

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7071974号
(P7071974)

(45)発行日 令和4年5月19日(2022.5.19)

(24)登録日 令和4年5月11日(2022.5.11)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N Z N A

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/573 (2006.01)

A 6 1 K 31/573

A 6 1 K 31/519 (2006.01)

A 6 1 K 31/519

請求項の数 13 (全25頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-521011(P2019-521011)

(86)(22)出願日 平成29年10月17日(2017.10.17)

(65)公表番号 特表2020-503251(P2020-503251
A)

(43)公表日 令和2年1月30日(2020.1.30)

(86)国際出願番号 PCT/IB2017/056428

(87)国際公開番号 WO2018/073734

(87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

審査請求日 令和2年10月19日(2020.10.19)

(31)優先権主張番号 201641036145

(32)優先日 平成28年10月21日(2016.10.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
インド(IN)

(73)特許権者 506292941

バイオコン・リミテッド

インド国、バンガロール 560100、
カルナータカ、エレクトロニック・シティ
、トゥエンティース・ケイएम・ホス
ル・ロード20th KM, Hosur Road,
Electronic City, Ka
rnataka Bangalore 5
60100, India

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 ナーイル, プラディブ

インド共和国 560076 カルナータ
カ州、バンガロール、オフ バナーガッタ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体および狼瘡の処置のための使用の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象において狼瘡を処置するための組成物であって、CD6へのALCAMの結合を妨げることなくCD6のドメイン1(D1)に結合する抗CD6モノクローナル抗体(T1h)を含み、ここで、抗CD6モノクローナル抗体は、配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含み、およびここで、抗CD6モノクローナル抗体は、対象における狼瘡の症候を低減させるための治療有効量である、前記組成物。

【請求項2】

狼瘡が、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、皮膚エリテマトーデス、中枢神経系(CNS)狼瘡、新生児エリテマトーデス、小児期全身性エリテマトーデス、薬剤誘発性エリテマトーデス、または結果として狼瘡症状をもたらす補体欠損症候群を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

狼瘡の症候が、心血管症状、肺症状、肝臓症状、血液学的症状、胃腸症状および/または筋骨格症状を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

抗CD6モノクローナル抗体が、T細胞の活性化を低減させるかまたは防止する、T細胞増殖を阻害する、および/または補体依存性細胞毒性(CDC)の誘導を低減させる、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

抗CD6モノクローナル抗体が、配列番号3および配列番号4を含むヌクレオチド配列、またはそれらと少なくとも90%同一性を有し、配列番号1および配列番号2をコードするヌクレオチド配列、によってコードされる、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

非経口投与による送達のために製剤化された、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

薬学的に許容し得る担体をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

抗CD6モノクローナル抗体が、化学療法剤、免疫抑制剤、抗マラリア薬、細胞毒性剤、インテグリン拮抗薬、サイトカイン拮抗薬、またはホルモンと組み合わせられる、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項9】

免疫抑制剤が、プレドニゾン、メトトレキサート、アザチオプリンまたはシクロホスファミドである、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

治療有効量が、対象の体重あたり0.01~100mg/kgである、請求項1に記載の組成物。

【請求項11】

抗CD6モノクローナル抗体が、炎症促進性サイトカインの低減を引き起こす、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項12】

対象が、狼瘡以外の自己免疫疾患を有しない、請求項1~11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

抗CD6モノクローナル抗体が配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含む、狼瘡の処置のために有用な医薬の製造における抗CD6モノクローナル抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胸腺上皮細胞、単球、活性化T細胞および種々の他の細胞種の表面に存在するCD6のスカベンジャー受容体システインリッチ(SRCR)ドメイン1(D1)に結合するヒト化IgG1アイソタイプ抗CD6モノクローナル抗体(T1h)に関する。本発明はさらに、CD6リガンドである活性化白血球細胞接着分子(ALCAM)とのCD6の相互作用を遮断することなくT細胞の増殖を阻害する方法に関する。それはまた、CD6のSRCRドメイン1(D1)に結合する抗CD6モノクローナル抗体を使用した狼瘡の処置のために有用な組成物および方法にも関する。

30

【背景技術】

【0002】

ヒト全身性自己免疫疾患の原型である狼瘡は、種々広範な多臓器損傷によって特徴づけられる。それは、結合組織を攻撃する抗体が関与している自己免疫疾患である。この疾患には、100万人近くの米国人、主として20~40歳の間の女性が、罹患していると推計される。狼瘡の主な形は、全身性のもの(全身性エリテマトーデス;SLE)であり、抗核抗体の生産、循環免疫複合体、および補体系の活性化と関連している。

40

【0003】

SLEの発病機序は依然としてよく理解されていないが、一方、B細胞、T細胞および単球は、疾患の進行において不可欠な役割を担うことに関係しているということが知られている。具体的には、ポリクローナルB細胞およびT細胞活性化の著しい増大があり、かかる増大は、種々の自己抗原に対するT細胞および抗体応答の発生によって特徴づけることができる。T細胞の活性化は、ある特定のエピトープに対する自己反応性B細胞の生産を刺激して、次に他のエピトープへ広がることができるということが理論立てられている

50

。かかる抗体応答は、上で述べたとおり、抗核抗体 (ANA) および抗二本鎖 DNA 抗体などの自己抗原に対する自己抗体の生産を包含し得る。

【0004】

SLE は、不利益なプロセス / 経路への拮抗または有益なプロセス / 経路への刺激のいずれかにより免疫応答を調整することによって処置することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体を使用すること、または免疫応答を直接的に阻害することは、免疫関連疾患を改善するための有効な手だてである。

【0005】

CD6 は、ヒト T 細胞、および B 細胞のサブセットにより主に発現し、ならびにいくつかの B 細胞性慢性リンパ性白血病およびニューロンにより主に発現する、重要な細胞表面タンパク質である。CD6 は、I 型マクロファージのスカルビン受容体システインリッチドメイン (SRCR) に相同である少なくとも 1 つのドメインを有することによって特徴づけられるタンパク質の大規模なファミリーのメンバーである。抗 CD6 モノクローナル抗体 (mAb) を使用した遮断研究は、CD6 が、胸腺上皮 (TE) 細胞との T 細胞接着相互作用を調節することによって、T 細胞発生において重要な役割を担うということを提案する。

10

【0006】

追加の研究は、CD6 が、T 細胞活性化において重要なアクセサリー分子 (accessory molecule) として機能することができることを示している。例えば、特定の抗 CD6 mAb は、T 細胞に対して直接的にマイトジェニックであり [1, 2]、これに対して、他のものは、抗 CD3、抗 CD2 またはホルポール 12 ミリスタート 13 アセター (PMA) と連動して T 細胞増殖を共刺激することが可能である [1, 3, 4]。T 細胞活性化における CD6 の役割の、なおも追加の証拠は、T 細胞活性化に続いて、CD6 が Ser および Thr 残基で過剰なリン酸化を生じ [5, 6, 7]、および Tyr 残基でリン酸化を生じる [8] ということを示す研究から来る。これらおよびその他の研究は、T 細胞活性化およびシグナル変換の両方に影響を及ぼす、in vivo での未熟および成熟 T 細胞機能の両方の重要なモジュレーターとして、CD6 を関係させている。

20

【0007】

成熟 CD6 タンパク質の細胞外ドメインは、3 つの SRCR ドメイン (これ以降において、D1、D2、および D3 と称する) から構成される。D3 が対応するのは、膜近位 SRCR ドメインであり、短い 33 アミノ酸のストーク領域 (stalk region) がこれに続く。これらの細胞外ドメインは、短い膜貫通ドメインを介して細胞膜にアンカリングされており、可変の長さの細胞質ドメインがこれに続く [19]。

30

【0008】

ヒト IgG₁ 定常ドメインと融合した CD6 の選択された細胞外ドメインを含有する CD6 - 免疫グロブリン融合タンパク質 (CD6 - Rgs) を使用した研究は、「活性化白血球細胞接着分子」(ALCAM) と称される CD6 リガンドの同定およびクローニングに導いた [11, 12]。ALCAM は、膜近位 SRCR ドメインに対応する CD6 のドメイン 3 と結合する [13]。

【0009】

T 細胞調節における CD6 / ALCAM 相互作用の役割の研究は、この受容体 - リガンド対が、CD6 を発現する細胞の胸腺上皮細胞への接着を媒介することが可能であることを示している [12]。これおよびその他の証拠は、CD6 / ALCAM 相互作用が T 細胞の発生および活性化を調整するために重要であるということを示唆する。

40

【0010】

CD6 の機能的特性評価は不完全なままであるにも関わらず、抗 CD6 mAb は、骨髄から T 細胞および T 細胞前駆体を除去するために首尾よく臨床の場に適用されている。これらの知見は、CD6 が、T 細胞の機能を in vivo で調整することにおける重要な役割を担うという仮説を、さらに支持する。CD6 はまた、初期または後期の T 細胞 - 抗原提示細胞 (APC) 相互作用を媒介する免疫学的シナプスの一部であることも報告されている。 [

50

14]

【0011】

米国特許第6,372,215号は、ヒトCD6(hCD6)のSRCRドメイン3(D3)またはヒトCD6ストロクドメイン(CD6S)に特異的に結合し、CD6への活性化した白血球細胞接着分子(ALCAM)の結合を阻害する、抗体およびその他の結合剤を開示する。

【0012】

先行する刊行物および特許は、マウス抗CD6(IOR-T1)モノクローナル抗体の配列、および、IOR-T1をT1h(ヒト化IOR-T1)へヒト化するために実施したアミノ酸改変を開示した。米国特許第5,712,120号およびそれに対応する欧州特許第0699755号は、マウスモノクローナル抗体をヒト化するための具体的な方法、ならびにIOR-T1およびT1hの配列を開示する。米国特許第6,572,857号およびそれに対応する欧州特許第0807125号は、IOR-T1およびT1h(ヒト化IOR-T1)の配列を開示している。Roque-Navarro文献[15]は、マウスモノクローナル抗体をヒト化するための具体的な方法、ならびにIOR-T1およびT1hの配列について論じている。「A Monoclonal Antibody and a Method Thereof」と題されたPCT/IN2008/00562は、多発性硬化症、移植拒絶反応および移植片対宿主病などの自己免疫疾患の処置としてCD6の標的化について論じている。

10

【0013】

狼瘡の処置のための改良された治療方法および組成物の、差し迫った必要性がある。現在のところ、狼瘡は、典型的には、コルチコステロイドおよび免疫抑制剤を用いて処置されている。いくつかの態様においては、リンパ球を有意に枯渇させる抗体が使用され、他の態様においては、リンパ球は枯渇させられない。CD6へのALCAMの結合を妨げることなくCD6、D1ドメインに結合することによりT細胞活性化を阻害する抗CD6モノクローナル抗体であって、狼瘡を処置し、狼瘡型疾患において通常起こるT細胞の増殖を阻害する能力を有する、抗CD6モノクローナル抗体を提供することが、有益となる。

20

【発明の概要】

【0014】

本発明は、T細胞の活性化を低減または防止し、T細胞増殖を阻害し、補体依存性細胞毒性(CDC)の誘導を低減させ、および、CD6に活性化白血球細胞接着分子(ALCAM)が結合することを妨げることなくCD6のドメイン1(D1)に結合する、抗CD6モノクローナル抗体(T1h)に関し、ここで、抗CD6モノクローナル抗体は、配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列またはそれらと少なくとも97%同一性を有する配列を含む。

30

【0015】

1つの側面において、本発明は、狼瘡を処置する方法を提供し、方法は、配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる抗CD6モノクローナル抗体の治療有効量を、狼瘡による影響を患っている対象へ投与することを含む。

【0016】

本発明の方法は、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、皮膚エリテマトーデス、中枢神経系(CNS)狼瘡、心血管症状、肺症状、肝臓症状、血液学的症状、胃腸症状、筋骨格症状、新生児エリテマトーデス、小児期全身性エリテマトーデス、薬剤誘発性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群、または、結果として狼瘡症状をもたらす補体欠損症候群を、限定することなく包含する、狼瘡の症状または系の1つ以上を有する対象を処置するために使用することができる。

40

【0017】

別の側面において、本発明は、配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含む抗CD6モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを包含するベクター、およびベクターを包含する宿主細胞を提供する。細胞は、真核細胞(例として、ヒト、マウス、サルまたはウサギの細胞などの哺乳動物性)であ

50

ってもよく、または原核細胞（例として、E. coli細胞などの細菌細胞）であってもよい。

【0018】

なおも別の側面において、本発明は、対象において狼瘡を処置する方法を提供し、方法は、配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含む抗CD6モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを対象へ投与することを含み、ここで、抗CD6モノクローナル抗体の使用は、炎症促進性サイトカインの低減を示す。

【0019】

本発明の別の側面は、配列番号1および配列番号2のアミノ酸配列を含む抗CD6モノクローナル抗体を使用する、炎症状態を調整するための方法を提供する。モノクローナル抗体は、化学療法剤、免疫抑制剤、抗マラリア薬、細胞毒性剤、インテグリン拮抗薬、サイトカイン拮抗薬、またはホルモンと組み合わせられてもよい。

10

【0020】

免疫抑制剤は、プレドニゾン、メトトレキサート、アザチオプリンまたはシクロホスファミドを包含し得る。重要なことに、本件の抗CD6モノクローナル抗体の投与は、免疫抑制剤の量の低減を提供し、それによって、他の潜在的病因に対する体の防御を弱める可能性があり、これにより対象が感染およびその他の潜在的に致死性の疾患、例えばがんなどに極めて罹りやすくなるという免疫抑制剤の悪影響を回避する。

【0021】

別の側面において、本発明は、本発明の抗CD6モノクローナル抗体の治療有効量を患者へ投与することを含む、抗核抗体（ANA）および/または抗二本鎖DNA（dsDNA）抗体のレベルが上昇した対象においてT細胞の活性化を低減する方法もまた提供する。

20

【0022】

なおもさらなる側面において、本発明は、抗CD6抗体の治療有効量を、少なくとも第2の化合物と組み合わせて、患者へ投与することを含む、それを必要とする狼瘡の患者を処置する方法もまた提供する。第2の化合物は、典型的には、狼瘡を処置するのに使用される治療剤、例えば、標準治療または実験的な処置である。この発明の併用療法において、抗CD6抗体および追加の治療剤は、患者にとって適当であれば、あらゆる順序で投与することができる。抗CD6抗体および追加の剤（単数または複数）は、同時にまたは連続的に投与することができる。例えば、追加の剤（単数または複数）は、抗CD6治療の前または後に投与することができる。この発明においては、かかる併用療法のために有用なキットもまた提供される。

30

【0023】

本発明の別の側面は、(a)配列番号3に記述されたヌクレオチド配列；および(b)配列番号4に記述されたヌクレオチド配列を含む核酸分子、によってコードされる重鎖および軽鎖を含む、CD6のスカルペンジャー受容体システインリッチ（SRCR）ドメイン1（D1）に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0024】

本発明のさらに別の側面は、狼瘡の処置のために有用な医薬の製造における上記の抗CD6抗体の使用を提供する。

本発明の別の側面は、狼瘡以外の自己免疫疾患を有しない対象に対する処置方法を提供する。

40

【0025】

さらなる側面において、本発明は、(a)本発明の抗CD6モノクローナル抗体を含む容器；および(b)対象において狼瘡を処置するための指示を伴う添付文書、を含む製造物を提供し、ここで、指示は、狼瘡の悪影響を低減させることを提供するのに有効である量の抗体が対象へ投与されることを示唆する。

本発明の上記およびその他の目的および側面は、本明細書における図面および下記に記述される仕様において、詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

50

【図1】図1は、正常およびSLEのマウスのリンパ節の外観検査を示す：SLEのマウス（右のパネル）は、腫れたリンパ節（矢印でマークした）および肥大した唾液腺を示す。

【図2】図2は、臓器重量およびリンパ節腫脹の比較を示す：動物（ $n = 6$ ）を、60もしくは600 μg の - mCD6または60 μg のラットIgG（アイソタイプ対照）を用いて腹腔内（i.p.）にて10日間（用量あたり3週間、1日おきに）処置した。研究の最後に、リンパ節腫脹（a）を測定し（スケール0~3；リンパ節の腫れが低程度/なし~重度）、および臓器重量を測定した（b~d）。リンパ節腫脹スコア（a）、ならびに脾臓（c）および唾液腺（d）のサイズにおいて、有意な低減が観察された（ $p < 0.05$ 、一元配置ANOVAに続いて多重比較検定）。

【0027】

【図3】図3は、細胞増殖アッセイの結果を示す：各群からのリンパ細胞の単一細胞懸濁液を、抗mCD3に媒介される増殖に供した。 - mCD6処置群は、抗CD3に媒介される増殖への有意な（ $p < 0.05$ 、一元配置ANOVAに続いて多重比較検定）反応性低下を示した。

【図4】図4は、サイトカイン分析の結果を示す：Cytokine Bead Array（CBA）分析によってサイトカイン放出を測定するために、増殖アッセイからの上清を使用する。 - mCD6は、処置群（群は両方とも、分析の目的のために組み合わせられた）において、アイソタイプ群と比較してIFN- γ の放出の有意な減少（ $p < 0.05$ ；Mann-Whitney検定）を示した。TNF- α もまた、アイソタイプ処置群と比較して処置群においてより低かったが、その差は統計的に有意ではなかった（ $p < 0.09$ ）。

【0028】

【図5】図5は、血清ANAおよび抗ds-DNA抗体分析の結果を示す：ELISAを使用してANAおよび抗ds-DNA抗体（1：100希釈）を分析するために、アイソタイプおよび - mCD6処置マウスからの血清を使用する。

【図6】図6は、マウスの処置のための投薬レジメンを示す。

【図7A】図7（A）VH（配列番号3）およびVk（配列番号4）の、プラスミドおよびゲノムDNAに由来するT1hのヌクレオチド配列、

【図7B】（B）VH（配列番号1）およびVk（配列番号2）のアミノ酸配列、

【図7C】（C）以前の刊行物に開示されているVkアミノ酸配列（配列番号5）の、この特許に開示されている配列（配列番号2）と比較して配列の違いを強調した比較。

【0029】

【図8】図8は、T1hおよびALCAM、またはT1h単独の存在下におけるCD6-Fcが拘束されたプレートのELISAの読取り値を示す。

【図9】図9は、リンパ球に対するT1hの用量依存性を棒グラフとして示す。図は、各種の濃度（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）での、PHAで活性化した（PHA activate）リンパ球に対するT1hの阻害の%を表す。hR3（非特異的抗体）を同じ濃度で使用した。

【図10】図10は、アラマーブルー（Alamar Blue）を使用したCDCアッセイにおける、RituxanとT1hとの間の細胞毒性の倍数差（fold difference）を示す。

【0030】

【図11】図11は、T1h抗体（5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、hR3抗体（5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、およびラパマイシン（1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または抗体なし（対照として）で処置したHUT78細胞であって、CO₂インキュベーター中で37℃にて終夜インキュベートしたものについての、結果を示す。細胞を、次にアネキシンV（Annexin V）標識化溶液で処置し、これに続いてフローサイトメトリー分析を行った。アネキシンV FITC対数値を横軸とし、PI/PEテキサスレッドを縦軸とする。

【図12】図12は、T1h抗体（10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、hR3（アイソタイプ対照）または抗体なし（対照として）でPBMCを処置し、CO₂インキュベーター中で37℃にて5日間インキュベートした結果を示す。インキュベーションの前に、細胞を破傷風トキソイドで刺激した。アラマーブルー色素を用いて増殖を測定した。T1hの存在下では、増

10

20

30

40

50

殖の阻害は観察されなかった。

【0031】

【図13】図13は、免疫蛍光により、Raji細胞が真のB細胞であり、およびMHC I I抗原も発現することを示す。

【図14】図14は、マイトマイシン処置されたRaji細胞の存在下でのPBMCの増殖性を示す。陽性対照は、PHAの存在下でPBMCが成長するということを示す。sT1hは、抗体なしまたはhR3対照と比較してT細胞増殖を阻害する(t検定により有意)。各実験結果は、6つの異なるウェルから得られた平均および標準偏差である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の詳細な記載

本発明は、CD6のドメイン1(D1)に結合することを可能とし、ALCAMの結合を妨げることなくT細胞増殖を阻害する、抗CD6モノクローナル抗体を提供し、ここで、抗CD6モノクローナル抗体は、全身性の狼瘡に起因する炎症状態を低減させる。さらに、抗CD6モノクローナル抗体は、in vitroで補体依存性細胞毒性(CDC)を誘導しないことが見出されている。

【0033】

本発明の実施は、他に指示しない限り、当分野の技術の範囲内である免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組み換えDNAの、従来技術を採用する。例として、Sambrook, et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版(1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); METHODS IN ENZYMOLOGYのシリーズ(Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. HamesおよびG. R. Taylor eds. (1995)), HarlowおよびLane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, および ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))を参照。

【0034】

定義

本明細書中において他に定義しない限り、本発明に関して使用する科学および技術用語は、当業者に普通に理解されている意味を有するものとする。さらに、別様に文脈から要求されない限り、単数形の用語は複数形を包含するものとし、複数形の用語は単数形を包含するものとする。

本発明を記載およびクレームすることにおいては、以下の専門用語を、本明細書中に定めた定義に従って使用する。

【0035】

本明細書中において使用する「狼瘡」は、結合組織を攻撃する抗体が関与している自己免疫疾患または障害である。狼瘡の主な形は、全身性のもの、全身性エリテマトーデス(SLE)(皮膚SLEおよび亜急性皮膚SLEを包含する)、ならびに、他の狼瘡の型(腎炎、腎外(extrarenal)、脳炎、小児、腎外性(non-renal)、円板状、および脱毛を包含する)である。

【0036】

本明細書中において使用する「抗CD6抗体」は、一般的に、ヒトCD6(hCD6)のSRCRドメイン1(D1)に特異的に結合する抗体である。本発明の好ましい側面において、ネイティブおよび人工的に改変された抗体および抗体フラグメントを包含する、抗体およびその他の免疫グロブリンであって、CD6のヒトSRCRドメイン1に特異的に結合するが、CD6に活性化白血球細胞接着分子(ALCAM)が結合することを妨げないものが提供される。

【0037】

本明細書中において使用する「対象」は、ヒト対象である。一般的に、かかる対象は、狼瘡のための処置に適格である。本明細書中における目的のために、かかる適格な対象は、狼瘡の1つ以上の兆候、症候またはその他の指標を経験しているか経験した者、または、

10

20

30

40

50

例えば、新たなフレアがあると新たに診断されたか、以前に診断されたか、または慢性ステロイド依存で新たなフレアがあるかを問わず、狼瘡と診断されている者、または、狼瘡を発生させるリスクを有する者である。

【0038】

本明細書中において使用する、狼瘡を診断するために使用される「症候」またはその他の指標は、頬の紅斑、円板状紅斑、または赤い隆起した斑；日光に対する反応などの光過敏性；鼻内や口内における潰瘍などの口腔潰瘍；2つ以上の末梢関節が関与する非びらん性関節炎などの、関節炎；過剰な尿中タンパク質などの腎障害；癲癇（けいれん）などの神経学的兆候；および、溶血性貧血、白血球減少症、リンパ球減少症または血小板減少症などの血液学的症候を包含し得る。

10

【0039】

本明細書中において使用する「モノクローナル抗体」（mAb）は、実質的に同質である抗体の集団の抗体を指し；つまり、その集団中における個々の抗体は、少量存在し得る自然発生突然変異以外では同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原決定基「エピトープ」に対して向けられている。したがって、修飾語句「モノクローナル」は、同一のエピトープに向けられた実質的に同質である抗体の集団を意味するが、いかなる特定の手法による抗体の生産を要求すると解されるものでもない。当技術分野において知られているあらゆる手法または方法論によってモノクローナル抗体を作ることができることが理解されるべきであり；例として、当技術分野において知られている組み換えDNA法、またはファージ抗体ライブラリーを使用して組み換え技術により生産されたモノクローナルの単離の方法が包含される。

20

【0040】

本明細書中において使用する「補体依存性細胞毒性」または「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解させる分子の能力を指す。補体活性化経路は、補体系の第1の構成成分の、同種抗原と複合体化した分子（例として、抗体）への結合によって開始する。

【0041】

本明細書中において使用する「サイトカイン」は、別の細胞に対して細胞間メディエーター（intercellular mediators）として作用する1つの細胞集団から放出されるタンパク質の総称である。かかるサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン；IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15などのインターロイキン（IL）；TNF- またはTNF- などの腫瘍壊死因子である。

30

本明細書中において使用する「成長阻害」抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を、防止または低減させるものである。例えば、抗体は、in vitroおよび/またはin vivoにおいてT細胞の増殖を防止または低減させ得る。

【0042】

本明細書中において使用する「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するための、必要な投薬量および期間での、有効な量を指す。

本明細書中において使用する「自己免疫疾患」は、個体の自身の組織または臓器から生じ、およびそれらに対して向けられ、ならびに、自己抗原（例として、核抗原）からのエピトープに対して特異的である自己抗体の分泌などの、正常な体内組織および抗原と反応する抗体のB細胞による生産によってもたらされるか、またはそれらによって増悪する、疾患または障害である。

40

【0043】

本明細書中において使用する、ある特定の抗体によるアポトーシス（プログラム細胞死）の決定であって、それらがアポトーシス（例として、T細胞の）を誘導するか誘導しないかは、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞萎縮、小胞体の拡張、細胞断片化、および/または膜ベシクル（アポトーシス体と呼ばれる）の形成などの標準アポトーシスアッセイにより決定することができる。

本明細書中において記載された本発明の側面は、「からなる」および「から本質的になる

50

」という側面もまた包含することが理解される。

【0044】

本発明の第1の側面によると、配列番号1および配列番号2を含む、CD6へのALCAMの結合を妨げることなくCD6のD1ドメインに特異的に結合することを可能とする抗CD6モノクローナル抗体が提供される。抗CD6モノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号3および配列番号4を包含するか、または、ヌクレオチド配列は、それらと少なくとも90%同一性を有し、配列番号1および配列番号2をコードする。

【0045】

本発明の抗CD6モノクローナル抗体を生産するための方法

本発明はさらに、開示されている抗CD6抗体を生産するための方法を提供する。これらの方法は、本発明の抗体をコードする単離された核酸（単数または複数）を含有する宿主細胞を培養することを網羅する。当業者には当然認識される通り、これは、抗体の性質に応じて種々のやり方によって行うことができる。

【0046】

一般に、本発明の抗体をコードする、核酸が提供される。ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAの形とすることができる。DNA、cDNA、ゲノムDNA、核酸類似体、および合成DNAの形でのポリヌクレオチドは、本発明の範囲内にある。DNAは、二重鎖または一重鎖であり得、一重鎖であれば、コード（センス）鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。抗CD6モノクローナル抗体をコードするコード配列は、本明細書中において提供されるコード配列と同一であり得、または、その配列が、遺伝子コードの重複もしくは縮退の結果として、本明細書中において提供されるDNAと同じポリペプチドをコードする、異なるコード配列であり得る。

【0047】

いくつかの態様において、本発明の抗CD6モノクローナル抗体をコードする核酸（単数または複数）は、染色体外であるかまたはそれが導入される宿主細胞のゲノム中へと組み入れられるように設計されたものであり得る、発現ベクター中へと組み込まれている。発現ベクターは、いくつかの適切な調節配列（転写および翻訳制御配列、プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー、複製の起点等を包含するが、これに限られない）または他の構成成分（選択遺伝子等）を含有することができ、それらの全てが、当技術分野においてよく知られているとおりに作動可能に（operably）連結している。

【0048】

いくつかの場合において、2つの核酸が使用され、および各々が異なる発現ベクター中に（例として、重鎖が第1の発現ベクター中に、軽鎖が第2の発現ベクター中に）入れられるか、またはこれに代えて、それらが同じ発現ベクター中に入れられることができる。調節配列の選択を包含する、発現ベクター（単数または複数）の設計は、宿主細胞の選定、所望のタンパク質の発現のレベル等の、かかる因子に依存し得ることが、当業者には当然認識される。

【0049】

一般に、核酸および/または発現は、選択された宿主細胞に適切なあらゆる方法（例として、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）を使用して組み換え宿主細胞を作り出すために、核酸分子（単数または複数）が1つ以上の発現制御エレメントに（例として、ベクター中において、細胞中のプロセスによって作り出されるコンストラクト中、宿主細胞ゲノム中へと組み入れられて）作動可能に連結するように、適切な宿主細胞中へと導入されることができる。結果として生じる組み換え宿主細胞は、発現に適切である環境下（例として、インデューサーの存在下で、適切な非ヒト動物中において、適当な塩、増殖因子、抗生物質、栄養補助剤等を補充された適切な培地中において）で維持されることができ、これにより、コードされているポリペプチド（単数または複数）が生産される。いくつかの場合において、1つの細胞中で重鎖が生産され、別の1つの中で軽鎖が生産される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

組み換え宿主細胞中においてモノクローナル抗体の合成が得られるように、発現ベクターを、E. coli細胞、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または、他のやり方では免疫グロブリンタンパク質を生産しない骨髄腫細胞などの宿主細胞中へとトランスフェクトすることができる。酵母、昆虫、および植物細胞もまた、組み換え抗体を発現するために使用することができる。いくつかの態様において、抗体は、ウシまたはニワトリなどのトランスジェニック動物において生産することができる。

【 0 0 5 1 】

抗体分子生物学、発現、精製、およびスクリーニングについての、一般的な方法は、例えば、Antibody Engineering, Kontermann & Dubel, Springer, Heidelbergによって編集、2001および2010年、において記載されている。

10

【 0 0 5 2 】

投与方法

以下に記載される使用の方法における投与のために、抗CD6モノクローナル抗体は、投与の前に、非毒性の薬学的に許容し得る担体物質（例として、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水）と混合されてもよく、あらゆる医学上適当な手順、例として、非経口投与（例として、注入）、例えば静脈内または動脈内注入などによって投与されることとなる。

【 0 0 5 3 】

本発明に従って使用される抗CD6モノクローナル抗体の処方物は、所望の純度を有する抗体を、任意に、凍結乾燥製剤または水溶液のいずれかの形での薬学的に許容し得る担体、賦形剤または安定化剤とともに、混合することによって調製し得る。

20

【 0 0 5 4 】

許容し得る担体、賦形剤または安定化剤は、採用される投薬量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンなどを包含する抗酸化物質；塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムなどの保存料；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノールおよびm-クレゾール；低分子（約10よりも少ない残基の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを包含する単糖類、二糖類、およびその他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例として、Zn-タンパク質錯体）；および/またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤、を包含する。

30

【 0 0 5 5 】

抗CD6モノクローナル抗体はまた、コアセルベーション手法により、または界面重合により、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルで、それぞれ、コロイド薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中においてまたはマイクロエマルジョン中において、調製されたマイクロカプセル中に封入されてもよい。かかる手法は、当技術分野においてよく知られている。

40

【 0 0 5 6 】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の適切な例は、抗CD6モノクローナル抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半透過性のマトリックスであって、そのマトリックスが、成形品、例として、フィルムまたはマイクロカプセルの形であるものを包含する。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル、L-グルタミン酸のコポリマー、非

50

分解性酢酸エチレンビニルおよび分解性乳酸 - グリコール酸コポリマーを包含する。

【 0 0 5 7 】

抗CD6モノクローナル抗体は、対象に、ボラスでまたはある期間にわたる持続注入によつての静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳髄腔内、皮下、関節内、滑液内、クモ膜下腔内、または経口経路などの知られている方法に沿つて投与され得る。抗CD6モノクローナル抗体の静脈内または皮下投与が、好ましい。

【 0 0 5 8 】

本発明による狼瘡関連疾患の処置は、使用される抗CD6モノクローナル抗体の「治療有効量」を包含する。注目すべきことに、治療有効量は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を引き出すための抗CD6モノクローナル抗体の能力などの因子によつて変動し得る。

10

【 0 0 5 9 】

投薬レジメンは、最適な所望の応答（例として、治療反応）を提供するように加減される。例えば、単回のボラスが投与されてもよく、複数の分割用量が時間をかけて投与されてもよく、または用量が、治療状況の緊急事態により示唆されるとおりに比例的に低減させられるかもしくは増大させられてもよい。本発明において使用される抗CD6モノクローナル抗体のための効率的な投薬量および投薬レジメンは、狼瘡型疾患の重症度に依存し、および当業者によつて決定され得る。

【 0 0 6 0 】

本発明において使用する抗CD6モノクローナル抗体の治療有効量の、例示の、限定されない範囲は、対象の体重あたり約0.01~100mg/kg、例えば約0.01~50mg/kgなど、例えば、約0.01~25mg/kgである。当技術分野における通常の技術を有する医療専門家は、要求される医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方し得る。例えば、医師は、抗CD6モノクローナル抗体の用量を、所望の治療効果を達成するために必要なそれよりも低いレベルで始めて、所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増大させることができる。

20

【 0 0 6 1 】

1つの態様において、抗CD6モノクローナル抗体は、対象の体重あたり1~500mg/kg、例えば20~200mg/kgなどの週間投薬量で、注入により投与される。かかる投与は、繰り返されてもよく、例として、1~8回、例えば3~5回などである。代替において、投与は、2~24時間の、例えば2~12時間などの期間にわたる、持続注入により行われてもよい。

30

【 0 0 6 2 】

1つの態様において、抗CD6モノクローナル抗体は、10mg~200mgの週間投薬量で、7回まで、例えば4~6回など、投与される。投与は、2~24時間の、例えば2~12時間などの期間にわたる、持続注入により行われてもよい。かかるレジメンは、例えば6か月または12か月後に、必要に応じて1回以上繰り返されてもよい。

【 0 0 6 3 】

以下の例は、本発明の理解を補助するために記述されているが、いかなるやり方でもその範囲を限定するものと意図するものではなく、またそのように解されてはならない。例は、アッセイ手順において採用されている従来型の方法についての詳細な記載を含んでいない。かかる方法は、当業者によく知られており、ほんの例として包含する多数の刊行物において記載されている。

40

【 実施例 】

【 0 0 6 4 】

例 1

CD6は、リンパ球上に主に発現する共刺激分子であり、数多くの自己免疫疾患[16, 17]と関連する。抗マウスCD6(-mCD6)は、CD6のドメイン1に特異的に結合し、イトリズマブに対するサロゲート抗体である。この抗体を使用した以前の研究は、マウスにおける多発性硬化症についてのモデルであるEAE(実験的自己免疫性脳脊髄

50

炎)の有意な改善を実証した。本研究において、抗体は、ヒトにおける狼瘡様疾患と関係のあるマウスモデルであるMRL Fas / lprマウスにおいて評価される。

【0065】

- mCD6処置は、アイトタイプ対照と比較して、リンパ節腫脹、脾臓および唾液腺の重量の有意な低減を示した ($p < 0.05$)。 - mCD6処置された動物は、抗CD3に媒介されるT細胞増殖アッセイに対して、有意な低増殖 (hypo proliferation) を、IFN- ($p < 0.04$) およびTNF- ($p < 0.09$) のような炎症促進性サイトカインの放出の同時の低減とともに示した。

【0066】

MRL Fas / lprは、狼瘡様自己免疫疾患において使用される、よく知られた動物モデルである [18 ~ 21]。このモデルは、Fas遺伝子に、主にBおよびT細胞の増殖に影響を及ぼす自然発生突然変異を有する。この突然変異は、リンパ球の増殖を制御せずにアポトーシスを防止し、それによって、図1に示すとおり、リンパ節 (リンパ節腫脹)、唾液腺および脾臓の大幅な肥大化を結果としてもたらす。このモデルはまた、ヒトにおけるループス腎炎に似た糸球体腎炎も示す [22]。マウスにおいて、疾患発症は、第8週以降、第16 ~ 18週の間死亡に至るまでである [20、21]。

【0067】

全身性エリテマトーデス (SLE) は、その大部分は中年女性が罹患する (女性と男性の比率9 : 1) 自己免疫性炎症性疾患である。SLEの特徴は、皮膚発疹、関節痛、再発性の胸膜炎、および腎疾患を包含する。

【0068】

この研究は、この狼瘡モデルにおける - mCD6の使用を記載している。動物 (群あたり $n = 6$ 、年齢 : 12週) を、60および600 μg / 用量の - mCD6または60 μg のラットIgG (アイトタイプ対照) で、腹腔内経路にて (i.p.) 10日間 (用量あたり3週間) 処置した。動物を、16週齢でサクリファイスした。試験方式は、図6に示されている。研究の最後に、以下のパラメーターを評価した :

- ・リンパ節腫脹の測定とこれに続く臓器の回収および研究の最後の評価
- ・研究の期間の間に測定した蛋白尿
- ・研究終了時の採血
- ・リンパ節および脾臓を用いた増殖アッセイ。
- ・マウス血清からの抗核抗体および抗dsDNA抗体測定。
- ・増殖アッセイからのサイトカイン分析。

【0069】

結果 :

- mCD6でのリンパ節腫脹の減少と、それに伴う関連する特定のリンパ器官の縮小。
図2に示すとおり、 - mCD6抗体で処置した狼瘡マウスは、アイトタイプ対照と比較して、リンパ節腫脹スコアおよび臓器すなわち脾臓、唾液腺の重量の有意な低減を示した。群の間で、測定された蛋白尿、腎臓および胸腺のサイズには、差がなかった (データ示さず)。

【0070】

- mCD6処置されたものは抗CD3に媒介される増殖への低応答性と、それに伴う関連する炎症促進性サイトカインの低減を示す

図3に示すとおり、 - mCD6で処置した動物からのリンパ節由来細胞は、アイトタイプ処置群と比較して、抗CD3に媒介されるT細胞の増殖 ($p < 0.05$) への低応答性を示しており、これは、おそらく疾患抑制と関連するであろうT細胞活性化の抑制を示唆している。

【0071】

サイトカインは、SLEの発病機序においてメジャーな役割を担う [23 ~ 26]。Th1 / Th2 / Th17サイトカインを、増殖アッセイからの上清から測定した。図4に示すとおり、 - mCD6処置群は、対照群と比較して、IFN- およびTNF- のよ

10

20

30

40

50

うな炎症促進性サイトカインのより低い放出を示した。しかしながら、群間で評価した他のサイトカイン（IL - 2、IL - 6、IL - 10およびIL - 17）における差はなかった。

【0072】

- mCD6 処置された動物は、B細胞応答に影響を与える可能性がある

抗核抗体（ANA）および抗ds-DNAは、狼瘡疾患において一般的に観察される主要な自己抗体である。これもまた、この動物モデルにおいて観察される[18、20、21、27]。図5に示すとおり、- mCD6での処置は、アイソタイプ処置群と比較してマウス血清中におけるより少ないANAおよび抗ds-DNA抗体を示した。低減は、しかしながら、統計的に有意ではなかった。

10

【0073】

この初期用量設定研究において、60および600 μg / 用量の両方が、測定した物理的および生物学的エンドポイントにおいて、同等の有効性を示した。ゆえに、- mCD6抗体の使用は、このマウスモデルにおいて狼瘡様の症候を軽減することが可能であるということが示されている。

【0074】

例2

ELISAによると、Th1とALCAMはCD6上の同じドメインに結合しない

CD6-Fcで被覆されたELISAプレート中で、様々な濃度のALCAM-Fcを、固定された濃度のTh1と一緒にインキュベートしたとき、Th1は全ての濃度のALCAM-Fcで検出された。この実験から、Th1が、ALCAM結合ドメイン（ドメイン3）とは異なるドメインに結合するということが提案された。

20

【0075】

rhCD6FC / キメラ (R and D systems) (100 μg / ml) をコーティング緩衝液中で希釈し、100 μl を96ウェルNunc-Maxisorpプレートの各ウェルに加えた。プレートを、次に、4にて終夜インキュベートした。プレートをPBS Tween 20で3回洗浄した。その後、200 μl のブロッキング溶液 (1 x PBS中の2% BSA + 0.1% Tween 20) を加え、37にて1時間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを再びPBS Tween 20で3回洗浄し、これに続いてTh1モノクローナル抗体 (0.2 mg / ml) および.rhALCAMFc (R and D systems) の様々な濃度での添加を行った。これを、次に、37にて1時間インキュベートした。プレートを、PBS Tween 20でその後3回洗浄した。

30

【0076】

ウェルに、200 μl の、ブロッキング緩衝液中で希釈した抗ヒトIgG (Fab) ₂ ALP (1 : 20000) を加え、37にて1時間インキュベートした。プレートを、PBS Tween 20で3回洗浄し、200 μl のp - ニトロフェニルリン酸 (PNPP) 基質を各ウェルに加え、37にて、およそ15分で発色するまでインキュベートした。BIOTEK Micro Plate Readerを使用して、405 nmで読取り値を取った。実験は、様々な濃度のALCAMの存在は、CD6受容体へのTh1の結合を防止しないということを示唆する。図8に示すとおり、ALCAMとTh1との競合がないことは、両者についての結合ドメインが異なるということを示唆する。

40

【0077】

例3

CFSEを使用したフローサイトメトリーによるリンパ球増殖阻害

PBMCを採取し、PBS中で洗浄した。細胞 (7.5 × 10⁶) を、1 ml の、PBS中における濃度2 μMのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) 中に再懸濁させた。細胞を、厳密に37で10分間インキュベートした。10 ml のRoswell Park Memorial Institute培地 (RPMI)、10% FBSを加えることで反応を止めた。細胞を、10 ml のPBSで2回洗浄した。細胞調製物を、次に、1.5 × 10⁶ 細胞 / ml の細胞密度で、5 ml のPBS中に再懸濁させ、200 μl を各BDF

50

A C Sチューブに加えた。200 μ lの所要および非特異的抗体を各種の濃度（それぞれ50 μ g / m l、25 μ g / m l、12.5 μ g / m lおよび6.25 μ g / m l）で加え、37 で30分間インキュベートした。

【0078】

2 mlのP B Sを各チューブに加え、未結合の抗体を洗い落とすために、R Tにて5分間、1200 R P Mで遠心分離した。各チューブ中のペレットに、1 mlのR P M I、10% F B Sを加えた。各チューブに、増殖を刺激するために、1 mlのR P M I 10% F B S中におけるP H A 20 μ g / m lを加えた。チューブ中の合計体積は2 mlであり、P H Aの最終濃度は10 μ g / m lであった。チューブをボルテックスし、C O₂ インキュベーター中で37 にて3日間インキュベートした。細胞をP B Sで洗浄し、5分間、4にて1200 R P Mでスピンドウンした。上清を捨て、500 μ lの1 x P B S中に再懸濁させた。およそ200事象/秒で合計20000の事象を取得し、F I T Cチャンネルを見た。

10

【0079】

阻害の% = { [P H A - (T 1 h + P H A)] / P H A } * 100

（ここで、P H A = P H A - 細胞単独

P H A + T 1 h = (P H A + T 1 h) - 細胞単独

P H A + h R 3 = (P H A + h R 3) - 細胞単独）

細胞単独は、C F S E + 細胞 である。

【0080】

これらのデータは、T 1 h抗体が、P H Aで刺激されたリンパ球の増殖の阻害を用量依存的な様式で媒介するということを提案する。阻害率は、正常な個体間の生来の変動に起因して、個体間で変動し得る。しかしながら、全体として、図9に示すとおり、P H Aで刺激されたリンパ球の用量依存的な阻害は、T 1 hで観察されたが、非特異的抗体h R 3では観察されなかった。

20

【0081】

例4

T 1 hは補体依存性細胞毒性(C D C)を媒介しない

アラマブルー(レサズリン)に基づいたアッセイは、抗体の、細胞殺滅を促進する能力を測定するために使用される。これは、それによって補体を固定および活性化させて標的細胞溶解を結果としてもたらす細胞表面抗原への抗体の結合によって誘導される。レサズリンは、還元されると色が青色からピンク色へ変化する酸化還元活性色素である。

30

【0082】

全血からのプールしたヒト血清(最小3(minimum three))を滅菌チューブ中に回収し、血液を室温で少なくとも4時間凝固させ、およびこれを20分間、900 gで遠心分離する。血清を採取し;分注して-80 で保管した。標的細胞(Wil-2S/H U T - 78)を希釈緩衝液中で洗浄し、2 x 10⁵細胞/mlまで再懸濁させた。抗体を希釈緩衝液中で、最終的な所望の濃度の4 xとして希釈した。補体を、所望の最終濃度の4 xとして希釈した(すなわち、1:10の最終濃度に対しては、1:2.5希釈)。各50 μ Lの希釈した抗体、希釈した補体、および50 μ Lの細胞懸濁液(10,000細胞/ウェル)を、96ウェル平底プレートの各ウェルに加えた。

40

【0083】

以下の対照ウェルを含めた:標的細胞+A b単独(自発的細胞死)、標的細胞+血清単独(バックグラウンドの溶解)、および標的細胞+10% S D S(細胞死の最大値のため)。陽性対照は、異なる濃度でのRituxanで処置したWil-2S細胞とした。96ウェルプレートを、37 にて2時間インキュベートした。50 μ L/ウェルのアラマブルーを各ウェルに加え、プレートを37 にて終夜インキュベートした。蛍光を、分光光度計Biotek Synergy(商標)H Tで530 nm励起、590 nm発光、および感度=35にて測定した。結果は、図10に示すとおり、T 1 hがRituxanと比較してC D Cを誘導しないということを提案する。ゆえに、この実験からの結果は、抗C D 6モノクローナル抗体は、C

50

D6を発現する細胞株、つまりHUT78において、CDCを誘導しないということを決定的に証明する。

【0084】

例5

T1hはHUT78細胞においてアポトーシスを誘導しない

アポトーシスの特質の1つは、原形質膜の内部から外部へのホスファチジルセリン(PS)の移行である。アポトーシス細胞と壊死細胞との区別のために、アネキシンVフルオレセインおよびヨウ化プロピジウム(PI)を使用することにより、アポトーシス細胞膜の外葉についてのホスファチジルセリンの分析が行われる。

【0085】

アネキシンVは、ホスファチジルセリンに対して高い親和性を持つ、Ca²⁺依存性のリン脂質結合タンパク質である。PIは、明確な壊死細胞に結合し、一方、アネキシンVフルオレセインは、アポトーシス細胞に結合する。この方法は、アポトーシスおよび壊死の細胞集団を区別するのに役立つ。早期アポトーシスの集団は、アネキシンVのみ陽性であり、一方、後期アポトーシスは、アネキシンVおよびPIの両方が陽性である。

【0086】

細胞を採取し、1.5mlの3.3×10⁵細胞/ml(最終的な細胞:5×10⁵細胞)を、各35mmディッシュ中に播種した。それぞれのディッシュに、要求される量の抗体を加え、(5μg/ml)の最終濃度にした。対照ディッシュ中には、抗体を加えなかった。陽性対照として、細胞を、1.2μg/mlのラパマイシンとともにインキュベートした。細胞を、5%CO₂インキュベーター中で37℃にて終夜インキュベートした。細胞を、次に、FACSチューブBD Falcon カタログ番号:352054へと移し、室温(RT)にて5分間、1200RPMで遠心分離した。上清を捨て、2mlのPBS中に再懸濁させ、RTにて5分間、1200RPMで遠心分離した。

【0087】

上清を捨て、100μlのアネキシンVフルオレセイン標識化溶液を加え、RTにて10~15分間インキュベートした。細胞を、2mlのPBSで洗浄し、5分間、1200RPMで遠心分離した。次に、上清を捨てた。細胞を、0.5mlのPBS中に再懸濁させ、励起488nmでフローサイトメーター(3000個の細胞をゲーティングした)により取得した。試料は、アネキシンVに関してFITCチャンネルで、PIに関してPEテキサスレッドチャンネルで、読み取った。ラパマイシン処置アームにおけるアネキシンV単独およびPI単独の試料に、補償が可能となるようにランを行った。

【0088】

T1hで処置したHUT78細胞は、アネキシンV FITCチャンネルにおける未処置対照とほぼ等しい40%のアポトーシスを示した。未処置および非特異的抗体(hR3抗体)処置細胞は、35.3%および36.5%のアポトーシスをそれぞれ示し、一方、陽性対照のラパマイシンは、54.3%のアポトーシスを示した。図11に示すとおり、このデータは、T1hがHUT78細胞においてアポトーシスを媒介しないということを提案する。

【0089】

例6

破傷風トキソイド媒介性T細胞増殖アッセイにおいてはT1hによるメモリーT細胞の阻害はない

PBMCを、Ficoll-Paque(Amersham、カタログ番号:17-14403-03)、密度勾配遠心分離により単離した。軟膜を、健常ドナーから取得し、常に新鮮な状態で採取した。PBMCを、次に、PBS(Invitrogen)中で洗浄した。PBMCを、次に、0.3×10⁶細胞/mlの細胞密度で、5%FBSを補充した2mlのRPMI培地中に再懸濁させた。細胞を、次に、T1h 10μg/mlおよび非特異的対照として使用するhR3とともにまたはそれなしで、滅菌BD FACS 5mlチューブ中で30分間インキュベートした。

10

20

30

40

50

【0090】

インキュベーション後に、細胞をボルテックスし、100 μ lの細胞懸濁液をそれぞれのウェルに加えた。100 μ lの破傷風トキソイド（カタログ番号582231、CALBIOCHEM）（10 μ g/ml）希釈標準溶液（5% FBS添加RPMI培地）をそれぞれのウェルに加えることで、メモリーT細胞増殖を刺激した。プレートを、CO₂インキュベーター中で37℃にて5日間インキュベートした。65 μ lのアラマブルーを各ウェルに加え、CO₂インキュベーター中で37℃にて終夜インキュベートした。蛍光を、分光光度計Biotek Synergy（商標）HTで530 nm励起、590 nm発光、および感度 = 35にて測定した。

【0091】

図12に記述されたとおりの実験結果は、破傷風トキソイドはT細胞の増殖を用量依存的な様式で刺激するが、T1hはこれらの細胞の増殖の阻害を全く示さない、ということを示す。これは、T1hがメモリーT細胞増殖を阻害しないことを強く提案している。循環メモリーT細胞増殖が影響されず、T1h療法を受けている患者が感染に罹りやすくないため、これはT1h療法にとって好都合である。

【0092】

例7

T1hは、PBMCおよびRaji細胞により媒介される混合リンパ球反応においてT細胞増殖を阻害する

Raji/PBMC細胞を採取して、1xPBS中に再懸濁させた。8x10⁵細胞/mlのRaji細胞/PBMCを、1mlのマイトマイシン（25 μ g/ml）中に再懸濁させた。細胞を、CO₂インキュベーター中で37℃にて30分間インキュベートした。インキュベーション後に、2mlの5% FBS添加RPMIを各チューブに加え、マイトマイシンを取り除くために、RTにて5分間、1200 RPMで遠心分離した。上清を捨て、再度、2mlの5% FBS添加RPMIを加えて遠心分離した。上清を捨て、細胞をRPMI培地中に再懸濁する。

【0093】

50 μ lのPBMC（4x10⁵細胞/ml）を、96ウェル丸底プレートのそれぞれのウェルに加えた。100 μ lの抗体希釈物T1またはhR3（10 μ g/ml）をそれぞれのウェルに加え、CO₂インキュベーター中で37℃にて30分間インキュベートした。50 μ lのマイトマイシン処置されたRaji細胞（4x10⁵細胞/ml）を、それぞれのウェル中へと加えた。アッセイとともに、包含された対照は、マイトマイシン処置されたRaji細胞単独、PBMC単独、マイトマイシン処置されたRaji細胞+PHA、PBMC+PHA、マイトマイシン処置されたRajiおよびPBMCであった。

【0094】

プレートを、CO₂インキュベーター中で37℃にて5日間インキュベートした。65 μ lのアラマブルーを各ウェルに加え、CO₂インキュベーター中で37℃にて終夜インキュベートした。蛍光を、分光光度計Biotek Synergy（商標）HTで530 nm励起、590 nm発光、および感度 = 35にて測定した。結論として、図13および14の結果を参照して、T1hは、Raji細胞が抗原提示細胞でありおよびPBMCが増殖する一方向MLRを特異的に阻害することができることが観察された。

【0095】

参考

本明細書中において引用されている全ての参考文献の内容は、ここに全ての目的のために参照により本明細書中に組み込まれる。

【0096】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

1. Gangemi et al., Anti-T12, An Anti-CD6 Monoclonal-Antibody, Can Activate Human Lymphocytes-t, *J. Immunol.* 1989, 143:2439-2447.
2. Bott et al., Activation of Human T-cells Through CD6 - Functional-Effects of A Novel Anti-CD6 Monoclonal-Antibody and Definition of 4 Epitopes of The CD6 Glycoprotein, *Int. Immunol.* 1993, 7:783-792.
3. Morimoto et al., Zh1 - A Novel Antigen Involved In Lymphocyte-T Triggering, *J. Immunol.* 1988, 140:2165-2170. 10
4. Osorio et al., The Anti-CD6 mab, IOR-t1, Defined a New Epitope on The Human CD6 Molecule That Induces Greater Responsiveness In T-cell Receptor/CD3-Mediated T-cell Proliferation, *Cell. Immunol.* 1994, 154: 123-133.
5. Swack et al., Structural Characterization of CD6 - Properties of 2 Distinct Epitopes Involved In T-cell Activation Structural Characterization of CD6 - Properties of 2 Distinct Epitopes Involved In T-cell Activation, *Mol. Immunol.* 1989 26:1037-1049. 20
6. Swack et al., Biosynthesis And Posttranslational Modification of CD6, a T-cell Signal-Transducing Molecule, *J. Biol. Chem.* 1991, 266:7137-7143.;
7. Cardenas et al., Phosphorylation-Dephosphorylation of The CD6 Glycoprotein Renders 2 Isoforms of 130 and 105 Kilodaltons - Effect of Serum and Protein-Kinase-C Activators, *J. Immunol.* 1990, 145:1450-1455. 30

40

50

【表 1 - 2】

8. Wee et al., Tyrosine Phosphorylation of CD6 By Stimulation of CD3 - Augmentation By The CD4 and CD2 Coreceptors, *J. Exp. Med.* 1993, 177:219-223.
9. Aruffo et al., The Lymphocyte Glycoprotein-CD6 Contains a Repeated Domain-Structure Characteristic Of a New Family Of Cell-surface And Secreted Proteins, *J. Exp. Med.* 1991, 174:949-952.
10. Wee, et al., Characterization Of A CD6 Ligand(s) Expressed On Human-Derived And Murine-Derived Cell-Lines And Murine Lymphoid-Tissues, *Cell. Immunol.* 1994, 158:353-364. 10
11. Patel, et al., Identification And Characterization of A 100-Kd Ligand For CD6 On Human Thymic Epithelial-Cells, *J. Exp. Med.* 1995. 181:1563-1568.
12. Bowen et al., Cloning, Mapping, And Characterization of Activated Leukocyte-Cell Adhesion molecule (ALCAM), a CD6 Ligand, *J. Exp. Med* 1995, 181:2213-2220. 20
13. Whitney, et. al., The Membrane-Proximal Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain of CD6 Contains The Activated Leukocyte Cell-Adhesion Molecule-Binding Site, *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 18187-18190.
14. Gimferrer I. Relevance of CD6-mediated interactions in T-cell activation and proliferation, *J Immunol* 2004. 173: 2262-2270.
15. Roque-Navarro L., et. al., Humanization of Predicted T-cell Epitopes Reduces the Immunogenicity of Chimeric Antibodies: New Evidence Supporting A simple Method, *Hybridoma and Hybridomics* 2003.22:245-257. 30
16. Alonso-Ramirez, R., et al., Rationale for Targeting CD6 as a Treatment for Autoimmune Diseases. *Arthritis.* 2010: p. 130646. 40

【表 1 - 3】

17. Rodriguez, P.C., et al., A clinical exploratory study with itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Results.* 2012, 2: p. 204-11.

18. Blank, M. and Y. Shoenfeld, Experimental models of systemic lupus erythematosus: anti-dsDNA in murine lupus. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. 44(9): p. 1086-9.

10

19. Liu, K. and E.K. Wakeland, Delineation of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus by using murine models. *Adv Exp Med Biol*, 2001. 490: p. 1-6.

20. Perry, D., et al., Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011: p. 271694.

21. Theofilopoulos, A.N. and F.J. Dixon, Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol*, 1985. 37: p. 269-390.

20

22. Mannoor, K., et al., Expression of natural autoantibodies in MRL-lpr mice protects from lupus nephritis and improves survival. 2012, *J Immunol.* 188(8): p. 3628-38.

23. Adhya, Z., S. Borozdenkova, and M.Y. Karim, The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. 2011, *Nephrol Dial Transplant.* 26(10): p. 3273-80.

30

24. Marian, V. and J.H. Anolik, Treatment targets in systemic lupus erythematosus: biology and clinical perspective. 2012 *Arthritis Res Ther.* 14 Suppl 4: p. S3.

25. Poole, B.D., et al., Cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010: p. 735169.

40

50

【表 1 - 4】

26. Richards, H.B., et al., Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *J Exp Med*, 1998. 188(5): p. 985-90.

27. Li, Y., et al., Anti-DNA B cells in MRL/lpr mice show altered differentiation and editing pattern. *J Exp Med*, 2002. 196(12): p. 1543-52.

U.S. Patent No. 6,372,215

U.S. Patent No. 5,712,120

EP 0699755

U.S. Patent No. 6,572,857

EP 0807125

PCT/IN2008/00562

10

20

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

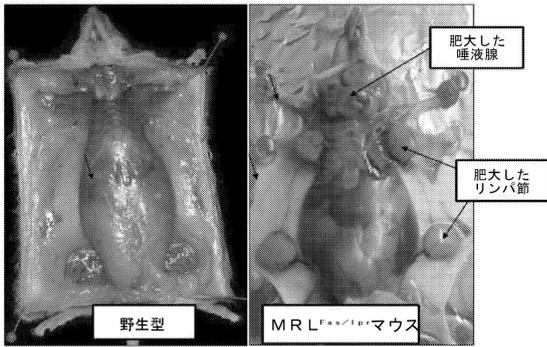


図 1

【 図 2 】

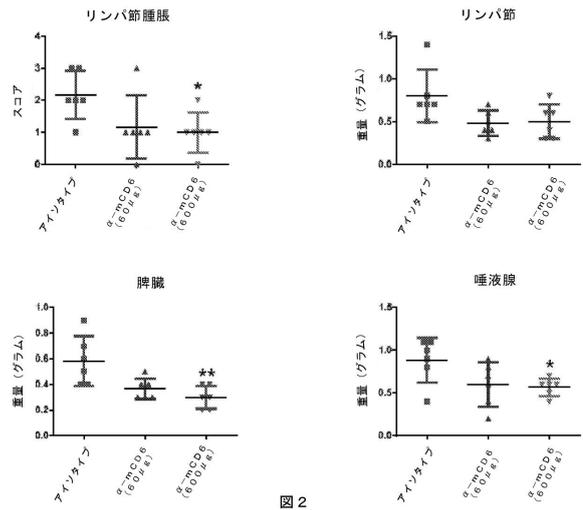


図 2

10

【 図 3 】

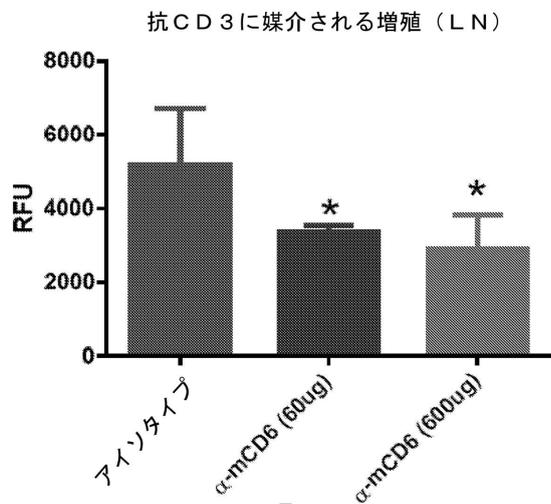


図 3

【 図 4 】

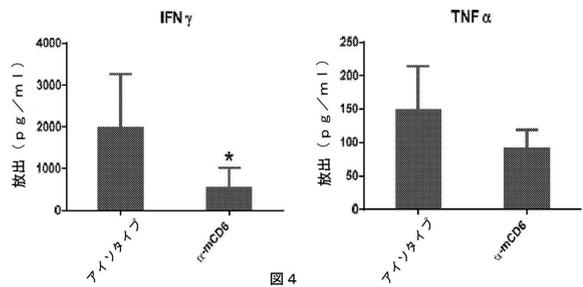


図 4

20

30

40

50

【 図 5 】

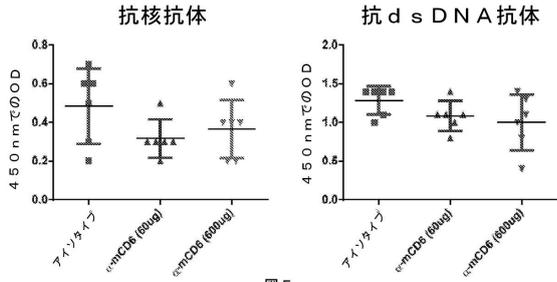


図 5

【 図 6 】

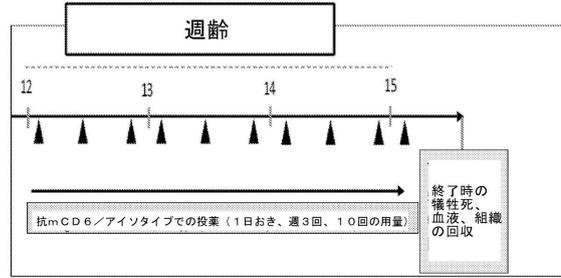


図 6

10

【 図 7 A 】

VH配列:
 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGG
 TCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTAGTAGATG
 CCATGCTTGGGTTTCGCCAGGCTCCGGGAAGAGGCTGGAGTGGGTCG
 CAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTACATCTACTATCCAGACAGTGTAA
 GGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACCCTGTATCTG
 CAAATGAGCAGTCTGAGGTTCTGAGACACGGCCATGTATTACTGTGCA
 AGACGAGATTACGACCTGGACTACTTTGACTCCTGGGCCAAGGCACC
 CTGTGCACCGTCTCCTCA

Vk配列:
 GACATCCAAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCGGTGGGAG
 ACAGAGTCACTATCACTTGCAAGCGAGTCGGGACATTAGAAGCTATT
 TAACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAGCTCCTAAGACCTGATCT
 ATTAGCAACAAGCTTGGCAGATGGGGTCCCGTCGAGATTCACTGGCA
 GTGGATCTGGGCAAGATTATCTCTCACCAATCAGCAGCCTGGAGTCTGA
 CGATACAGCAACTACTACTGTCTACAACATGGTGAGAGTCCATTACG
 CTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAATCAAA

図 7A

【 図 7 B 】

VH配列:
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAASGFKFSRYAMSW
 VRQAPGKRLEWVATISSGGSYIYPDSVKGRFTISR
 NVKNTLYLQMSLSRSEDAMYCYARRDYLDYDFD
 WGQGLTVTVSS

Vk配列:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASRDIRSYLTWYQ
 QKPGKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSQDYSLT
 ISSLESDDTATYYCLQHGESPFLLGSGTKLEIK

図 7B

20

【 図 7 C 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASRDIRSYLTWYQQK
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASRDIRSYLTWYQQK
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASRDIRSYLTWYQQK

GKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSQDYSLTISSLESD
 GKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSQDYSLTISSLESD
 GKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSQDYSLTISSLESD

DTATYYCLQHGESPFLLGSGTKLEIKRA EP0807125 B1,
 DTATYYCLQHGESPFLLGSGTKLEIK-- ゲノムDNAからの翻訳されたヌクレオチド配列
 DTATYYCLQHGESPFLLGSGTKLEIK-- アミノ酸配列

図 7C

【 図 8 】

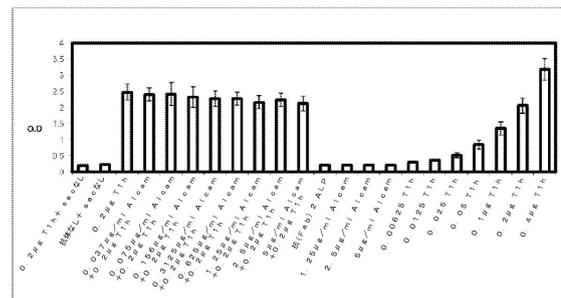


図 8

30

40

50

【 図 9 】

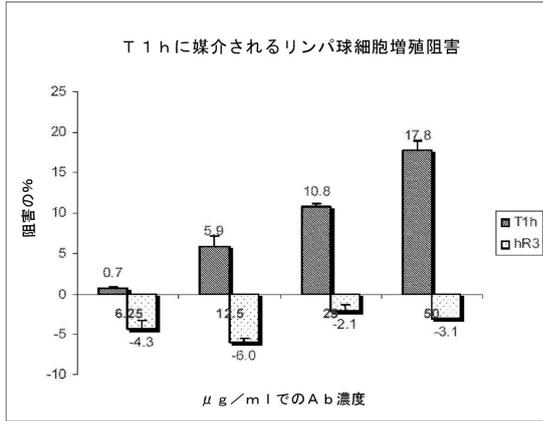


図 9

【 図 10 】

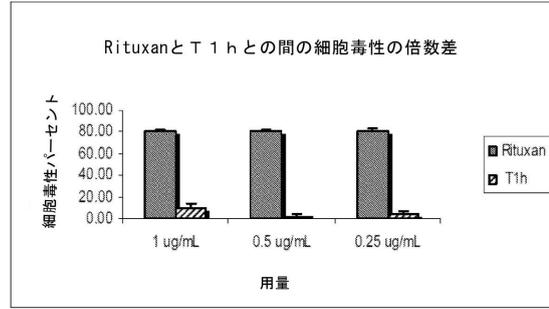


図 10

10

【 図 11 】

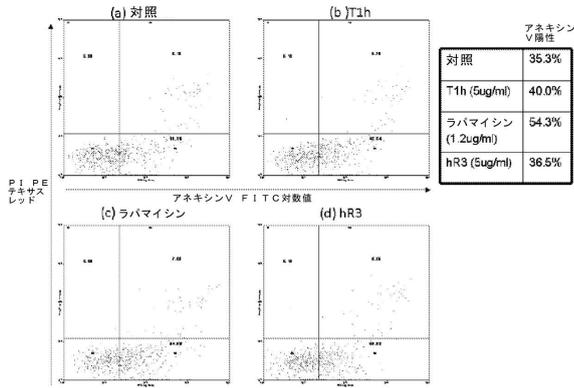


図 11

【 図 12 】

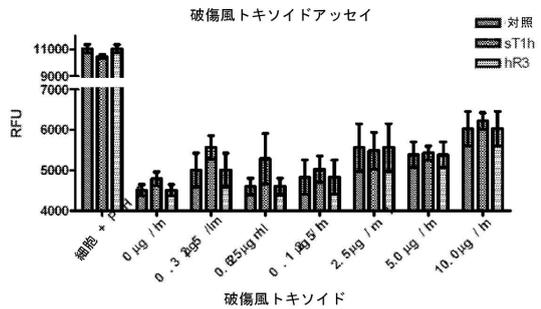


図 12

20

30

40

50

【 図 1 3 】

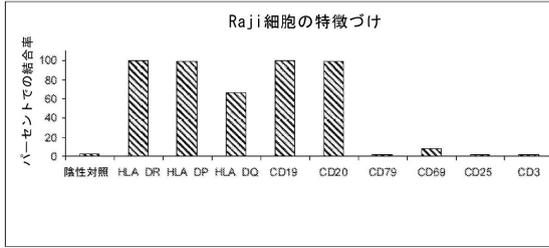


図 1 3

【 図 1 4 】

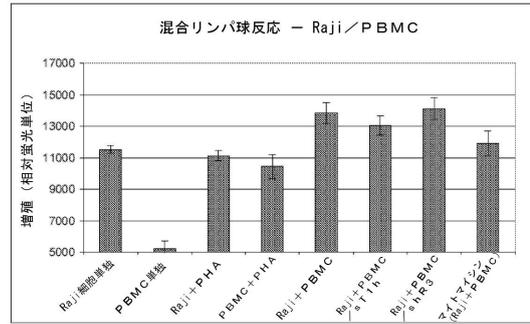


図 1 4

10

【 配列表 】

[0007071974000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/52 (2006.01) A 6 1 K 31/52
 A 6 1 K 31/675 (2006.01) A 6 1 K 31/675

ロード、アイキャ アパートメンツ、303

(72)発明者

サダシヴァラオ, ラヴィンドラ, ベラピナコディジ

インド共和国 577127 カルナータカ州、チッカマガルール ディストリクト、エヌ.アール
 .プラ タルク、カマラブラ シーサー ポスト、ドゥーパダサラ、c/ ラガヴェンドラ ケー.
 アール.

(72)発明者

メラーコーデ, ラマクリシュナン

インド共和国 560035 カルナータカ州、バンガロール、サージャプール ロード、レインボ
 ー ドライブ レイアウト、288 4ス メイン 8ス クロス

審査官 吉川 阿佳里

(56)参考文献

特表2011-513479(JP, A)

臨床化学, 1998年, 第27巻, 第3号, p. 138-145

(58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39/00 - 39/44

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/00 - 31/80

A 6 1 P 1/00 - 43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST
 N)