

(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2016-506411
(P2016-506411A)

(43) 公表日 平成28年3月3日(2016.3.3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-549837 (P2015-549837)
 (86) (22) 出願日 平成25年12月20日 (2013.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月11日 (2015.8.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/077273
 (87) 国際公開番号 W02014/100746
 (87) 国際公開日 平成26年6月26日 (2014.6.26)
 (31) 優先権主張番号 61/740, 946
 (32) 優先日 平成24年12月21日 (2012.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

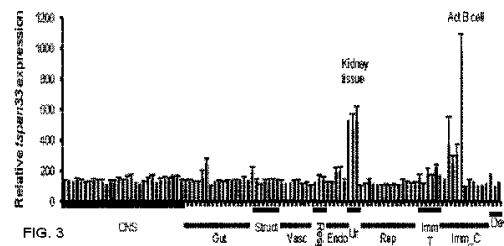
(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トゥエルフス フロ
 ア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B細胞ホジキンリンパ腫の治療のための抗体標的療法についての候補である TSPAN33

(57) 【要約】

テトラスパニン33 (TSPAN33 / BAAM) を発現する活性化Bリンパ球に関連する疾病を治療する方法。疾病は、例えば、リンパ腫または免疫疾患であり得る。方法は、疾病を治療するのに有効な量で抗TSPAN33 / BAAM抗体を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む。活性化B細胞を精製する方法並びに活性化および/または病的B細胞を識別する方法もまた提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T S P A N 3 3 が上方制御されるリンパ腫または白血病を治療する方法であって、前記リンパ腫または白血病を治療するのに有効な量で抗 T S P A N 3 3 抗体を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記リンパ腫は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前駆 T 細胞白血病 / リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B 細胞慢性リンパ性白血病 / リンパ腫、M A L T リンパ腫、パーキットリンパ腫、パーキットリンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫 - 特記のないもの、結節硬化型のホジキンリンパ腫、または混合細胞質サブタイプのホジキンリンパ腫である、請求項 1 の方法。

10

【請求項 3】

前記リンパ腫がホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫である、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

前記投与が、前記患者において低減された数の T S P A N 3 3 + B 細胞をもたらす、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

前記抗 T S P A N 3 3 抗体が、モノクローナル抗体、中和抗体、もしくはヒト化抗体、またはこれらの組み合わせである、請求項 1 の方法。

【請求項 6】

T S P A N 3 3 が上方制御される免疫疾患を治療する方法であって、前記免疫疾患を治療するのに有効な量で抗 T S P A N 3 3 抗体を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む、方法。

20

【請求項 7】

前記免疫疾患は、アレルギーまたは自己免疫疾患である、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

前記疾病は、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、潰瘍性大腸炎、クローン病、強皮症、過敏性肺臓炎、自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強直性脊椎炎、セリアック病、特発性血小板減少性紫斑病、混合性結合組織病、多発性硬化症、多発性骨髄腫、尋常性天疱瘡、側頭動脈炎、白斑、または全身性エリテマトーデスである、請求項 6 の方法。

30

【請求項 9】

前記疾病は、関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである、請求項 8 の方法。

【請求項 10】

前記投与が、前記患者において低減された数の T S P A N 3 3 + B 細胞をもたらす、請求項 6 の方法。

【請求項 11】

前記抗 T S P A N 3 3 抗体が、モノクローナル抗体、中和抗体、もしくはヒト化抗体、またはこれらの組み合わせである、請求項 6 の方法。

【請求項 12】

抗 T S P A N 3 3 抗体をリンパ球含有細胞製剤と混合することと、前記抗体により結合されたリンパ球を分離することとを含む、活性化 B リンパ球を精製する方法。

40

【請求項 13】

前記抗 T S P A N 3 3 抗体が、モノクローナル抗体、中和抗体、もしくはヒト化抗体、またはこれらの組み合わせである、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

前記分離が、蛍光標識細胞分取によるものである、請求項 12 の方法。

【請求項 15】

前記リンパ球における T S P A N 3 3 の上方制御された発現を検出することを含む、活性化および / または病的 B リンパ球を識別する、方法。

50

【請求項 16】

前記検出が、
 前記リンパ球のタンパク質を含む試料に抗 T S P A N 3 3 抗体を添加することと、
 T S P A N 3 3 が前記試料に存在する場合に、前記抗体と T S P A N 3 3 との間の免疫複合体を形成することと、
 前記免疫複合体を検出することを含む、請求項 15 の方法。

【請求項 17】

前記検出が、
 前記リンパ球の R N A から c D N A を調製することと、
 前記 T S P A N 3 3 遺伝子におけるヌクレオチド配列に特異的なプライマーにより前記 c D N A を増幅すること、または前記 T S P A N 3 3 遺伝子のヌクレオチド配列に対する前記 c D N A をハイブリダイズすることと、
 前記増幅反応の増幅生成物を検出することまたは前記 c D N A と前記 T S P A N 3 3 ヌクレオチド配列との間のハイブリッドを検出することを含む、請求項 15 の方法。

10

【請求項 18】

前記リンパ球が患者由来であり、前記方法は、T S P A N 3 3 の上方制御された発現が検出される場合に、前記患者に抗 T S P A N 3 3 抗体を投与することをさらに含む、請求項 15 の方法。

【請求項 19】

活性化および/または病的 B リンパ球を伴うリンパ腫または免疫疾患を診断する方法であって、

20

請求項 15 の方法に従って、前記試料のリンパ球における T S P A N 3 3 の上方制御された発現を検出することにより、活性化および/または病的 B リンパ球の存在について患者の試料を分析することを含み、

前記患者は、前記活性化および/または病的 B リンパ球が検出される場合に、前記リンパ腫または免疫疾患と診断される方法。

【請求項 20】

前記疾病は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、関節リウマチ、または全身性エリテマトーデスである、請求項 19 の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所から助成金番号 R 2 1 A I 0 9 6 2 7 8 を受けて、政府援助によりなされた。政府は、本発明においてある特定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は、活性化 B 細胞において発現されるタンパク質 T S P A N 3 3 に関する。

【背景技術】

【0003】

40

B 細胞は、順応性免疫システムの体液性応答を調整するリンパ球である (1) 。胸腺で成熟する T 細胞とは異なり、B 細胞は骨髄で発達し、そこでそれらは、成熟ナイーブ B 細胞に成熟する (1) 。B 細胞は、もっぱら、外来抗原を認識する抗体、または自己免疫疾患の場合、自己抗原を分泌する役割を担う。抗体には、粘膜表面の保護に關与する I g A のような、それらの位置および機能の両方を決定するサブタイプのいろいろな形がある。ある特定のタイプのリンパ腫は、B 細胞起源である。B 細胞リンパ腫は、歴史的に、2 つの主要なタイプ、すなわちホジキンリンパ腫 (H L) および非ホジキンリンパ腫 (N H L) に分けられている。ホジキンリンパ腫は、トーマス・ホジキンに因んでおり、1832 年に最初に記載されたが (2) 、リード・ステルンベルグ細胞の存在、脾臓、リンパ節、または身体の他の免疫組織の膨大、並びにリンパ組織を超えて拡がり得る異常な増殖によ

50

り特徴づけられる。「非ホジキンリンパ腫」という用語は、顕著なHL症状を呈しないすべてのタイプのリンパ腫を記載するために使用されている。現在のリンパ腫分類は、4つの広いカテゴリにおける80タイプを含むもので、HLまたNHLグループ化システムに取って代わっている(2)。いくつかのT細胞リンパ腫は、CD20のような、B細胞抗原を異常に発現することが知られているので(3)、本発明のいくつかの実施形態は、活性化B細胞もしくはB細胞リンパ腫の膜で発現される、新規なバイオマーカーを用いて、特定の病的B細胞を識別する、またはBAAM抗原としても知られる、テトラスパニン33(TSPAN33)を発現する病的B細胞もしくはT細胞リンパ腫の特異的な除去を達成することを伴う。よって、治療標的としてのBAAMの使用は、リンパ腫タイプにより制限されず、リンパ球細胞の表面でTSPAN33/BAAM遺伝子によりコードされるタンパク質の存在により制限される。

10

【0004】

癌免疫療法は、治療のモノクローナル抗体の開発により変化してきた。これらの抗体標的細胞の表面分子は、特異的に腫瘍細胞で発現される。一度に何千もの遺伝子の発現の集団的なスクリーニングを可能にする、遺伝子アレイのような技術がある。バイオインフォマティクスの適用は、モノクローナル抗体の開発のための標的を示す細胞表面タンパク質をコードする遺伝子を特定するための遺伝子アレイデータの分析を可能にする。これらの抗体は、次いで、腫瘍の成長を遅くするための、または腫瘍細胞を直接死滅させるための治療として使用され得る。抗体標的療法は、パウル・エールリヒが、1908年に病原菌または腫瘍に毒素を送達し得る「特效薬」としての抗体を最初に構想して以来(4)、人気が増加した。1981年に、Gaffar, S.A., et al.(5)は、ヒト結腸癌異種移植片への、おそらくDNA損傷の誘導により、特定の細胞毒性(cytotoxicity)を送達するためにヒト癌胎児性の抗原(CEA)に対する放射標識された抗体を使用した。1988年に、DeNardo, et al.(6)は、放射標識された抗体標的療法の投与の後で、B細胞悪性腫瘍を有する10人の患者のうち4人の完全なまたは部分的な寛解を報告した。すぐ後に、他者が、補体媒介細胞毒性(CMC)または抗体依存性細胞傷害(ADCC)を介する、「裸」(非標識)の抗体の類似の抗腫瘍活性を報告した(7)。

20

【0005】

標的分子に対する治療抗体の結合は、通常は標的分子により制御されるシグナルトランスダクション経路の引き金を引き得る。このことは、腫瘍細胞の運命の変更へと導く。それはアポトーシス、ネクローシス、細胞周期休止、増大された増殖、または分化を生じさせ得る。これらの変化された細胞の挙動のいくつかは、癌細胞の場合、特に、増殖の停止または細胞死を導くもの(アポトーシス、ネクローシス)が望ましい。当業者は、所与の抗体が、腫瘍細胞においてこれらの影響のいずれかを誘導するかどうかを測定することが可能である(8~9)。

30

【0006】

マウス細胞から産生されたモノクローナル抗体は、ヒトにおいて使用されるためにそれらの免疫原性を低減させるために、「ヒト化」を必要とする。これを行ういくつかの方法がある。1つは、抗体のマウスの領域(結晶化フラグメントまたはFc)がヒトFc配列により置換される、ヒト化抗体を産生することによる(9)。これは、種々の分子生物学技術を用いて行うことができる(8~9)。代替的には、抗体が、分子生物学技術を用いて、ヒト免疫グロブリン遺伝子でマウスを置換することにより変化されたそれらの免疫システムを有する、免疫化したトランスジェニックマウスにより産生され得る。いくつかのこのようなマウスが産生されている(7)。

40

【0007】

上記のような可能性を考慮して、治療のモノクローナル抗体が、種々の癌を治療するための好ましい方法となっている(10)。リツキシマブ(抗CD20抗体)のような、FDAに認可された抗体による治療が、非ホジキンリンパ腫(NHL)並びに関節リウマチ(RA)のような自己免疫障害の治療のために使用されている(11)。よって、疾病細胞/組織で発現される固有のバイオマーカーへの抗体標的療法の、ヒト癌または自己免疫

50

障害を治療することにおける有効性が証明された。他の例は、胸部癌細胞における H e r - 2 抗原を標的とするヒト化モノクローナル抗体であるハーセプチン (1 2)、または結腸直腸癌における血管内皮成長因子を標的とするヒト化抗体であるアバスタチン (1 3) を含む。これらの例は、ある特定のヒト癌で、劇的な (陽性の) 治療効果を有する非常に成功的な抗体を示す。

【 0 0 0 8 】

多くのリンパ腫および白血病が B 細胞抗原を発現するので (1 1)、B 細胞を標的とする抗体が治療上重要であることが証明されている。1つの例は、ある特定のヒトリンパ腫で発現されるタンパク質の C D 2 0 を標的とする治療抗体である、リツキシマブ (1 4) である。しかしながら、C D 2 0 は正常な B 細胞によっても発現され、そのため、C D 2 0 を標的とする抗体治療が腫瘍細胞のほとんどを排除するが、治療は、C D 2 0 発現するそれらの正常な B 細胞も切断する (1 5)。このことは、ヒトにおけるリツキシマブの投与の深刻な副作用である。それにもかかわらず、腫瘍細胞を除去することの利益は、C D 2 0 陽性リンパ腫を有する患者におけるリツキシマブの使用を正当化する (1 1)。

10

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

一態様において、T S P A N 3 3 が上方制御されるリンパ腫または白血病を治療する方法が提供される。方法は、リンパ腫または白血病を治療するのに有効な量で抗 T S P A N 3 3 抗体を、このような治療を必要とする患者に投与することを含む。

20

【 0 0 1 0 】

方法において、

a) リンパ腫は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前駆 T 細胞白血病 / リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B 細胞性慢性リンパ性白血病 / リンパ腫、M A L T リンパ腫、パーキットリンパ腫、パーキットリンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫 - 特記のないもの、結節硬化型のホジキンリンパ腫、または混合細胞質サブタイプのホジキンリンパ腫であり得、

b) リンパ腫は、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫であり得、

c) 投与は、患者において T S P A N 3 3 + B 細胞の低減された数をもたらし得、

d) 抗 T S P A N 3 3 抗体が、モノクローナル抗体、中和抗体、もしくはヒト化抗体、またはこれらの組み合わせであり得、または

30

e) a から d の組み合わせである。

【 0 0 1 1 】

別の態様において、T S P A N 3 3 が上方制御される免疫疾患を治療する方法が提供される。方法は、免疫疾患を治療するのに有効な量で抗 T S P A N 3 3 抗体を、このような治療を必要とする患者に投与することを含む。

【 0 0 1 2 】

方法において、

a) 免疫疾患は、アレルギーまたは自己免疫疾患であり得、

b) 疾病は、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、潰瘍性大腸炎、クローン病、強皮症、過敏性肺臓炎、自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強直性脊椎炎、セリアック病、特発性血小板減少性紫斑病、混合性結合組織病、多発性硬化症、多発性骨髄腫、尋常性天疱瘡、側頭動脈炎、白斑、または全身性エリテマトーデスであり得、

40

c) 疾病は、関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスであり得、

d) 投与が、患者において T S P A N 3 3 + B 細胞の低減された数をもたらし得、

e) 抗 T S P A N 3 3 抗体が、モノクローナル抗体、中和抗体、もしくはヒト化抗体、またはこれらの組み合わせであり得、または

f) a から e のあらゆる組み合わせである。

【 0 0 1 3 】

50

さらなる態様において、活性化Bリンパ球を精製する方法が提供される。方法は、抗TSPAN33抗体をリンパ球含有細胞製剤と混合することと、抗体により結合されたリンパ球を分離することを含む。方法では、抗TSPAN33抗体は、モノクローナル抗体、中和抗体、もしくはヒト化抗体、またはこれらの組み合わせであり得、および/または分離は蛍光標識細胞分取によるものであり得る。

【0014】

別の態様では、活性化および/または病的Bリンパ球を識別する方法が提供される。方法は、リンパ球におけるTSPAN33の上方制御された発現を検出することを含む。

【0015】

方法において、

a) 検出は、リンパ球のタンパク質を含む試料に抗TSPAN33抗体を添加することと、TSPAN33が試料に存在する場合に、抗体とTSPAN33との間の免疫複合体を形成することと、免疫複合体を検出することを含み得、

b) 検出は、リンパ球のRNAからcDNAを調製することと、TSPAN33遺伝子におけるヌクレオチド配列に特異的なプライマーによりcDNAを増幅することまたはTSPAN33遺伝子のヌクレオチド配列に対するcDNAをハイブリダイズすることと、および増幅反応の増幅生成物を検出することまたはcDNAとTSPAN33ヌクレオチド配列との間のハイブリッドを検出することを含み得、

c) リンパ球が患者由来であり得、方法は、TSPAN33の上方制御された発現が検出される場合に、患者に抗TSPAN33抗体を投与することをさらに含み得、または

d) a) および c) または b) および c) のあらゆる組み合わせである。

【0016】

別の態様において、活性化および/または病的Bリンパ球を伴うリンパ腫または免疫疾患を診断する方法が提供される。方法は、試料のリンパ球におけるTSPAN33の上方制御された発現を検出することにより、活性化および/または病的Bリンパ球の存在について患者の試料を分析することを含み、患者は、活性化および/または病的Bリンパ球が検出される場合に、前記リンパ腫または免疫疾患と診断される。

【0017】

方法において、

a) 疾病は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前駆T細胞白血病/リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンテル細胞リンパ腫、B細胞性慢性リンパ性白血病/リンパ腫、MALTリンパ腫、パーキットリンパ腫、パーキットリンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫 - 特記のないもの、結節硬化型のホジキンリンパ腫、または混合細胞質サブタイプのホジキンリンパ腫であり得、

b) 疾病は、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、潰瘍性大腸炎、クローン病、強皮症、過敏性肺臓炎、自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強直性脊椎炎、セリアック病、特発性血小板減少性紫斑病、混合性結合組織病、多発性硬化症、多発性骨髄腫、尋常性天疱瘡、側頭動脈炎、白斑、または全身性エリテマトーデスであり得、

c) 疾病は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、関節リウマチ、または全身性エリテマトーデスであり得、

d) 試料のリンパ球におけるTSPAN33の上方制御された発現を検出することが、本明細書に記載されるTSPAN33の上方制御された発現を検出するあらゆる方法によるものであり得る。

【0018】

本発明のより完全な理解のために、ここで参照が、添付の図面とあわせて、以下の記載になされる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ヒトTSPAN33のアミノ酸配である(配列番号1)。

10

20

30

40

50

【図2】ヒトTSPAN33（配列番号1）およびマウスTSPAN33（配列番号2）のアミノ酸配列の比較である。コンセンサス配列（配列番号3）もまた示される。

【図3】TSPAN33発現が、正常なヒト組織において活性化B細胞に制限されることを示すグラフである。アフメトリックス遺伝子アレイ（U133plus2.0）データは、免疫細胞および正常なヒト組織（n=8）におけるTSPAN33発現を観察する遺伝子発現データベースのヒトボディインデックスから収集した。X軸は、臓器系：CNS（中枢神経系）、Gut（胃腸）、Struct（構造）、Vasc（脈管構造）、Resp（呼吸）、Endo（内分泌）、Ur（泌尿器）、Rep（生殖）、Imm__T（免疫組織）、ImmC（免疫細胞）、およびDev（発生）より組織される。

【図4-1】TSPAN33発現が、マウスおよびヒトにおいて活性化B細胞に制限されることを示すパネルである。4A)ヒト骨髓と比較した、ヒト血液から精製された休止および活性化（抗CD40+IL-4）ヒトBリンパ球におけるTSPAN33発現のqRT-PCR、n=3。4B)ローディング対照としてアクチンを用いる、CpG+ポークウィードマイトジェン（PWM）+パンソルビン（pansorbin）による、休止および活性化条件下でのTSPAN33発現についてのPBMCのもののウエスタンブロット。濃度測定分析についても示される。4C)抗CD40mAb+IL-4刺激による、ヒト2E2B細胞（黒い棒）における経時的なTSPAN33発現のqRT-PCRおよび非刺激、抗CD3+抗CD28mAb、または12時間のPMA+イオノマイシン刺激下でのヒトJurkatT細胞（白い棒）、n=3。4D)抗CD40mAb+IL-4による休止対活性化ヒト2E2B細胞におけるTSPAN33発現のウエスタンブロット。濃度測定分析もまた示される。^{*}p 0.05、^{**}p 0.01および^{***}p 0.001は、スチューデントのt検定により統計学的有意性を示す。図4-1及び図4-2のデータは独立した3つの実験を表す。エラーバーは、標準偏差（SD）を示す。

【図4-2】TSPAN33発現が、マウスおよびヒトにおいて活性化B細胞に制限されることを示すパネルである。4E)0.1、1、または10ng/mLのLPS+IL-4による休止および活性化条件下でのTspan33A20-2JB細胞のqRT-PCR。4F)12時間の10ng/mLのLPS+IL-4によるC57BL/6脾臓から濃縮された休止または刺激B細胞のqRT-PCR、n=3、^{*}p 0.05、^{**}p 0.01および^{***}p 0.001は、スチューデントのt検定により統計学的有意性を示す。図4-1及び図4-2のデータは独立した3つの実験を表す。エラーバーは、標準偏差（SD）を示す。

【図5】TSPAN33がヒトホジキンおよび非ホジキンリンパ腫で発現されることを示すパネルである。5A)qRT-PCRが、いくつかのヒトNHL株で行われ、TSPAN33（黒い棒）対MS4A1/CD20（白い棒）発現について測定された。試料は、GAPDHに正規化された。5B)GAPDHと比較して、BaF3（マウスプロB細胞株）に対するヒトパーキットリンパ腫株Raji、Ramos、およびDaudiにおけるTSPAN33の大きな細胞外ループ33（LEL）に対応するRT-PCR発現分析。5C)ウサギ抗TSPAN33ポリクローナルを用いて、Raji、Ramos、Daudi、およびBaF3細胞のTSPAN33発現のウエスタンブロット分析。データは独立した3つの実験の代表である。

【図6】TSPAN33がヒトリンパ腫において発現されることを示すパネルである。リンパ腫バイオプシーが切片にされて、ヘマトキシリン/エオシン（Hematoxylin/Eosin）および抗TSPAN33で、その後、アイソタイプまたは抗ウサギIgGHRPで染色された。白い矢印はリード・シュテルンベルク細胞（Reed-Stenberg cell）を示し、黒い矢印は陽性TSPAN33染色細胞を示す。患者から採取したバイオプシーからの代表的な画像は、HL（n=6）、DLBCL（n=6）、およびマントル細胞リンパ腫（n=2）を診断した。

【図7-1】TSPAN33がB細胞関連自己免疫において上方制御されることを示すパネルである。7A)CD19発現に対して正規化されたMRL/faslpr/lprマウスから得られた総脾臓細胞のTspan33発現のqRT-PCR。9週齢のマウス（

10

20

30

40

50

検出可能な病理なし)、24週齢(軽度の耳障害を有するまたは有しないリンパ節腫脹)、および36週齢(耳および顔の障害を有するリンパ節腫脹)が、 $n = 5$ でTspan33発現について比較された。7B) $n = 2$ 、11.5週齢雌(リンパ節腫脹)および12.5週齢雄(病理なし)MRL/faslpr/lprマウス由来のCD19+CD138-およびCD19-CD138+脾臓細胞におけるTspan33発現のqRT-PCR。 $*p = 0.05$ 、 $**p = 0.01$ 、 $***p = 0.001$ (スチューデントのt検定)。図7-1及び図7-2のデータは、少なくとも3つの独立した実験(A~C)の代表である。エラーバーは、標準偏差(SD)を示す。

【図7-2】TSPAN33がB細胞関連自己免疫において上方制御されることを示すパネルである。7C) $n = 9$ 、ヒトSLE患者または健康な対照由来のPBMCのTSPAN33発現分析のqRT-PCR。7D) 健常者およびRA患者由来の滑膜におけるTSPAN33対MS4A1/CD20発現のマイクロアレイ分析。滑膜は、記載されるように、対照またはRA患者から単離された(H. Soto, P. Hevezi, R.B. Roth, A. Pahuja, D. Alleva, H.M. Acosta, C. Martinez, A. Ortega, A. Lopez, R. Araiza-Casillas, A. Zlotnik, Gene array analysis comparison between rat collagen-induced arthritis and human rheumatoid arthritis, Scand J Immunol, 68 (2008) 43-57)。RNAが膜から単離されて、アフィメトリックス遺伝子アレイU133plus2.0を用いて、MS4A1/CD20およびTSPAN33発現について分析された、 $n = 9$ 健常者および $n = 5$ RA患者、 $*p = 0.05$ 、 $**p = 0.01$ 、 $***p = 0.001$ (スチューデントのt検定)。図7-1及び図7-2のデータは、少なくとも3つの独立した実験(A~C)の代表である。エラーバーは、標準偏差(SD)を示す。

【図8】TSPAN33が、近位、遠位曲尿細管および集合尿細管で発現され、腎系球体で発現されないことを示す画像のパネルである。腎臓の生検体が組織アレイにおいてIHCについて染色された。試料は、H&Eおよび抗TSPAN33またはウサギIgGアイソタイプ対照、その後、抗ウサギIgG-HRPにより染色された。8A)リンパ球(黒い矢印)および神経(白い矢印)を示す40x倍率。8B)近位曲尿細管(黒い矢印)および腎系球体(白い矢印)を示す40x倍率。8C)遠位曲尿細管(黒い矢印)および集合尿細管(白い矢印)を示す40x倍率。8D)頂端膜側(apical surface)(黒い矢印)および顆粒(白い矢印)を示す近位曲尿細管の100x倍率。

【発明を実施するための形態】

【0020】

2012年12月21日に出願された米国仮特許出願第61/740,946号に対する優先権が主張され、この仮特許出願は参照により本明細書に組み込まれる。

【0021】

テトラスパニン33は、膜タンパク質であるテトラスパニンファミリーの成員であり(16)、骨髄異形成症候群および急性骨髄性白血病における欠失のホットスポットとなる領域である(17)、ヒト7番染色体(7q31.2-q32)にマッピングされた(17)。テトラスパニン33は最初に、赤血球形成に関与する新規のテトラスパニンとして特徴付けられた(17~18)。テトラスパニン33はまた、Pen遺伝子の標的欠失を有するマウス(Pen^{-/-})が貧血症および脾腫大を伴って異常でより巨大な好塩基球性RBCを発達させたことから(18)、Proerythroblast nu (new) membraneの名をとってペナンブラ(Penumbra)、Penとも命名された(17)。ペナンブラ発現は、全赤芽球を含むTER119+画分の中で、マウスの骨髄において最も高いことが分かったが、一方、好中球、休止T細胞、休止B細胞、単球、またはナチュラルキラー細胞においては、ペナンブラ発現は低いかまたは検出不可であった(18)。後者の研究によってTER119+B細胞が骨髄の最も高いTspan33発現細胞であることが分かったが、本明細書に含まれる我々のデータは、活性化B細胞におけるテトラスパニン33発現が全骨髄における発現よりも40倍高いことを示している。後者の知見から、活性化B細胞は人体におけるTspan33/BAAAMの最も高い発現を有する細胞であると結論付けられる。このことから、Tspan33/BAAAMは、B細胞が病因に関与するリンパ腫または

10

20

30

40

50

ある特定のヒト自己免疫疾患を治療するための医療用抗体開発の独特の標的候補となっている。

【0022】

ヒトテトラスパニン33 (TSPAN33にコード)は、90種を超える様々な組織および器官の遺伝子発現プロファイルの総合データベース(遺伝子発現の身体指標)を用いることで、B細胞リンパ腫上に存在するバイオマーカーとして同定された(19)。ヒトテトラスパニン33は、マウステトラスパニン33と97%の相同性を有する、4回膜貫通型スーパーファミリーのメンバーであり、造血に関連している(18)。マウスおよびヒトのBAA M遺伝子間の高レベルの保存は、マウスモデルを、抗体標的療法を含む前臨床試験に適切なものとしている。

10

【0023】

ヒトテトラスパニン33タンパク質配列が図1に提供される。ヒト対マウスのTSPAN33タンパク質アラインメントが図2に示される。ヒトTSPAN33ヌクレオチド配列受入番号はNM_178562(参照により本明細書に組み込まれる)であり、一方、ヒトTSPAN33タンパク質配列受入番号はNP_848657(参照により本明細書に組み込まれる)である。

【0024】

人体の105種類の組織および細胞におけるTspan33の発現をマッピングするために、遺伝子発現の総合データベース(遺伝子発現の身体指標(Body Index of Gene Expression):BIGE(19))が用いられた。BIGEデータベースは、Tspan33の発現が高度に特異的であり、最も高い発現量が活性化B細胞内に見られることを示している(図3)。このことから発明者は、この分子を、ヒトにおけるその発現パターンをより良く反映している名称である、BAA M、またはB細胞活性化関連分子(B cell Activation Associated Molecule)と新たに命名することを決定した。顕著なBAA M発現量を有する別の部位は、腎臓である(図3)。このBAA M発現パターンは、ヒトRNAのqRT-PCRを用いて確認され(図4)、高レベルのBAA M mRNAが腎臓において検出された。一次リンパ器官(骨髄および胸腺)および二次リンパ器官(脾臓)を含む他の全ての組織、並びに休止B細胞は、BAA M発現について陰性であった。

20

【0025】

BAA M発現のリンパ系外の部位の中で、腎臓における発現は、インビボにおける抗BAA M抗体の可能性のある治療用途に対する関心を引き起こした。腎臓におけるBAA Mに対する治療的モノクローナル抗体の遠隔標的化の可能性を評価するために、抗BAA Mポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学を行った(図8)。これらの結果は、BAA Mは腎臓の近位曲尿細管および遠位曲尿細管において発現されるが、一方で、リンパ球、神経、集合管および糸球体はBAA Mを発現しなかったことを明らかにした。近位曲尿細管および遠位曲尿細管は、尿濾過中のタンパク質、イオン、および有機溶質の分泌および吸収に参与する上皮刷子縁細胞で裏打ちされている。従って、腎臓におけるBAA Mの発現は、B細胞活性化とは無関係であり、おそらくは、これらの細胞における小胞輸送またはシグナル伝達に関連しているが、これは、テトラスパニンが、ファミリーとして、これらの機能に関連していたためである(16)。重要なことは、低分子量のタンパク質のみが、血流の輸入管から糸球体間隙を通過して、尿が膀胱に移行するために集められる曲尿細管に進入することができる。従って、抗体はこの間隙に進入しないため、BAA Mを標的とする治療的モノクローナル抗体は、それらの標的に到達して腎機能に影響を与えることはしないはずである。さらに、腎臓上皮細胞は生物学的細胞傷害性薬物に対して抵抗性であることが報告されており、腎細胞癌がADC Cに対して抵抗性であることも報告されている(20)。まとめると、これらのデータは、Tspan33/BAA Mの腎臓発現が、ヒトにおける抗BAA M抗体の治療用途に対する懸念を引き起こさないはずであることを示している。

30

40

【0026】

TSPAN33は高度に保存されており(21)、活性化B細胞において高度に発現上

50

昇されているため、B細胞の活性化に関与していると予測されている。従って、一実施形態では、抗体を用いて、B細胞活性化が制御され、自己免疫性疾患またはアレルギー性免疫疾患が治療される。「発現上昇された発現」という用語とは、対照と比較して発現が増加されていることを意味する。例えば、TSPAN33の発現は対照遺伝子と比較して増加している可能性があり、あるいは、発現は対照細胞における発現と比較して増加されている可能性がある。

【0027】

B細胞活性化マーカーのレベルの上昇が非ホジキンリンパ腫(NHL)等の発がんリスクと関連することが示されている(22~23)ことから、B細胞活性化マーカーは診断ツールとして重要である。この目的のために、発明者は、他のB細胞抗原(特に、CD19およびCD20)もこれらの腫瘍において高発現される(24)ことから、BAAMがヒトリンパ腫において発現されると推論した。NHLにおけるTSPAN33の発現を評価するために、いくつかのびまん性B細胞リンパ腫(非ホジキンリンパ腫)に対してRT-PCRが行われ、その結果は、BAAM発現がCD20発現と同程度であったこと示している。いくつかのヒトパーキットリンパ腫細胞株(非ホジキンリンパ腫)に対してもRT-PCRおよびウエスタンブロッティングが行われ、TSPAN33は、mRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で容易に検出された。さらに、侵襲型NHL、マンテル細胞リンパ腫(NHL)、およびホジキンリンパ腫含有リード・シュテルンベルク細胞を有する患者から得られた生検体に対して、免疫組織化学が行われた。その結果は、後者が高度にBAAM陽性であること示している。マンテル細胞リンパ腫はBAAM陰性であった。BAAM発現は、B細胞リンパ腫の活性化状態に関連している可能性がある。リード・シュテルンベルク細胞は、不利益な体細胞超変異を獲得した胚中心B細胞に由来し、アポトーシスを起こすことができないと考えられていることから、リード・シュテルンベルク細胞は、リンパ腫の活性化型である(25)。一方、マンテル細胞リンパ腫は、11q13上のサイクリンD1遺伝子の、14q32上の免疫グロブリン重鎖座位のプロモーターへの転座を含有する、成熟CD5+B細胞リンパ腫の一種である(26)。その細胞は、ナイーブ前胚中心リンパ球(naive, pre-germinal center lymphocyte)に由来すると考えられていることから、非活性化Bリンパ球の一形態である(26)。従って、リンパ腫に対する医療用抗体の標的としてのTSPAN33の有用性における差異は、それらの活性化状態に関連している可能性がある。

【0028】

B細胞活性化のマーカーはある特定の自己免疫疾患にも関連している。例えば、血清免疫グロブリンであるIL-6およびIL-21のレベルは全て、関節リウマチ(RA)と新たに診断された患者において有意に上昇している(27~28)。RAにおける活性化B細胞の役割、およびRAの有望なバイオマーカーとしてのBAAMの発現量をさらに調べるために、9人の健常人、および再建または置換膝外科手術を受けている5人のRA患者の滑膜の包括的遺伝子発現解析から得られたマイクロアレイデータをそれぞれ用いた(29)。BAAM($p=0.0019$)およびCD20($p=0.0008$)の両方のmRNAレベルが、関節リウマチを患う患者から得られた試料において上昇していた。さらに、RA試料において上昇した上から25個のプロンプセットは、RAにおける活性化B細胞の役割と一致する、免疫グロブリン軽鎖および重鎖遺伝子を含む、B細胞活性化のマーカーを表す(29)。BAAMは、ヒトにおけるRA病変部に存在する活性化B細胞のバイオマーカーであると結論付けられる。これらのデータは、抗BAAM抗体が活性化B細胞をこれらの病変部から除去するであろうこと、従ってRA患者における状態を改善するであろうことを示している。これらの知見は、活性化B細胞が関与する他の自己免疫疾患、例えば(限定はされないが)、乾癬、アトピー性皮膚炎、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、クローン病、強皮症、過敏性肺臓炎、自己免疫性甲状腺炎(autoimmune thyroiditis)、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強直性脊椎炎、セリアック病、特発性血小板減少性紫斑病、混合性結合組織病、多発性硬化症、多発性骨髄腫、尋常性天疱瘡、側頭動脈炎、白斑、および全身性エリテマトーデスに括

10

20

30

40

50

張される。

【0029】

本発明のいくつかの実施形態は、B A A Mが活性化B細胞およびある特定の種類のリンパ腫のマーカであるという知見に基づいている。一態様において、本発明は、活性化B細胞を伴う、種々のB A A M陽性のリンパ腫および白血病、並びに自己免疫疾患等の疾患を治療するための、医療用抗体の新規且つ特定の用途を提供する。別の態様では、本発明は、このタンパク質の存在を伴う、アレルギー、自己免疫疾患、またはリンパ腫の診断のための、B細胞活性化のバイオマーカーとしてのB A A Mの用途を提供する。従って、本発明のいくつかの実施形態は、当業者によって生産されるT S P A N 3 3に対する医療用抗体の、活性化B細胞を伴う、T S P A N 3 3陽性リンパ腫または自己免疫疾患を治療するための標的としての、新規且つ特定の用途を提供する。また、本発明のいくつかの実施形態は、活性化B細胞を伴う、T S P A N 3 3陽性リンパ腫、自己免疫疾患、またはアレルギー等の疾患の診断において用いられるための、活性化B細胞のバイオマーカーとしてのT S P A N 3 3の用途を提供する。

10

【0030】

いくつかの実施形態は、T S P A N 3 3 / B A A Mの特定および特徴付け、並びにT S P A N 3 3 / B A A Mが活性化Bリンパ球およびある特定のリンパ腫において発現上昇しているという知見に基づいている。これらの実施形態は、T S P A N 3 3 / B A A M陽性であるリンパ腫または自己免疫障害を含むあらゆる疾患を治療するための、「負荷された」または「裸の」治療的モノクローナル抗体の、新規且つ特定の用途を提供する。「負荷された」および「裸の」という語は、抗体が負荷されるものとして知られている放射性医薬品、フリーラジカル、または毒素等の細胞傷害性薬物に、抗体が複合体化されているかどうかを指す。「裸の」という語は、細胞傷害性薬物に複合体化されていない医療用抗体を指す。細胞傷害性薬物の結合が、抗体を自動誘導ミサイルとして用いる特定標的への細胞傷害性薬物の送達を通じて抗体の「作用強度」を増加させることによって、モノクローナル抗体の治療用途を強力に向上させ得ることは、当該技術分野において十分に理解される。

20

【0031】

抗T S P A N 3 3抗体は、T S P A N 3 3を発現している活性化されたおよび/または病的なBリンパ球を標的とすることができ、補体媒介性細胞傷害(complement mediated cytotoxicity: C M C)もしくは抗体依存性細胞傷害(antibody dependent cellular cytotoxicity: A D C C)を介した、または、より直接的には、細胞行動を変化させることによる、それらの枯渇を引き起こす。さらに、抗T S P A N 3 3抗体は、抗体-薬剤複合体において用いられることで、T S P A N 3 3を発現する細胞に対する抗体の殺滅能を増加させることができる。例えば、抗C D 2 0モノクローナル抗体であるリツキシマブのように、B細胞を枯渇させるための抗体の使用は、有効な治療法であることが示されている。

30

【0032】

マウス細胞から産生されたモノクローナル抗体は、ヒトにおいて使用するために、ヒト化を必要とする。これを行うためのいくつかの方法がある。1つは、抗体のマウス領域(結晶化フラグメントまたはF c)がヒトF c配列で置換されているヒト化抗体を作製することによるものである。これは、当業者による、分子生物学的手法を用いる種々の方法で行うことができる(7~8)。あるいは、前記抗体は、分子生物学的手法を用いて免疫系をマウスからヒトへ変化させられたマウスを免疫することにより、作製することができる。いくつかのそのようなマウスが作製されている(7)。ある特定の実施形態では、T S P A N 3 3 / B A A M陽性病的B細胞を伴うあらゆる疾患を治療するための医療用抗体の標的としてのT S P A N 3 3 / B A A Mに対する、負荷されたまたは裸の、ヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体の新規且つ特定の用途が、これらの公知の方法を通じて生み出される。

40

【0033】

T S P A N 3 3 / B A A M陽性病的B細胞を伴うあらゆる疾患の治療は、T S P A N 3

50

3 / B A A Mが活性化B細胞およびある特定の種類のリンパ腫のバイオマーカーであると決定されるという知見に基づいている。病的B細胞は、それぞれ、アレルゲンおよび関節リウマチに対して産生された抗体等における、T S P A N 3 3 / B A A M陽性病的B細胞を伴うアレルギー性免疫関連疾患および自己免疫疾患にまで及ぶことが企図される。

【0034】

一実施形態では、治療的モノクローナル抗体の標的としてバイオマーカーを用いることによる、T S P A N 3 3 / B A A M陽性であるあらゆるリンパ腫または白血病を治療する方法が提供される。これには、この分子を発現するホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫の変種、例えば、T S P A N 3 3 / B A A Mを発現し得るある特定のT細胞リンパ腫等のあらゆるリンパ腫型が含まれる。治療のための他のリンパ腫としては、前駆T細胞性白血病/リンパ腫；濾胞性リンパ腫；びまん性大細胞型B細胞リンパ腫；マンツル細胞リンパ腫；B細胞性慢性リンパ性白血病/リンパ腫；M A L Tリンパ腫；パーキットリンパ腫；パーキットリンパ腫；非特定型末梢性T細胞リンパ腫；結節硬化型ホジキンリンパ腫；混合細胞型ホジキンリンパ腫が挙げられる。別の実施形態では、アレルギーおよび自己免疫疾患を含む、前記バイオマーカーを発現する病的Bリンパ球を含有する、あらゆる免疫疾患を治療するための方法が提供される。アレルゲンに対する抗体を有する過敏性アレルギー性Bリンパ球は、T S P A N 3 3を医療用抗体の標的として用いることで、枯渇され得る。同様に、自己抗原に対する自己抗体を有する自己反応性Bリンパ球は、上記のいかなる方法を用いても、同様に枯渇され得る。

10

【0035】

別の実施形態では、中和抗体を用いてT S P A N 3 3 / B A A Mを遮断することにより、B細胞の活性化またはT細胞への提示を制御するための手段が提供される。これは、T S P A N 3 3 / B A A Mが、ヒトおよびマウスにおいて97%超保存されていることから、B細胞の機能、活性化、増殖、または輸送に関与しているであろうという知見に基づいている。従って、当業者による中和抗体の開発は、B細胞機能を阻止するために用いられ得る。これを利用することで、体液性免疫の免疫応答を調節することもでき得、それにより、T S P A N 3 3 / B A A Mがこの機能に実際に関与している場合の、B細胞の活性化または提示を阻害することで、アレルギーまたは自己免疫等の種々の疾患を治療することができ得る。中和抗体がT S P A N 3 3分子の細胞外大ループ (large extracellular loop : L E L) 領域に結合するアッセイを用いることにより、中和抗体をスクリーニングすることができる。例えば、可溶性L E Lは、T S P A N 3 3のL E L部分に対応するヌクレオチド配列を発現ベクターにクローニングし、次にそれを適切な宿主細胞に形質移入することにより、発現され得る。抗T S P A N 3 3抗体がL E Lと結合する能力は、ウエスタンブロットによりアッセイすることができる。

20

30

【0036】

抗体は、I g G、I g M、I g A、I g DおよびI g E等の免疫性結合因子である。抗体に基づく種々の構築体およびフラグメントを調製および使用する手法は、当該技術分野において周知である。抗体を調製および特徴付けするための手段も当該技術分野において周知である (例えば、Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい、(参照により本明細書に組み込まれる))。モノクローナル抗体 (m A b) は、ある特定の利点 (例えば、再現性および大量生産) を有すると認識されている。従って、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギ、さらにはニワトリ起源のモノクローナル抗体の使用が企図される。いくつかの実施形態では、抗原結合領域を有する抗体様分子が適切である場合がある。そのような抗体様分子の例としては、限定はされないが、F a b'、F a b、F (a b')₂、単ドメイン抗体 (D A B)、F v、s c F v (一本鎖F v) 等の抗体断片が挙げられる。

40

【0037】

ポリクローナル抗体は、広範な動物種において調製することができる。典型的には、血清の産生に用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはヤギである。免疫原性を増加させるための、アジュバントの使用および、限定はされな

50

いが、キーホールリンペットヘモシアニンまたはウシ血清アルブミン等の担体タンパク質への複合体化は、周知の手順である。

【0038】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,196,265号(参照により本明細書に組み込まれる)に例示されている手法等の、周知の手法を用いることにより、容易に調製することができる。典型的には、この手法は、適切な動物を、選択された免疫原組成物、例えば、精製または部分精製したポリペプチド、ペプチドまたはドメインで免疫することを含む。免疫組成物は抗体産生細胞を刺激するのに効果的な様式で投与される(31~33)。

【0039】

例えば、数回の免疫の後、マウス血清中の抗TSPAN33抗体の存在は、血清を酵素結合免疫吸着検定法(enzyme-linked immunosorbant assay:ELISA)により検査することによって検定され得る。抗TSPAN33抗体の存在が所与のマウスの血清中で確認されると、その脾臓は、PEGにより駆動される融合または電気的手法のようなくつつかの手法を用いて、モノクローナル抗体の産生に適した骨髄腫細胞に融合され得る。得られたハイブリドーマは、HAT培地中で選抜され、ELISAにより抗TSPAN33抗体の産生のためにスクリーニングされ得る。

【0040】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、濾過、遠心分離およびHPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー等の種々のクロマトグラフィー法を用いることで、必要に応じてさらに精製され得る。

【0041】

ヒト化モノクローナル抗体は、元の抗原特異性を保持しつつ定常領域および/または可変領域フレームワーク配列をヒト配列と置き換えるための遺伝子工学技術を用いて改変された、動物起源の抗体である。そのような抗体は、通常、ヒト抗原に対する特異性を有するげっ歯類抗体に由来する。そのような抗体は、概して、インビボにおける治療適用に有用である。この戦略により、外来抗体に対する宿主応答が低減され、ヒトエフェクター機能の選択が可能となる。従って、TSPAN33に対するヒト化抗体は、いくつかの実施形態に含まれ、ヒト定常領域ドメインおよび/またはヒト可変領域ドメインを有するマウス、ラット、または他の種由来のキメラ抗体、二重特異性抗体、組換え型および改変抗体並びにそれらの断片も同様に含まれる。ヒト化免疫グロブリンを作製するための手法は当業者に周知である(34~39)。例えば、米国特許第5,693,762号では、一つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリンの作製法および組成物が開示されている。無傷抗体と組み合わせられた場合、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、エピトープを含有するタンパク質または他の化合物等のドナー免疫グロブリンと実質的に同一の、抗原に対する結合性を保持する。この領域における他の教示の例としては、米国特許第6,054,297号;同第5,861,155号;および同第6,020,192号(全て参照により明確に組み込まれる)が挙げられる。患者の疾患に対し「特別にあつらえた」抗体を開発するための方法は、同様に公知であり、そのような特別にあつらえた抗体も企図される。

【0042】

抗体の様々な製剤または医薬組成物(無菌の、緩衝化した、徐放性、制御放出性、安定剤、軟膏剤等)が、最適な投与経路に応じて治療的処置に用いられ得る。例えば、Niazi S.K. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations Informa Healthcare 2012を参照されたい。さらに、前記化合物は、単一製剤戦略において他の治療剤と組み合わせ用いられ得る。薬理学的変種を用いることで、所望の薬物動態学的結果(分泌、半減期、溶解性または排泄経路の最適化)を得ることができる。

【0043】

抗体の正確な用量は治療の目的に依存し、公知の技術を用いて当業者により確認される。例えば、Ansel, et al, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery; Lieberman

10

20

30

40

50

(1992) *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*; and Pickar (1999)を参照されたい。当該技術分野で知られているように、タンパク質分解、全身的对局所的送達 (systemic versus localized delivery)、および新規プロテアーゼ合成の速度、並びに年齢、体重、全体的な健康、性別、食事、投与時期、薬物相互作用、並びに状態の重症度に対する調整が必要な場合があり、当業者によるいくつかの実験法によって確認される。

【0044】

種々の薬剂的に許容できる賦形剤が当該技術分野において周知であり、製剤または医薬組成物に含まれ得る。本明細書で使用される場合、「薬剂的に許容できる賦形剤」には、組成物の活性成分と組み合わせられた場合に、その成分が、対象の免疫系と破壊的な反応を引き起こすことなく、生物活性を保持することを可能にする物質が含まれる。そのようなものには、安定剤、保存剤、塩または糖の複合体または結晶等が含まれ得る。例えば、Nazi S.K. *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations Informa Healthcare 2012*を参照されたい。

【0045】

製剤または医薬組成物に含まれ得る例示的な薬剂的に許容できる担体には、無菌の、水性または非水性の、溶液、懸濁液、およびエマルジョンが含まれる。例として、限定はされないが、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン (例えば、油/水エマルジョン)、および種々の湿潤剤等の、標準的な医薬品賦形剤が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、およびオレイン酸エチル等の注射用有機酸エステルである。水性担体としては、水、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁剤、例えば、食塩水および緩衝化媒質が挙げられる。非経口用ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖加リンゲル液 (Ringer's dextrose)、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液または固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、体液および栄養分補充液 (fluid and nutrient replenisher)、電解質補充液 (ブドウ糖加リンゲル液に基づくもの等) 等が挙げられる。他の実施形態では、組成物は、徐放性粒子、ガラスビーズ、包帯、眼上挿入物 (inserts on the eye)、および局所的形態を含む固体マトリックスに組み込まれる。投与経路には以下が含まれ得る: 局所的、全身、静脈内、腹腔内、経呼吸器、経口的、眼、植込、経膈、経肛門、坐剤、徐放性デバイス (devices with control release) 等。

【0046】

本願の他の場所に記載される適応症に対する既存の治療薬を、抗 T S P A N N 3 3 抗体と組み合わせ、またはそれと順次用いることで、治療成績を最適化することができる。

【0047】

別の実施形態は、病的 B リンパ球のバイオマーカーの存在を検出するアッセイを用いる、病的 B リンパ球をスクリーニングするための手段を提供する。例としては、限定はされないが、活性化 B リンパ球または病的 B リンパ球のバイオマーカーとして T S P A N 3 3 / B A A M の発現のスクリーニングに用いられ得る、E L I S A、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、または蛍光標識細胞分取 (F A C S) アッセイが挙げられる。T S P A N 3 3 / B A A M 発現の「正常」レベルからの超過は、リンパ腫または過活性免疫応答 (例えば、アレルギーに見られる) を示し得る。

【0048】

T S P A N 3 3 を検出するための免疫検出法には、E L I S A、ラジオイムノアッセイ (R i A)、フルオロイムノアッセイ、化学発光法、生物発光分析法、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学が含まれ得る。これらの方法では、試料が、標的タンパク質に対する親和性を有する一次抗体と接触されて免疫複合体を形成し、次にその免疫複合体が、例えば、一次抗体に結合された標識 (放射性標識、蛍光標識または酵素標識等) によって、または一次抗体に対し結合性を有する第二の結合分子 (二次抗体等) によって、検出される。前記第二の分子は検出のための標識に連結されていてもよい。

【0049】

核酸検出法としては、PCRに基づく方法およびハイブリダイゼーションに基づく方法が挙げられる。PCRに基づく方法としては、限定はされないが、逆転写PCR (RT-PCR)、逆転写定量PCR (RT-qPCR)、または標準的PCRが挙げられる。PCRに基づく方法では、細胞または組織試料から得られたRNAがcDNAに逆転写され、次にプライマーを用いて増幅される。ハイブリダイゼーションに基づく方法の例としては、限定はされないが、DNAマイクロアレイ、ノーザンブロット法、およびインサイツハイブリダイゼーションが挙げられる。ハイブリダイゼーションに基づく方法では、細胞または組織試料から得られたRNAが、標識化cDNA (例えば、蛍光標識された) に逆転写され、それが次に、例えば、DNAマイクロアレイ、ノーザンブロット、またはインサイツハイブリダイゼーション用に作製された組織切片をプローブするために用いられる。

10

【0050】

別の実施形態では、本発明は、バイオマーカーであるTSPAN33/BAAAMを活性化Bリンパ球のマーカーとして用いる細胞分離、精製カラム、またはFACSソーティングを用いて、活性化Bリンパ球を選別または精製するための手段を提供する。

【0051】

疾患を治療するためのTSPAN33/BAAAMに対する抗体標的療法 (antibody targeted therapy) の使用

いくつかの実施形態において、TSPAN33/BAAAMに対する抗体標的療法が、TSPAN33/BAAAM陽性リンパ腫に対する治療として用いられ得る。例えば、マンツル細胞リンパ腫 (NHL)、侵攻型非ホジキンリンパ腫、およびリード・シュテルンベルク細胞含有ホジキンリンパ腫を有する患者から生検体を採取した。その組織を切片にし、H&E染色に対する、HRP結合抗マウスIgGを用いてTSPAN33に対して染色した。ホジキンリンパ腫および侵攻型非ホジキンリンパ腫は活性化Bリンパ球に由来すると考えられており (25)、一方、マンツル細胞リンパ腫は、ナイーブ前胚中心Bリンパ球 (naive, pre-germinal center B lymphocyte) に由来すると考えられており (26)、そのため、非活性化Bリンパ腫の一形態を表す。ホジキンリンパ腫および侵攻型非ホジキンリンパ腫の切片のみが、TSPAN33陽性であった。このことから、TSPAN33/BAAAMは、TSPAN33/BAAAM陽性リンパ腫における治療的モノクローナル抗体の有効な標的であると考えられる。

20

30

【0052】

いくつかの実施形態において、TSPAN33/BAAAM陽性および自己抗体分泌性Bリンパ球を伴う自己免疫疾患を治療するために、TSPAN33/BAAAMに対する抗体標的療法が用いられ得る。従って、関節リウマチ、乾癬、シェーグレン症候群およびエリテマトーデスを含むがこれらに限定はされない、TSPAN33/BAAAM陽性および自己抗体産生自己免疫疾患を含む自己免疫疾患の治療が提供される。

【0053】

いくつかの実施形態において、病的Bリンパ球を伴う免疫疾患を治療するために、TSPAN33/BAAAMに対する中和抗体が用いられ得る。これらの実施形態は、TSPAN33/BAAAMがマウスおよびヒトにおいて97%超保存されているという知見に基づいている。テトラスパニンファミリーは、脳内、免疫系内、腫瘍上および他の場所における細胞の形態、運動性、浸潤、融合およびシグナル伝達の制御を含む、種々の機能を有する (30)。従って、TSPAN33/BAAAMは、B細胞のシグナル伝達、活性化、増殖、もしくは提示またはT細胞へのそれらのシグナル伝達に関与している可能性がある。従って、TSPAN33/BAAAMシグナル伝達を遮断するための中和抗体の使用は、B細胞調節不全を伴う免疫疾患を治療するのに好都合な様式で、免疫応答を調節ために用いられることが企図される。

40

【0054】

スクリーニング手段としてのTSPAN33/BAAAMの使用

50

いくつかの実施形態において、TSPAN33/BAAAMは、診断検査としての、活性化Bリンパ球および病的Bリンパ球のバイオマーカーとして用いられる。これらの実施形態は、TSPAN33/BAAAMが休止B細胞においては陰性であるが、12時間後の抗CD40+IL-4による活性化の後に転写は40倍超に増加しているという知見に基づいている。例えば、 10^6 細胞/mLの精製ヒトB細胞および2E2ヒトB細胞株を、 $0.1\mu\text{g/mL}$ の抗CD40(G28.5mAb)および 4ng/mL のIL-4で刺激した。これらの細胞を溶解し、Qiagen社製RNeasyキットを用いてRNAを回収した。 $500\mu\text{g}$ を用い、Qiagen社製Quantitect Rev. Transcription Kitを用い、ランダムヘキサマーでcDNAを作製した。ロシユ社製Lightcycler 480システムを用いて、細胞可溶化液に対してRT-qPCRを行った。Lightcyclerプライマー設計プログラムを用い、フォワードプライマー5'-caacatgctcttctgggtga-3'(配列番号4)およびリバースプライマー5'-attagccgagcgtagacacc-3'(配列番号5)を用い、UPLプライマー#9を用いて、Tspann33プライマーを開発した。フォワードプライマー5'-aacaaaatctctactttgatggaactt-3'(配列番号6)およびリバースプライマー5'-gcaaggcctactgctgagtt-3'(配列番号7)を用い、UPLプライマー#60を用いて、CD20を増幅した。18SおよびGAPDH発現の平均値を用いて、発現を正規化した。このように、当業者によって作製されたTSPAN33/BAAAMに結合する抗体またはタンパク質は、ELISA、フローサイトメトリー、またはELISPOTを含むがこれらに限定はされないアッセイを用いて、活性化B細胞または病的B細胞に対するスクリーニングツールとして用いられることが企図される。いくつかの実施形態は、活性化B細胞または病的B細胞の検出のためのスクリーニングツールとしての、TSPAN33を検出するためのRT-PCR、RT-qPCR、またはPCR等のPCRに基づく方法の使用にまで及ぶ。

【0055】

病的Bリンパ球を単離または特定するための、選別ツールとしてのTSPAN33/BAAAMの使用

いくつかの実施形態において、TSPAN33/BAAAMは、細胞選別における活性化Bリンパ球および病的Bリンパ球のバイオマーカーとして用いられる。これらの実施形態は、活性化B細胞がTSPAN33/BAAAMを発現するという本出願の実施例に基づいている。従って、TSPAN33/BAAAMに結合する抗体またはタンパク質は、細胞を精製または標識するための細胞の選別、分離、またはFACS解析に用いられることが企図される。

【0056】

以下の参考文献は上で参照されるものである、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0057】

(1) Kaminski, D. A., Wei, C, Qian, Y., Rosenberg, A. F. and Sanz, I., Advances in human B cell phenotypic profiling. Front Immunol 2012. 3: 302.

(2) Vardiman, J. and Hyjek, E., World health organization classification, evaluation, and genetics of the myeloproliferative neoplasm variants. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011. 2011: 250-256.

(3) Went, P., Agostinelli, C, Gallamini, A., Piccaluga, P. P., Ascani, S., Sabbatini, E., Bacci, F., Falini, B., Motta,

T., Paulli, M., Artusi, T., Piccioli, M., Zinzani, P. L. and Pileri, S. A., Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol* 2006. 24: 2472-2479.

(4) Silverstein, A. M., The collected papers of Paul Ehrlich: why was volume 4 never published? *Bull Hist Med* 2000)2. 76: 335-339.

10

(5) Gaffar, S. A., Pant, K. D., Shochat, D., Bennett, S. J. and Goldenberg, D. M., Experimental studies of tumor radioimmunodetection using antibody mixtures against carcinoembryonic antigen (CEA) and colon-specific antigen-p (CSAp). *Int J Cancer* 1981. 27: 101-105.

(6) DeNardo, S. J., DeNardo, G. L., O'Grady, L. F., Hu, E., Sytsma, V. M., Mills, S. L., Levy, N. B., Macey, D. J., Miller, C. H. and Epstein, A. L., Treatment of B cell malignancies with 1311 Lym-1 monoclonal antibodies. *Int J Cancer Suppl* 1988. 3: 96-101.

20

(7) Nelson, A. L., Dhimolea, E. and Reichert, J. M., Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010. 9: 767-774.

(8) Almagro, J. C. and Fransson, J., Humanization of antibodies. *Front Biosci* 2008. 13:1619-1633.

30

(9) Presta, L. G., Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 2008. 20: 460-470.

(10) Sharkey, R. M. and Goldenberg, D. M., Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunconjugates. *CA Cancer J Clin* 2006. 56: 226-243.

(11) Robak, T. and Robak, E., New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *BioDrugs* 2011. 25: 13-25.

40

(12) Mukohara, T., Role of HER2-Targeted Agents in Adjuvant Treatment for Breast Cancer. *Chemother Res Pract* 2011. 2011: 730360.

(13) Strickler, J. H. and Hurwitz, H. I., Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2012. 17: 513-524.

50

- (14) Smith, M. R., Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003. 22: 7359-7368.
- (15) Rehnberg, M., Amu, S., Tarkowski, A., Bokarewa, M. I. and Brisslert, M., Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009. 11: R123. 10
- (16) Maecker, H. T., Todd, S. C. and Levy, S., The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997. 11: 428-442.
- (17) Chen, Z., Pasquini, M., Hong, B., DeHart, S., Heikens, M. and Tsai, S., The human Penumbra gene is mapped to a region on chromosome 7 frequently deleted in myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2005. 162: 95-98. 20
- (18) Heikens, M. J., Cao, T. M., Morita, C., Dehart, S. L. and Tsai, S., Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood* 2007. 109: 3244-3252.
- (19) Roth, R. B., Hevezi, P., Lee, J., WiWhite, D., Lechner, S. M., Foster, A. C. and Zlotnik, A., Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics* 2006. 7: 67-80. 30
- (20) Surfus, J. E., Hank, J. A., Oosterwijk, E., Welt, S., Lindstrom, M. J., Albertini, M. R., Schiller, J. H. and Sondel, P. M., Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with in vitro and in vivo interleukin-2-activated effectors. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996. 19: 184-191. 40
- (21) Bradbury, A. R., Sidhu, S., Dubel, S. and McCafferty, J., Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. *Nat Biotechnol* 2011. 29: 245-254.
- (22) De Roos, A. J., Mirick, D. K., Edlfsen, K. L., LaCroix, A. Z., Kopecky, K. J., Madeleine, M. M., Magpantay, L. and Martinez-Maza, O., Markers of B-cell ac 50

tivation in relation to risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 2012. 72: 4733-4743.

(23) Breen, E. C., Hussain, S. K., Magpantay, L., Jacobson, L. P., Detels, R., Rabkin, C. S., Kaslow, R. A., Variakojis, D., Bream, J. H., Rinaldo, C. R., Ambinder, R. F. and Martinez-Maza, O., B-cell stimulatory cytokines and markers of immune activation are elevated several years prior to the diagnosis of systemic AIDS-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011. 20: 1303-1314.

10

(24) Anderson, K. C., Bates, M. P., Slaughter, B. L., Pinkus, G. S., Schlossman, S. F. and Nadler, L. M., Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 1984. 63: 1424-1433.

20

(25) Kuppers, R., The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009. 9: 15-27.

(26) Perez-Galan, P., Dreyling, M. and Wiestner, A., Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011. 117: 26-38.

(27) Gottenberg, J. E., Miceli-Richard, C., Ducot, B., Goupille, P., Combe, B. and Mariette, X., Markers of B-lymphocyte activation are elevated in patients with early rheumatoid arthritis and correlated with disease activity in the ESPOIR cohort. *Arthritis Res Ther* 2009. 11: R114.

30

(28) Gottenberg, J. E., Dayer, J. M., Lukas, C., Ducot, B., Chiocchia, G., Cantagrel, A., Saraux, A., Roux-Lombard, P. and Mariette, X., Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis* 2012. 71: 1243-1248.

40

(29) Soto, H., Hevezzi, P., Roth, R. B., Pahuja, A., Alleva, D., Acosta, H. M., Martinez, C., Ortega, A., Lopez, A., Araiza-Casillas, R. and Zlotnik, A., Gene arr

50

ay analysis comparison between rat collagen-induced arthritis and human rheumatoid arthritis. Scand J Immunol 2008. 68: 43-57.

(30) Hemler, M. E., Tetraspanin functions and associated microdomains. Nat Rev Mo I Cell Biol 2005. 6: 801-811.

(31) Butler M, Meneses-Acosta A (2012) Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. Appl Microbiol Biotechnol 96: 885-894;

10

(32) Rasmussen SK, Naested H, Muller C, Tolstrup AB, Frandsen TP (2012) Recombinant antibody mixtures: production strategies and cost considerations. Arch Biochem Biophys 526: 139-145;

(33) Marichal-Gallardo PA, Alvarez MM (2012) State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: process trends in design and validation. Biotechnol Prog 28: 899-916, all incorporated by reference herein.

20

(34) Glassy MC (1993) Production methods for generating human monoclonal antibodies. Hum Antibodies Hybridomas 4: 154-165;

(35) Marichal-Gallardo PA, Alvarez MM (2012) State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: process trends in design and validation. Biotechnol Prog 28: 899-916;

30

(36) Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G (2011) Advances in the production and downstream processing of antibodies. N Biotechnol 28: 458-463;

(37) Di Fede G, Bronte G, Rizzo S, Rolfo Cervetto C, Cocoruo G, et al. (2011) Monoclonal antibodies and antibody fragments: state of the art and future perspectives in the treatment of non-haematological tumors. Expert Opin Biol Ther 11: 1433-1445;

40

(38) Chiarella P (2011) Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies. Recent Pat Anticancer Drug Discov 6: 258-267;

(39) Kaneko E, Niwa R (2011) Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering. BioDrugs 25

50

: 1 - 1 1 b b

【実施例】

【0058】

本発明は付随する実施例を参照することでより深い理解が得られるが、その記載は例証のみを目的としており、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0059】

実施例 1

活性化 B 細胞での発現を含む制限発現パターンを有する膜貫通タンパク質をコードする遺伝子 Tspan33 を特定した。TSPAN33 はテトラスパニンファミリーに属する。TSPAN33 は休止 B 細胞では発現しないが、活性化後のヒトのプレ B 細胞で強く誘導されている。パーキットリンパ腫由来 B 細胞の活性化及び分化のモデルであるヒト 2E2 細胞も活性化に伴い TSPAN33 の発現量が増加している。TSPAN33 はホジキンリンパ腫及びびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫を含む複数のリンパ腫で発現している。関節リウマチ患者、全身性エリテマトーデス (SLE)、及び MRL / Fas^{1Pr/1Pr} マウス (SLE のモデルマウス) 由来の脾臓 B 細胞を含む、B 細胞が病態に関与している一部の自己免疫疾患においても TSPAN33 が発現している。TSPAN33 を診断的バイオマーカー又は特定の B 細胞リンパ腫若しくは自己免疫疾患の治療に用いる医療用抗体の標的として利用可能であると結論付ける。

10

【0060】

実施例で用いられている略語を示す。BCMA : B 細胞成熟抗原、BIGE : Body Index of Gene Expression (データベース)、TSPAN33 : テトラスパニン 33、BL、パーキットリンパ腫 ; RA : 関節リウマチ、NHL : 非ホジキンリンパ腫、DLBCL : びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、HL : ホジキンリンパ腫、SLE : 全身性エリテマトーデス。

20

【0061】

実施例 2

序論

細胞系列特異的なマーカーの発見及び評価は複雑な免疫系の根底にある細胞サブセットの特定に役立っている。CD3e (全 T 細胞マーカー)、CD4 (ヘルパー T 細胞)、CD8 (細胞障害性 T 細胞) 及び B220 / CD45R (B 細胞) などの細胞表面のマーカーはリンパ球集団を分化させるために日常的に使用されている [1 - 2]。フローサイトメトリーの標識技術の進歩により、細胞系列特異的な転写因子の検出に基づいた CD4 サブタイプ (Th1、Th2、Th17 及び Treg 細胞) の評価が行えるようになった [3]。CD1d^{hi}CD5⁺ であり、IL-10 を分泌する B 細胞の小サブセットの特定に基づき、制御性「B10 細胞」が発見された [4 - 6]。さらに、細胞系列特異的表面マーカー (例えば B 細胞マーカーである CD20) は、その病原性 B 細胞除去能力により種々のリンパ腫のみならず関節リウマチ (RA¹) 等の自己免疫疾患に対して有効であることが示された医療用 mAb の開発の標的として有望である [7 - 8]。

30

【0062】

TSPAN33 は新規の B 細胞活性化マーカーである

40

ヒトリンパ球の新規マーカーの特定を目指し、免疫系細胞を含む異なる 105 のヒト臓器におけるヒトの遺伝子発現に関する広範なデータベース (Body Index of Gene Expression (BIGE) データベースとして知られている) を解析した [9 - 10]。このデータベースは特定の臓器又は細胞に関係する新規遺伝子の特定に有用である [11]。B 細胞とはこれまで無関係とされていた膜貫通型タンパク質をコードする遺伝子 (Tspan33) を特定した。テトラスパニンスーパーファミリーは高度に保存されたシステイン - システイン - グリシン (CCG) モチーフを含むシステインリッチな長い細胞外ループ (LEL) からなる保存領域の構造 (Pfam00335) により定義される [12]。これらの特徴により、インテグリン又は他のテトラスパニン等その他のタンパク質とより大きな分子複合体を形成しやすくなり、増殖、接着、運動

50

性及び分化を含む様々な機能を仲介する。いくつかのテトラスパニンは成人の組織に広く発現しているが、他（CD82、CD151及びCD37を含む）はより限定的な発現プロファイルを示し、免疫系の細胞系列特異的に高い発現が認められる[13]。

【0063】

TSPAN33に関するこれまでの報告

TSPAN33は当初、マウス骨髄中の赤血球前駆細胞のサブポピュレーション内で検出されたため造血に携わっていると考えられており、これまでPenumbra（前赤芽球のnu膜）として報告されている[14]。マウス骨髄中のTspan33の発現は骨髄細胞（赤芽球）のTER119+分画で検出され、好中球、T細胞、単球、NK細胞又は（休止）B細胞では検出されていない[14]。それは実際にマウスpre-CFU赤血球系細胞及びマウス骨髄中で発現している[15]。これらの結果は、骨髄総RNAに対するこれらTspan33+赤血球前駆細胞の寄与が少ないことを示唆している。興味深いことに、Heikensら[14]が作製したTspan33-/-マウスのうちいくつかのマウスで3カ月以内に赤血球形成異常が、1歳で脾腫大が認められた。しかし、ここに示した様に、ヒトの正常骨髄中でのTSPAN33の発現は非常に低く（図3）、その代わりに活性化Bリンパ球において特異的に強発現している。

10

【0064】

取り組み

TSPAN33の発現をマウスとヒト両方のB細胞で確認した。これらの結果をまとめると、TSPAN33が活性化B細胞の新規マーカーであることが示される。休止及び活性化B細胞のどちらにも存在している他のB細胞特異的な抗原（すなわちCD20、CD19）とは対照的に、TSPAN33は活性化B細胞でのみ発現している。次に、TSPAN33が、活性化悪性B細胞が関与するヒトの疾患でも発現しているかを確認することを試みた。そこで、ホジキンリンパ腫（HL）、様々な種類の非ホジキンリンパ腫（NHL）並びに全身性エリテマトーデス（SLE）及び関節リウマチ（RA）の2種類の自己免疫疾患においてTSPAN33の発現を測定した。

20

【0065】

実施例3

方法

マイクロアレイ解析

Body Index of Gene Expressionデータベース（BIG E）の作成については既に報告されている[9-10]。簡単に述べると、全RNAを死後3~5時間経過した男性4人、女性4人のヒトのドナーから、又は市販のヒト組織のRNA（Clontech、Palo Alto、CA）を追加し得た。ゲノムワイドな遺伝子発現データはAffymetrix Human Genome U133 Plus 2.0遺伝子アレイ（Affymetrix、Santa Clara、CA）を用いて取得し、データの正規化及び要約はArray Assistソフトウェア（Iobion Labs、La Jolla、CA）を用いて行った。

30

【0066】

qRT-PCR

製造元の説明書に従いQiagen RNeasy（登録商標）キット（Qiagen、CA）を用いて、ヒトの細胞株/細胞又は組織からRNAを単離した。Quantitect（登録商標）Reverse Transcription（Qiagen、CA）を用いてRNAをcDNAに変換した。Roche LightCycler（登録商標）480 Real-Time PCRシステムとTSPAN33、CD19、CD20、CD138及びGAPDH検出用のプローブ（Roche、Pleasanton、CA）を用いてqPCRを行った。配列番号4及び5記載の配列を有するTSPAN33用プライマーを用いた。

40

【0067】

TSPAN33タンパク質の検出

50

抗ヒトベータアクチン (Santa Cruz biotech、Santa Cruz、CA)、抗ベータチューブリン (MP Biomedicals、Santa Ana、CA) 及び抗Tspan33/TSPAN33 (Abeam、Cambridge、MA) ポリクローナルウサギ抗体をウエスタンブロッティングに用いた。

【0068】

細胞株

ヒトB細胞株2E2は既に報告されている[16]。ヒトT細胞株のジャーカットはATCC (American Type Culture Collection、Manassas、VA) より入手した。マウス細胞株A20-2Jは既に報告されている[17]。全てのDLBCL系列はDavid Fruman (UC Irvine Institute for Immunology) より提供して頂いた。ヒトのドナー由来のPBMCはフィコール密度勾配法により単離した。マウス脾臓B細胞はフィコール密度勾配分離法を用いて濃縮し、抗CD3 mAb (Biolegend、San Diego、CA) 及び抗CD11c mAb (Biolegend) をコートしたプレート上でパンニングした。簡単には、抗CD3及び抗CD11cを37で2時間、10cm組織培養用プレートにコーティングした。フィコール密度勾配分離法により単離した脾細胞をコーティングしたプレートで2時間インキュベートし、回収した非接着細胞を2回目の濃縮過程に供した。

10

【0069】

試薬

B細胞への刺激をLPS (Sigma Aldrich、St Louis、MO) + マウス又はヒトrIL-4 (Sigma)、抗CD40mAbクローンG38.5 (Invitrogen、Carlsbad、CA) + rIL-4又はCpG + ヤマゴボウ分裂促進因子 (PWM) + パンソルピン (Sigma) の何れかを用いて行った。T細胞への刺激を抗CD3mAb + 抗CD28mAb (Biolegend) 又はホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸 (PMA) + イオノマイシン (Sigma) を用いて行った。

20

【0070】

マウス

C57Bl/6j (保存番号000664) 及びMRL/lpr/lprマウス (保存番号000485) をJackson Laboratory (Bar Harbor、ME) から取得した。全ての動物実験プロトコールはカリフォルニア大学アーバイン校のInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) の承認を受けた。

30

【0071】

ヒト由来試料

ヒトPBMCをループス患者又は健常人の末梢血から静脈穿刺により採取した。本プロトコールはINNCMSZのInstitutional Review Board (IRB) により承認されており、試料はインフォームドコンセントを行った上で取得した。1982年にアメリカリウマチ協会が作成したSLEの新基準を4つ以上満たす者をループス患者とした[18]。臨床的疾患活動性はSLE疾患活動性インデックス又はSLEDAIを用いてスコア化した[19]。不活性疾患 (SLEDAI < 3) を持つ者を対照とし、活性疾患を伴う患者のうち3つ以上のインデックススコアを持つ者を活性疾患患者とした。cDNAを製造元の説明書に従い、M-MLV逆転写酵素を用いて作製した (Invitrogen、Carlsbad、CA)。

40

【0072】

組織アレイ

免疫組織化学的検査に用いたヒト組織試料は検死より得られたもので、Anatomy and Pathology Service of the University Hospital of the UANLの記録用試料である。健常ヒト腎臓又はHL患者6名、濾胞性リンパ腫患者6名、DLBCL患者6名及びマントル細胞リンパ腫患者

50

2名を含むヒトのリンパ腫生検を用いて、既報に従ったプロテアーゼ及び/又は熱処理による抗原賦活化(デマスキング)後に組織アレイを行った[20]。そして切片を抗TSPAN33抗体に続き、抗ウサギIgGロバ2次抗体酵素複合体(Abcam)を用いて染色した。

【0073】

統計解析

統計的有意差検定はスチューデントのt検定により行った。p < 0.05の値を統計的有意と判断した。エラーバーは標準偏差(SD)を表す。

【0074】

実施例4

B細胞におけるTSPAN33の高度な発現

BIGEデータベースの発現解析により、TSPAN33をB細胞活性化特異的マーカーとして特定した(図3)。その発現プロファイルは特異的且つ制限的な発現を示し、抗CD40及びIL-4で活性化後の末梢血液B細胞、次いで腎臓で最も高い発現が認められた(表1にTspan33発現が高い上位10箇所を示す;全リストは補足情報(SI1)に示す)。ヒトRNAに対してqRT-PCRを行い(SI2A)、BIGEデータベースのTspan33発現パターンを確認したが、骨髄、胸腺及び脾臓を含む他のほとんどの組織で低い又は検出限界以下の発現量であった。

【表1】

表1 ヒトにおけるTSPAN33発現部位上位10箇所

試料	平均強度
活性化B細胞	985.4
腎臓	526
腎髄質	519.1
腎皮質	471.3
休止B細胞	305.1
唾液腺	244.1
活性化単球(LPS+IFN γ)	238.5
扁桃腺	218
脳下垂体	189.3

表にはTSPAN33発現量の強度を高い方から低い方へ並べた際の上位10箇所を示す。データは図3に示すSIGEデータベースから得た。

【0075】

マイクロアレイデータを確認するために、PBMCから単離した休止又は活性化状態(抗CD40+IL-4)のヒトB細胞及びヒト骨髄を用いてTspan33 mRNAに対するqRT-PCRを行った(図4A)。最初、Tspan33はマウス骨髄中の赤血球前駆細胞のサブセットで発現していると確認されていたが[14]、ヒト骨髄中ではTspan33の著しい発現は検出されなかった(図4A)。活性化B細胞中のTspan33レベルは休止状態のB細胞(p = 0.0204)又は全骨髄の何れかで40倍を超えていた。Tspan33は最近になって研究が始まったため、入手できる試薬が限られている(抗体を含む)。しかし、我々は抗TSPAN33ポリクローナル抗体(Abcam)を入手し、ウエスタンブロット及び免疫組織化学的検査(IHC)(エピトープ賦活化後)を行ったが、FACS解析(データ割愛)には用いなかった。この抗体を用いて、活性化ヒトPBMCでTSPAN33タンパク質の発現が有意に上昇していることが示された(図4B)。濃度解析の結果、刺激を行ったPBMC試料中のTSPAN33タンパク質の発現量は非刺激の約5倍の増加を示した。

【0076】

ヒト2E2B細胞株は誘導性B細胞活性化及び分化のモデルである[16]。この細胞は非刺激状態ではIgM及びIgDを発現しており、抗CD40mAb+IL-4の刺激

後は活性化誘導シチジンデアミナーゼ (A i c d a) が直ちに増強され、下流のアイソトープのクラススイッチを誘導する (活性化の指標) [2 1 - 2 2]。q R T - P C Rを用いて、非刺激の 2 E 2 細胞と比較して抗 C D 4 0 + I L - 4 で 1 2 時間刺激後には T s p a n 3 3 m R N A レベルの有意な上昇 (p = 0 . 0 1 3) が認められ (図 4 C)、増加した T s p a n 3 3 転写レベルは刺激 1 2 0 時間後まで高い状態を保持した。反対に、T s p a n 3 3 の発現は休止細胞、抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 又は P M A + イオノマイシン刺激後のジャーカット細胞 (ヒト T 細胞白血病) では検出されなかった。2 E 2 細胞における T s p a n 3 3 の発現上昇はウエスタンブロットにより確認され、抗 T s p a n 3 3 ポリクローナル抗体を用いた場合 > 3 倍の増加 (濃度測定法による) を示した (図 4 D)。マウス組織中での T s p a n 3 3 発現を q R T - P C R を用いて測定した結果 (S I 2 B)、ヒトの発現プロファイルが確かめられた。さらに、L P S + I L - 4 の濃度を増加させて刺激したマウス B 細胞株 A 2 0 - 2 J にて q R T - P C R による解析を行い、用量依存の T s p a n 3 3 m R N A 発現量の増加を確認した (図 4 E)。T s p a n 3 3 転写は A 2 0 - 2 J において 0 . 1 n g / m L L P S + I L - 4 刺激により 5 0 倍を超える増加 (p = 0 . 0 0 1 4)、1 n g / m L 又は 1 0 n g / m L L P S + I L - 4 刺激により 1 0 0 倍を超える増加 (p = 0 . 0 1 1 及び p = 0 . 0 4 5) を示した。さらに、マウス脾臓 B 細胞をフィコール密度勾配分離法により単離し、抗 C D 3 及び抗 C D 1 1 c によるパンニングにより濃縮した [2 3]。濃縮した B 細胞を 1 0 n g / m L の L P S + I L - 4 で 1 2 時間刺激し、T s p a n 3 3 発現を q R T - P C R により解析した。図 4 F に示すように、休止状態と比べて L P S 刺激後に T s p a n 3 3 の転写が約 4 倍増加していた (p = 0 . 0 0 0 0 3)。様々な刺激条件下でマウス全脾細胞についても q R T - P C R を行っており、C D 4 0 L + I L - 4 又は抗 I g D + I L - 4 で刺激した脾細胞では T s p a n 3 3 発現の有意な増強が認められたが、抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 (T 細胞を刺激する) による刺激では増加しなかった (データ割愛)。これらの結果をまとめると、T S P A N 3 3 がマウス及びヒトの両方において活性化 B 細胞の新規マーカーであることを示している。

【 0 0 7 7 】

悪性 B 細胞による T S P A N 3 3 の発現

B 細胞活性化マーカーは診断ツールとして重要である。なぜなら、これら分子の一部、例えば s C D 2 3、s C D 2 7、s C D 3 0、s C D 4 4、C X C L 1 3、I L - 6 及び I L - 1 0 の血清中濃度の増加 [2 4 - 2 5] が、癌 (例えば、N H L) と関連していると報告されているからである。その他の既知の B 細胞抗原 (すなわち C D 1 9 及び C D 2 0) も N H L で高く発現している [2 6]。よって、T S P A N 3 3 はヒトリンパ腫においても発現していると仮定した。その検証のため、T s p a n 3 3 発現について q R T - P C R を行い、D L B C L (O C I - L Y 1、O C I - L Y 7、O C I - L Y 8、R C - K 8、S U - D H L - 2、S U - D H L 4、S U - D H L - 5、S U - D H L - 6、S U - D H L - 7 並びに S U - D H L - 8 及び V A L) として特徴づけられる N H L 細胞株を含む 1 1 細胞株並びに非刺激又は刺激 (抗 C D 4 0 m A b + I L - 4) 2 E 2 細胞について m s 4 a 1 (C D 2 0) と比較した (図 5 A)。D L B C L は侵襲性 N H L の最も一般的な種類で、通常のリンパ球の核の 2 倍以上の大きさの核を持つびまん性大型 B 細胞の増殖を共通の特徴として有する種々のリンパ腫のグループである [2 7]。D L B C L は中心芽細胞、免疫芽細胞又は未分化変異体 (H L の高度に活性化されたリード・シュテルンベルク細胞に類似) を含んでおり、増殖係数は > 9 0 % である [2 8]。これらのリンパ腫細胞株において、m s 4 a 1 / C D 2 0 m R N A レベルも測定し、T s p a n 3 3 の発現量と比較した。m s 4 a 1 / C D 2 0 及び T s p a n 3 3 は全ての D L B C L 細胞株で検出された。実際に、D L B C L において T s p a n 3 3 の発現量は C D 2 0 と同等であった。

【 0 0 7 8 】

D L B C L とは対照的に、パーキットリンパ腫 (B L) は C D 1 0 +、B C L 6 + 及び B C L 2 + の明確な表現型を含む胚中心表現型を示し [2 1]、丸型で中型サイズの形態で

、増殖係数が100% [29]でありCD20を発現している場合もある [28]。パーキットリンパ腫におけるTSPAN33の発現を調べるため、Raji、Ramos及びDaudi細胞株を含む複数のパーキットリンパ腫細胞と共に対照のマウスBaf3細胞 (ProB細胞株) 株においてRT-PCR及びウエスタンブロットを行った (図5B及び5C)。TSPAN33発現はmRNA及びタンパク質レベルの何れについても全てのパーキットリンパ腫細胞株で検出できたが、Baf3細胞では検出できなかった。よって、TSPAN33はヒトパーキットリンパ腫においても発現していると結論づけた。

【0079】

更に、他のB細胞リンパ腫におけるTSPAN33発現を特徴づけするため、DLBCL (n=6)、マントル細胞リンパ腫 (別の種類のNHL、n=2)、濾胞性リンパ腫 (2番目に頻度の高い低悪性度のNHL、n=6) 及びHL (n=6) と診断された患者の生検から作製された組織アレイについて免疫組織化学的検査 (IHC) を行うことにした。表2及び図6にHL、DLBCL又はマントル細胞リンパ腫患者のリンパ節の典型的なイメージを示す。Tspan33はHLのリード・シュテルンベルク細胞 (ホジキンリンパ腫に特徴的な細胞) において高度に発現しており、DLBCLにおいても均一にTSPAN33で陽性染色され、図5に示したqPCRデータの結果と一致した。マントル細胞リンパ腫のTSPAN33染色は陰性であった。リード・シュテルンベルク細胞は体細胞超変異を経たためアポトーシスを起こさなかった胚中心B細胞由来であると考えられており、活性型リンパ腫の形態を示している可能性がある [30]。DLBCLについては前述の通りである。一方マントル細胞リンパ腫は、成熟CD5+B細胞リンパ腫の一種で無感作の前胚中心リンパ球由来であると考えられ、非活性型Bリンパ球の形態を示している可能性がある [31]。これらTSPAN33レベルの差異は各B細胞リンパ腫の活性化又は分化状態を反映しているのかもしれない。一方、各リンパ腫におけるTSPAN33の発現量はそれが各リンパ腫の侵攻度を反映する別のバイオマーカーとなる可能性、又は予後因子としての利用可能性を示唆している [32-33]。

【表2】

表2 ヒトリンパ腫におけるTSPAN33の発現

症例	TSPAN33陽性試料	染色パターン
HL	6/6	リード・シュテルンベルク細胞に局在
DLBCL	6/6	均一
マントル細胞リンパ腫	0/2	陰性

表には、HL (n=6)、DLBCL (n=6) 及びマントル細胞リンパ腫 (n=2) と診断された個々の患者のヒト生検由来の組織アレイをTSPAN33発現に対しIHC染色した結果を示す。患者の総数及び染色パターンも併せて示す。

【0080】

全身性エリテマトーデス及び関節リウマチ病変におけるTSPAN33の発現

B細胞活性化マーカーはいくつかの自己免疫疾患とも関連している。例えば、臨床SLEにおいては、CD25、HLA-DR、CD38及びBlySは全て増加しており、自己抗体産生と関連している [34-35]。新たにRAと診断された患者において、血清免疫グロブリン量及びB細胞関連のサイトカインIL-6、IL-21及びBlySは全て有意に上昇している [36-38]。BlySを阻害するとMRKL/fas^{1pr/1pr}マウス (可溶性TACI) において病徴が削減され [39]、ヒトにおいても治療的に有益な効果が得られている (anti-BlySmAb: Benlysta) [40]。自己免疫疾患におけるTspan33の役割を明らかにするため、SLE患者のPBMC、RAの滑膜病変又はSLEのモデルマウス中のTspan33のmRNA発現量を測定した。

【0081】

MRL / fas^{lpr/lpr}マウスは調節機能不全のB細胞活性化、抗体及び自己抗体産生の上昇、炎症、並びに致死的な糸球体腎炎へと移行する免疫複合体の腎臓への沈着を含む、ヒトSLE及びRAと多くの特徴が類似する自発性且つ進行性の全身性自己免疫疾患を発症する[39-40]。MRL / fas^{lpr/lpr}マウス及びヒトSLEにおけるB細胞の異常な活性化はAicdaの発現上昇を引き起こし、組織及び臓器損傷を仲介する病原性のクラススイッチ及び超変異型抗体をもたらす[39、41]。MRL / fas^{lpr/lpr}マウスは高価の抗体を産生し、16週齢までに重度の腎臓損傷を発症する[42]。よって、B細胞は抗体依存的及び抗体非依存的なメカニズムの両方において、ループスの発病に重要な役割を担っている[43]。

【0082】

9、24及び36週齢のMRL / fas^{lpr/lpr}マウスの脾細胞におけるTspan33 mRNAの発現量を測定し、B細胞の寄与を明らかにするためCD19に対して正規化した(図7A)。皮膚損傷、自己抗体及び腎性の病態を含む広範なループス症状を既に発症している24週齢MRL / fas^{lpr/lpr}マウスでは、明確な病態の徴候が認められない対照の9週齢のマウスと比較してTspan33 mRNAの発現が約10倍増加していた($p = 0.016$)、(しかし、一部のB細胞は9週で既に活性化している可能性があり、MRL / fas^{lpr/lpr}の死亡率は30週齢では90%になり、生き残った少数のマウスでは特に調節機能不全レベルのサイトカイン及びケモカインを産生している)[42]。36週齢のMRL / fas^{lpr/lpr}マウスにおけるTspan33転写発現量はさらに増加していたが(24週齢のマウスと比較して)、この増加は統計的に有意ではなかった($p = 0.062$)。これらの結果をまとめると、TSPAN33がSLEの発病に重要な役割を担っていることを強く示唆する。

【0083】

ループス発症にB細胞は単独で関わっているわけではないので、MRL / fas^{lpr/lpr}マウスのループス病態におけるTSPAN33の増強が血漿中の細胞と関連があるか調べることにした。そのために、12週齢のオス及びメスのMRL / fas^{lpr/lpr}マウス由来の、FACSソート脾細胞をCD19⁺138⁻B細胞及びCD19⁻CD138⁺血漿細胞にフローサイトメトリーにより分離し、Tspan33の発現量をqRT-PCRで解析した(図7B)。12週齢のメスのMRL / fas^{lpr/lpr}マウスでは対照のオスに比べてCD19⁺B細胞にてTspan33発現量が有意に増加していた($p = 0.004$) (ヒトの病態に類似、MRL / fas^{lpr/lpr}マウスではオスよりもメスの方がループス様病態を起こしやすく発症も早い)。さらに、Tspan33はCD138⁺細胞では発現しておらず、その発現は活性化B細胞に限定されていて、末期に分化したB細胞(血漿細胞)には引き継がれていないことが示された。BIGEデータベース中の血漿細胞特異的マーカーの発現量も同様にこの結論を支持する。例えば、B細胞成熟抗原(BCMA)は血漿細胞が発現するBlyS及びAPRILのレセプターである[44]。BIGEデータベース中では、BCMAはヒト扁桃腺、気管支及び気管で強く発現しており、これらの組織が血漿細胞を多く含んでいることを示唆しており(データ割愛)、対照的にこれらの組織ではTSPAN33の発現は低い又は欠損している(図11及びSI1)。よって、TSPAN33が血漿細胞で発現している可能性は低いと結論した。これは血漿/記憶細胞に分化する過程で減少する他のB細胞活性化マーカーについても同様である[45-47]。

【0084】

ヒトSLEにおけるTSPAN33の活性化が果し得る役割を検証するため、健常者9名又はSLE患者9名のPBMC中のTspan33 mRNAの発現量をqRT-PCRで測定した(図7C)。SLE患者のPBMCではTspan33 mRNAの発現が>3倍増加していた($p = 0.038$)。これらの結果より、TSPAN33はヒトSLEにおいて上昇していることを示唆する。

【0085】

次に活性化B細胞がRAにおいて果し得る役割を調べることにした。その目的のために

10

20

30

40

50

、R A患者の滑膜中から作成したR AマイクロアレイデータベースにてT S P A N 3 3 m R N A発現量を解析した[4 8]。T S P A N 3 3 (p = 0 . 0 0 1 9) 及びC D 2 0 (p = 0 . 0 0 0 8) 転写物のレベルは何れもR A患者で上昇していた(図7 D)。R A滑膜関節にて特に上昇していると報告されている遺伝子には免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖遺伝子を含む多数のB細胞活性化マーカー、と同様にB L y S 及びC X C L 1 3のようにB細胞を標的とする遺伝子も含まれる[4 8]。これらの所見はR A病変の活性化B細胞の役割についてまとめた以前の報告[4 9 - 5 0]ならびに抗C D 2 0 (リツキサン) がR A治療に有効であるという事実[5 1 - 5 2]とも一致する。

【 0 0 8 6 】

腎臓中のT S P A N 3 3 発現

図3及びS I 2 Aに示すように、マイクロアレイ及びq P C Rの何れで解析を行ってもT S P A N 3 3 m R N Aは腎臓においても検出される。腎臓の生理学的に重要な役割を考慮し、腎臓中でのT S P A N 3 3の発現部位を特定することにした。そこで、T S P A N 3 3を検出するため、リンパ球浸潤が起こっている腎組織切片(図8 A)を含む健常者の腎臓切片を用いて免疫組織化学的検査を行った(図8 A - 8 D)。近位曲尿細管、遠位曲尿細管及び集合曲尿細管においてT S P A N 3 3染色が検出された(図8 B - 8 C)が、浸潤性のリンパ球(これまでの実験結果と一致) 又は糸球体では検出されなかった。より高い倍率の解析により、T S P A N 3 3は頂端膜及び近位曲尿細管の上皮刷子縁細胞の顆粒で発現していることが分かった(図8 D)。通常これらの部位に抗体は入り込めないの、これらの結果よりT S P A N 3 3が治療用の抗体開発の標的として支持される。

10

20

【 0 0 8 7 】

考察

概要

我々はテトラスパニンファミリーに属する分子(T S P A N 3 3) が活性化B細胞で強く発現しており、複数のリンパ腫及び病原性B細胞が関わる自己免疫疾患(S L E 及びR Aを含む) でも発現していることから、本分子が活性化B細胞のマーカーであることを発見した。

【 0 0 8 8 】

新規のB細胞活性化バイオマーカーとしてのT S P A N 3 3

現在、B細胞の同定及び追跡のために、C D 7 2、C D 2 0、C D 1 9 及びC D 2 4 を含む多くのマーカーが使用されている[5 3]。活性化胚中心B細胞はG L 7 [5 4]、C D 1 0 及びB C L 6 [5 5] を含む様々な遺伝子を発現していると報告されている。M U M 1 / I R F 4 及びF O X P 1、ならびにC D 2 3 やC D 6 9 等の他のB細胞活性化マーカー並びに全身性B細胞活性化マーカーであるC X C L 1 3、s C D 2 3、s C D 2 7、s C D 3 0、s C D 4 4 がマーカーとしてN H L 及びR Aの診断並びにリスク評価に用いられている[2 5、3 2、5 6]。重要なことは、これらの活性化マーカーは全て末梢において別の免疫細胞種と関わりがあるため、活性化B細胞でのみ発現しているマーカーが存在しないことである。よって、T S P A N 3 3はB細胞特異的な活性化マーカーであり、B細胞の活性化が関与する疾患の診断ツールとして活用できる可能性がある。リンパ腫及び自己免疫疾患双方の予後バイオマーカーの候補としてのT S P A N 3 3発現量の使用可能性はさらに研究が必要となる[5 7 - 5 9]。

30

40

【 0 0 8 9 】

悪性B細胞に対する医療用m A bの標的としてのT S P A N 3 3

T S P A N 3 3のB細胞活性化マーカーとしての利用に加えて、T S P A N 3 3は、3番目のテトラスパニンファミリーの分子で(T S P A N 3 3) であるため、膜貫通タンパク質である。よって、T S P A N 3 3は治療目的の抗T S P A N 3 3 m A bを作製するのにふさわしい候補である。C D 2 0は近縁のタンパク質であり現在はm e m b r a n e - s p a n n i n g 4 - d o m a i n s s u p e r f a m i l y (M S 4 A 1) に分類されているが、N H L、慢性リンパ性白血病(C L L) 及びR Aを含む特定の自己免疫疾患等の悪性B細胞の治療に効果的であると証明されている医療用モノクローナル抗体生

50

産の重要なターゲットの一例である [5 1 - 5 2、6 0]。しかし、C D 2 0 は休止及び活性化 B 細胞の両方で発現しているため、抗 C D 2 0 m A b 治療の結果、骨髄では 7 0 % の B 細胞が、末梢血液中では全 B 細胞が消失する [2 5、3 6、6 1]。そこで、T S P A N 3 3 のような活性化 B 細胞に限定された B 細胞マーカーの特定は B 細胞関連病態を治療するための「第二世代」 m A b 開発の代替戦略となりえる [3 2]。別のテトラスパニン (C D 1 5 1) は有望な治療抗体の標的として研究されている [6 2]。我々のデータから抗 T S P A N 3 3 医療用 m A b は治療を受ける患者の大部分の休止 B 細胞を消失させずにすむという大きな優位性を持つことが示唆される。

【 0 0 9 0 】

他の T S P A N 3 3 発現部位

T S P A N 3 3 は当初、骨髄中の赤血球前駆細胞の小集団内で発現している分子として特定されたので、これまで P e n u m b r a (前赤芽球の n u 膜) として報告されてきた [1 4]。この様な発現パターンから、造血に関与していると報告された。また、T s p a n 3 3^{-/-}マウスの一部が 3 カ月齢で異常な赤血球を産生したと報告されている [1 4]。ここで認められた真性赤血球無形成は、赤血球を欠く病気及び原因によっては自己治癒するヒトにおける病態と類似している [6 3]。これらの結果、ヒトにおける T S P A N 3 3 の一時的な阻害による副作用は限定的又は対処が容易である可能性が示唆された。

【 0 0 9 1 】

抗 T S P A N 3 3 m A b をヒトの治療に使用する際、別の問題となりうるのが腎臓での発現である。しかし、T s p a n 3 3 が糸球体で発現していない (図 8 B) かわりに近位及び遠位尿管上皮細胞 (図 8 B - 8 C) の上皮細胞で発現しているため、腎臓での発現パターンは大きな障害にはならないと考えられる。これらの部位への抗体の侵入は通常、分子サイズにより排除されるため不可能であるが、分子量がより小さいタンパク質 (例えばアルブミン ~ 6 7 K D 又はヘモグロビン ~ 6 8 K D) のみが糸球体障壁を通過可能である [6 4]。T S P A N 3 3 タンパク質の発現は頂端膜及び腎臓の上皮細胞の顆粒中で認められ、これらの細胞は小さなタンパク質、イオン並びに有機溶質 (グルコース及びアミノ酸) の分泌並びに吸収に関わっており、T S P A N 3 3 が小胞輸送及び / 又は尿濾過関連のシグナル伝達に関わっている可能性が示唆された [1 2]。さらに、腎臓上皮細胞は生物由来の細胞傷害性薬物にたいして耐性があると報告されており、腎細胞癌も A D C C (抗体依存性細胞傷害) に対して抵抗性である [6 5]。さらに、T s p a n 3 3^{-/-}マウスは生存可能で繁殖性であると報告されており [1 4]、T s p a n 3 3 欠損が腎臓機能に対して与える生理学的な影響は僅かであることを示している。

【 0 0 9 2 】

B 細胞活性化における T s p a n 3 3 の役割

B 細胞中での T s p a n 3 3 の機能は現在不明であるが、B 細胞活性化に伴い T s p a n 3 3 の発現が強く誘導されることから、B 細胞のシグナル伝達 / 活性化 (すなわち、C D 9 及び C D 8 1)、成熟化 / 生存 (すなわち C D 3 7) 又は抗原提示 (すなわち C D 6 3) に関与していることが強く示唆される。なぜなら、他の B 細胞で発現しているテトラスパニンがこれらの過程に寄与していることが知られているからである [6 6 - 6 9]。

【 0 0 9 3 】

要約

T S P A N 3 3 は活性化及び悪性 B 細胞の重要なバイオマーカー候補であると同時に、複数種の B 細胞リンパ腫 (D L B C L、B L、H L) と活性化 B 細胞の表現型を呈する病原性 B 細胞と関連する一部の自己免疫疾患 (S L E 及び R A) の治療に用いる医療用 m A b 開発の標的候補である。

【 0 0 9 4 】

実施例 5

実施例中に参照した以下の出版物は参照することで本願に組み込まれる：

[1] E . V . R o t h e n b e r g , J . E . M o o r e , M . A . Y u i , L a u n c h i n g t h e T - c e l l - l i n e a g e d e v e l o p

10

20

30

40

50

- mental programme, *Nat Rev Immunol*, 8 (2008) 9-21.
- [2] R.R. Hardy, K. Hayakawa, B cell development pathways, *Annu Rev Immunol*, 19 (2001) 595-621.
- [3] J. Zhu, H. Yamane, W.E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (*), *Annu Rev Immunol*, 28 (2010) 445-489.
- [4] T. Suda, A. O'Garra, I. MacNeil, M. Fischer, M.W. Bond, A. Zlotnik, Identification of a novel thymocyte growth-promoting factor derived from B cell lymphomas, *Cell Immunol*, 129 (1990) 228-240. 10
- [5] J.D. Bouaziz, K. Yanaba, T.F. Tedder, Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation, *Immunol Rev*, 224 (2008) 201-214.
- [6] S.I. Katz, D. Parker, J.L. Turk, B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions, *Nature*, 251 (1974) 550-551. 20
- [7] R. Korhonen, E. Moilanen, Anti-CD20 antibody rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 106 (2010) 13-21.
- [8] M.D. Pescovitz, Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action, *Am J Transplant*, 6 (2006) 859-866. 30
- [9] J. Lee, A. Hever, D. Willhite, A. Zlotnik, P. Hevezi, Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues, *FASEB J*, 19 (2005) 1356-1358.
- [10] R.B. Roth, P. Hevezi, J. Lee, D. Willhite, S.M. Lechner, A.C. Foster, A. Zlotnik, Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS, *Neurogenetics*, 7 (2006) 67-80. 40
- [11] P.A. Gerber, P.A. Hevezi, B.A. Buhren, C. Martinez, H. Schrupf, M. Gasis, S. Grether-Beck, J. Krutmann, B. Homey, A. Zlotnik, Systematic identification and characterization of novel human skin-associated genes encoding membrane and secreted proteins, *PIOS ONE*, In Press (2013).
- [12] H.T. Maecker, S.C. Todd, S. Levy, 50

- The tetraspanin superfamily: molecular facilitators, *FASEB J*, 11 (1997) 428-442.
- [13] A.B. van Spruiel, K.L. Puis, M. Sofi, D. Pouniotis, H. Hochrein, Z. Orinska, K.P. Knobloch, M. Plebanski, M.D. Wright, A regulatory role for CD37 in T cell proliferation, *J Immunol*, 172 (2004) 2953-2961.
- [14] M.J. Heikens, T.M. Cao, C. Morita, S.L. Dehart, S. Tsai, Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis, *Blood*, 109 (2007) 3244-3252. 10
- [15] J. Seita, D. Sahoo, D.J. Rossi, D. Bhattacharya, T. Serwold, M.A. Inlay, L.I. Ehrlich, J.W. Fathman, D.L. Dill, I.L. Weissman, Gene Expression Commons: an open platform for absolute gene expression profiling, *PIOS ONE*, 7 (2012) e40321 20
- [16] Z. Xu, Z. Fulop, G. Wu, E.J. Pone, J. Zhang, T. Mai, L.M. Thomas, A. Al-Qahtani, C.A. White, S.R. Park, P. Steinacker, Z. Li, J. Yates, 3rd, B. Herron, M. Otto, H. Zan, H. Fu, P. Casali, 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination, *Nat Struct Mol Biol*, 17 (2010) 1124-1135. 30
- [17] K.J. Kim, C. Kanellopoulos-Langevin, R.M. Merwin, D.H. Sachs, R. Asofsky, Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties, *J Immunol*, 122 (1979) 549-554.
- [18] E.M. Tan, A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. McShane, N.F. Rothfield, J.G. Schaller, N. Talal, R.J. Winchester, The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum*, 25 (1982) 1271-1277. 40
- [19] C. Bombardier, D.D. Gladman, M.B. Urowitz, D. Caron, C.H. Chang, Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE, *Arthritis Rheum*, 35 (1992) 630-640.
- [20] A.M. Burkhardt, K.P. Tai, J.P. Flores-Guiterrez, N. Vilches-Cisneros, K. Kandar, O. Barbosa-Quintana, R. Valle-Rio 50

s, P.A. Hevezzi, J. Zuniga, M. Selman, A. J. Ouellette, A. Zlotnik, CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity, *J Immunol*, 188 (2012) 6399-6406.

[21] A. Schaffer, A. Cerutti, S. Shah, H. Zan, P. Casali, The evolutionarily conserved sequence upstream of the human Ig heavy chain S gamma 3 region is an inducible promoter: synergistic activation by CD40 ligand and IL-4 via cooperative NF-kappa B and STAT-6 binding sites, *J Immunol*, 162 (1999) 5327-5336.

[22] S.R. Park, H. Zan, Z. Pal, J. Zhang, A. Al-Qahtani, E.J. Pone, Z. Xu, T. Mai, P. Casali, HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation, *Nat Immunol*, 10 (2009) 540-550.

[23] J.L. Maravillas-Montero, P.G. Gillespie, G. Patino-Lopez, S. Shaw, L. Santos-Argumedo, Myosin lc participates in B cell cytoskeleton rearrangements, is recruited to the immunologic synapse, and contributes to antigen presentation, *J Immunol*, 187 (2011) 3053-3063.

[24] E.C. Breen, S.K. Hussain, L. Magpantay, L.P. Jacobson, R. Detels, C.S. Rabkin, R.A. Kaslow, D. Variakojis, J.H. Bream, C.R. Rinaldo, R.F. Ambinder, O. Martinez-Maza, B-cell stimulatory cytokines and markers of immune activation are elevated several years prior to the diagnosis of systemic AIDS-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20 (2011) 1303-1314.

[25] A.J. De Roos, D.K. Mirick, K.L. Edlefsen, A.Z. LaCroix, K.J. Kopecky, M.M. Madeleine, L. Magpantay, O. Martinez-Maza, Markers of B-cell activation in relation to risk of non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Res*, 72 (2012) 4733-4743.

[26] K.C. Anderson, M.P. Bates, B.L. Slaughterhaupt, G.S. Pinkus, S.F. Schlossman, L.M. Nadler, Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation, *Blood*, 63 (1984) 1424-1433.

10

20

30

40

50

- [27] S. Gurbuxani, J. Anastasi, E. Hyjek, Diffuse large B-cell lymphoma - more than a diffuse collection of large B cells: an entity in search of a meaningful classification, *Arch Pathol Lab Med*, 133 (2009) 1121-1134.
- [28] P. McGowan, N. Nelles, J. Wimmer, D. Williams, J. Wen, M. Li, A. Ewton, C. Curry, Y. Zu, A. Sheehan, C.C. Chang, Differentiating between Burkitt lymphoma and CD 10+ diffuse large B-cell lymphoma: the role of commonly used flow cytometry cell markers and the application of a multiparameter scoring system, *Am J Clin Pathol*, 137 (2012) 665-670. 10
- [29] N. Nakamura, H. Nakamine, J. Tamaru, S. Nakamura, T. Yoshino, K. Ohshima, M. Abe, The distinction between Burkitt lymphoma and diffuse large B-Cell lymphoma with c-myc rearrangement, *Mod Pathol*, 15 (2002) 771-776. 20
- [30] R. Kupperts, The biology of Hodgkin's lymphoma, *Nat Rev Cancer*, 9 (2009) 15-27.
- [31] P. Perez-Galan, M. Dreyling, A. Westner, Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era, *Blood*, 117 (2011) 26-38.
- [32] H. Nyman, M. Jerkeman, M.L. Karjalainen-Lindsberg, A.H. Banham, S. Leppa, Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP, *Mod Pathol*, 22 (2009) 1094-1101. 30
- [33] Y. Suzuki, T. Yoshida, G. Wang, T. Togano, S. Miyamoto, K. Miyazaki, K. Iwabuchi, M. Nakayama, R. Horie, N. Niitsu, Y. Sato, N. Nakamura, Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL, *Ann Hematol*, 91 (2012) 997-1005. 40
- [34] T. Dorner, C. Giesecke, P.E. Lipsky, Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE, *Arthritis Res Ther*, 13 (2011) 243.
- [35] P.E. Spronk, B.T. vd Gun, P.C. Limburg, C.G. Kallenberg, B cell activation in clinically quiescent systemic lupus erythematosus (SLE) is related to immuno 50

globulin levels, but not to levels of anti-dsDNA, nor to concurrent T cell activation, Clin Exp Immunol, 93 (1993) 39-44.

[36] J.E. Gottenberg, C. Miceli-Richard, B. Ducot, P. Goupille, B. Combe, X. Mariette, Markers of B-lymphocyte activation are elevated in patients with early rheumatoid arthritis and correlated with disease activity in the ESPOIR cohort, Arthritis Res Ther, 11 (2009) R114. 10

[37] J.E. Gottenberg, J.M. Dayer, C. Lukas, B. Ducot, G. Chiocchia, A. Cantagrel, A. Saraux, P. Roux-Lombard, X. Mariette, Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort, Ann Rheum Dis, 71 (2012) 1243-1248. 20

[38] T.M. Seyler, Y.W. Park, S. Takemura, R.J. Bram, P.J. Kurtin, J.J. Goronzy, C.M. Weyand, BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis, J Clin Invest, 115 (2005) 3083-3092. 20

[39] C.A. White, J. Seth Hawkins, E.J. Pone, E.S. Yu, A. Al-Qahtani, T. Mai, H. Zan, P. Casali, AID dysregulation in lupus-prone MRL/Fas(lpr/lpr) mice increases class switch DNA recombination and promotes interchromosomal c-Myc/IgH loci translocations: modulation by HoxC4, Autoimmunity, 44 (2011) 585-598. 30

[40] P.L. Cohen, R.A. Eisenberg, Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease, Annu Rev Immunol, 9 (1991) 243-269.

[41] H. Zan, J. Zhang, S. Ardeshtna, Z. Xu, S.R. Park, P. Casali, Lupus-prone MRL/faslpr/lpr mice display increased AID expression and extensive DNA lesions, comprising deletions and insertions, in the immunoglobulin locus: concurrent upregulation of somatic hypermutation and class switch DNA recombination, Autoimmunity, 42 (2009) 89-103. 40

[42] J. Liu, G. Karypis, K.L. Hippen, A.L. Vegoe, P. Ruiz, G.S. Gilkeson, T.W. Behrens, Genomic view of systemic autoimmunity in MRLlpr mice, Genes Immun, 7 (2006) 156-168. 50

[43] O.T. Chan, L.G. Hannum, A.M. Haberman, M.P. Madaio, M.J. Shlomchik, A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus, *J Exp Med*, 189 (1999) 1639-1648.

[44] C.M. Coquery, L.D. Erickson, Regulatory roles of the tumor necrosis factor receptor BCMA, *Crit Rev Immunol*, 32 (2012) 287-305.

[45] A.L. Shaffer, K.I. Lin, T.C. Kuo, X. Yu, E.M. Hurt, A. Rosenwald, J.M. Giltinan, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, L.M. Staudt, Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program, *Immunity*, 17 (2002) 51-62.

[46] M. Jourdan, A. Caraux, J. De Vos, G. Fiol, M. Larroque, C. Cognot, C. Bret, C. Duperray, D. Hose, B. Klein, An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization, *Blood*, 114 (2009) 5173-5181.

[47] K.A. Fairfax, A. Rallies, S.L. Nutt, D.M. Tarlinton, Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches, *Semin Immunol*, 20 (2008) 49-58.

[48] H. Soto, P. Hevezzi, R.B. Roth, A. Pahuja, D. Alleva, H.M. Acosta, C. Martinez, A. Ortega, A. Lopez, R. Araiza-Casillas, A. Zlotnik, Gene array analysis comparison between rat collagen-induced arthritis and human rheumatoid arthritis, *Scand J Immunol*, 68 (2008) 43-57.

[49] G.J. Silverman, D.A. Carson, Roles of B cells in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther*, 5 Suppl 4 (2003) S1-6.

[50] L. Martinez-Gamboa, H.P. Brezinschek, G.R. Burmester, T. Dorner, Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy, *Autoimmun Rev*, 5 (2006) 437-442.

[51] S. Blumli, K. McKeever, R. Ettinger, J. Smolen, R. Herbst, B-cell targeted therapeutics in clinical development, *Ar*

10

20

30

40

50

- thrititis Res Ther, 15 Suppl 1 (2013) S4.
- [52] A. Vancsa, Z. Szabo, S. Szamosi, N. Bodnar, E. Vegh, L. Gergely, G. Szucs, S. Szanto, Z. Szekanecz, Longterm Effects of Rituximab on B Cell Counts and Autoantibody Production in Rheumatoid Arthritis: Use of High-sensitivity Flow Cytometry for More Sensitive Assessment of B Cell Depletion, J Rheumatol, 40 (2013) 565-571. 10
- [53] T.W. LeBien, T.F. Tedder, B lymphocytes: how they develop and function, Blood, 112 (2008) 1570-1580.
- [54] Y. Naito, H. Takematsu, S. Koyama, S. Miyake, H. Yamamoto, R. Fujinawa, M. Sugai, Y. Okuno, G. Tsujimoto, T. Yamaji, Y. Hashimoto, S. Itohara, T. Kawasaki, A. Suzuki, Y. Kozutsumi, Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation, Mol Cell Biol, 27 (2007) 3008-3022. 20
- [55] G. Goteri, G. Lucarini, A. Zizzi, A. Costagliola, F. Giantomassi, D. Stramazotti, C. Rubini, P. Leoni, Comparison of germinal center markers CD 10, BCL6 and human germinal center-associated lymphoma (HGAL) in follicular lymphomas, Diagn Pathol, 6 (2011) 97. 30
- [56] M. Erlanson, E. Gronlund, E. Lofvenberg, G. Roos, J. Lindh, Expression of activation markers CD23 and CD69 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma, Eur J Haematol, 60 (1998) 125-132.
- [57] J.W. Gregersen, D.R. Jayne, B-cell depletion in the treatment of lupus nephritis, Nat Rev Nephrol, 8 (2012) 505-514.
- [58] E. Choy, Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, Rheumatology (Oxford), 51 Suppl 5 (2012) v3-l 1. 40
- [59] D. Cornec, V. Devauchelle-Pensec, G.J. Tobon, J.O. Pers, S. Jousse-Joulin, A. Saraux, B cells in Sjogren's syndrome: from pathophysiology to diagnosis and treatment, J Autoimmun, 39 (2012) 161-167.
- [60] M.R. Smith, Rituximab (monoclonal 50

anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance, *Oncogene*, 22 (2003) 7359-7368.

[61] M. Rehnberg, S. Amu, A. Tarkowski, M.I. Bokarewa, M. Brisslert, Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther*, 11 (2009) R123.

[62] J.F. Haeuw, L. Goetsch, C. Bailly, N. Corvaia, Tetraspanin CD 151 as a target for antibody-based cancer immunotherapy, *Biochem Soc Trans*, 39 (2011) 553-558.

10

[63] K. Sawada, M. Hirokawa, N. Fujishima, Diagnosis and management of acquired pure red cell aplasia, *Hematol Oncol Clin North Am*, 23 (2009) 249-259.

[64] B. Haraldsson, J. Nystrom, W.M. Deen, Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria, *Physiol Rev*, 88 (2008) 451-487.

20

[65] J.E. Surfus, J.A. Hank, E. Oosterwijk, S. Welt, M.J. Lindstrom, M.R. Albertini, J.H. Schiller, P.M. Sondel, Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with in vitro and in vivo interleukin-2-activated effectors, *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 19 (1996) 184-191.

30

[66] A.B. van Spruiel, Tetraspanins in the humoral immune response, *Biochem Soc Trans*, 39 (2011) 512-517.

[67] P.K. Mattila, C. Feest, D. Depoel, B. Treanor, B. Montaner, K.L. Otipoby, R. Carter, L.B. Justement, A. Bruckbauer, F.D. Batista, The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling, *Immunity*, 38 (2013) 461-474.

40

[68] A.B. van Spruiel, S. de Keijzer, A. van der Schaaf, K.H. Gartlan, M. Sofi, A. Light, P.C. Linszen, J.B. Boezeman, M. Zuidscherwoude, I. Reinieren-Beeren, A. Cambi, F. Mackay, D.M. Tarlinton, C.G. Figdor, M.D. Wright, The tetraspanin CD37 orchestrates the alpha(4)beta(1) integrin-Akt signaling axis and supports long-lived plasma cell survival, *Sci Signal*,

50

5 (2012) ra82.

[69] S.H. Petersen, E. Odintsova, T.A. Haigh, A.B. Rickinson, G.S. Taylor, F. Berditchevski, The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II, Eur J Immunol, 41 (2011) 2556-2561.

【0095】

単数形の名詞は請求項及び明細書の何れで用いた場合も特筆しないかぎり、複数形の意味も含める。

【0096】

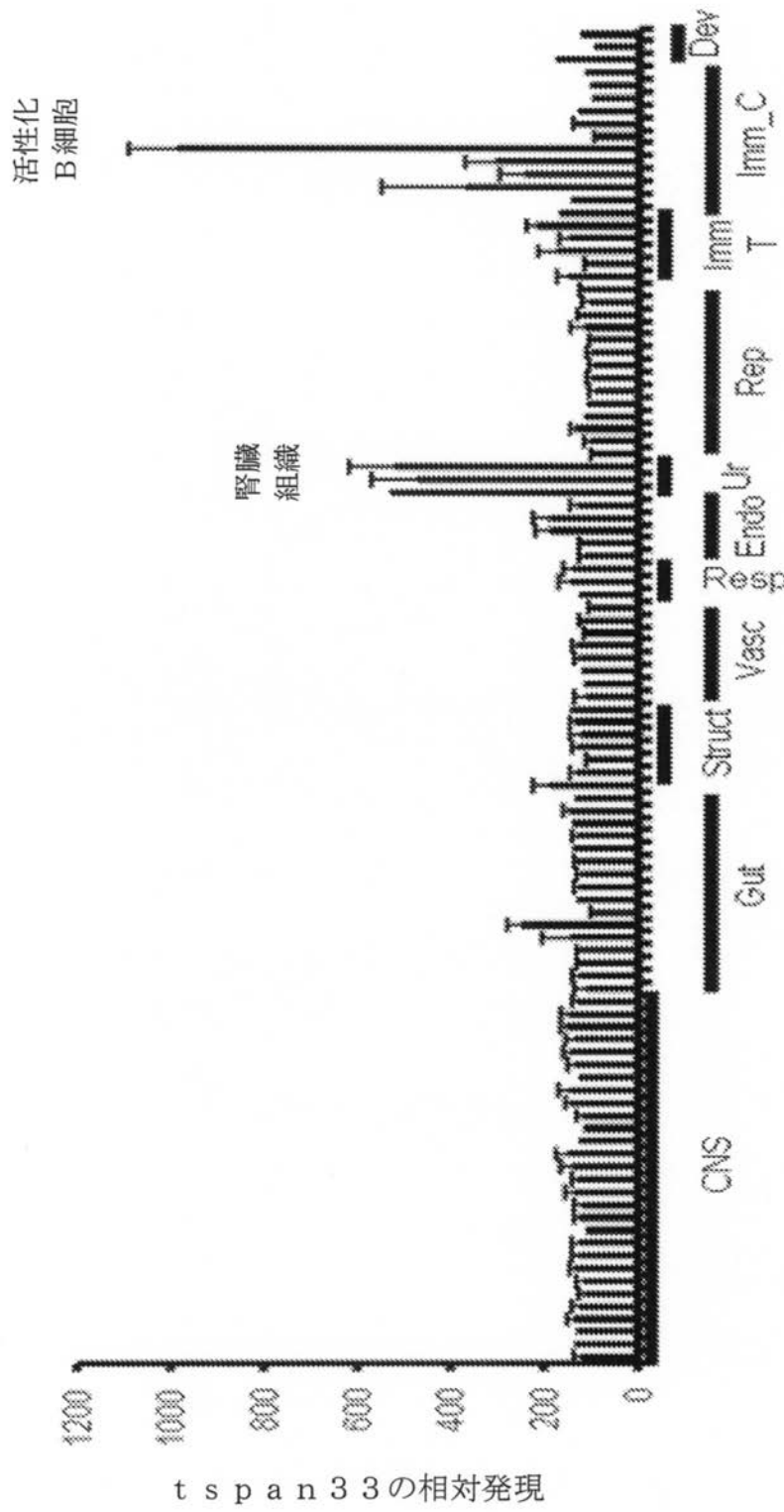
本発明は好ましい実施例を用いて説明を行ったが、本発明の原理及び範囲から外れることなく当業者が容易に理解可能な修正及び変更を用いることができることが理解されるものとする。従って、そのような修正は本発明及び以下の請求項の範囲内で実施され得る。

【 図 1 】

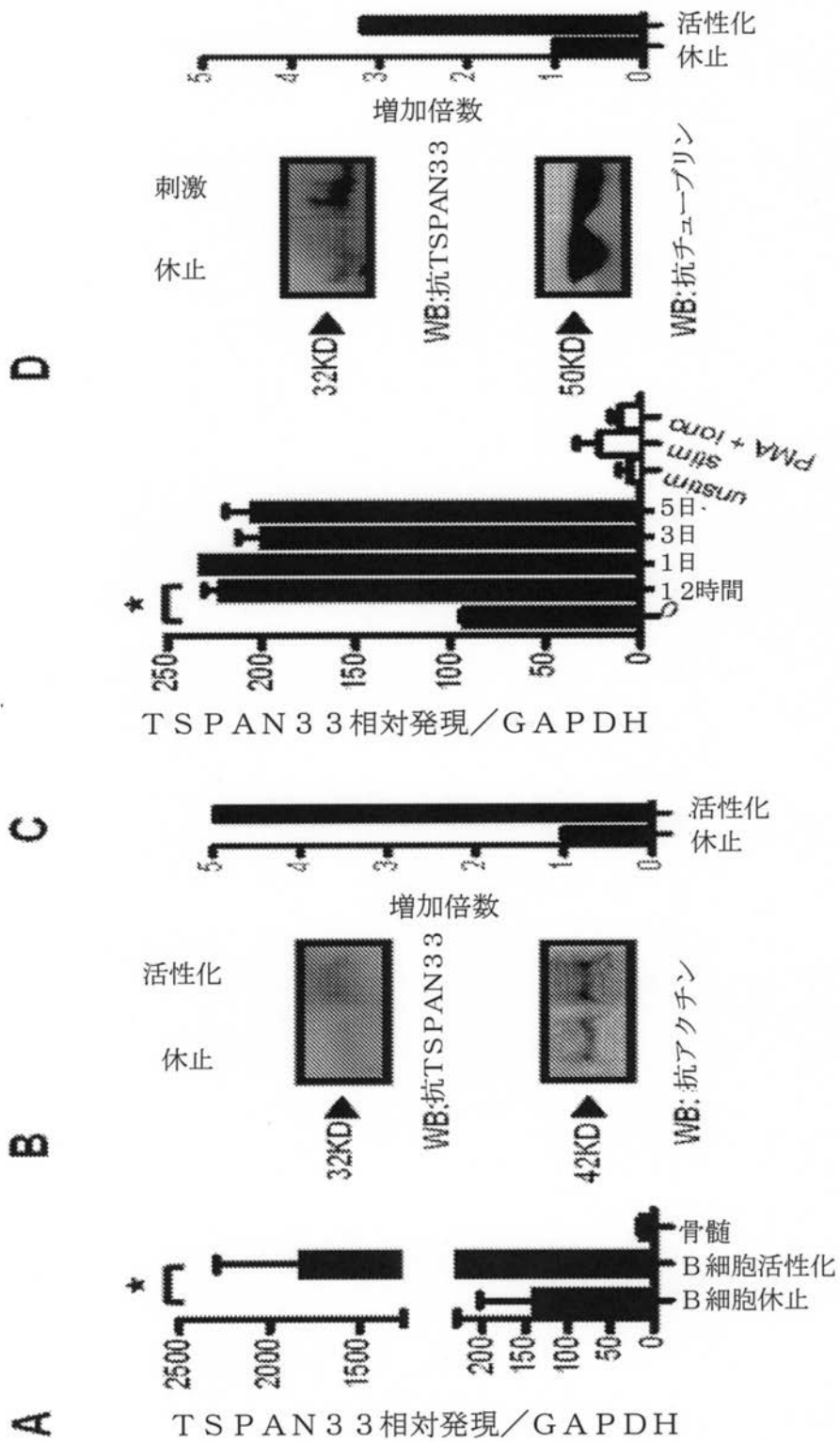
MARRPRAPAASGEEFSFVSPLVKYLLFFFNMLFWVISMVMVAVGVYARLMKHAEAAALACLAVDP
AILLIVVGVLMFLLTFCGCIGSLRENICLLQTFSLCLTAVFLLQLAAGILGFVFSKARGKVSE
IINNAIVHYRDDLDLQNLIDFGQKKFSCCGGISYKDWSQNMVFNCSEDNPSRERCSVPYSCCLP
TPDQAVINTMCGQGMQAFDYLEASKVIYTNCGIDKLVNWIHSNLFLLGGVALGLAIPQLVGILL
SQILVNQIKDQIKLQLYNQHRADPWY (配列番号 1)

ヒト	1	MARRPRAPAAASGEEFSVSPLVKYLFFFNMLFWVISMVMVAVGVYARLMKHAEEAALACL	60
		MARRP PAA G+EFVSPVPLVKYLFFFNMLFWVISMVMVAVGVYARLMKHAEEAALACL	
マウス	1	MARRPGVPAAYGDEFVSPVPLVKYLFFFNMLFWVISMVMVAVGVYARLMKHAEEAALACL	60
ヒト	61	AVDPAILLIVVGLMFLTFCGCIGSLRENICLLQTFSLCLTAVFLQLAAGILGFVFS	120
		AVDPAILLIVVGLMFLTFCGCIGSLRENICLLQTFSLCLT VFLQLAAGILGFVFS	
マウス	61	AVDPAILLIVVGLMFLTFCGCIGSLRENICLLQTFSLCLTIVFLQLAAGILGFVFS	120
ヒト	121	KARGKVSEIINNAIVHYRDDLDLQNLIDFGQKFSCCGGISYKDWSONMYFNCS	180
		KARGKVSEIINNAIVHYRDDLDLQNLIDFGQKFSCCGGISY+DWSQNM	
マウス	121	KARGKVSEIINNAIVHYRDDLDLQNLIDFGQKFSCCGGISYRDWSONMYFNCS	180
ヒト	181	ERCSVPYSCCLPTPDQAVINTMCGGMQAFDYLEASKVIYTINGCIDKLVNWIHSNLFLLG	240
		ERCSVPYSCCLPTP+QAVINTMCGGMQA DYLEASKVIYTINGCIDKLVNWIHSNLFLLG	
マウス	181	ERCSVPYSCCLPTPNQAVINTMCGGMQALDYLEASKVIYTINGCIDKLVNWIHSNLFLLG	240
ヒト	241	GVALGLAIPQLVGILLSQILVNQIKDQIKLQLYNQQRADPWY	283 (配列番号 1)
		GVALGLAIPQLVGILLSQ+LVNQIKDQIKLQLYNQQRADPWY	(配列番号 3)
マウス	241	GVALGLAIPQLVGILLSQVLVNQIKDQIKLQLYNQQRADPWY	283 (配列番号 2)

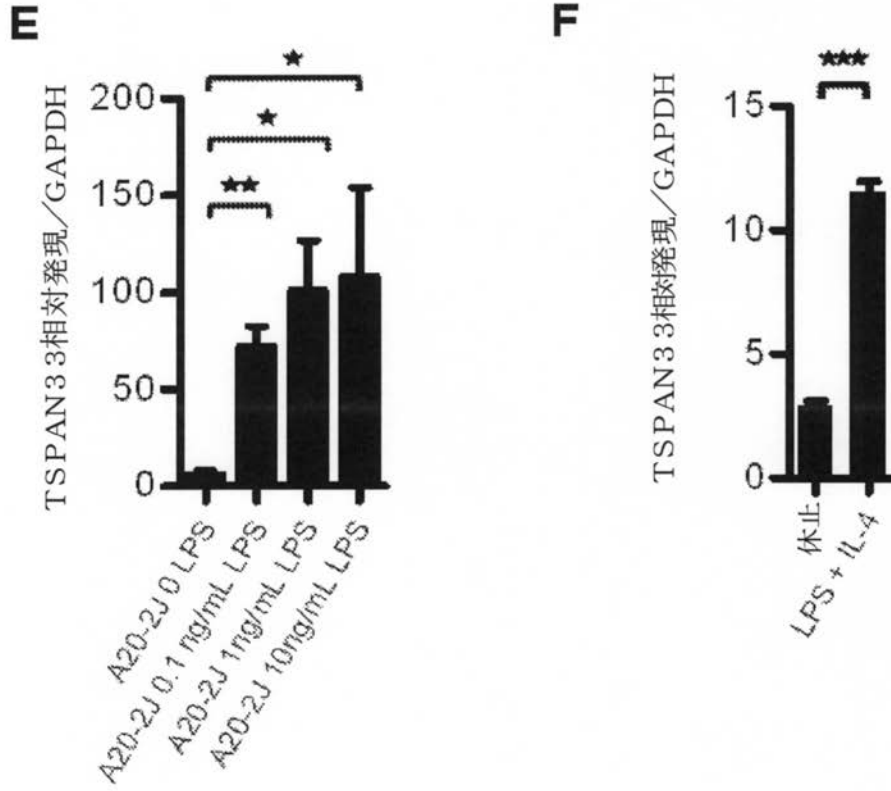
【 図 3 】



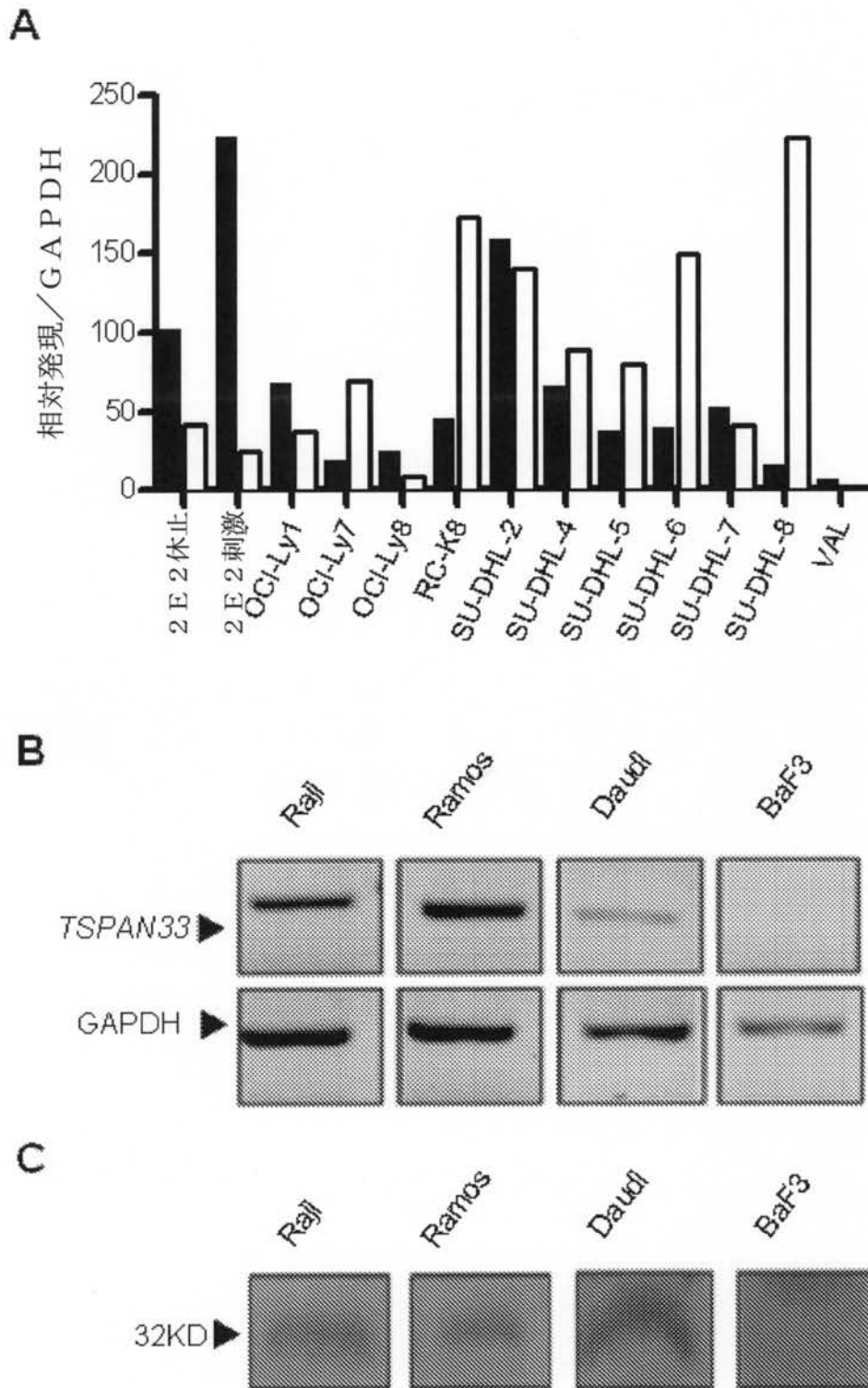
【 図 4 - 1 】



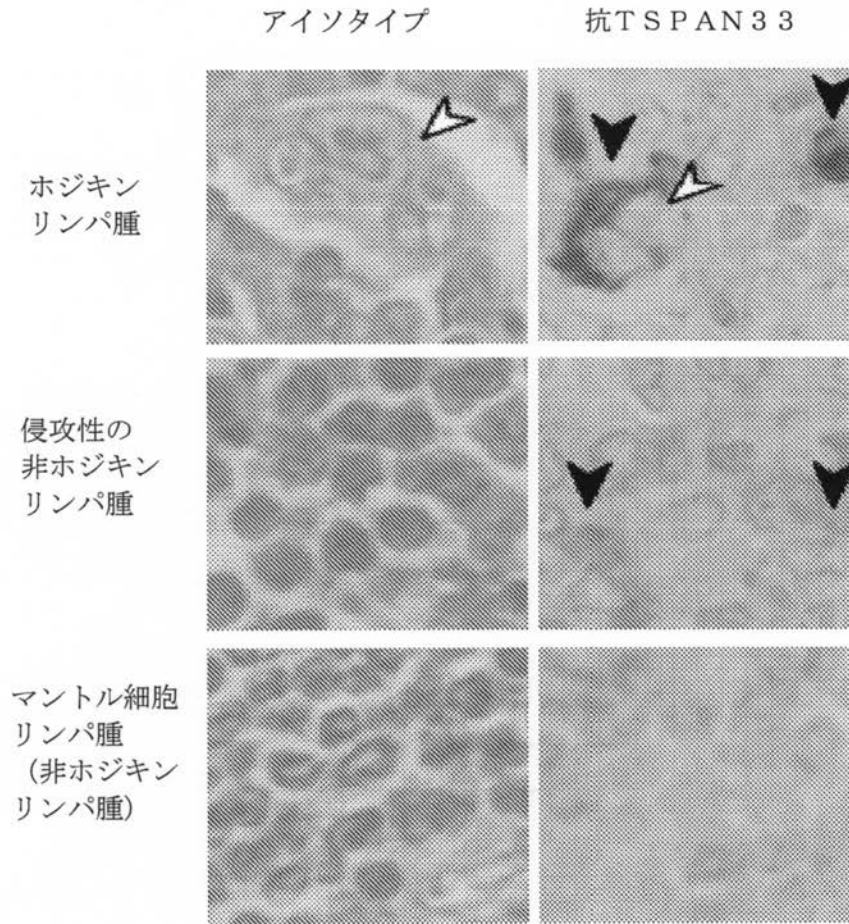
【 図 4 - 2 】



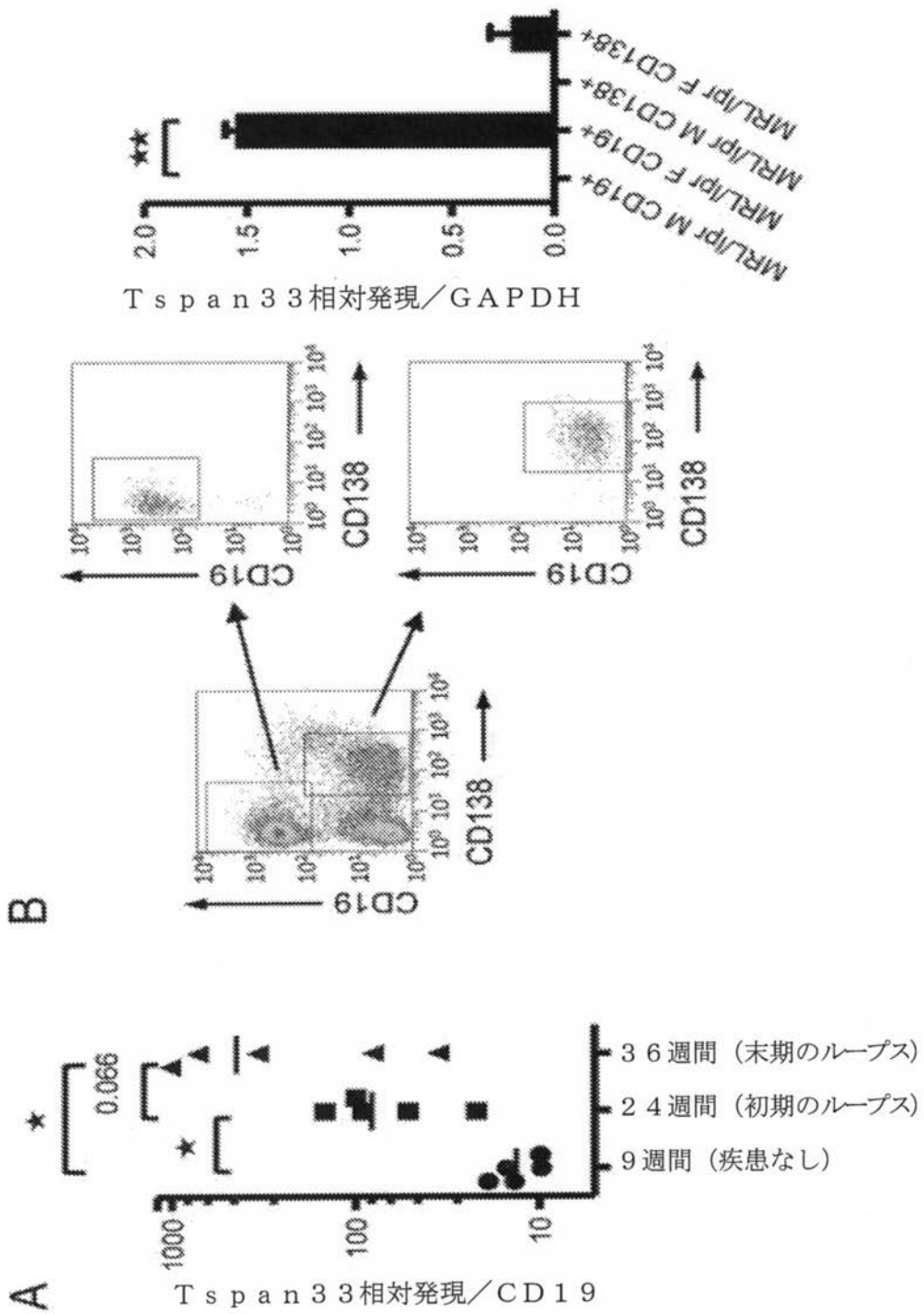
【 図 5 】



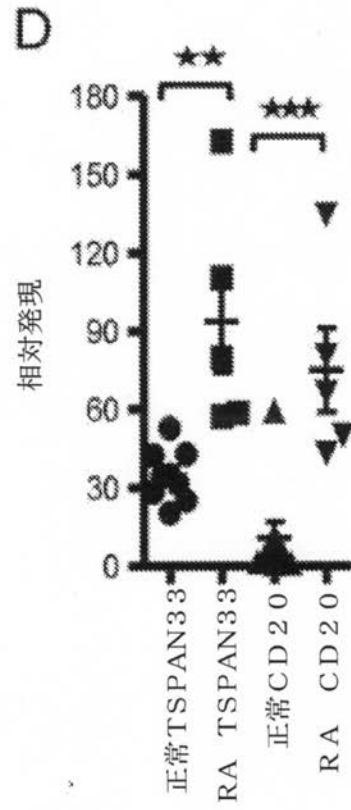
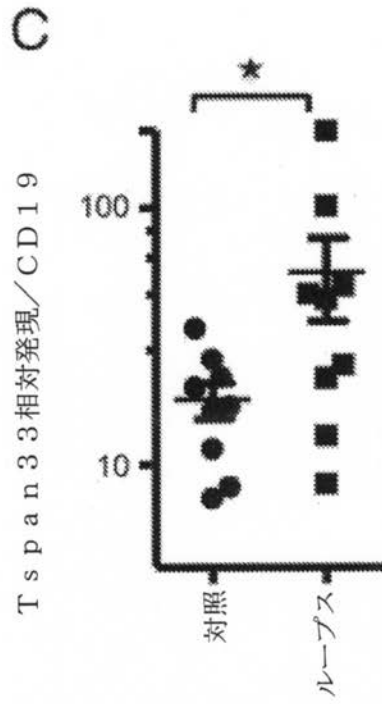
【 図 6 】



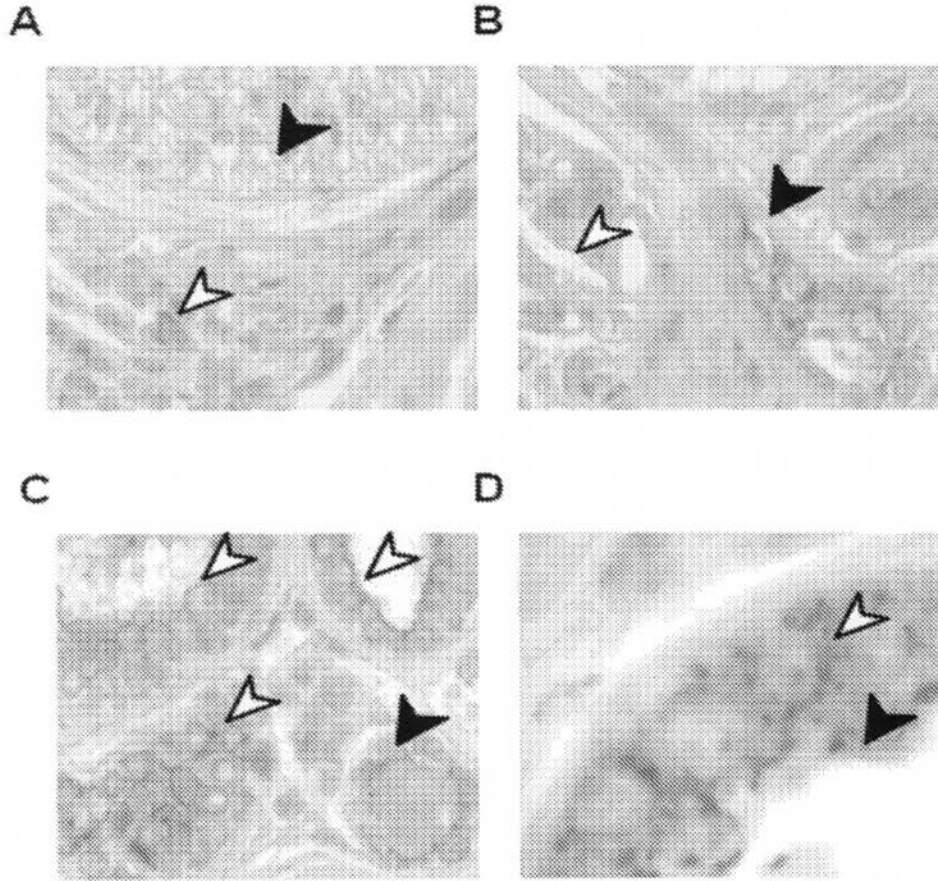
【図7-1】



【図7-2】



【 図 8 】



【 配 列 表 】

2016506411000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US2013/07273

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - A61K 39/395 (2014.01) USPC - 424/155.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) - A61K 31/00, 38/00, 39/395; A61P 35/02; C07K 16/28 (2014.01) USPC - 424/133.1, 142.1, 155.1; 435/287.2, 330, 971; 514/1.1; 530/300, 427 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 2039/505; C07K 14/70596, 16/2803; G01N 33/5052 (2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBasa, Google Patents, Google Scholar, ProQuest, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0264354 A1 (TSAI et al) 22 October 2009 (22.10.2009) entire document	1-20
Y	DUNN et al. 'A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in Caenorhabditis elegans and in human cells.' Proc. Natl. Acad. Sci. 107(13): 5907-5912. 10 March 2010. entire document	1-11, 15-20
Y	US 2012/0213786 A1 (VAN DER HORST et al) 23 August 2012 (23.08.2012) entire document	2-4, 10
Y	US 2009/0214539 A1 (GROSMIRE et al) 27 August 2009 (27.08.2009) entire document	4, 10
Y	TEACHEY et al. 'Targeting notch signaling in autoimmune and lymphoproliferative disease.' Blood 111(2): 705-714. 09 October 2007. entire document	6-11
Y	AVERY et al. 'Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage.' J. Immunol. 174: 4034-4042. 01 April 2005. entire document	12-14
Y	US 2009/0022731 A1 (VON SCHACK et al) 22 January 2009 (22.01.2009) entire document	15-20
P, X	LUU et al. 'TSPAN33 is a novel marker of activated and malignant B cells.' Clin. Immunol. 149 (3): 388-399. 15 August 2013. entire document	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 February 2014		Date of mailing of the international search report 18 MAR 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 5/14	(2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 1/14	(2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/533	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	K
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	G 0 1 N 33/533	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		C 0 7 K 16/18	

(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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 515169164

ユニベルシダ アウトノマ デ NUEVO LEON

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

メキシコ 6 6 4 5 1 NUEVO LEON, サン ニコラス デ ロス ガルサ

San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, 6 6 4 5 1 (MX)

(74)代理人 100074332

弁理士 藤本 昇

(74)代理人 100114432

弁理士 中谷 寛昭

(74)代理人 100171310

弁理士 日東 伸二

(72)発明者 フローレス, ファン, パブロ

メキシコ 6 6 3 5 4 NUEVO LEON, サンタ カタリーナ, フランシスコ ペレス リオス
3 1 0

(72)発明者 プロトニク, アルバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ, ドレークウッド テラス 4 8

63

- (72)発明者 ヘヴェジ, ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92024 エンシニータス, コテージ グレン 1673
- (72)発明者 ルー, ヴァン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92780 タスティン, ブライアン アベニュー 115
3, ユニット シー

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 CA11 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ43 QQ52 QQ58 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25
QS28 QS34 QX02
4C085 AA13 AA14 BB11 CC05 CC23 DD88 EE01
4H045 AA11 BA10 DA76 DA86 EA28 FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016506411A5	公开(公告)日	2017-03-23
申请号	JP2015549837	申请日	2013-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会 海胆铃蕨出卢武铉制造新莱昂 新莱昂自治大学		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会 Uniberushida自治新莱昂		
[标]发明人	フローレスファンパブロ ズロトニクアルバート ヘヴェジピーター ルーヴァン		
发明人	フローレス,ファン,パブロ ズロトニク,アルバート ヘヴェジ,ピーター ルー,ヴァン		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P37/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P1/16 A61P1/04 A61P11/00 A61P5/14 A61P1/14 A61P7/00 A61P25/00 A61P9/00 A61P43/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/533 C12N15/09 C07K16/18		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/28 C07K2317/76 C07K16/3061 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/56972 G01N2333/705		
FI分类号	A61K39/395.N A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P37/06 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P17/06 A61P17/00 A61P1/16 A61P1/04 A61P11/00 A61P5/14 A61P1/14 A61P7/00 A61P25/00 A61P9/00 A61P43/00.111 A61K39/395.D C12Q1/68.A G01N33/53.K G01N33/53.D G01N33/533 C12N15/00.ZNA.A C07K16/18		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/CC23 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA71		
代理人(译)	藤本登 日东真嗣		
优先权	61/740946 2012-12-21 US		
其他公开文献	JP2016506411A		

摘要(译)

一种治疗与表达四跨膜蛋白33 (TSPAN33 / BAAM) 的活化B淋巴细胞相关的疾病的方法。 该疾病可以是例如淋巴瘤或免疫疾病。 该方法包括以有效治疗疾病的量向需要这种治疗的患者施用抗TSPAN33 / BAAM抗体。 还提供了纯化活化的B细胞和鉴定活化的和/或患病的B细胞的方法。

