように、アミノ酸の置換は、概して、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づいている。当業者には、上述の様々な特徴を考慮した典型的な置換が知られており、これらの典型的な置換には、アルギニンとリジンとの置換、グルタミン酸とアスパラギン酸との置換、セリンとトレオニンとの置換、グルタミンとアスパラギンとの置換、および、バリン、ロイシンとイソロイシンとの置換が含まれる。

10

## 【0070】

本発明の抗体の他の種類のアミノ酸修飾は、抗体の元のグリコシル化パターンを変異するために有効であり得る。

## 【0071】

「変異する」という語は、抗体内にある1つまたは複数の糖質成分を取り除くこと、および/または、抗体内に存在しない1つまたは複数のグリコシル化部位を加えることを意味するものである。

## 【0072】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型である。「N結合型」とは、糖質成分が、アスパラギン残基の側鎖に付着されていることを指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（ここでXは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、糖質成分をアスパラギン側鎖に酵素によって付着させるための認識配列である。従って、ポリペプチド内のこれらトリペプチド配列のいずれかの存在が、潜在的グリコシル化部位を生成する。グリコシル化部位を抗体に加えることは、従来、アミノ酸配列が、上述のトリペプチド配列のうちの（N結合型グリコシル化部位用の）1つまたは複数の配列を含むように、アミノ酸配列を変異することによって、実現される。

20

## 【0073】

他の種類の共有結合修飾は、抗体に化学的または酵素的に結合されたグリコシドを含む。これらの手順は、これらが、宿主細胞において、N結合型またはO-結合型のグリコシル化のためのグリコシル化性を有する抗体を生成する必要がない点で、有利である。用いられる結合モードに応じて、糖が、（a）アルギニンおよびヒスチジンに、（b）遊離カルボキシル基に、（c）遊離スルフヒドリル基（例えば、システイン基）に、（d）遊離ヒドロキシル基（例えばセリン基、トレオニン基、またはヒドロキシプロリン基）に、（e）芳香族残基（例えば、フェニルアラニン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基）に、または（f）グルタミンのアミド基に付着する。例えば、このような方法は、国際公開第87/05330号パンフレットに記載されている。

30

## 【0074】

抗体上に存在する任意の糖質成分を取り除くことは、化学的または酵素的に行うことが可能である。化学的な脱グリコシル化では、抗体をトリフルオロメタンスルホン酸化合物または同等の化合物に曝す必要がある。この処理は、連結糖（N-アセチルグルコサミン、または、N-アセチルガラクトサミン）を除く、ほとんどの糖または全ての糖を切断させる一方、抗体を無傷のまま残す。化学的な脱グリコシル化については、Sojahr H. et al. (1987)およびEdge, AS. et al. (1981)によって記載されている。抗体上の糖質成分の酵素による切断は、Thotakura, NR. et al. (1987)によって記載されているように、様々なエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって実現可能である。

40

## 【0075】

他の種類の、抗体の共有結合修飾は、米国特許第4,640, 835号明細書、米国特許第4,496, 689号明細書、米国特許第4,301, 144号明細書、米国特許第4,670, 417号明細書、米国

50

特許第4,791, 192号明細書、または米国特許第4,179,337号明細書に説明されているような方法で、抗体を、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンといった様々な非タンパク性の高分子のうちの1つに結合することを含む。

【0076】

本発明の抗体をエフェクター機能に関して修飾して、例えば、抗体の抗原-依存性の細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)を助長することも望ましい。これは、1つまたは複数のアミノ酸置換を抗体のFc領域に導入することによって実現可能である。選択的または追加的に、システイン残基をFc領域に導入して、この領域において鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にしてもよい。このように生成されたホモ二量体の抗体は、改善された内在化性能および/または増大した補体媒介性細胞殺滅、および/または、抗体-依存性細胞傷害性(ADCC)を有することが可能である(Caron PC. et al. 1992、およびShopes B. 1992)。

10

【0077】

薬学的組成物

本発明はまた、増大したTreg活性に関連付けられる疾病を治療または予防するための、CD39抗体を含む薬学的組成物に関する。

【0078】

従って、治療用組成物を形成するために、CD39抗体を、薬学的に許容される賦形剤、および場合によっては、生分解性高分子などの持続放出性マトリクスと組み合わせることが可能である。

20

【0079】

「薬学的」または「薬学的に許容される」という語は、必要に応じて、哺乳類、特にヒトに投与した場合に、アレルギー反応または他の有害反応といった副作用を生成しない分子の実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤とは、無毒性の固体、semI-3889個体または液体のフィラー、希釈剤、封入材料、または任意の種類の製剤補助物を指す。

【0080】

薬学的組成物の形態、投与ルート、投与量、および投薬計画は、当然ながら、治療される対象物の状態、疾病の重篤度、患者の年齢、体重、および性別に応じて決定される。

30

【0081】

本発明の薬学的組成物は、局所性投与、経口投与、非経口的投与、経鼻投与、静脈内投与、筋内投与、皮下投与、または、眼内投与などのために構築することが可能である。

【0082】

この薬学的組成物は、注射可能な剤形の、薬学的に許容される媒介物を含むことが好ましい。これらは、特に、等張液、滅菌溶液、食塩水(リン酸1ナトリウム塩またはリン酸2ナトリウム塩、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、または塩化マグネシウムなど、あるいはこれらの塩の組み合わせ)か、または、乾燥した、特に凍結乾燥した組成物であってよく、場合によっては、滅菌水または生理食塩水を添加することによって、注射剤を構成することが可能である。

40

【0083】

投与に用いる投与量は、様々なパラメータに応じて、特に、用いる投与の形態、関連する病状、あるいは、所望の治療持続時間に応じて、適応させることが可能である。

【0084】

薬学的組成物を調製するために、有効な量の抗体を、薬学的に許容される担体または水媒体の中に溶解させるか、または分散させてよい。

【0085】

注射としての使用に適した薬学的形態は、滅菌水溶液または滅菌水分散液と、ごま油、ピーナッツ油、または水性プロピレングリコールを含む製剤と、注射可能な滅菌溶液または滅菌分散液を即時調整するための滅菌パウダーとを含む。いずれの場合にも、この形態

50

は、滅菌されている必要があり、容易に注射可能である程度に流動性を有している必要がある。この形態は、産生状態および貯蔵状態では安定している必要があり、細菌および菌類といった微生物に汚染されないように保存される必要がある。

【0086】

遊離塩基または薬理的に許容される塩としての、活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合された水において、調製可能である。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物において、並びに油においても調製可能である。通常の貯蔵状態および使用状態では、これらの調製液は、微生物の増殖を防ぐための防腐剤を含む。

【0087】

CD39抗体を、中性または塩の形の組成物に構築することが可能である。薬学的に許容される塩は、(タンパク質の遊離アミノ基によって形成される)酸付加塩を含み、例えば、塩酸またはリン酸といった無機酸、または、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などといった有機酸によって形成される。遊離型のカルボキシル基によって形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄といった無機塩基、および、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどといった有機塩基に由来してよい。

【0088】

担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、これらを好適に混合させたもの、および植物油脂を含む溶媒または分散媒であってよい。例えば、レシチンなどのコーティング剤を用いることによって、分散液の場合に所要の粒径を維持することによって、および、界面活性剤を用いることによって、適切な流動性を維持することが可能である。微生物の作用は、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどといった様々な抗菌剤および抗真菌薬によって予防することが可能である。多くの場合、等張剤、例えば、糖質または塩化ナトリウムが含まれていることが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、該組成物において、吸収を遅延させる媒体、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによって、実現可能である。

【0089】

注射可能な滅菌溶液は、必要に応じて、所要量の活性化化合物を、上に列挙した他の様々な成分を有する適切な溶媒に組み入れ、その後、濾過滅菌することによって調製される。概して、分散液は、滅菌された様々な有効成分を、塩基性分散媒および上に列挙した成分のうちの他の必要な成分を含む、滅菌媒介物の中に組み入れることによって、調製される。注射可能な滅菌溶液を調製するための滅菌パウダーの場合、好ましい調製方法は、真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、この技術によって、有効成分に任意の所望のさらなる成分を加えたものであるパウダーが生成される。この所望のさらなる成分は、当該成分の予め滅菌して濾過させた溶液から、生成されるものである。

【0090】

直接注射するためのより濃度が高い液、または高濃縮液を調製することも想定される。ここでは、高濃度の活性剤を極めて迅速に浸透させると共に、小さな腫瘍領域に運搬するために、DMSOを溶媒として用いることも想定可能である。

【0091】

製剤形成後、溶液は、剤形と適合するように、かつ、治療上効果のある量で、投与される。この製剤は、様々な剤形において(上述の注射剤の種類でもよいが、薬物放出カプセルなども用いることが可能である)、容易に投与される。

【0092】

例えば、非経口的投与のための水溶液では、この水溶液は、必要ならば、適切に緩衝化されている必要があり、最初に、液体希釈剤を、十分な生理食塩水またはブドウ糖で等張にする必要がある。これらの特別な水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、および腹腔内投与に特に適している。これに関して、用いられ得る滅菌された水媒体は、本開

10

20

30

40

50

示を考慮すれば、当業者には公知であろう。例えば、1投与量を、1mlのNaCl等張液の中に溶解させ、1000mlの皮下注入用の液体に加えるか、または計画される注入部位に注射する（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、頁1035-1038および頁1570-1580参照）。治療される被験体の状態によっては、投与量を幾分変更する必要が生じる。いずれにしても、投与担当者が、個々の被験体にとっての適切な投与量を決定する。

【0093】

CD39抗体が、治療用混合物内に、約0.0001~1.0ミリグラム、または約0.001~0.1ミリグラム、または約0.1~1.0含まれるように、あるいは、1回の投与につき約10ミリグラム含まれるように、CD39抗体を構築することが可能である。複数回投与を行うことも可能である。

10

【0094】

静脈内注射または筋肉内注射といった非経口的投与のために構築された組成物に加えて、薬学的に許容される他の剤形には、例えば、経口投与のための錠剤または他の固形物、持続放出性カプセル、および、現在用いられている他の任意の剤形が含まれる。

【0095】

特定の実施形態では、抗体を宿主細胞の中に導入するために、リポソームおよび/またはナノ粒子の使用が検討されている。リポソームおよび/またはナノ粒子の構成および使用は、当業者に公知である。

【0096】

ナノカプセルは、一般に、化合物を、安定しかつ再生可能なように封入してよい。細胞内の高分子の過荷重による副作用を避けるために、このような超微粒子（サイズが約0.1 $\mu$ m）は、一般に、生体内で劣化し得る高分子を用いて構成される。これらの要件を満たす生体分解性のポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子が、本発明における使用には想定可能である。このような粒子は、容易に形成可能である。

20

【0097】

リポソームは、リン脂質から形成される。このリン脂質は、水媒体内に分散され、多重膜集中二重層小胞体（多重膜小胞体（MLVs）とも呼ばれる）を自発的に形成する。MLVは、概して、25nm~4 $\mu$ mの直径を有している。MLVを超音波処理することによって、核内に水溶液を含有する、200~500の範囲の直径を有する小さな単層の小胞（SUV）が形成される。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度、および二価陽イオンの存在に応じて異なっている。

30

【0098】

本発明はまた、少なくとも1つのCD39抗体、特に本発明の抗体を含むキットを提供する。CD39抗体を含有するキットは、治療用分析試料に用いるためのものである。

【0099】

本発明の抗体およびポリペプチド

本発明は、ヒトCD39に対する、単離された抗体または該抗体のフラグメントを提供する。特に、本願発明者は、2008年1月4日に、マウスのCD39抗体（BY40）を生成するハイブリドーマを、ブタペスト条約の条項に基づき、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)に寄託した。寄託したハイブリドーマのCNCM寄託番号は、I-3889である。

40

【0100】

従って、本発明の他の一態様は、CNCM寄託番号I-3889の下で入手可能なハイブリドーマから得られる、マウスのCD39抗体（BY40）に関する。

【0101】

他の一実施形態では、本発明の抗体は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体のVL鎖のCDRを含む可変の軽鎖（VL）と、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体のVH鎖のCDRを含む可変の重鎖（VH）と

50

を含む。

【0102】

他の一実施形態では、本発明の抗体は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体のV L鎖と、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体のV H鎖とを含む。

【0103】

本願発明者は、上述のmAb BY40の軽鎖および重鎖の可変ドメインをクローン化して特徴付け、これによって、この抗体の相補性決定領域(CDR)ドメインを、表1のように割り出した。

【0104】

【表1】

表1：mAb BY40のVHドメイン、VLドメイン、および、CDRドメイン

MAb BY40 ドメイン	
VH	TRVKK PRETV KISCK ASGYT FTHYG MNWVK QAPGK GLKWM GWINT YTGEF TYADD FKGRF AFSLE ASVST AYLQI NNLKN EDTAT YFCAR RRYEG NYVfy YFDYW GQGT LTVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK GYFPE QVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PS (配列番号1)
VH CDR1	GYTFT HYG (配列番号2)
VH CDR2	INTYT GEP (配列番号3)
VH CDR3	ARRRY EGNyV FYYFD YWGQG TTLTV SS (配列番号4)
VL	DIQMT QSPAS LSASV GETVT ITCRA SENIY SYFSW YQKQK GKSPQ LLVYT AKTLA EGVPS RFSGS GSGTQ FSLKI NSLQP EDFGS YYCQH HYVTP YTFGG GTKLE IKRAD APTV SIFPP SSEQL TSGGA SVVCF LNNFY PKDIN VKWKI DGSER QNGVL NSWTD (配列番号5)
VL CDR1	RASEN IYSYF S (配列番号6)
VL CDR2	TAKTLAE (配列番号7)
VL CDR3	QHHYV TPYTF GGGTK LEIKR (配列番号8)

【0105】

本発明の一実施形態は、CD39抗体に関する。CD39抗体は、配列番号2に示される第1の重鎖CDR配列、配列番号3に示される第2の重鎖CDR配列、および配列番号4に示される第3の重鎖CDR配列、並びに、配列番号6に示される第1の軽鎖CDR配列、配列番号7に示される第2の軽鎖CDR配列、および配列番号8に示される第3の軽鎖CDR配列を含む。具体的な一実施形態では、前記抗体の重鎖の可変ドメインは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、および/または、前記抗体の軽鎖の可変ドメインは、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する。

【0106】

本発明の抗体は、従来から公知の任意の技術を用いて産生可能である。特に、前記抗体は、以下に記載する技術によって産生される。

【0107】

他の一実施形態では、本発明の1つの抗体は、キメラ抗体、好ましくはキメラマウス/ヒト抗体である。特に、前記キメラマウス/ヒト抗体は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体の可変ドメインを含んでよい。

【0108】

本発明の一実施形態は、CNCM寄託番号I-3889の下で入手可能なハイブリドーマに関する。

【0109】

他の一実施形態では、本発明の1つの抗体は、ヒト化抗体である。特に、前記ヒト化抗

10

20

30

40

50

体において、可変ドメインは、ヒトアクセプターフレームワーク領域と、存在するならば、任意のヒト定常ドメインと、上記において規定されたマウスCDRといった非ヒトドナーCDRとを含む。

【0110】

本発明はさらに、前記抗体のフラグメントを提供する。このフラグメントには、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、および二重特異性抗体、並びに、抗体フラグメントから形成された多特異的抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0111】

他の一態様では、本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8から構成される群から選択された1つの配列を含むポリペプチドに関する。

10

【0112】

本発明のさらなる一対象は、本発明の抗体または該抗体のフラグメントをコードする核酸配列に関する。

【0113】

具体的な一実施形態では、本発明は、CNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体(BY40)のVHドメイン、またはCNCM-I-3889として寄託されたハイブリドーマから得られる抗体(BY40)のVLドメインをコードする核酸配列に関する。

20

【0114】

具体的な一実施形態では、本発明は、mAb BY40のVHドメイン、またはmAb BY40のVLドメインをコードする核酸配列に関する。

【0115】

【表2】

表2：mAb BY40におけるVHドメインおよびVLドメインの核酸

VHドメイン:	acg cga gtg aag aag cct cga gag aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca cac tat gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg ggc tgg ata aac acc tac act gga gag cca aca tat gct gat gac ttc aag gga cgg ttt gcc ttc tct tlg gaa gcc tct gtc agc act gcc tat tlg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt gca aga agg aga tat gag ggt aac tac gtt ttt tac tac ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca (配列番号9)
VLドメイン:	gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gaa aat att tac agt tat ttt tca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat act gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cag cct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat cat tat gtt act cog tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg (配列番号10)

30

【0116】

典型的には、前記核酸は、DNA分子またはRNA分子である。DNA分子またはRNA分子は、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージといった任意の好適なベクター、またはウイルスベクターの中に含まれていることが可能である。

40

【0117】

「ベクター」、「クローニングベクター」、および「発現ベクター」という語は、DNAまたはRNA配列(例えば外来遺伝子)を宿主細胞の中に導入して、宿主を形質転換させると共に導入配列の発現(例えば、転写および翻訳)を促進することが可能な媒介物のことを意味している。

【0118】

従って、本発明のさらなる一対象は、本発明の核酸を含むベクターに関する。

【0119】

50

このようなベクターは、被験体に投与すると前記抗体を生じさせる、または直接発現させる、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどといった調節要素を含んでよい。動物細胞用の発現ベクターにおいて用いられるプロモーターおよびエンハンサーの例には、SV40の早期プロモーターおよび早期エンハンサー(Mizukami T. et al. 1987)、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターおよびLTRエンハンサー(Kuwana Y et al. 1987)、免疫グロブリンH鎖のプロモーター(Mason JO et al. 1985)、および、免疫グロブリンH鎖のエンハンサー(Gillies SD et al. 1983)などが含まれる。

#### 【0120】

ヒト抗体C領域をコードする遺伝子が挿入され、発現可能である限り、動物細胞用の任意の発現ベクターを用いることが可能である。好適なベクターの例には、PAGE107(Miyaji H et al. 1990)、PAGE103(Mizukami T et al. 1987)、PHSG274(Brady G et al. 1984)、PKCR(O'Hare K et al. 1981)、PSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990)などが含まれる。

#### 【0121】

プラスミドの他の例には、複製起点を含む複製型プラスミド、または、例えばpUC、pcDNA、pBRなどの統合型プラスミドが含まれる。

#### 【0122】

ウイルスベクターの他の例には、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびAAVベクターが含まれる。このような組み換えウイルスは、従来から公知の技術、例えば、パッケージング細胞をトランスフェクトする技術、またはヘルパープラスミドまたはヘルパーウイルスによる一過性トランスフェクト技術によって、産生可能である。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例には、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞などが含まれる。このような複製欠損組み換えウイルスを産生するための詳細な手順は、例えば、国際公開第95/14785号パンフレット、国際公開第96/22378号パンフレット、米国特許第5,882,877号明細書、米国特許第6,013,516号明細書、米国特許第4,861,719号明細書、米国特許第5,278,056号明細書、および国際公開第94/19478号パンフレットに記載されている。

#### 【0123】

本発明のさらなる一対象は、本発明に係る核酸および/またはベクターによってトランスフェクトされた、感染された、または形質転換された細胞に関する。

#### 【0124】

「形質転換」という語は、「外来の」(つまり外部または細胞外の)遺伝子であるDNAまたはRNA配列を、宿主細胞に導入した結果、宿主細胞が、導入遺伝子または導入配列を発現し、所望の物質、典型的には、該導入遺伝子または導入配列によってコーディングされたタンパク質または酵素を産生することを意味している。導入されたDNAまたはRNAを受容すると共に発現する宿主細胞が、「形質転換」される。

#### 【0125】

本発明の核酸は、本発明の抗体を、好適な発現系において産生するために用いられ得る。「発現系」という語は、例えば、タンパク質を発現するために適した条件下の、宿主細胞および適合可能なベクターを意味するものである。前記タンパク質は、前記ベクターによって運搬され、宿主細胞に導入された外来DNAによってコーディングされたものである。

#### 【0126】

一般的な発現系には、大腸菌宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、哺乳類宿主細胞およびベクターが含まれる。宿主細胞の他の例には、原核生物の細胞(例えば細菌)および真核生物の細胞(例えばイースト菌、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞など)が含まれるが、これらに限定されない。特別な例には、大腸菌、クルイベロマイセス属、またはサッカロミセス属の酵母、哺乳類細胞株(例えば、ペロ細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など)、および、(例えば、リンパ

10

20

30

40

50

芽球細胞、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから産生された)一次または株化された哺乳類細胞培養が含まれる。マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下では「D H F R 遺伝子」と呼ぶ)が欠損したC H O細胞(Urlaub G et al; 1980)、ラットYB 2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662(以下では「Y B 2 / 0 細胞」と呼ぶ))なども例に含まれる。

【0127】

本発明はまた、本発明に係る抗体を発現する組み換え宿主細胞の産生方法に関する。前記産生方法は、(i)組み換え核酸または上述のベクターを、生体内または生体外で、コンピテント宿主細胞の中に導入するステップと、(ii)得られた組み換え宿主細胞を生体内または生体外で培養するステップと、(iii)任意により、本発明に係る抗体を発現および/または分泌する細胞を選択するステップとを含む。このような組み換え宿主細胞を、本発明の抗体を産生するために用いることが可能である。

10

【0128】

上述のように、本発明の抗体は、従来から公知の任意の技術によって、産生および/または修飾することが可能である。

【0129】

〔図面〕

図1は、H I V<sup>-</sup>対照群およびH I V<sup>+</sup>患者群からのC D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>low</sup>およびC D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>T細胞上のC D 3 9の発現を示す図である。

20

【0130】

H I V<sup>-</sup>( )対照群およびH I V<sup>+</sup>(塗りつぶされた )患者群からの末梢血リンパ球が、抗C D 3 9 B Y 4 0、抗C D 4、および抗C D 2 5 m A b sで染色されている。そして、C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>low</sup>およびC D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>母集団内のC D 3 9<sup>+</sup>細胞の割合(A)、および、两部分母集団内のC D 3 9発現の平均蛍光強度(M F I)(B)は、フローサイトメトリーによって算出されたものである。Cには、H I V<sup>+</sup>ドナー(塗りつぶされていないヒストグラム)およびH I V<sup>-</sup>ドナー(塗りつぶされたヒストグラム)からのC D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>low</sup>(左)およびC D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>(右)T細胞上のC D 3 9発現レベルの比較を示す重ね合わせが示されている。AおよびBには、ウイルコクソンおよびマンホイットニーのノンパラメトリック検定によって算定されたp値が示されている。

30

【0131】

図2は、C D 3 9 m A b , B Y 4 0が、C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>制御性T細胞の免疫抑制活性に与える影響を示す図である。Aは、H I V<sup>+</sup>患者群からのC F S Eと記されたC D 8 T細胞を、固定化されたC D 3 m A b (5 μ g / m l)およびC D 3 9 m A bの存在下(上部のヒストグラム)で、または自己C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>T r e g (C D 8 : T r e gの割合は4 : 1)の存在下(真中のヒストグラム)で、またはC D 3 9 m A bで前培養された自己C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>T r e gの存在下(下部のヒストグラム)で培養したものである。72時間後、分裂された細胞(C F S E<sup>low</sup>)の割合を、フローサイトメトリーによって算出した。Bは、自己C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>細胞の存在下での、C D 8 T細胞増殖の抑制の割合(上部のパネル)を、(自己C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>細胞の存在下でのC F S E<sup>low</sup>C D 8<sup>+</sup>T細胞の%) × 100 / (C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>細胞が存在しない中でのC F S E<sup>low</sup>C D 8<sup>+</sup>T細胞の%)として、計算したものである。抗C D 3 9 m A bの存在下でのC D 8 T細胞増殖の回復の割合(下部のパネル)は、100 - (C D 3 9で前処理された自己C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>細胞の存在下でのC F S E<sup>low</sup>C D 8<sup>+</sup>T細胞の%) × 100 / (自己C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>細胞の存在下でのC F S E<sup>low</sup>の%)として、計算されている。ウイルコクソンおよびマンホイットニーのノンパラメトリック検定によって算定されたp値が示されている。

40

【0132】

図3は、C D 3 9 m A b , B A 5 4 gが、C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>high</sup>制御性T細胞の免疫抑制活性に与える影響を示す図である。Aは、H I V<sup>+</sup>患者群のC F S Eと記されたC D 8

50

T細胞を、固定化されたCD3 mAb (5 µg/ml) およびBA54g mAbの存在下(上部のヒストグラム)で、または、自己CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg (CD8:Tregの割合は4:1)の存在下(真中のヒストグラム)で、または、BA54g mAbで前培養された自己CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Tregの存在下(下部のヒストグラム)で、培養したものである。72時間後、分裂された細胞(CFSE low)の割合を、フローサイトメトリーによって算出した。

#### 【0133】

図4は、幾つかの抗CD39 mAbsによる、CD39発現の修飾を示す図である。YT2C2 NK細胞(1×10<sup>6</sup>細胞/ml)を、96ウェルプレート内で、BY12、BY40、BA54g、A1 (Biolegend)、BU61 (Santa Cruz Biotech)、またはAC2 (Immunotech) (10 µg/ml)の存在下で、37°Cにおいて2時間培養した。その後、細胞を洗浄し、前記培養に使用した同一の抗体(10 µg/ml)を用いて、4°Cにおいて20分間培養した。APCが結合されたヤギの抗マウスAbによって、抗体固定が現れた。この抗体固定は、フローサイトメトリーによって算出されたものである。抗体固定の抑制の割合は、次の式に基づいて、算出したものである。100 - (mAb処理された細胞のMFI / 制御イソタイプ処理された細胞のMFI) \* 100。

#### 【0134】

##### 〔実施例〕

HIV-対照群およびHIV+患者群からのCD4+CD25<sup>low</sup>およびCD4+CD25<sup>high</sup> T細胞上のCD39の発現；

最近、マウスおよびヒトCD4+CD25<sup>high</sup>制御性T細胞は、エクトヌクレオチダーゼであるCD39を構成的に発現することが報告されている。エクトヌクレオチダーゼは、免疫活性化サイトで生成された細胞外ATPを変換し、細胞増殖の阻害剤であるアデノシンの生成を導く。ここで、我々は、抗CD39 mAb BY40を用いて、HIV-対照群およびHIV+患者群からのCD4+CD25<sup>low</sup>およびCD4+CD25<sup>high</sup>末梢血リンパ球(PBL)母集団におけるCD39の発現を検査した。図1からは、HIV-およびHIV+個体からのPBLでは、CD4+CD25<sup>high</sup>部分母集団内のCD39+細胞の割合が、CD4+CD25<sup>low</sup>部分母集団内のCD39+細胞の割合よりも、著しく高い(p<0.01)ことが示されている(図1A)。平均は、16%対46%(HIV-)、および、17%対42%(HIV+)である。HIV-およびHIV+の群の間の母集団の同一のCD4+のそれぞれ比較した場合に、CD39+細胞間の割合に、統計上の差異は確認されなかった。

#### 【0135】

次に、我々は、HIV+の個体およびHIV-の個体からのCD4+細胞におけるCD39の発現レベルを分析した(図1Bおよび図1C)。我々は、HIV+患者群のCD4+CD25<sup>low</sup>およびCD4+CD25<sup>high</sup>におけるCD39発現が、HIV-対照群の細胞におけるCD39発現レベルと比べて、著しく高いこと(それぞれの平均は、84対45、および、136対93)を観察した。

#### 【0136】

これらの結果は、CD39に対し陽性染色されたCD4+CD25<sup>high</sup>の割合が、CD4+CD25<sup>low</sup>母集団と比べてより高いこと、および、HIV+患者群からのCD4+CD25<sup>high</sup>制御性T細胞およびCD4+CD25<sup>low</sup>制御性T細胞が、より高いレベルのCD39を発現することを示している。

#### 【0137】

CD4+CD25<sup>high</sup>制御性T細胞におけるCD39の阻止が、それらの、自己CD8エフェクターT細胞に対する免疫抑制効果を元に戻す。

#### 【0138】

HIV+患者群からのCD4+CD25<sup>high</sup>制御性T細胞が、高いレベルのCD39を発現することを証明した後、我々は、HIV+制御性T細胞を介したCD8T細胞の増殖抑制における、CD39の可能な役割を検査した。

## 【0139】

予期されたように、我々は、共培養実験において、治療されていない自己CD4 + CD25high制御性T細胞が、CD8 + T細胞の増殖を効果的に抑制することを観察した。これは、CD4 + CD25high制御性T細胞を、CD39 mAb BY40の存在下で予め培養した時(図2A、下部のヒストグラム)には観察されなかった効果である。CD39 mAbは、CD8 + T細胞の増殖には直接影響しない(図2A、上部のヒストグラム)。BY40 mAbが、CD4 + CD25high制御性T細胞の免疫抑制効果に逆作用する性能は、HIV + 患者群からのCD4 + CD25high制御性T細胞に限定されない。類似の効果が、HIV - 個体からのT細胞で行われた共培養実験において、観察された。しかし、CD4 + CD25high制御性T細胞の免疫抑制活性を抑制し、HIV + 患者群の自己CD8 T細胞の増殖を回復するためには、BY40 mAbがより有効であった(図2B)。

10

## 【0140】

これらの結果は、BY40 mAbを有するCD4 + CD25high制御性T細胞においてCD39分子を誘発させることが、それらの免疫抑制活性を元に戻すと共に、CD3 mAbによって引き起こされた自己CD8 T細胞の増殖を回復することが可能であることを示している。

## 【0141】

観察されたBY40 mAbによる効果は、別の抗CD39、BA54g mAbに拡張された(図3)。

20

## 【0142】

CD39 mAbsによって引き起こされたCD39分子の下流制御。

## 【0143】

BY40 mAbおよびBA54g mAbの作用の潜在的機構として、我々は、それらの、細胞表面上のCD39の発現を抑制的に調節する性能を測定した。図4に示すように、我々は、YT2C2細胞を、BA54g mAbまたはBY40 mAbの存在下で2時間培養することにより、CD39発現が潜在的に抑制されることを証明した(>70%の抑制)。BU61 mAbによる、CD39発現の著しい修飾は確認されなかったが、BY12、A1、およびAC2 mAbは、CD39細胞表面発現の中程度の抑制的調節を引き起こした。

30

## 【0144】

CD4 + CD25high制御性T細胞をBY40 mAbによって前処理することは、部分的に、腫瘍特異的細胞毒性エフェクターCD4 T細胞の生成に対する、それらの免疫抑制効果に逆作用する。

## 【0145】

次に、我々は、BY40 mAbの、エフェクター機能を有する腫瘍特異的T細胞の持続的な生成に対する性能を測定した。表3に示したように、PBLを、CD4 + CD25high Tregおよび黒色腫細胞株HM11によって共培養することによって、細胞傷害性エフェクターCD4 T細胞の低レベルの生成が導かれる。細胞傷害性エフェクターCD4 T細胞の生成は、脱顆粒特異的マーカーであるCD107の発現を得ることによって明らかになる。予備的な実験は、CD4 + CD25high TregをBY40 mAbによって前処理することによって、CD4 + CD107 + エフェクターT細胞の割合がわずかに増大したことを示している(表3)。これは、BY40 mAbが、部分的に、Treg免疫抑制活性を元に戻し、細胞傷害性T細胞の生成を可能にすることを示唆している。

40

## 【0146】

【表 3】

	% CD107a の発現	増加した CTL 活性 %
CD4+CD25high + IgG1	4.21%	
CD4+CD25high + BY40	6.56%	56%

## 【0147】

表3：CD39 mAb BY40が、腫瘍特異的細胞毒性CD4 T細胞の生成に与える影響。2 × 10<sup>5</sup>の末梢血単核細胞、および1 × 10<sup>5</sup> HM11が照射された癌細胞（60 Gray）に、予めIgG1対照またはBY40 mAb（10 μg/ml）で1時間培養し、精製された5 × 10<sup>4</sup>のCD4 + CD25high細胞（Treg）を補充し、6日間共培養した。この培養物に、48時間ごとに、0.5 μgのIgG1対照またはBY40 mAbを添加した。その後、リンパ球を集菌し、96ウェルプレート内で、IgG1対照またはBY40 mAb（10 μg/ml）の存在下で、HM11細胞と共に培養した（割合は1/1）。腫瘍特異的エフェクター細胞傷害性CD4 T細胞の割合を、モネシン（2 μM終末濃度）の存在下で、抗CD107a - PC5抗体をラベリングすることによって測定した。5%のCO<sub>2</sub>、37°Cで4時間後、細胞を洗浄し、抗CD4 - FITC抗体で染色した。CD4およびCD107aの二重発現を、フローサイトメトリーによって測定した。CD107a発現の回復の割合を、次の式に基づいて測定した。（BY40処理した後のCD4 + CD107a + 細胞の%） - （対照IgG1処理後のCD4 + CD107a + 細胞の%） / 対照IgG1処理後のCD4 + CD107a + 細胞の% \* 100。

10

20

## 【0148】

BA54g mAbは、ヒトPBMCのATPase活性を抑制する。

## 【0149】

CD39については、既に、細胞周囲レベルのアデノシンの修飾によって少なくとも部分的に作用する、Tregの抑制機構の構成要素として説明した。次に我々は、BA54g CD39 mAbがヒトPBMCの自発的ATPase活性に与える影響を分析した。BA54gの存在下で24時間培養した後のヒトPBMCの自発的ATPase活性が、対照IgG1の存在下で培養したPBMCと比べて、29%減少したことが観察された（表4）。他のCD39 mAbおよび特にBY40の影響については、現在調査中である。

30

## 【0150】

【表 4】

	OD620nm	% 抑制
対照 IgG1	0.215	
BA54g	0.151	29%

## 【0151】

表4：CD39 mAb, BA54gの、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）のATPase活性に与える影響。4 × 10<sup>5</sup>のPBMCを、RPMI完全培地において、BA54g mAbまたはIgG1対照（10 μg/ml）の存在下で培養した。24時間後、細胞を、無リンの緩衝液（10 mMのブドウ糖、20 mMのHEPES、5 mMのKCL、120 mMのNaCl、2 mMのCaCl<sub>2</sub>）中で3回洗浄し、2 mMのATPが補充された400 μlの培養緩衝液において再懸濁させた。10分後、37°Cにおいて、細胞を、遠心分離機にかけ、マラカイトグリーン/ポリビニルアルコール/アンモニウムモリブデン酸塩の溶液を添加した後、浮遊物内のリン酸濃度を、分光測光器（620 nm）によって20分間測定した。

40

## 【0152】

〔参照〕

Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat

50

ure Rev. Immunol. 3, 253-257 (2003).

Brady G, Jantzen HM, Bernard HU, Brown R, Schutz G, Hashimoto-Gotoh T. New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning. *Gene*. 1984 Feb;27(2):223-32.

Caron PC, Laird W, Co MS, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med*. 1992 Oct 1; 176(4): 1191-5.

Chardes T, Villard S, Ferrieres G, Piechaczyk M, Cerutti M, Devauchelle G, Pau B. Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family. *FEBS Lett*. 1999 Jun 11;452(3):386-94.

Cole et al. "'Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy'", Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96. 10

Connolly DC, Bao R, Nikitin AY, Stephens KC, Poole TW, Hua X, Harris SS, Vanderhyden BC, Hamilton TC. Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAG under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003 Mar 15;63(6):1389-97.

Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. "Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Apr;80(7):2026-30.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enyoloji K, Lindén J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6): 1257-65. Epub 2007 May 14. 20

Edge AS, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE Jr, Weber P. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal Biochem*. 1981 Nov 15;118(1):131-7.

Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp TC, Chen AB, Mukku VR. A nonradioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. *J Immunol Methods*. 1997 Mar 28;202(2): 163-71.

Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*. 1983 Jul;33(3):717-28. 30

Koehler G., M. C. (1975) *Nature* 256, 495-497.

Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, Nagase F, Kurosawa Y. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Dec 31;149(3):960-8.

Mason JO, Williams GT, Neuberger MS. Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell*. 1985 Jun;41(2):479-87.

Miyaji H, Mizukami T, Hosoi S, Sato S, Fujiyoshi N, Itoh S. Expression of human beta-interferon in Namalwa KJM-1 which was adapted to serum-free medium. *Cytotechnology*. 1990 Mar;3(2): 133-40. 40

Mizukami T, Itoh S. A new SV40-based vector developed for cDNA expression in animal cells. *J Biochem (Tokyo)*. 1987 May; 101(5): 1307-10.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(21):6851-5.

Neuberger MS, Williams GT, Fox RO. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*. 1984 Dec 13-19;312(5995):604-8.

O'Hare K, Benoist C, Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to metho 50

trexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Mar;78(3): 1527-31.

Padlan EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol Immunol. 1991 Apr-May;28(4-5):489-98.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 1988 Mar 24;332(6162):323-7.

Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1 ;91(3 ):969-73. 10

Shitara K, Nakamura K, Tokutake-Tanaka Y, Fukushima M, Hanai N. A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells. J Immunol Methods. 1994 Jan 3;167(1-2):271-8.

Shopes B. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. J Immunol. 1992 May 1 ;148(9):2918-22.

Strohhal R, Kroemer G, Wick G, Kofler R. Complete variable region sequence of a nonfunctionally rearranged kappa light chain transcribed in the nonsecretor P3-X63-Ag8.653 myeloma cell line. Nucleic Acids Res. 1987 Mar 25;15(6):2771. 20

Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. Protein Eng. 1994 Jun;7(6):805-14. 20

Thotakura NR, Bahl OP. Enzymatic deglycosylation of glycoproteins. Methods Enzymol. 1987;138:350-9.

Urlaub G, Chasin LA. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul;77(7):4216-20.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 3 】

【図1】 HIV<sup>-</sup>対照群および HIV<sup>+</sup>患者群からの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T細胞上の CD39 の発現を示す図である。 30

【図2】 CD39 mAb, BY40 が、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>制御性 T細胞の免疫抑制活性に与える影響を示す図である。

【図3】 CD39 mAb, BA54g が、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>制御性 T細胞の免疫抑制活性に与える影響を示す図である。

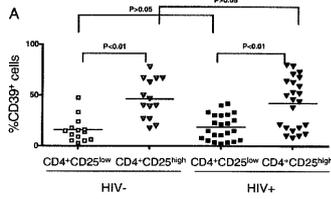
【図4】 幾つかの抗 CD39 mAbs による、CD39 発現の修飾を示す図である。

【受託番号】

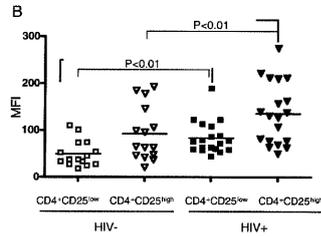
【 0 1 5 4 】

CNCM I-3889

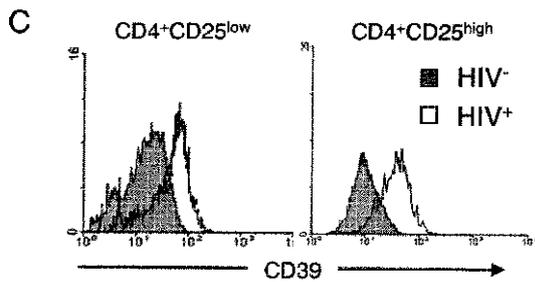
【 図 1 A 】



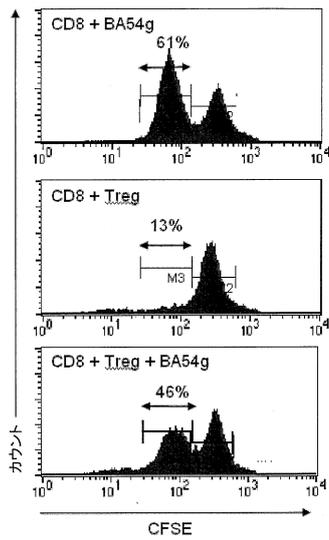
【 図 1 B 】



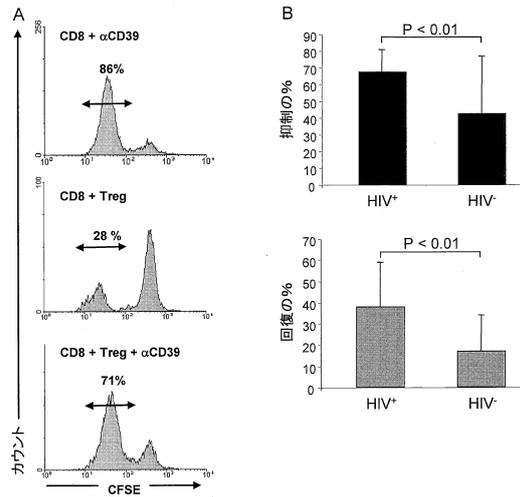
【 図 1 C 】



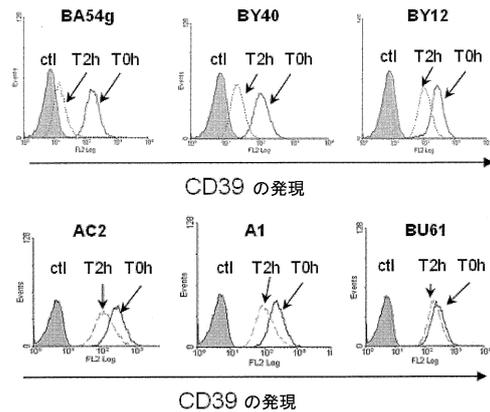
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



mAb	% 抑制されたMFI
BA54g	77
BY40	73
BY12	49
AC2	48
A1	50
BU61	20

**【配列表】**

0006018361000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 33/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/06	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P	33/06	
		A 6 1 P	35/00	
		A 6 1 P	43/00	1 1 1
		C 1 2 N	15/00	A

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100141357

弁理士 鈴木 音哉

(72)発明者 レヴィ, イヴ

フランス, エフ - 9 4 0 1 0 クレテイユ, アヴェニュー マレシャル ド ラトル ド タシニー  
5 1, ス イミュノ クリニック/オピタル アンリ モンドール

(72)発明者 エリオール, ジャン - フランソワ

フランス, エフ - 9 4 0 1 0 クレテイユ, アヴェニュー マレシャル ド ラトル ド タシニー  
5 1, ス イミュノ クリニック/オピタル アンリ モンドール

(72)発明者 バンズツサン, アルマン

フランス, エフ - 9 4 0 0 0 クレテイユ, リュ デュ ジェネラル サライユ 8, アンセルム  
ユ 8 4 1 エキップ 0 2 /ファク メドゥサン ド クレテイユ

(72)発明者 ボネフォワ - ベラール, ナタリー

フランス, エフ - 9 4 0 0 0 クレテイユ, リュ デュ ジェネラル サライユ 8, アンセルム  
ユ 8 5 1 ファクルテ ド メドゥサン ド クレテイユ

## 合議体

審判長 田村 明照

審判官 松田 芳子

審判官 中島 庸子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 1 9 8 6 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 0 2 9 3 2 (US, A 1)

国際公開第 0 3 / 0 5 2 1 2 1 (WO, A 2)

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 27  
1, No. 51, pp. 33116 - 33122 (1996)THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 27  
5, No. 3, pp. 2057 - 2062 (2000)

実験医学, Vol. 25, No. 18, pp. 2868 - 2874 (2007)

実験医学, Vol. 25, No. 18, pp. 2862 - 2867 (2007)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 /

C 0 7 K

MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS(STN)