

(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2016-527187
(P2016-527187A)

(43) 公表日 平成28年9月8日(2016.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	ZNA 4B064
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	N 4C085
A61P 37/02 (2006.01)	A61P 37/02	4H045
A61P 17/14 (2006.01)	A61P 17/14	
A61P 7/06 (2006.01)	A61P 7/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-515141 (P2016-515141)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月27日 (2014.5.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年1月13日 (2016.1.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/039621
 (87) 国際公開番号 WO2014/190356
 (87) 国際公開日 平成26年11月27日 (2014.11.27)
 (31) 優先権主張番号 61/827, 216
 (32) 優先日 平成25年5月24日 (2013.5.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504333972
 メディミュン, エルエルシー
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミュン ウェイ
 (71) 出願人 398076227
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー
 アメリカ合衆国、メリーランド州 21218、ボルチモア、ノース・チャールズ・ストリート 3400
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗B7-H5抗体およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、B7-H5:CD28経路のB7-H5リガンドに免疫特異的に結合することができる、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに他の分子に関し、また、自己免疫疾患、移植による拒絶反応および他の炎症性疾患の治療および診断におけるそのような分子の使用に関する。

【選択図】 図1

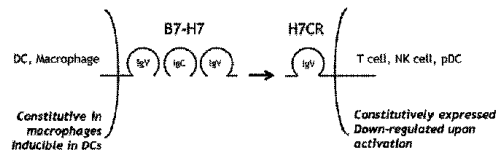


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

6つの相補性決定領域(CDR)を含む、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

前記CDRが、

(1) 3つの配列番号11の軽鎖CDRおよび3つの配列番号9の重鎖CDR；または

(2) 3つの配列番号15の軽鎖CDRおよび3つの配列番号13の重鎖CDR

を含み、かつ

前記抗体またはその抗原結合フラグメントがB7-H5に結合する、
抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

前記3つの軽鎖CDRが、配列番号11のアミノ酸27～38を含む第1の軽鎖CDR、配列番号11のアミノ酸56～58を含む第2の軽鎖CDR、および配列番号11のアミノ酸95～102を含む第3の軽鎖CDRを含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

前記3つの重鎖CDRが、配列番号9のアミノ酸26～33を含む第1の重鎖CDR、配列番号9のアミノ酸51～58を含む第2の重鎖CDR、および配列番号9のアミノ酸97～106を含む第3の重鎖CDRを含む、請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 4】

配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記3つの軽鎖CDRが、配列番号15のアミノ酸27～38を含む第1の軽鎖CDR、配列番号15のアミノ酸56～58を含む第2の軽鎖CDR、および配列番号15のアミノ酸95～102を含む第3の軽鎖CDRを含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 7】

前記3つの重鎖CDRが、配列番号13のアミノ酸26～33を含む第1の重鎖CDR、配列番号13のアミノ酸51～58を含む第2の重鎖CDR、および配列番号13のアミノ酸97～106を含む第3の重鎖CDRを含む、請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 10】

配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

前記結合したB7-H5が、生細胞の表面に配置されているか、または内因性もしくはは

50

トラスフェクトされた濃度で発現されている、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

前記生細胞が、マクロファージまたは樹状細胞である、請求項 7 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 14】

前記 B7 - H5 が、ヒト B7 - H5 である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

- (A) B7 - H5 のリガンドの CD28H に対する結合能力を低下させ；
- (B) B7 - H5 の CD28H への結合の結果として生じるシグナル伝達を遮断し；
- (C) 同種 T 細胞反応を阻害し；
- (D) それらの組み合わせである、

10

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 16】

免疫グロブリン定常領域 (Fc) の 1 つまたは複数の定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 17】

前記定常ドメインは、ヒト定常ドメインである、請求項 16 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 18】

前記ヒト定常ドメインは、ヒト IgA ドメイン、IgD ドメイン、IgE ドメイン、IgG ドメインまたは IgM ドメインである、請求項 17 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 19】

前記ヒト IgG 定常ドメインは、IgG1 ドメイン、IgG2 ドメイン、IgG3 ドメインまたは IgG4 ドメインである、請求項 18 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 20】

検出可能に標識されるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 21】

前記抗体は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 22】

前記抗体は、二重特異性、三重特異性または多重特異性の抗体である、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 23】

1 つまたは複数のヒト IgG4 定常ドメイン、および
配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、または
配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域
を含む、ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 24】

請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいは CD28H - Ig 融合タンパク質、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 25】

50

被験体の免疫系を下方調節する方法に使用するための、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記被験体が自己免疫疾患を有する、請求項 2 5 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 2 7】

自己免疫疾患を治療する方法で使用するための、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記自己免疫疾患は、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャグ・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、クレスト症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑病（ITP）、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、ループスエリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、視神経脊髄炎（NMO）、1型または免疫性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、全身性紅斑性狼瘡、紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、たとえば疱疹状皮膚炎血管炎、白斑、ならびにウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される、請求項 2 6 または 2 7 に記載の使用のための医薬組成物。

10

20

【請求項 2 9】

前記被験体が炎症性疾患を有する、請求項 2 5 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 3 0】

炎症性疾患を治療する方法で使用するための、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

前記炎症性疾患は、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性のウイルス感染もしくは細菌感染に起因する慢性炎症からなる群から選択される、請求項 2 9 または 3 0 に記載の使用のための医薬組成物。

30

【請求項 3 2】

前記被験体が移植を受けたことがあるか、または受ける予定がある、請求項 2 5 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 3 3】

移植による拒絶反応を治療または防止する方法で使用するための、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

被験体の免疫系を下方調節する薬剤の製造における、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいはCD 2 8 H - Ig 融合タンパク質の使用。

40

【請求項 3 5】

被験体の自己免疫疾患を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいはCD 2 8 H - Ig 融合タンパク質の使用。

【請求項 3 6】

被験体の炎症性疾患を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいはCD 2 8 H - Ig 融合タン

50

パク質の使用。

【請求項 37】

被験体の移植による拒絶反応を治療または防止するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいは CD 28 H - I g 融合タンパク質の使用。

【請求項 38】

疾患、障害または感染症を検出または診断する方法であって、(a) 請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて被験体の細胞または組織サンプルにおける B7 - H5 の発現をアッセイすること、および (b) 前記 B7 - H5 のレベルを対照レベルと比較することを含み、前記対照レベルと比較した、前記アッセイされた B7 - H5 レベルの上昇が、前記疾患、障害または感染症を示唆する、方法。

10

【請求項 39】

前記 B7 - H5 の発現が、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) または蛍光活性化セルソーティング (FACS) によってアッセイされる、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

疾患、障害または感染症の進行をモニターする方法であって、(a) 第 1 の時点で、被験体の細胞または組織サンプルにおける B7 - H5 の発現を、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを用いてアッセイすること、および (b) 第 2 の時点で、または経時的に、前記被験体の前記細胞または前記組織サンプルにおける B7 - H5 の発現レベルを比較することを含み、前記アッセイされた B7 - H5 レベルの上昇が、前記疾患、障害または感染症の進行を示唆する、方法。

20

【請求項 41】

前記 B7 - H5 の発現が、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) または蛍光活性化セルソーティング (FACS) によってアッセイされる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 42】

治療に対する応答をモニターする方法であって、(a) 治療前に、被験体の細胞または組織サンプルにおける B7 - H5 の発現を、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを用いてアッセイすること、および (b) 治療後、1 つまたは複数の時点の前に、被験体の細胞または組織サンプルにおける B7 - H5 の発現をアッセイして、B7 - H5 レベルを経時的に比較することを含み、前記治療前の B7 - H5 レベルと比較した、前記アッセイされた B7 - H5 レベルの低下が、治療に対する応答を示す、方法。

30

【請求項 43】

前記 B7 - H5 の発現が、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) または蛍光活性化セルソーティング (FACS) によってアッセイされる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

B7 - H5 の発現の増大を特徴とする疾患の被験体を治療する方法において使用するための医薬組成物であって、前記方法が

40

(i) 前記被験体が B7 - H5 の発現の増大を特徴とする疾患を有するか否かを

(a) 前記被験体の細胞または組織サンプルにおける前記 B7 - H5 の発現を、B7 - H5 に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いてアッセイし；

(b) 前記 B7 - H5 レベルを対照レベルと比較する

ことによって決定する工程であって、

前記対照レベルと比較した、前記アッセイされた B7 - H5 レベルの上昇が、前記被験体が B7 - H5 の発現の増大を特徴とする疾患を有することを示唆する工程と；

(i i) 前記被験体が B7 - H5 の発現の増大を特徴とする疾患を有する場合、治療上有効な量の請求項 24 に記載の医薬組成物を前記被験体に投与する工程と

50

を含む、医薬組成物。

【請求項 45】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

B7 - H5 の発現の増大を特徴とする前記疾患が、自己免疫疾患である、請求項 44 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 47】

B7 - H5 の発現の増大を特徴とする前記疾患が、炎症性疾患である、請求項 44 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 48】

CD28H の発現の増大を特徴とする疾患の被験体を治療する方法において使用するための医薬組成物であって、前記方法が

(i) 前記被験体が CD28H の発現の増大を特徴とする疾患を有するか否かを

(a) 前記被験体の細胞または組織サンプルにおける前記 CD28H の発現を、抗 CD28H 抗体またはその抗原結合フラグメントを用いてアッセイし；

(b) 前記 CD28H レベルを対照レベルと比較する

ことによって決定する工程であって、

前記対照レベルと比較した、前記アッセイされた CD28H レベルの上昇が、前記被験体が CD28H の発現の増大を特徴とする疾患を有することを示唆する工程と；

(ii) 前記被験体が CD28H の発現の増大を特徴とする疾患を有する場合、治療上有効な量の請求項 24 に記載の医薬組成物を前記被験体に投与する工程と

を含む、医薬組成物。

【請求項 49】

CD28H の発現の増大を特徴とする前記疾患が、自己免疫疾患である、請求項 48 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 50】

CD28H の発現の増大を特徴とする前記疾患が、炎症性疾患である、請求項 48 に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府による支援の研究または開発に関する記載

本発明は、国立衛生研究所 (National Institute of Health) (NIH) による助成金 RO1 CA097085 および RO1 A172592、ならびに国立癌研究所 (National Cancer Institute) (NCI) による助成金 U19 CA113341 の下で、政府の支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

配列表の参照

本出願は、紙およびコンピューター読み取り可能な媒体の両方で開示される、37C.F.R. 1.821 および以下参照に準拠した 1 つまたは複数の配列表を含み、紙およびコンピューター読み取り可能な開示内容はその全体を援用する。

【0003】

本発明は、B7 - H5 : CD28H 経路の B7 - H5 リガンドに結合することができる、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに他の分子に関し、また、自己免疫疾患、移植による拒絶反応および他の炎症性疾患の治療および診断におけるそのような分子の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

10

20

30

40

50

ヒトおよび他の哺乳動物の免疫系は、感染および疾患を防止する役割を担っている。こうした防止は、液性免疫反応および細胞性免疫反応により行われる。液性反応では、抗体と外来の標的（抗原）を認識し、中和することができる他の生体分子とが作られる。一方、細胞性免疫反応では、T細胞によりマクロファージ、ナチュラルキラー細胞（NK）および抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球が活性化し、抗原の認識に反応して様々なサイトカインが放出される（Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」 *Immunolog. Res.* 28(1): 39-48）。

【0005】

T細胞が抗原に対する免疫反応を最適に媒介できるには、2つの異なるシグナル伝達の相互作用を必要とする（Viglietta, V. et al. (2007) 「Modulating Co-Stimulation,」 *Neurotherapeutics* 4: 666-675; Korman, A. J. et al. (2007) 「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」 *Adv. Immunol.* 90: 297-339）。最初に、抗原提示細胞（APC）の表面に配置されている抗原が、抗原特異的ナイーブCD4⁺T細胞に提示されなければならない。こうした提示があると、シグナルがT細胞受容体（TCR）を介して伝達され、提示された抗原に特異的となる免疫反応をT細胞が開始するように誘導する。次に、APCと特有のT細胞表面分子との間の相互作用を介して行われるいくつかの共刺激および共抑制シグナルが、最初にT細胞の活性化および増殖の引き金を引き、最終的にT細胞の抑制を誘導する。こうして、第1のシグナルは免疫反応に特異性を付与するのに対し、第2のシグナルは反応の性質、大きさおよび持続期間を決定する役割を果たす。

【0006】

免疫系は、共刺激および共抑制リガンドおよび受容体によりしっかりと制御されている。これらの分子は、T細胞活性化のための第2のシグナルを与え、正のシグナルおよび負のシグナルのネットワークのバランスを取って、自己に対する免疫を抑制しながら感染に対する免疫反応を最大化する（Wang, L. et al. (March 7, 2011) 「VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses,」 *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619: 1-16; Lepenies, B. et al. (2008) 「The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,」 *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8: 279-288）。特に重要なのは、抗原提示細胞のB7.1（CD80）リガンドおよびB7.2（CD86）リガンドと、CD4⁺Tリンパ球のCD28受容体およびCTLA-4受容体との間の結合である（Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7-CD28 Superfamily,」 *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126; Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」 *Immunolog. Res.* 28(1): 39-48; Lindley, P. S. et al. (2009) 「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,」 *Immunol. Rev.* 229: 307-321）。B7.1またはB7.2がCD28に結合すると、T細胞の活性化が刺激されるのに対し、B7.1またはB7.2がCTLA4に結合すると、そうした活性化が阻害される（Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」 *Immunolog. Res.* 28(1): 39-48; Lindley, P. S. et al. (2009) 「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,」 *I*

10

20

30

40

50

mmunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R. J. et al. (2005) 「The B7 Family Revisited,」 Ann. Rev. Immunol. 23:515-548)。CD28は、T細胞の表面に恒常的に発現する一方(Gross, J., et al. (1992) 「Identification And Distribution Of The Costimulator Receptor CD28 In The Mouse,」 J. Immunol. 149:380-388)、CTLA4の発現は、T細胞活性化後に急速に上方制御される(Linsley, P. et al. (1996) 「Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,」 Immunity 4:535-543)。CTLA4は高親和性受容体であるため(Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7-CD28 Superfamily,」 Nature Rev. Immunol. 2:116-126)、結合すると、最初にT細胞増殖を惹起し(CD28を介して)、次いでT細胞増殖を阻害する(CTLA4の新たな発現により)ことで、増殖がもはや必要でなくなったときにその作用を抑制する。

【0007】

CD28受容体のリガンドに関する詳細な調査により、関連する一連のB7分子(「B7スーパーファミリー」)の同定および特徴付けが行われてきた(Coyle, A. J. et al. (2001) 「The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function,」 Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7-CD28 Superfamily,」 Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R. J. et al. (2005) 「The B7 Family Revisited,」 Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) 「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」 Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) 「Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells,」 Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A. J. et al. (2007) 「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」 Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D. B. et al. (2007) 「The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,」 J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) 「The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,」 Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Lenschow, D. J. et al. (1996) 「CD28/B7 System of T Cell Costimulation,」 Ann. Rev. Immunol. 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) 「Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,」 Microbes Infect. 6:759-766)。このファミリーには、現在、9つの公知のメンバー、すなわち、B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、inducible co-stimulator ligand(ICOS-L、B7-H2)、programmed death-1 ligand(PD-L1

10

20

30

40

50

; B7-H1)、programmed death-2 ligand (PD-L2; B7-DC)、B7-H3、B7-H4 (B7x、B7-H6およびB7S1とも呼ばれる; Sica, G. L. et al. (2003) 「B7-4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18: 849-861; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100: 10388-10392; Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18: 863-873)、B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) 「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」Genome Biol. 6: 223.1-223.7)およびB7-H5 (Flajnik, M. F. et al. (2012) 「Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64: 571-590)が存在する。B7の遺伝子ファミリーは、適応免疫系の調節に不可欠である。ほとんどのB7ファミリーメンバーは、免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) の可変 (V) 型と定常 (C) 型の両方のドメインを含有する。

【0008】

B7リガンドは、抗原提示細胞 (APC) を含む様々な細胞型の細胞表面上に発現され、それとT細胞上の受容分子との相互作用により、T細胞の活性化および寛容性を調節する活性化シグナルおよび/または抑制シグナルが与えられる (Collins, M. et al. (2005) 「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」Genome Biol. 6: 223.1-223.7)。抑制性B7リガンドの一部は、腫瘍細胞上にも発現され、免疫応答の抑制がもたらされる (Keir, M. E. et al. (2008) 「PD-1 And Its Ligands In Tolerance And Immunity,」Annu. Rev. Immunol. 26: 677-704; Zou, W. et al. (2008) 「Inhibitory B7-Family Molecules In The Tumour Microenvironment,」Nat. Rev. Immunol. 8: 467-477)。したがって、B7リガンドとその受容体との相互作用の促進または減弱により、自己免疫疾患、癌および感染症の治療が可能になる可能性がある (国際公開第2011/020024号パンフレット; Flajnik, M. F. et al. (2012) 「Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64: 571-590)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2011/020024号パンフレット

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」

Immunolog. Res. 28 (1) : 39 - 48

【非特許文献2】Viglietta, V. et al. (2007) 「Modulating Co-Stimulation,」 Neurotherapeutics 4 : 666 - 675

【非特許文献3】Korman, A. J. et al. (2007) 「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」 Adv. Immunol. 90 : 297 - 339

【非特許文献4】Wang, L. et al. (March 7, 2011) 「VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses,」 J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619 : 1 - 16

【非特許文献5】Lepenies, B. et al. (2008) 「The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,」 Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8 : 279 - 288

【非特許文献6】Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7 - CD28 Superfamily,」 Nature Rev. Immunol. 2 : 116 - 126

【非特許文献7】Lindley, P. S. et al. (2009) 「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28 - Mediated Costimulation,」 Immunol. Rev. 229 : 307 - 321

【非特許文献8】Greenwald, R. J. et al. (2005) 「The B7 Family Revisited,」 Ann. Rev. Immunol. 23 : 515 - 548

【非特許文献9】Gross, J., et al. (1992) 「Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,」 J. Immunol. 149 : 380 - 388

【非特許文献10】Linsley, P. et al. (1996) 「Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,」 Immunity 4 : 535 - 543

【非特許文献11】Coyle, A. J. et al. (2001) 「The Expanding B7 Superfamily : Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function,」 Nature Immunol. 2 (3) : 203 - 209

【非特許文献12】Collins, M. et al. (2005) 「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」 Genome Biol. 6 : 223.1 - 223.7

【非特許文献13】Loke, P. et al. (2004) 「Emerging Mechanisms Of Immune Regulation : The Extended B7 Family And Regulatory T Cells.」 Arthritis Res. Ther. 6 : 208 - 214

【非特許文献14】Flies, D. B. et al. (2007) 「The New B7s : Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,」 J. Immunother. 30 (3) : 251 - 260

【非特許文献15】Agarwal, A. et al. (2008) 「The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,」 Curr. Opin

10

20

30

40

50

. Organ Transplant. 13: 366 - 372

【非特許文献16】Lenschow, D. J. et al. (1996) 「CD28 / B7 System of T Cell Costimulation,」Ann. Rev. Immunol. 14: 233 - 258

【非特許文献17】Wang, S. et al. (2004) 「Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,」Microbes Infect. 6: 759 - 766

【非特許文献18】Sica, G. L. et al. (2003) 「B7-4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18: 849 - 861

【非特許文献19】Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100: 10388 - 10392

【非特許文献20】Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18: 863 - 873

【非特許文献21】Flajnik, M. F. et al. (2012) 「Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64: 571 - 590

【非特許文献22】Keir, M. E. et al. (2008) 「PD-1 And Its Ligands In Tolerance And Immunity,」Annu. Rev. Immunol. 26: 677 - 704

【非特許文献23】Zou, W. et al. (2008) 「Inhibitory B7-Family Molecules In The Tumour Microenvironment,」Nat. Rev. Immunol. 8: 467 - 477

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

炎症性疾患および自己免疫疾患の治療におけるこれまでのあらゆる進歩にもかかわらず、そうした状態の治療のために高度の免疫療法を提供することができる組成物が依然として求められている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、そのような、炎症性疾患、自己免疫疾患、および免疫系の活性亢進を特徴とする類似の疾患や状態を治療するための組成物、ならびに、それらの使用に関する。

【0013】

B7-H5: CD28H経路のB7-H5リガンドに免疫特異的に結合することができる、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに他の分子、また、自己免疫疾患、移植による拒絶反応および他の炎症性疾患の治療および診断におけるそのような分子の使用が提供される。

【0014】

一実施形態は、哺乳類のB7-H5（特に、ヒトB7-H5）に免疫特異的に結合する、抗体、または抗体の抗原結合フラグメントを有する他の分子を提供する。B7-H5は

10

20

30

40

50

、たとえば生細胞の表面に配置され得る。

【0015】

生細胞の例としては、マクロファージ、樹状細胞などが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

【0016】

他の実施形態は、B7 - H5に免疫特異的に結合し、かつB7 - H5のCD28Hとの相互作用を実質的に遮断することができる分子を提供する。さらに他の実施形態は、B7 - H5に免疫特異的に結合し、かつB7 - H5のCD28Hとの相互作用を実質的に遮断することができない分子を提供する。

【0017】

B7 - H5結合分子は、6つのCDRを含む抗原結合フラグメントを有し得る。これらのCDRは、抗B7 - H5抗体：2D3および18C3、のCDRの少なくとも1つのコンセンサスCDRを含み、残りのすべてのCDRは、

(A) 抗B7 - H5抗体2D3の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；または
(B) 抗B7 - H5抗体18C3の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR
から選択され得る。

【0018】

他の実施形態は、6つのCDRが、

(A) 抗B7 - H5抗体2D3の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；または
(B) 抗B7 - H5抗体18C3の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR
である、B7 - H5結合分子を提供する。

【0019】

いくつかの実施形態では、分子は、2種以上の異なるB7 - H5抗体の抗原結合フラグメント(Fab)を含むキメラ抗体である。

【0020】

B7 - H5結合分子は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であり得、かつ/あるいは二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である。

【0021】

B7 - H5結合分子は、検出可能に標識することができるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、もしくは受容体リガンドを含む。

【0022】

さらに他の実施形態は、治療上有効な量または予防上有効な量の上記B7 - H5結合分子のいずれか、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含有する医薬組成物を提供する。

【0023】

他の実施形態では、B7 - H5とCD28Hとの相互作用を実質的に遮断することができる分子は、CD28H融合タンパク質であり、好ましくはCD28H - Ig融合タンパク質である。

【0024】

疾患の治療における、この医薬組成物の使用方法もまた提供される。

【0025】

被験体の疾患を診断する方法は、被験体の細胞について、上記B7 - H5結合分子のいずれかに結合するその能力をアッセイすることを含み、この方法は、被験体の疾患の存在を診断するための細胞学的アッセイを提供する。

【0026】

開示されたB7 - H5結合分子は、自己免疫疾患または移植による拒絶反応に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、B7-H5およびそのカウンター受容体CD28Hの概略図を提供する。

【図2】図2、パネルA~Jは、B7-H5がマクロファージ上で構成的に発現し、樹状細胞上で誘導的であることを示す。

【図3】図3、パネルA~Dは、CD28HがT細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞上で発現するが、B細胞では発現しないことを示す。

【図4】図4A~4Bは、クローン2D3および18C3によって産生される抗体の、CHOトランスフェクタントにより発現するヒトB7-H5に結合する能力を示す。

【図5】図5A~5Cは、単離された抗体と対照Igの、B7-H5:CD28H相互作用を遮断する能力を示す。

【図6】図6は、B7-H5 Ig融合の、T細胞反応を刺激する能力を示す。

【図7】図7は、B7-H5 Igの、サイトカイン:IL-2、IFN- およびIL-10の発現を誘導する能力を示す。

【図8】図8は、B7-H5がそのカウンター受容体CD28Hと相互作用する能力を遮断するために、本発明の抗B7-H5抗体2D3がB7-H5に結合することができることを示す。

【図9】図9は、抗B7-H5抗体2D3の、同種T細胞反応を阻害する能力を示す。

【図10】図10Aおよび図10Bは、ヒトPBMCを移植されたNSGマウスの脾臓(図10A)および末梢血(図10B)の活性化(CD45RO⁺)ヒトT細胞中のCD28H⁺の割合に対する抗ヒトB7-H5抗体の効果を示す。

【図11】図11Aおよび図11Bは、ヒトPBMCを移植されたNSGマウスの脾臓(図11A)および末梢血(図11B)のナイーブ(CD45RO⁻)ヒトT細胞中のCD28H⁺の割合に対する抗ヒトB7-H5抗体の効果を示す。

【図12】図12A~12Cは、組換え抗ヒトB7-H5キメラ抗体(2D3および18C3)の結合特性を示す。図12A~12Cは、組換え技術によりマウスIgGアイソタイプがヒトIgG4アイソタイプに変換された抗ヒトB7-H5抗体(2D3および18C3)の、CHO細胞によって発現されたヒトB7-H5に結合する能力を示す。

【図13】図13(パネルA~C)は、組換え抗ヒトB7-H5キメラ抗体(2D3および18C3)の、CHO B7-H5トランスフェクタントへのCD28H融合タンパク質の結合を完全に遮断する能力を示す。ヒトB7-H5 FL CHOトランスフェクタントを対照上清(パネルA)とともに、または組換えキメラ2D3上清(パネルB)および組換えキメラ18C3上清(パネルC)とともにプレインキュベートし、その後、ビオチン化CD28Hh Ig融合タンパク質で染色した。

【図14】図14A~14Bは、抗ヒトB7-H5抗体(2D3および18C3)のエピトープ認識部位を示す。図14Aおよび図14Bは、2D3および18C3がB7-H5の第1のIgVドメインを認識していることを示す。図14Cは、B7-H5 IgVドメインがB7-H5のCD28Hとの相互作用を仲介していることを示す。

【図15】図15は、CHO細胞の表面で発現したヒトB7-H5に対する抗体2D3および18C3の結合親和性を比較する。

【図16A】図16A~16Bは、TT特異的メモリーT細胞のリコールに対するB7-H5:CD28Hの内因性相互作用の効果を示す。図16Aは、B7-H5:CD28Hの相互作用を遮断する抗体2D3(パネルB)または対照Ig(パネルA)の存在下、TTワクチンで誘導されたT細胞の増殖を示す。図16Bは、そのような応答に関連する発現サイトカイン(パネルA)およびBrdU陽性細胞(パネルB)のレベルを示す。

【図16B】図16A~16Bは、TT特異的メモリーT細胞のリコールに対するB7-H5:CD28Hの内因性相互作用の効果を示す。図16Aは、B7-H5:CD28Hの相互作用を遮断する抗体2D3(パネルB)または対照Ig(パネルA)の存在下、TTワクチンで誘導されたT細胞の増殖を示す。図16Bは、そのような応答に関連する発現サイトカイン(パネルA)およびBrdU陽性細胞(パネルB)のレベルを示す。

【図17】図17A~17Bは、2D3によるB7-H5:CD28Hの内因性相互作用

10

20

30

40

50

の遮断が、ヒト化 NSG マウスの CD8⁺T 細胞 (図 17 A、パネル A ~ B) および CD4⁺T 細胞 (図 17 B、パネル A ~ B) の両者の同種増殖反応を阻害することを示す。

【図 18】図 18 は、TCR と B7 - H5 融合タンパク質の同時架橋が刺激 30 分後に AKT リン酸化反応を誘導したが、TCR 架橋単独では最小の AKT リン酸化反応を誘起しただけであったことを示す。重要なことには、B7 - H5 抗体 2D3 が含まれると AKT 活性化を抑制した。これは B7 - H5 共刺激が AKT 経路を使用して T 細胞反応を促進することを示している。

【図 19】図 19 は、おとり受容体融合タンパク質 CD28HIg による B7 - H5 - CD28H 経路の遮断が、B7 - H5 をトランスフェクトされた 624Mel マメラノーマ細胞株に対する同種 CD8⁺T 細胞の細胞障害性殺活性を抑制したことを示す。これは B7 - H5 - CD28H 経路が標的細胞上の CD8⁺T 細胞の細胞障害性殺活性を促進することを示している。

【図 20 A】図 20 A ~ B は、可溶性組換えヒト IL - 2 の存在下、ナチュラルキラー細胞 (NK) 上の CD16 および B7 - H5 融合タンパク質の同時架橋が、NK の活性化および脱顆粒 (CD107a 表面の上方制御) を誘導する一方、CD16 の関与のみでは NK の有意な脱顆粒は誘導されなかったことを示す。B7 - H5 融合タンパク質の用量に応じて NK の活性化が変化することが観察された (図 20 A)。重要なことには、B7 - H5 抗体 2D3 が含まれると NK の活性化を抑制した (図 20 B)。これは B7 - H5 が NK の活性化を共刺激することを示している。

【図 20 B】図 20 A ~ B は、可溶性組換えヒト IL - 2 の存在下、ナチュラルキラー細胞 (NK) 上の CD16 および B7 - H5 融合タンパク質の同時架橋が、NK の活性化および脱顆粒 (CD107a 表面の上方制御) を誘導する一方、CD16 の関与のみでは NK の有意な脱顆粒は誘導されなかったことを示す。B7 - H5 融合タンパク質の用量に応じて NK の活性化が変化することが観察された (図 20 A)。重要なことには、B7 - H5 抗体 2D3 が含まれると NK の活性化を抑制した (図 20 B)。これは B7 - H5 が NK の活性化を共刺激することを示している。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、B7 - H5 : CD28H 経路の B7 - H5 リガンドに免疫特異的に結合することができる、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに他の分子に関し、また、自己免疫疾患、移植による拒絶反応および他の炎症性疾患の治療および診断におけるそのような分子の使用に関する。

【0029】

B7 - H5 : CD28H 経路は、B7 - H5 リガンドおよびそのカウンター受容体 CD28H を含む細胞性免疫経路である (図 1)。B7 - H5 は抗原提示細胞上に発現し、それはマクロファージ上に構成的に発現し、樹状細胞上に誘導される (図 2、パネル A ~ J)。CD28H は特に、ナイーブ T 細胞、NK 細胞および形質細胞様樹状細胞上に (特に脾臓、リンパ節および胸腺において) 発現され、その発現は成熟細胞または活性化細胞上で下方制御される。それは T 細胞または B 細胞上で発現しない (図 3) が、T_n、T_CM、T_{EM} および T_{EMRA} の T 細胞サブセット上で発現する。ヒト臍帯血 T 細胞は CD28H を発現し、CD4⁺、CD8⁺ および CD4⁺/CD8⁺ 胸腺細胞も同様である。B7 - H5 は、カウンター受容体 CD28H と相互作用して免疫系を刺激し、それによって免疫反応の強化を促進する。CD28H の下方制御は、インビボで、活性化 / メモリー T 細胞の生存を損なうことが分かった。したがって、B7 - H5 と CD28H との間の相互作用は、インビボにおける、ナイーブ T 細胞プライミングおよび活性化 / メモリー T 細胞の生存にとって重要である。CD28H はまた、長期にわたって抗原に曝露された / 消耗した T 細胞で下方制御されると見られる。CD28H はナチュラルキラー細胞 (NK) 上に構成的に発現する。B7 - H5 - CD28H 経路は、CD16 架橋などの他の NK 活性化シグナルの存在下で、NK の活性化および脱顆粒を促進する。

【0030】

10

20

30

40

50

本発明は、B7-H5に免疫特異的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントなどの分子（「抗B7-H5抗体」）、特に抗B7-H5抗体、または、B7-H5のCD28Hへの結合能力を損なう（すなわち、防止または減弱する）ために、B7-H5:CD28H相互作用を遮断するおとり受容体癒合タンパク質CD28HIgなどの分子が、B7-H5の、CD28Hとの相互作用による免疫反応の強化を促進する能力を低下させることができ、それ故、T細胞増殖、サイトカイン産生およびNK活性化のアンタゴニストとして機能することができるという認識を一部反映したものである。こうした分子は、免疫系活性化の生理学的低下を仲介することができ、したがって、炎症性疾患および自己免疫疾患の治療に有用である。特に、そのような抗体は、インビボにおける活性化T細胞およびNK細胞の割合を低減することができる。

10

【0031】

A. B7-H5

B7-H5アミノ酸配列は、機能が知られていなかった(Flajnik, M. F. et al. (2012)「Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64:571-590)、以前に発見されたヒト遺伝子のHHLA2(human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2(HHLA2); Mager, D. L. et al. (1999)「Endogenous Retroviruses Provide The Primary Polyadenylation Signal For Two New Human Genes(HHLA2 And HHLA3,」Genomics 59:255-263)に類似していることが分かった。B7-H5は、本明細書その他において、B7-H7ともいう。したがって、B7-H5およびB7-H7という用語は、本明細書においては、交換可能な用語として使用される。

20

【0032】

ヒトB7-H5配列は、ニワトリ、オボッサム、有蹄哺乳動物（たとえば、ウマ、ブタ）、サケおよびサメにホモログがあることが見出されている。しかしながら、げっ歯類（マウスおよびラット）ではこれまでに偽遺伝子のみが同定されている。こうした遺伝子のアミノ酸配列は、あらゆる種で類似のドメイン構造を示し、Igスーパーファミリードメインの基準残基が保存されている。

30

【0033】

ヒトB7-H5ポリペプチドは、414アミノ酸長であり、以下のもの、すなわち、シグナル配列、3つの免疫グロブリン様(Ig様)ドメインを有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含有することが報告されている。特に、ヒトB7-H5ポリペプチドは、Ig様V型1ドメイン、Ig様C-1型ドメインおよびIg様V型2ドメインを含有することが報告されている。B7-H5の複数の天然変異体が存在する（たとえば、受託番号Q9UM44-1(ヒト(homo sapiens))、NP_009003(GI:5901964、ヒト(homo sapiens))およびAAD48396(GI:15726285、ヒト(homo sapiens)); 国際公開第2011/020024号パンフレットを参照のこと)。

40

【0034】

「ネイティブB7-H5」(「ネイティブB7-H5」ともいう)という用語は、未成熟形態、前駆形態および成熟形態を含む、任意の天然B7-H5アミノ酸配列をいう。代表的なヒトB7-H5、受託番号Q9UM44-1のアミノ酸配列は以下のとおりである(配列番号1)。

MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP
 SSFERGSEVV IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ
NGNASLFFRR VSLLDGIYT CYVGTAIQVI TNKVVLKVG FLTPVMKYEK
 RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS ENNMEETGSL DSFSINSPLN
 ITGSNSSYEC TIENSLLKQT WTGRWTKMDG LHKMQSEHVS LSCQPVDYF
 SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSQQN TIINESRFSW NKELINQSDP
 SMNLMDLNLN DSGEYLCNIS SDEYTLTIIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL
 VPSAILAAFL LIWSVKCCRA QLEARSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA
 PDNGEENVPL SGKV

【0035】

ヒトB7-H5は、以下のもの、すなわち、配列番号1のアミノ酸残基約1~22のシグナル配列、配列番号1のアミノ酸残基約61~131のIg様V型1ドメイン(上記下線で示す)、配列番号1のアミノ酸残基約138~222のIg様C-1型ドメイン、配列番号1のアミノ酸残基約235~328のIg様V型2ドメイン、および配列番号1のアミノ酸残基約345~365の膜貫通ドメインを含有することが報告されている。ヒトB7-H5ポリペプチドに対して予測される二量体界面は、配列番号1のアミノ酸残基141~144、156、158、160、162、193~196、198、200、201、224および225である。ヒトB7-H5ポリペプチドに対して予測されるN連結糖鎖付加部位は、配列番号1のアミノ酸残基90、103および318である。ヒトB7-H5ポリペプチドの天然変異体としては、BOT、N344KおよびS346R(UniProt Q9UM44)が挙げられる(国際公開第2011/020024号パンフレットを参照のこと、この文献は、ヒトB7-H5の構造および配列の教示のために、その内容全体を参照により本明細書に援用する)。

10

20

【0036】

ヒトB7-H5(配列番号1)をコードするDNA配列(配列番号2)は、以下のとおりである。

```

atgaaggcac agacagcact gtctttcttc ctcattctca taacatctct
gagtggatct caaggcatat tcccttggc tttcttcatt tatgttccta
tgaatgaaca aatcgtcatt ggaagacttg atgaagatat aattctccct
tcttcatttg agaggggatc cgaagtcgta atacactgga agtatcaaga
tagctataag gttcatagtt actacaaagg cagtgaccat ttggaaagcc
aagatcccag atatgcaaac aggacatccc ttttctataa tgagattcaa
aatgggaatg cgtcactatt tttcagaaga gtaagccttc tggacgaagg
aatttacacc tgctatgtag gaacagcaat tcaagtgatt acaaacaaag
tgggtgctaaa ggtgggagtt tttctcacac ccgtgatgaa gtatgaaaag
aggaacacaa acagcttctt aatatgcagc gtgttaagtg tttatcctcg
tccaattatc acgtggaaaa tggacaacac acctatctct gaaaacaaca
tggagaagaa agggctcttg gattcttttt ctattaacag cccactgaat
attacaggat caaattcatc ttatgaatgt acaattgaaa attcactgct
gaagcaaaaca tggacagggc gctggacgat gaaagatggc cttcataaaa
tgcaaagtga acacgtttca ctctcatgtc aacctgtaaa tgattatttt
tcaccaaaacc aagacttcaa agttacttgg tccagaatga aaagtgggac
tttctctgtc ctggcttact atctgagctc ctcacaaaat acaattatca
atgaatcccg attctcatgg aacaaagagc tgataaacca gagtgacttc
tctatgaatt tgatggatct taatctttca gacagtgggg aatatttatg
caatatttct tcggatgaat atactttact taccatccac acagtgcattg
tagaaccgag ccaagaaaca gcttcccata acaaaggctt atggattttg
gtgcctctct cgatttttggc agcttttctg ctgatttggg gcgtaaaatg
ttgcagagcc cagctagaag ccaggaggag cagacaccct gctgatggag
cccaacaaga aagatgttgt gtccctctctg gtgagcgtctg tcccagtgca
cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag ta

```

30

40

【0037】

代表的なヒトB7-H5 IgVドメイン ヒトIgG4融合タンパク質は、以下のとおりである(配列番号3)(B7-H5配列はボールド体で示し、IgG4配列は下線を付す)。

IFPLAFFIYV PMNEQIVIGR LDEDIILPSS FERGSEVVIH WKYQDSYKVVH
SYKGSYDHL E SQDPRYANRT SLFYNEIQNG NASLFFRRVS LLDEGIYTCY
VGTAIQVITN KVVLKGVFVL TPVMKYEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV
FLFPKPKKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NOVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNYHTQKS
LSLSPG

【 0 0 3 8 】

融合タンパク質は、以下のような、N末端リーダー配列（配列番号1の残基1～22のような、すなわち、天然に存在するB7-H5リーダー配列（配列番号4）をさらに含む得る。

10

MKAQTALSFF LILITSLSGS QG

【 0 0 3 9 】

天然に存在するB7-H5リーダー配列をコードするDNA配列（配列番号5）は、以下のとおりである。

atgaagcccc agaccgcctt gtccttcttc ctgatctga tcacctccct
gtccggcagc cagggga

20

【 0 0 4 0 】

本発明においては、B7-H5配列はヒトIgG4領域へ融合したものを示すが、そのような配列は、任意のIgアイソタイプ、または、実際のところ、任意の他のタンパク質に融合することができる。

【 0 0 4 1 】

B7-H5 IgV-h IgG4（配列番号3）をコードするDNA配列（配列番号6）は、以下のとおりである。

atcttccctc tggccttctt catctacgtg cccatgaacg agcagatcgt
gatcggcccg ctggacgagg atattatcct gccctccagc ttcgagcggg
gctccgaggt cgtgatccac tggagtagc aggactccta caaggtgcac
tctactaca agggtccga ccacctggaa tcccaggacc ccagatacgc
caaccggacc agcctgttct acaacgagat ccagaacggc aacgcctccc
tgttcttccg gcgagtgtcc ctgctggatg agggcatcta cacctgttac
gtgggcaccg coatccaagt gatcaccac aaggtggtgc tgaagtggg
cgtgttctcg acccccgtga tgaagtacga gaaagagtct aagtacggcc
ctccctgccc cccttgctct gccctgaat ttctggggcg accctctgtg
ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc
cgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccaggaagat cccgaggtgc
agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag
cccagagagg aacagttcaa ctccacctac cgggtggtgt cctgctgac
cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt
ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaaa agaccatctc caaggccaag
ggccagcccc gggaaaccca ggtgtacaca ctgcctccaa gccaggaaga
gatgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc
cctccgatat cgccgtggaa tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac
tacaagacca cccccctgt gctggactcc gaaggctctt tcttctgtg
ctcccgcctg accgtggaca agtccagatg gcaggaaggc aacgtgttct
cctgctccgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagtcc
ctgtccctga gccccggc

30

40

【 0 0 4 2 】

B7-H5の細胞外ドメインを含んでいる、代表的なヒトB7-H5ヒトIgG4P融合タンパク質のアミノ酸配列は、以下のとおりである（配列番号24）（B7-H5 ECDのaa1-340に下線を付したB7-H5ECD-hIgG4P、セリン228か

50

らプロリンへの突然変異には二重下線を付す。

IFPLAFFIYVPMNEQIVIGRLDEDIILPSSFERGSEVVIHWKYQDSYKVHSYYKGS
DPRYANRTSLFYNEIQNGNASLFFRRVSLLDDEGIYTCYVGTAIQVITNKVVLKVG
VFLTPVMKYEKRNTNSFLICSVLSVYPRPIITWKMDNTPISENNMEETGSLDSFS
INSPLNITGSNSSYECTIENSLLKQTWTGRWTMKDGLHKMQSEHVSLS
QPVNDYFSPNQDFKVTWSRMKSGTFSV
LAYYLSSSQNTIINESRFSWNKELINQSDFSMNLMDLNLSDSGEYLCN
ISSDEYTLTITHTVHVEPSQETESKYGPPCP~~CP~~CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

10

【 0 0 4 3 】

シグナル配列はネイティブシグナル配列であり得る（配列番号 2 9 ）

MKAQTALSFFLILITSLSGSQG

【 0 0 4 4 】

融合タンパク質は核酸配列（配列番号 2 5 ）によってコードされ得る。

20

atgaaggcccagaccgcccctgtccttcttctctgatcctgatcacctccctgtccggcagcca
 ggaatcttccctctggccttcttcatctacgtgccatgaacgagcagatcgtgatcggcc
 ggctggacgaggatattatcctgcccctccagcttcgagcggggctccgaggtcgtgatccac
 tggaaagtaccaggactcctacaaggtgcaactcctactacaagggtccgaccacctggaatc
 ccaggaccccagatacgccaaccggaccagcctgttctacaacgagatccagaacggcaacg
 cctccctgttcttccggcgagtgtccctgctggatgagggcatctacacctgttacgtgggc
 accgccatccaagtgatccaacaaggtgggtgctgaaagtggcggtgttccctgacccccgt
 gatgaagtacgagaagcggaaatccaactcttctctgatctgctccgtgctgtccgtgtacc
 ctccggccatcatcacctggaagatggacaacacccccatctccgagaacaacatggaagag
 acaggctccctggactccttctccatcaactccccctgaacattaccggctccaactcctc
 ctacgagtgcaccatcgagaactccctgctgaagcagacctggaccggcagatggactatga
 aggacggcctgcacaagatgcagtcggagcagctgtccctgtcctgccagcccgtgaacgac
 tacttcagcccccaaccaggacttcaaagtgacctgggtcccggatgaagtccggcaccttcag
 cgtgctggcctactacctgtccagctcccagaacacccatcatcaacgagtcctcggttctcct
 ggaacaaagagctgatcaaccagtcggacttctccatgaacctgatggacctgaacctgtcc
 gacagcggcgagtagctgtgcaacatctccagcagcagtagtacacctgctgacctccacac
 cgtgcacgtggaacctcccaggaaaccgagcttaagtagccctccctgccaccttgtc
 ccgcccctgaatttctggcgaccctctgtgttctctgttcccccaagcccaggacacc
 ctgatgatctcccggacccccgaagtgacatgctgggtggatgtgtcccaggaagatcc
 cgaggtgcagttcaattggtacgtggacggcggtggaagtgcacaacgccaagaccaagccc
 gagaggaacagttcaactccacctaccgggtgggtgtctgtgctgacctgctgcaccaggac
 tggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccagctccatcga
 aaagaccatctccaaggccaagggccagccccgggaaccccaggtgtacacactgcctccaa
 gccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccc
 tccgatatcgccgtggaatgggagtcacaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccc
 ccctgtgctggactccgacggctcttcttctctgtactcccgcctgacctggacaagtcca
 gatggcaggaaggcaacgtgttctcctgcagcgtgatgcacgagggcctgcacaaccactac
 acccagaagtccctgagcctgtcccccggtga

10

20

30

【 0 0 4 5 】

発現が広範囲にわたるヒト B 7 - H 4 とは対照的に、ヒト B 7 - H 5 は、発現が限定されている（たとえば、腸、腎臓、肺、上皮細胞およびリンパ球での発現）ことが見出されている。ヒト HHLA 2 は、B 7 . 1 および B 7 . 2 の近傍の染色体 3 q 1 3 . 3 3 上に見出されている。B 7 - H 5 は、マクロファージ上で構成的に発現され、樹状細胞（DC）上で誘導される。

【 0 0 4 6 】

40

B . C D 2 8 H

本明細書その他において H 7 C R と呼ばれる C D 2 8 H は、B 7 - H 5 のカウンター受容体である。したがって、C D 2 8 H および H 7 C R という用語は、本明細書においては、交換可能な用語として使用される。本明細書で使用する場合、「ネイティブ C D 2 8 H」という用語は（また「ネイティブ H 7 C R」も）、天然に存在する B 7 - H 7 またはその変異体のカウンター受容体をいう。C D 2 8 H は、T 細胞、NK 細胞および形質細胞様樹状細胞により発現する。ヒト C D 2 8 H ポリペプチドは、そうでなければ、文献 / データベース中で膜貫通および免疫グロブリンドメイン含有 2（T M I G D 2）と呼ばれるが（Rahimi, N. et al. (Epub 2012 Mar 14) 「Identification Of IGPR-1 As A Novel Adhesion

50

M o l e c u l e I n v o l v e d I n A n g i o g e n e s i s ,」 M o l e c . B i o l . C e l l . 2 3 (9) : 1 6 4 6 - 1 6 5 6)、C D 2 8 H の機能はこれまでに解明されなかった。こうしたネイティブC D 2 8 H分子のアミノ酸配列に対する受託番号の非限定例としては、以下のものが挙げられる：Q 9 6 B F 3 - 1 (ヒト (h o m o s a p i e n s))、Q 9 6 B F 3 - 2 (ヒト (h o m o s a p i e n s))、N P _ 6 5 3 2 1 6 . 1 (G I : 2 1 3 8 9 4 2 9 ; ヒト (h o m o s a p i e n s)) および N P _ 6 5 3 2 1 6 . 2 (G I : 2 8 1 3 0 6 8 3 8 ; ヒト (h o m o s a p i e n s))。ネイティブC D 2 8 H分子の代表的なアミノ酸配列 (Q 9 6 B F 3 - 2) を、配列番号7として以下に示す。

```

MGSPGMVLGL LVQI WALQEA SLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT
AWERLRVKWT KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD
PVSLNHS GAY VCWAAVEIPE LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NRNRIASFPG
FLFVLLGVGS MGVA AIVWGA WFWGRRSCQQ RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR
GAPKKS EDCS GEGKDQRGQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP CPSRPRCPSF
RPGHPVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGF PKVG EE

```

10

【 0 0 4 7 】

ヒトC D 2 8 H (配列番号7) をコードするD N A配列 (配列番号8) は、以下のとおりである。

```

atggggtccc cgggcatggt gctgggcctc ctggtgcaga tctgggccct
gcaagaagcc tcaagcctga gcgtgcagca ggggcccaac ttgctgcagg
tgaggcaggg cagtcaggcg accctggtct gccagggtga ccaggccaca
gcctgggaac ggctccgtgt taagtggaca aaggatgggg ccatcctgtg
tcaaccgtac atcaccaacg gcagcctcag cctggggggtc tgcgggcccc
agggacggct ctectggcag gcacccagcc atctcaccct gcagctggac
cctgtgagcc tcaaccacag cggggcgtac gtgtgctggg cggccgtaga
gattcctgag ttggaggagg ctgagggcaa cataacaagg ctctttgtgg
accagatga cccacacag aacagaaacc ggatcgcaag cttcccagga
ttcctcttcg tgctgctggg ggtgggaagc atgggtgtgg ctgcgatcgt
gtggggtgcc tggttctggg gccgccgag ctgccagcaa agggactcag
gtaacagccc aggaaatgca ttctacagca acgtcctata cgggccccgg
ggggcccaa agaagagtga ggactgctct ggagagggga aggaccagag
gggccagagc atttattcaa cctccttccc gcaaccggcc ccccgccagc
cgcacctggc gtcaagacc tgccccagcc cgagaccctg ccccagcccc
aggcccggcc accccgtctc tatggtcagg gtctctccta gaccaagccc
caccagcag ccgaggccaa aagggttccc caaagtggga gagggag

```

20

30

【 0 0 4 8 】

C . 定義

本明細書で使用する場合、ある分子が第2の分子に「免疫特異的に結合する」ことができるとされるのは、そうした結合が抗体に対応する抗原に対して抗体の特異性および親性を示す場合である。抗体が抗原 (特に、抗原B 7 - H 5) の標的領域または立体構造 (「エピトープ」) に「免疫特異的に結合する」ことができるとされるのは、そうした結合が免疫グロブリン分子の抗原認識部位を含む場合である。特定の抗原に免疫特異的に結合する抗体は、たとえば、イムノアッセイ、B I A C O R E (登録商標) アッセイまたは当該技術分野において公知の他のアッセイで判定して、他の抗原が抗原認識部位により認識される配列または立体構造に類似性のある程度有する場合、より低い親和性を持つ他の抗原に結合することもあるが、まったく無関係の抗原には結合しないと考えられる。ただし、抗体 (およびその抗原結合フラグメント) は、他の抗原と交差反応しないことが好ましい。また、抗体は、Fc領域など、抗原認識部位を含まない分子の他の領域/ドメインの結合ドメインによって、免疫特異的でない形でFcR受容体など他の分子に結合することができる。

40

【 0 0 4 9 】

結合または示された効果の文脈で使用する「実質的に」という用語は、観察された効果

50

が生理学上または治療上意味があることを表すことを意図している。したがって、たとえば、遮断の程度が生理学上または治療上意味がある場合、分子はB7-H5の活性を実質的に遮断することができる（たとえば、そうした程度が、60%超完全、70%超完全、75%超完全、80%超完全、85%超完全、90%超完全、95%超完全、または97%超完全である場合）。同様に、ある分子が別の分子と実質的に同じ免疫特異性および/または特性を有するとされるのは、そうした免疫特異性および特性が、60%超同一、70%超同一、75%超同一、80%超同一、85%超同一、90%超同一、95%超同一、または97%超同一である場合である。

【0050】

本明細書で使用する場合、「被検体」という用語は、非霊長類（たとえば、雌ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット等）および霊長類（たとえば、サルおよびヒト）、最も好ましくはヒトなど、哺乳動物を意味することを意図している。「患者」という用語は、診断、治療または予防を目的として、本発明の組成物を投与される被験体を意味することを意図している。

【0051】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、「可変領域」抗原認識部位を有する免疫グロブリン分子を意味することを意図している。「可変領域」という用語は、免疫グロブリンのそうしたドメインと、抗体により広く共有されるドメイン（抗体のFcドメインなど）を区別することを意図している。可変領域は、その残基が抗原結合を担う「超可変領域」を含む。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」のアミノ酸残基（すなわち、典型的には軽鎖可変ドメインの約24~34残基（L1）、50~56残基（L2）および89~97残基（L3）と、重鎖可変ドメインの約27~35残基（H1）、50~65残基（H2）および95~102残基（H3）；Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）および/または「超可変ループ」のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインの26~32（L1）残基、50~52（L2）残基および91~96（L3）残基と、重鎖可変ドメインの26~32（H1）、53~55（H2）および96~101（H3）；Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917）を含む。「フレームワーク領域」すなわち「FR」残基は、本明細書で定義したような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。抗体という用語は、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体（たとえば、Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; 国際公開第94/04678号パンフレットおよび国際公開第94/25591号パンフレット; 米国特許第6,005,079号明細書を参照）、一本鎖Fv (scFv)（たとえば、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照）、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、イントラボディおよび抗イデオタイプ（抗Id）抗体（たとえば、開示されるB7-H5抗体に対する抗Idおよび抗-抗Id抗体）を含む。特に、そうした抗体は、任意の種類（たとえば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（たとえば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂）またはサブクラスの免疫グロブリン分子を含む。

【0052】

本明細書で使用する場合、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語は、抗体の相補

10

20

30

40

50

性決定領域（「CDR」）と、任意に抗体の「可変領域」抗原認識部位を含むフレームワーク残基とを含み、抗原に免疫特異的に結合する能力を示す抗体の1つまたは複数の部分をいう。そうしたフラグメントは、Fab'、F(ab')₂、Fv、一本鎖（ScFv）およびこれらのミュータント、天然変異体、ならびに抗体の「可変領域」抗原認識部位と異種タンパク質（たとえば、トキシン、別の抗原の抗原認識部位、酵素、受容体または受容体リガンド等）とを含む融合タンパク質を含む。本明細書で使用する場合、「フラグメント」という用語は、少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも100個の連続するアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、少なくとも200個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドをいう。

【0053】

ヒト抗体、キメラ抗体または抗ヒトB7-H5抗体のヒト化誘導体は、ヒトにおけるインビボでの使用に特に好ましいものであるが、しかしながら、マウス抗体または他の種の抗体も多く用途（たとえば、インビトロまたはインサイツ検出アッセイ、インビボでの急性使用等）に有利に利用することができる。ヒト化抗体は、1つまたは複数の非ヒトCDRにアミノ酸残基の置換、欠失または付加を含むことができる。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体と比較すると、結合が実質的に同じでも、結合がより強くて、あるいは結合がより弱くてよい。特定の実施形態では、CDRの1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている（すなわち、変異している）。完全なヒト抗体は、ヒト被験者の治療処置に特に望ましい。

【0054】

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法など当該技術分野において公知の種々の方法により作製することができる（米国特許第4,444,887号明細書および同第4,716,111号明細書；ならびに国際公開第98/46645号パンフレット、国際公開第98/50433号パンフレット、国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第98/16654号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレット、国際公開第96/33735号パンフレットおよび国際公開第91/10741号パンフレットを参照）。ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて製造してもよい。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子の複合体は、ランダムにまたは相同組換えによりマウス胚性幹細胞に導入することができる。あるいは、ヒト重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域をマウス胚性幹細胞に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別に非機能的にしても、あるいは同時に非機能的にしてもよい。特に、J_H領域がホモ接合性に欠失すると、内因性抗体の産生が妨げられる。改変された胚性幹細胞は、増殖させ、胚盤胞に微量注入してキメラマウスを作製する。次いでキメラマウスを交配して、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を得る。このトランスジェニックマウスを、選択された抗原、たとえば、B7-H5ポリペプチドの全部または一部で従来の方法を用いて免疫する。従来ハイブリドーマ技術を用いれば、免疫したトランスジェニックマウスから、抗原に対するモノクローナル抗体を得ることができる（たとえば、米国特許第5,916,771号明細書を参照）。トランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞分化において再編成し、その後クラススイッチおよび体細胞突然変異が起こる。このように、こうした技術を用いて、治療上有用なIgG抗体、Ig

10

20

30

40

50

A抗体、IgM抗体およびIgE抗体を作製することができる。このヒト抗体の作製に関する技術の概要については、LonbergおよびHuszar（その全体を本明細書に援用する1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93）を参照されたい。このヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体に関する技術の詳細な考察と、そうした抗体を作製するためのプロトコールに関しては、たとえば、本明細書にその全体を援用する国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレットおよび国際公開第96/33735号パンフレット；ならびに米国特許第5,413,923号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,814,318号明細書および同第5,939,598号明細書を参照されたい。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Medarex (Princeton, NJ) などの会社は、上述の技術と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体の提供に従事している場合がある。

10

【0055】

「キメラ抗体」は、非ヒト抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体などの分子であって、抗体の様々な部分が、異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。キメラ抗体を作製する方法は、当該技術分野において知られている。たとえば、Morrisson, 1985, Science 229: 1202; Oiet al., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; ならびに米国特許第6,311,415号明細書、同第5,807,715号明細書、同第4,816,567号明細書および同第4,816,397号明細書を参照されたい。非ヒト種由来の1つまたは複数のCDRと、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを含むキメラ抗体は、当該技術分野において知られる種々の技術、たとえば、CDR移植法（欧州特許第239,400号明細書；国際公開第91/09967号パンフレット；ならびに米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書および同第5,585,089号明細書）、ベニヤリングまたはリサーフェイシング（resurfacing）（欧州特許第592,106号明細書；欧州特許第519,596号明細書；Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7: 805; および Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969）、および鎖シャフリング（米国特許第5,565,332号明細書）などを用いて作製することができる。

20

30

【0056】

本発明は特に「ヒト化抗体」に関する（たとえば、欧州特許第239,400号明細書、欧州特許第592,106号明細書および欧州特許第519,596号明細書；国際公開第91/09967号パンフレットおよび国際公開第93/17105号パンフレット；米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書、同第5,565,332号明細書、同第5,585,089号明細書、同第5,766,886号明細書および同第6,407,213号明細書；ならびにPadlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska et al., 1994, PNAS 91: 969-973; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13: 353-360; Morea et al., 2000, Methods 20: 267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 10678-10684; Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9: 895-904; Couto et al., 1995, Cancer Res.

40

50

55 (23 Supp) : 5973s - 5977s ; Couto et al. , 1995 , Cancer Res . 55 : 1717 - 22 ; Sandhu , 1994 , Gene 150 : 409 - 10 ; Pedersen et al. , 1994 , J . Mol . Biol . 235 : 959 - 973 ; Jones et al. , 1986 , Nature 321 : 522 - 525 ; Reichmann et al. , 1988 , Nature 332 : 323 - 329 ; および Presta , 1992 , Curr . Op . Struct . Biol . 2 : 593 - 596などを参照されたい)。本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（通常、マウスまたはラット）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRを含む免疫グロブリンをいう。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンを「ドナー」と呼び、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「アクセプター」と呼ぶ。定常領域は存在しなくてもよいが、存在する場合、定常領域はヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、好ましくは約95%以上同一でなければならない。このため、おそらくCDRを除くヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。たとえば、ヒト化抗体は、典型的なキメラ抗体を包含しないと考えられる。たとえば、キメラ抗体の全可変領域は非ヒトであるためである。ドナー抗体は、「ヒト化」のプロセスにより「ヒト化」されてきたと言われる。得られるヒト化抗体が、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合すると予想されるからである。ほとんどの場合、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域残基が、非ヒト種（ドナー抗体）、たとえばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類由来の、所望の特異性、親和性および能力を有する超可変領域残基で置き換えられている。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために施される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全部含むもので、超可変領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に対応し、FRの全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のFRである。また、ヒト化抗体は、任意選択により、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはアミノ酸残基の置換、欠失または付加（すなわち、突然変異）の導入により変化したFc R I I Bポリペプチドに免疫特異的に結合するヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部を含む。

【0057】

好ましいヒトアクセプターのフレームワーク配列をコードするDNA配列には、ヒト生殖系列VHセグメントVH1～18およびJH6と、ヒト生殖系列VLセグメントVK-A26およびJK4とに由来するFRセグメントがあるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、通常の組換えDNA技術を用いて1つまたは複数のCDRをフレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は天然のフレームワーク領域でも、あるいはコンセンサフレームワーク領域でもよく、好ましくはヒトフレームワーク領域である（たとえば、ヒトフレームワーク領域のリストに関するChothia et al. , 1998 , 「Structural Determinants In The Sequences Of Immunoglobulin Variable Domain ,」 J . Mol . Biol . 278 : 457 - 479を参照）。

【0058】

ヒト化抗体またはキメラB7-H5抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全部含んでもよく、CDR領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のCDR領域に対応し、フレームワーク領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリンコンセンサ配列のフレームワーク領域である。好ましくは、B7-H5抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部をさらに含む。B7-H5抗体の定常ドメインは、

抗体の想定される機能、特に必須である場合があるエフェクター機能に関連して選択してもよい。いくつかの実施形態では、B7-H5抗体の定常ドメインは、ヒトIgAドメイン、IgDドメイン、IgEドメイン、IgGドメインまたはIgMドメインである（または、それらを含む）。特定の実施形態では、ヒト化B7-H5抗体が治療用途を意図し、抗体エフェクター機能、たとえば抗体依存性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）活性を必要とする場合、ヒトIgG定常ドメイン、特にIgG1およびIgG3アイソタイプのヒトIgG定常ドメインを使用する。代替の実施形態では、B7-H5抗体が治療目的を意図し、抗体エフェクター機能を必要とする場合、IgG2およびIgG4アイソタイプを使用する。本発明は、米国特許出願公開第2005/0037000号明細書および同第2005/0064514号明細書に開示されているアミノ酸修飾など、抗体エフェクター機能を変化させる、1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むFc定常ドメインを包含する。

【0059】

いくつかの実施形態では、B7-H5抗体は、軽鎖と少なくとも重鎖の可変ドメインとの両方を含む。他の実施形態では、B7-H5抗体は、重鎖のCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域およびCH4領域の1つまたは複数を含んでもよい。抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEなど免疫グロブリンの任意のクラス、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄などの任意のアイソタイプから選択することができる。いくつかの実施形態では、定常ドメインは補体結合定常ドメインであり、抗体が細胞障害活性を示し、クラスは典型的にはIgG₁であることが望ましい。そうした細胞障害活性が望ましくない他の実施形態では、定常ドメインはIgG₂クラスのものであってもよい。B7-H5抗体は、2つ以上のクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化する特定の定常ドメインを選択することは、当業者の技術の範囲である。

【0060】

ヒト化抗体のフレームワーク領域およびCDR領域は、親配列に正確に一致する必要はなく、たとえば、少なくとも1つの残基の置換、挿入または欠失により、ドナーCDRまたはコンセンサフレームワークに変異を誘発して、その部位のCDR残基またはフレームワーク残基がコンセンサあるいはドナー抗体に一致しないようにしてもよい。ただし、そうした突然変異は、好ましくは大規模なものではない。通常、ヒト化抗体残基は、親フレームワーク領域（FR）配列およびCDR配列の残基と少なくとも75%、より頻繁には90%、最も好ましくは95%超一致する。ヒト化抗体は、当該技術分野において公知の様々な技術、以下に限定されるものではないが、CDR移植法（欧州特許第239,400号明細書；国際公開第91/09967号パンフレット；ならびに米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書および同第5,585,089号明細書）、ベニヤリング（veneer ing）またはリサーフィニング（resurfacing）（欧州特許第592,106号明細書および欧州特許第519,596号明細書；Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498；Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814；およびRoguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973）、鎖シャフリング（米国特許第5,565,332号明細書）および、たとえば、米国特許第6,407,213号明細書、同第5,766,886号明細書、同第5,585,089号明細書、国際公開第9317105号パンフレット、Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-25, Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13: 353-60, Morea et al., 2000, Methods 20: 267-79, Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 10678-84, Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9: 895-904, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55(23 Supp): 5973s-5977

s, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu, 1994, Gene 150:409-10, Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323およびPresta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596に開示されている技術を用いて作製することができる。多くの場合、フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるため、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換される。こうしたフレームワークの置換は、当該技術分野において周知の方法、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための、CDR残基とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、および特定の位置の特殊なフレームワーク残基を特定するための配列比較により確認される。(たとえば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号明細書;米国特許出願公開第2004/0049014号明細書および同第2003/0229208号明細書;米国特許第6,350,861号明細書;同第6,180,370号明細書;同第5,693,762号明細書;同第5,693,761号明細書;同第5,585,089号明細書;および同第5,530,101号明細書、ならびにRiechmann et al., 1988, Nature 332:323を参照)。

10

【0061】

本発明の方法に使用される抗体は、単一特異性であり得る。B7-H5に加えて免疫系の他の分子など、異なる標的に特異性を示す二重特異性抗体、三重特異性抗体、またはより多重の特異性抗体も対象となる。たとえば、そのような抗体は、B7-H5と、抗体が特定の細胞型または組織を標的とするのに重要な抗原(たとえば、治療している腫瘍の癌抗原に関連する抗原)との両方に結合することができる。他の実施形態では、そのような多重特異性抗体は、CTLA4、TIM3、TIM4、OX40、CD40、GITR、4-1-BB、CD27/CD70、ICOS、B7-H4、LIGHT、PD-1またはLAG3など、代替的または補足的免疫調節経路に関与する分子(受容体またはリガンド)に結合し、免疫調節効果をさらに弱める。さらに、多重特異性抗体は、急性および慢性免疫反応の両方の抑制的調節に特に関係し得るエフェクター分子、たとえばサイトカイン(たとえば、IL-7、IL-15、IL-12、IL-4、TGF-ベータ、IL-10、IL-17、IFN γ 、Flt3、Blys)およびケモカイン(たとえば、CCL21)などに結合してもよい。

20

30

【0062】

本発明の抗体は、たとえば、インビトロ合成、組換えDNA作製および同種のものなど、ポリペプチドの製造に有用な当該技術分野において公知のどのような方法により作製してもよい。好ましくは、抗体は、組換えDNA技術により作製する。B7-H5抗体は、組換え免疫グロブリン発現技術を用いて作製してもよい。ヒト化抗体を含む免疫グロブリン分子の組換え体の作製については、米国特許第4,816,397号明細書(Boss et al.)、米国特許第6,331,415号明細書および同第4,816,567号明細書(どちらもCabilly et al.)、英国特許第2,188,638号明細書(Winter et al.)、および英国特許第2,209,757号明細書に記載されている。ヒト化免疫グロブリンを含む免疫グロブリンの組換え発現の技術は、Goeddel et al., Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991)、およびBorreback, Antibody Engineering, W.H. Freeman (1992)でも確認することができる。組換え抗体の生成、設計および発現に関する追加情報は、Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993)で確認することができる。

40

【0063】

50

組換えキメラ B7 - H5 抗体を作製するための例示的方法は、a) 従来の分子生物学法により、抗体重鎖をコードし発現する発現ベクターであって、マウス抗ヒト B7 - H5 モノクローナル抗体の CDR および可変領域を、ヒト免疫グロブリンに由来する Fc 領域に融合した発現ベクターを構築することで、キメラ抗体重鎖発現用のベクターを作製すること； b) 従来の分子生物学法により、マウス抗ヒト B7 - H5 モノクローナル抗体の抗体軽鎖をコードし発現する発現ベクターを構築することで、キメラ抗体軽鎖発現用のベクターを作製すること； c) 従来の分子生物学法により発現ベクターを宿主細胞に導入して、キメラ抗体発現用のトランスフェクトされた宿主細胞を作製すること； および d) キメラ抗体を産生するように、トランスフェクト細胞を従来の細胞培養技術により培養することを含んでもよい。

10

【0064】

組換えヒト化 B7 - H5 抗体を作製するための例示的方法は、a) 従来の分子生物学法により、抗ヒト B7 - H5 重鎖をコードし発現する発現ベクターであって、ドナー抗体結合特異性の保持に必要とされている CDR および可変領域フレームワークの最小限の部分が非ヒト免疫グロブリン、たとえばマウス抗ヒト B7 - H5 モノクローナル抗体に由来し、抗体の残りの部分がヒト免疫グロブリンに由来する発現ベクターを構築することで、ヒト化抗体重鎖の発現用のベクターを作製すること； b) 従来の分子生物学法により、抗体軽鎖をコードし発現する発現ベクターであって、ドナー抗体結合特異性の保持に必要とされる CDR および可変領域フレームワークの最小限の部分が非ヒト免疫グロブリン、たとえばマウス抗ヒト B7 - H5 モノクローナル抗体に由来し、抗体の残りの部分がヒト免疫グロブリンに由来する発現ベクターを構築することで、ヒト化抗体軽鎖発現用のベクターを作製すること； c) 発現ベクターを従来の分子生物学法により宿主細胞に導入して、ヒト化抗体の発現用のトランスフェクトされた宿主細胞を作製すること； および d) ヒト化抗体を産生するように、トランスフェクト細胞を従来の細胞培養技術により培養することを含んでもよい。

20

【0065】

どちらの例示的な方法に関しても、そうした各発現ベクターを宿主細胞にコトランスフェクトしてもよく、各発現ベクターは、様々な選択可能なマーカーを含んでもよいが、重鎖コード配列および軽鎖コード配列以外は、同一であることが好ましい。この手順により、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドが同等に発現される。あるいは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを使用してもよい。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNA もしくはゲノム DNA または両方を含んでもよい。組換え B7 - H5 抗体の発現に使用する宿主細胞は、細菌細胞、たとえばエシエリキア・コリ (*Escherichia coli*) でも、あるいは一層好ましくは真核細胞 (たとえば、チャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) 細胞または HEK-293 細胞) でもよい。発現ベクターの選択は宿主細胞の選択によって異なり、選択された宿主細胞において所望の発現および制御特性を有するように選択してもよい。使用し得る他の細胞株として、CHO-K1、NSO および PER.C6 (Crucell, Leiden, Netherlands) があるが、これに限定されるものではない。

30

【0066】

当業者によく知られている技術により、上記の抗体のいずれかを用いて抗イディオタイプ抗体を生成してもよい (たとえば、Greenspan, N. S. et al. (1989) 「Idiotypes: Structure And Immunogenicity,」 FASEB J. 7: 437 - 444; および Nisino, A. (1991) 「Idiotypes: Concepts And Applications,」 J. Immunol. 147 (8): 2429 - 2438 を参照)。

40

【0067】

上記の抗体のいずれの結合特性も、必要に応じて、そうした所望の特性を示す変異体をスクリーニングすることによりさらに改良してもよい。たとえば、そうした抗体は、当該技術分野において公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することができる。

50

ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインがそれをコードするポリヌクレオチド配列を持つファージ粒子の表面上に提示される。特定の実施形態では、そうしたファージを利用して、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（たとえば、ヒトまたはマウス）から発現した抗原結合ドメイン、たとえばFabおよびFvまたはジスルフィド結合安定化Fvを提示させてもよい。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、たとえば、標識抗原、あるいは、固体表面もしくはビーズに結合または捕捉された抗原を用いて選択または特定することができる。こうした方法に使用されるファージは典型的にはfdおよびM13などの繊維状ファージである。抗原結合ドメインは、ファージ遺伝子IIITタンパク質あるいはファージ遺伝子VIIITタンパク質との組換え融合タンパク質として発現される。本発明の免疫グロブリンまたはそのフラグメントの製造に使用できるファージディスプレイ法の例として、Brinkman, U. et al. (1995) 「Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments,」 J. Immunol. Methods, 182: 41-50, 1995; Ames, R. S. et al. (1995) 「Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins,」 J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough, C. A. et al. (1994) 「Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments,」 Eur. J. Immunol., 24: 952-958, 1994; Persic, L. et al. (1997) 「An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries,」 Gene, 187: 9-18; Burton, D. R. et al. (1994) 「Human Antibodies From Combinatorial Libraries,」 Adv. Immunol. 57: 191-280; 国際公開第92/001047号パンフレット; 国際公開第90/02809号パンフレット; 国際公開第91/10737号パンフレット; 国際公開第92/01047号パンフレット; 国際公開第92/18619号パンフレット; 国際公開第93/11236号パンフレット; 国際公開第95/15982号パンフレット; 国際公開第95/20401号パンフレット; および米国特許第5,698,426号明細書; 同第5,223,409号明細書; 同第5,403,484号明細書; 同第5,580,717号明細書; 同第5,427,908号明細書; 同第5,750,753号明細書; 同第5,821,047号明細書; 同第5,571,698号明細書; 同第5,427,908号明細書; 同第5,516,637号明細書; 同第5,780,225号明細書; 同第5,658,727号明細書; 同第5,733,743号明細書および同第5,969,108号明細書に開示されているものがある。

【0068】

上記の参考文献に記載されているように、ファージの選択後、抗体をコードする領域をファージから単離し、これを使用して全抗体、たとえばヒト化抗体または他の任意の所望のフラグメントを作製し、たとえば、以下に詳述するように所望の宿主、たとえば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌で発現させることができる。また、たとえば、当該技術分野において公知の方法により、Fabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントを組換えにより作製する技術を利用してよい（たとえば国際公開第92/22324号パンフレット; Mullinax, R. L. et al. (1992) 「Expression Of A Heterodimeric

Fab Antibody Protein In One Cloning Step,」BioTechniques, 12(6):864-869;およびSawai et al.(1995)「Direct Production Of The Fab Fragment Derived From The Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction And cDNA Expression Vectors,」Am.J.Reprod.Immunol.34:26-34;およびBetter, M. et al.(1988)「Escherichia coli Secretion Of An Active Chimeric Antibody Fragment,」Science 240:1041-1043に開示されている方法)。一本鎖Fvおよび抗体の作製に使用できる技術の例として、米国特許第4,946,778号明細書および同第5,258,498号明細書;Houston, J.S. et al.(1991)「Protein Engineering Of Single-Chain Fv Analogs And Fusion Proteins,」Methods in Enzymology 203:46-88;Shu, L. et al.,「Secretion Of A Single-Gene-Encoded Immunoglobulin From Myeloma Cells,」Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)90:7995-7999;およびSkerra, A. et al.(1988)「Assembly Of A Functional Immunoglobulin Fv Fragment In Escherichia coli,」Science 240:1038-1040に記載されているものが挙げられる。

【0069】

ファージディスプレイ技術は、B7-H5に対する抗体の親和性を高めるために使用してもよい。この技術は、開示されるコンビナトリアル法に使用し得る高親和性抗体を得るのに有用であると考えられる。この技術は、親和性成熟と呼ばれ、変異誘発またはCDRウォーキング、およびそうした受容体もしくはリガンド(またはそれらの細胞外ドメイン)またはその抗原性フラグメントを用いた再選択を利用して、最初の抗体または親抗体と比較すると、より高い親和性で抗原に結合する抗体を特定する(たとえば、Glaser, S.M. et al.(1992)「Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,」J.Immunol.149:3903-3913を参照)。単一のヌクレオチドではなく全コドンに変異を誘発すると、アミノ酸突然変異をセミランダムに導入したレパートリーが得られる。各々が単一のCDRに単一のアミノ酸変化を含み、かつCDR残基ごとに可能なそれぞれのアミノ酸置換を示す変異体を含む、変異体クローンのプールからなるライブラリーを構築してもよい。抗原に対する結合親和性が増加したミュータントは、固定化したミュータントを標識抗原と接触させることによりスクリーニングすることができる。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いれば、抗原に対するアビディティーが向上したミュータント抗体を特定することができる(たとえば、ELISA)(たとえば、Wu, H. et al.(1998)「Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab,」Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)95(11):6037-6042;Yelton, D.E. et al.(1995)「Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,」J.Immunol.155:1994-2004を参照されたい)。軽鎖にランダム変異を導入するCDRウォーキングを使用してもよい(Schier et al.(1996)「Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity De

termining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,」J. Mol. Biol. 263:551-567を参照)。

【0070】

本発明は、したがって、ランダム変異誘発を使用して、改良されたCDRを特定することを想定している。あるいは、ファージディスプレイ技術を、CDR親和性を増加（または減少）させるために使用することができる。この技術は、親和性成熟と呼ばれ、変異誘発または「CDRウォーキング」、および標的抗原もしくはその抗原性フラグメントを用いた再選択を利用して、最初の抗体または親抗体と比較すると、より高い（またはより低い）親和性で抗原に結合するCDRを有する抗体を特定する（たとえば、Glaser, S. M. et al. (1992)「Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,」J. Immunol. 149:3903-3913を参照)。単一のヌクレオチドではなく全コドンに変異を誘発すると、アミノ酸突然変異をセミランダムに導入したレパートリーが得られる。各々が単一のCDRに単一のアミノ酸変化を含み、かつCDR残基ごとに可能なそれぞれのアミノ酸置換を示す変異体を含む、変異体クローンのプールからなるライブラリーを構築してもよい。抗原に対する結合親和性が増加（または減少）したミュータントは、固定化したミュータントを標識抗原と接触させることによりスクリーニングすることができる。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いれば、抗原に対するアビディティーが向上（低下）したミュータント抗体を特定することができる（たとえば、ELISA）(Wu, H. et al. (1998)「Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95(11):6037-6042; Yelton, D. E. et al. (1995)「Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,」J. Immunol. 155:1994-2004を参照されたい)。軽鎖にランダム変異を導入するCDRウォーキングを使用してもよい(Schier et al. (1996)「Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,」J. Mol. Biol. 263:551-567を参照)。

【0071】

そうした親和性成熟を達成するための方法は、たとえば、Krause, J. C. et al. (2011)「An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody,」MBio. 2(1)pii:e00345-10. doi:10.1128/mbio.00345-10; Kuan, C. T. et al. (2010)「Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,」Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al. (2010)「Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,」J. Mol. Biol. 401(1):84-96; Montgomery, D. L. et al. (2009)「Affinity Maturation And Characterizat

10

20

30

40

50

ion Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41,」MABS 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009)「Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth,」Virology 393(1):112-119; Finlay, W. J. et al. (2009)「Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions,」J. Mol. Biol. 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009)「Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development,」Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008)「In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,」Mol. Immunol. 46(1):135-144; および Barderas, R. et al. (2008)「Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034に記載されている。

【0072】

本発明は、特に、上記抗体およびその抗原結合フラグメントのいずれかの「誘導体」の作製および使用を想定している。

【0073】

「誘導体」という用語は、抗原に免疫特異的に結合するが、「親」（または野生型）分子に対して1、2、3、4、5またはそれを上回るアミノ酸の置換、付加、欠失または修飾を含む抗体またはその抗原結合フラグメントをいう。そうしたアミノ酸の置換または付加は、天然の（すなわち、DNAによりコードされた）アミノ酸残基を導入しても、あるいは非天然のアミノ酸残基を導入してもよい。「誘導体」という用語は、たとえば、抗体1、3、4、5または7、8のいずれかのキメラ変異体またはヒト化変異体、ならびにたとえばエフェクター特性または結合特性が増強または障害された変異Fc領域を有する抗体等を形成させるように改変されたCH1、ヒンジ、CH2、CH3またはCH4の領域を有する変異体を包含する。「誘導体」という用語は、非アミノ酸修飾、たとえば、グリコシル化（たとえば、マンノース、2-N アセチルグルコサミン、ガラクトース、フクトース（fucose）、グルコース、シアル酸、5-N-アセチルノイラミン酸、5-グリコルノイラミン酸等の含量の変更）、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結等を施し得るアミノ酸をさらに包含する。いくつかの実施形態では、変化させた糖鎖修飾により、抗体の可溶化、細胞内輸送および抗体の分泌の促進、抗体形成の促進、立体構造の安定性および抗体のエフェクター機能のうち1つまたは複数調節される。特定の実施形態では、変化させた糖鎖修飾により、糖鎖修飾がない抗体と比較して抗体のエフェクター機能が増強される。抗体のエフェクター機能を変化させる糖鎖修飾は、当該技術分野において周知である（たとえば、Shields, R. L. et

al. (2002) 「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fc gamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.」 J. Biol. Chem. 277 (30) : 26733 - 26740 ; Davies J. et al. (2001) 「Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII,」 Biotechnology & Bioengineering 74 (4) : 288 - 294 を参照)。糖鎖量を変化させる方法は当業者に公知であり、たとえば、Wallick, S. C. et al. (1988) 「Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha(1 - - - 6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen,」 J. Exp. Med. 168 (3) : 1099 - 1109 ; Tao, M. H. et al. (1989) 「Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region,」 J. Immunol. 143 (8) : 2595 - 2601 ; Routledge, E. G. et al. (1995) 「The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody,」 Transplantation 60 (8) : 847 - 53 ; Elliott, S. et al. (2003) 「Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering,」 Nature Biotechnol. 21 : 414 - 21 ; Shields, R. L. et al. (2002) 「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fc gamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.」 J. Biol. Chem. 277 (30) : 26733 - 26740) を参照されたい。

【0074】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は誘導体である。こうしたヒト化抗体は、1つまたは複数の非ヒトCDRにアミノ酸残基の置換、欠失または付加を含む。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体に比較すると、結合が実質的に同じでも、結合がより良くても、あるいは結合がより悪くてもよい。特定の実施形態では、CDRの1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている（すなわち、変異している）。

【0075】

誘導体抗体または抗体フラグメントは、以下に限定されるものではないが、特異的な化学的切断、アセチル化、製剤、ツニカマイシンの代謝合成等の、当業者に公知の技術を用いて化学修飾により修飾してもよい。一実施形態では、抗体誘導体は、親抗体と類似または同一の機能を有する。別の実施形態では、抗体誘導体は、親抗体と比較して活性の変化を示す。たとえば、誘導体抗体（またはそのフラグメント）は親抗体より、そのエピトープに密接に結合してもよいし、あるいはタンパク質分解に対する耐性が強くてもよい。

【0076】

誘導体化抗体を用いて、哺乳動物、好ましくはヒトにおける親抗体の半減期（たとえば

、血清中半減期)を変化させてもよい。好ましくは、そうした変化の結果、半減期は15日を超える、好ましくは20日を超える、25日を超える、30日を超える、35日を超える、40日を超える、45日を超える、2ヶ月を超える、3ヶ月を超える、4ヶ月を超える、または5ヶ月を超える。哺乳動物、好ましくはヒトにおける、本発明のヒト化抗体またはそのフラグメントの半減期の延長の結果、哺乳動物における前記抗体または抗体フラグメントの血清中力価が上昇し、したがって、前記抗体または抗体フラグメントの投与頻度が減少する、および/または、投与される前記抗体または抗体フラグメントの濃度が低下する。インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術により作製することができる。たとえば、インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に参与すると判定されたアミノ酸残基を修飾する(たとえば、置換、欠失または付加する)ことにより作製することができる。ヒト化B7-H5抗体は、生物学的半減期を延長するように操作してもよい(たとえば米国特許第6,277,375号明細書を参照)。たとえば、ヒト化B7-H5抗体は、Fc-ヒンジドメインにおいてインビボまたは血清中半減期を延長するように操作してもよい。

10

【0077】

インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、前記抗体または抗体フラグメントにポリマー分子、たとえば高分子量ポリエチレングリコール(PEG)を結合することにより作製することができる。PEGは、多機能リンカーを用いてあるいは用いずに、前記抗体または抗体フラグメントのN末端またはC末端にあるいはリジン残基上にある-アミノ基を介して、PEGを部位特異的にコンジュゲートすることにより前記抗体または抗体フラグメントに結合することができる。生物活性の低下を最小限にとどめる直鎖または分岐ポリマー誘導体化を使用する。コンジュゲーションの程度は、SDS-PAGEおよび質量分析法により詳細にモニターして、PEG分子の抗体への適切なコンジュゲーションを確かなものにする。未反応PEGは、たとえば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーにより抗体-PEGコンジュゲートから分離することができる。

20

【0078】

また、B7-H5抗体は、実質的に免疫原性反応を伴わない、哺乳動物の循環系に注入してもよい組成物を得るため、Davis et al. (米国特許第4,179,337号明細書を参照)に記載された方法およびカップリング剤により修飾してもよい。

30

【0079】

一実施形態は、ヒト化B7-H5抗体のフレームワーク残基の修飾を包含する。フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるため、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換してもよい。こうしたフレームワークの置換は、当該技術分野において周知の方法、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための、CDR残基とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、および特定の位置の特殊なフレームワーク残基を特定するための配列比較により確認される。(たとえば、米国特許第5,585,089号明細書;およびRiechmann, L. et al. (1988)「Reshaping Human Antibodies For Therapy,」Nature 332:323-327を参照)。

40

【0080】

なお別の実施形態は、異種分子(すなわち、無関係の分子)に組換え技術で融合させたまたは化学的にコンジュゲートした(共有結合および非共有結合の両方)抗ヒトB7-75抗体(一層好ましくは、ヒト化抗体)およびその抗原結合フラグメントを包含する。融合は、必ずしも直接でなくてもよく、リンカー配列を介して行ってもよい。

【0081】

一実施形態では、そうした異種分子は、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも20個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも80個のアミノ酸、少なくとも90個のアミノ酸または少なくとも100個のアミノ

50

酸を有するポリペプチドである。あるいは、そうした異種分子は、酵素でも、ホルモンでも、細胞表面受容体でも、薬剤部分、たとえば、トキシン（たとえばアブリン、リシンA、シュードモナス（*Pseudomonas*）外毒素（すなわち、PE-40）、ジフテリア毒素、リシン、ゲロニンもしくはアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質）、タンパク質（たとえば腫瘍壊死因子、インターフェロン（たとえば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン）、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子またはアポトーシス剤（たとえば、腫瘍壊死因子- α 、腫瘍壊死因子- β ）、生物学的応答調節剤（たとえば、リンホカイン（たとえば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」））、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）もしくはマクロファージコロニー刺激因子、（「M-CSF」））、または増殖因子（たとえば、成長ホルモン（「GH」））、細胞毒（たとえば、細胞増殖抑制剤もしくは殺細胞薬、たとえばパクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらのアナログまたはホモログ）、代謝拮抗薬（たとえば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（たとえば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、BiCNU（登録商標）（カルムスチン；BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（たとえば、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（たとえば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））、または有糸分裂阻害薬（たとえば、ビンクリスチンおよびピンブラスチン）でもよい。

【0082】

そうした治療部分を抗体にコンジュゲートする技術は、よく知られている。たとえば、Arnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」, in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; および Thorpe et al. (1982) 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugate

10

20

30

40

50

tes」、Immunol. Rev. 62: 119 - 158を参照されたい。

【0083】

一実施形態では、B7 - H5抗体またはB7 - H5融合分子はFc部分を含む。そうした分子のFc部分は、たとえばエフェクター機能、半減期の制御、組織への到達性の向上のため、安定性などの生物物理学的特徴の増強のため、さらに製造効率の改善（および費用削減）のため、アイソタイプまたはサブクラスが異なってもよいし、キメラまたはハイブリッドでもよいし、および/または、修飾してもよい。開示された融合タンパク質の構築に有用な多くの修飾、およびそれを行う方法については当該技術分野において公知であり、たとえばMueller, J. P. et al. (1997)「Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,」Mol. Immun. 34(6): 441 - 452、Swann, P. G. (2008)「Considerations For The Development Of Therapeutic Monoclonal Antibodies,」Curr. Opin. Immun. 20: 493 - 499 (2008)、およびPresta, L. G. (2008)「Molecular Engineering And Design Of Therapeutic Antibodies,」Curr. Opin. Immun. 20: 460 - 470を参照されたい。いくつかの実施形態では、Fc領域は天然のIgG1、IgG2またはIgG4のFc領域である。いくつかの実施形態では、Fc領域はハイブリッド、たとえばIgG2/IgG4のFc定常領域からなるキメラである。Fc領域の修飾には、Fc受容体および補体への結合を防止するように修飾されたIgG4、1つまたは複数のFc受容体への結合を改善するように修飾されたIgG1、エフェクター機能を最小限に抑えるように修飾されたIgG1（アミノ酸変化）、グリカンを変化させた/含まないIgG1（典型的には発現宿主の変更による）、およびFcRnへのpH依存性結合を変化させたIgG1、および安定性を増強するためにヒンジ領域のアミノ酸残基番号228のセリンをプロリンに変化させた（S228P）IgG4があるが、これに限定されるものではない。Fc領域は全ヒンジ領域を含むことも、あるいは全ヒンジ領域より小さい領域を含むこともある。

10

20

30

【0084】

非ホジキンリンパ腫またはワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症用のリツキシマブ（CD20に対するキメラマウス/ヒトIgG1モノクローナル抗体）で処置した患者の治療結果は、ヒトIgG1のFcドメインに対する固有の親和性が異なるFc受容体の対立遺伝子変異体の個々の発現に相関した。特に、低親和性活性化Fc受容体CD16A（FcRIIA）の高親和性対立遺伝子を持つ患者は、より高い反応率を示し、非ホジキンリンパ腫の場合、無増悪生存期間が改善した。別の実施形態では、Fcドメインは、低親和性抑制性Fc受容体CD32B（FcRIIB）への結合を抑え、低親和性活性化Fc受容体CD16A（FcRIIA）への野生型レベルの結合を保持するまたはその結合を増強する、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失または置換を含んでもよい。

40

【0085】

別の実施形態は、FcRへの結合を抑制してあるIgG2 - 4ハイブリッドおよびIgG4ミュータントを含み、それらの半減期が延長される。代表的なIgG2 - 4ハイブリッドおよびIgG4ミュータントについては、Angal, S. et al. (1993)「A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human (IgG4) Antibody,」Molec. Immunol. 30(1): 105 - 108; Mueller, J. P. et al. (1997)「Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Ant

50

ibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,」Mol. Immun. 34 (6): 441 - 452; および米国特許第6,982,323号明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、IgG1ドメインおよび/またはIgG2ドメインを欠失する。たとえば、Angal, s. et al. は、プロリンで置換したセリン241を有するIgG1およびIgG2について記載している。

【0086】

誘導体化抗体の置換、付加または欠失は抗体のFc領域にあってもよく、それにより1つまたは複数のFc Rに対する抗体の結合親和性の改変に貢献することができる。抗体を修飾して1つまたは複数のFc Rに対する結合を改変する方法は、当該技術分野において知られており、たとえば、国際公開第04/029207号パンフレット、国際公開第04/029092号パンフレット、国際公開第04/028564号パンフレット、国際公開第99/58572号パンフレット、国際公開第99/51642号パンフレット、国際公開第98/23289号パンフレット、国際公開第89/07142号パンフレット、国際公開第88/07089号パンフレット、ならびに米国特許第5,843,597号明細書および同第5,642,821号明細書を参照されたい。特定の一実施形態では、Fc領域の修飾の結果、抗体は、抗体のエフェクター機能の変化、他のFc受容体（たとえば、Fc活性化受容体）に対する結合の変化、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性の変化、C1q結合活性の変化、補体依存性細胞傷害活性（CDC）の変化、食作用活性、またはこれらの任意の組み合わせを有する。

【0087】

いくつかの実施形態では、本発明は、その分子がFc受容体（FcR）結合活性の変化を示すように、たとえば、FcRIIAもしくはFcRIIIAなどの活性化受容体に対する活性の低下を示すように、あるいは、FcRIIBなどの抑制性受容体に対する活性の増大を示すように、Fc領域が修飾された抗体を包含する。好ましくは、そのような抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性または補体依存性細胞傷害（CDC）活性の低下（野生型Fc受容体と比較して）を示すであろう。

【0088】

Fcのエフェクター機能に影響を与える修飾は、当該技術分野においてよく知られている（米国特許第6,194,551号明細書および国際公開第00/42072号パンフレット; Stavenhagen, J. B. et al. (2007) 「Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors」, Cancer Res. 57(18): 8882 - 8890; Shields, R. L. et al. (2001) 「High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcRI, FcRII, FcRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcR」, J. Biol. Chem. 276(9): 6591 - 6604を参照)。FcRIIAまたはFcRIIIAへの結合を減少させるが、FcRIIBへの結合は変化させないか、または増加させるヒトIgG1 Fcドメインの変異体の例としては、S239A、H268A、S267G、E269A、E293A、E293D、Y296F、R301A、V303A、A327G、K322A、E333A、K334A、K338A、A339A、D376Aが挙げられる。

【0089】

いくつかの実施形態では、本発明は、Fc領域が欠失されている抗体（たとえば、FabまたはF(ab)₂など）を包含する。

【0090】

精製しやすくするため、本発明の分子のいずれかをペプチドなどのマーカー配列に融合してもよい。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに相当するヘマグルチニン「HA」タグ (Wilson, I. A. et al. (1984) 「The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein,」Cell, 37:767-778) および「flag」タグ (Knappik, A. et al. (1994) 「An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments,」Biotechniques 17(4):754-761) である。

10

【0091】

本発明は、診断薬もしくは治療薬、または血清中半減期が延長されると望ましいいずれかの他の分子にコンジュゲートし得る抗体またはその抗原結合フラグメントも包含する。この抗体は、たとえば、臨床試験手順の一部として疾患、障害または感染症の発症または進行をモニターするため診断 (インビボ、インサイツまたはインビトロでの) に使用して、たとえば、特定の処置レジメンの有効性を判定してもよい。抗体を検出可能な物質に結合することで検出を行いやすくすることができる。検出可能な物質の例として、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性物質、ポジトロン放出金属および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当該技術分野において公知の技術を用いて抗体に直接結合またはコンジュゲートしても、あるいは、中間体 (たとえば、当該技術分野において公知のリンカー) を介して間接的に結合またはコンジュゲートしてもよい。たとえば、本発明による診断で使用される抗体にコンジュゲートできる金属イオンに関する米国特許第4,741,900号明細書を参照されたい。そうした診断および検出は、以下に限定されるものではないが、様々な酵素、以下に限定されるものではないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼなどの酵素; 以下に限定されるものではないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族複合体; 以下に限定されるものではないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンなどの蛍光材料; 以下に限定されるものではないが、ルミノールなどの発光材料; 以下に限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンなどの生物発光材料; 以下に限定されるものではないが、ビスマス (^{213}Bi)、炭素 (^{14}C)、クロム (^{51}Cr)、コバルト (^{57}Co)、フッ素 (^{18}F)、ガドリニウム (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム (^{68}Ge)、ホルミウム (^{166}Ho)、インジウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、ヨウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタン (^{140}La)、ルテチウム (^{177}Lu)、マンガン (^{54}Mn)、モリブデン (^{99}Mo)、パラジウム (^{103}Pd)、リン (^{32}P)、プラセオジウム (^{142}Pr)、プロメチウム (^{149}Pm)、レニウム (^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム (^{105}Rh)、ルテミウム (^{97}Ru)、サマリウム (^{153}Sm)、スカンジウム (^{47}Sc)、セレン (^{75}Se)、ストロンチウム (^{85}Sr)、硫黄 (^{35}S)、テクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、スズ (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、トリチウム (^3H)、キセノン (^{133}Xe)、イッテルビウム (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、イットリウム (^{90}Y)、亜鉛 (^{65}Zn) などの放射性物質; 様々なポジトロン断層法を用いたポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンなどの検出可能な物質に抗体を結合することにより達成することができる。

20

30

40

【0092】

米国特許第4,676,980号明細書でSegalにより記載されたように、本発明の分子を第2の抗体にコンジュゲートして抗体のヘテロコンジュゲートを形成してもよい

50

。そうしたヘテロコンジュゲート抗体はさらに、ハプテン（たとえばフルオレセイン等）に結合しても、あるいは細胞マーカー（たとえば、PD-1、4-1-BB、B7-H4、B7-H5、CD4、CD8、CD14、CD25、CD27、CD40、CD68、CD163、CTLA4、GITR、LAG-3、OX40、TIM3、TIM4、TLR2、LIGHT等）に結合しても、あるいはサイトカイン（たとえば、IL-7、IL-15、IL-12、IL-4、TGF- β 、IL-10、IL-17、IFN γ 、Flt3、Blyis）に結合しても、あるいはケモカイン（たとえば、CCL21）等に結合してもよい。

【0093】

標的抗原、または支持体に固定化した標的抗原に本発明の抗体もしくは抗原結合フラグメントへの結合を介して結合することができる他の分子のイムノアッセイまたは精製に特に有用である固体支持体に本発明の分子を結合させてもよい。そうした固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンがあるが、これに限定されるものではない。

【0094】

本発明は、追加的に、任意のそうした抗体、融合タンパク質またはフラグメントをコードする核酸分子（DNAまたはRNA）、ならびにそうした核酸分子の送達または複製、および細胞株中でのそうした抗体、融合タンパク質またはフラグメントの発現を可能にするベクター分子を含む。核酸は、一本鎖でも、二本鎖でもよく、一本鎖部分と二本鎖部分の両方を含んでも構わない。

【0095】

D. 本発明の好ましいモジュレーター組成物

本明細書で使用する場合、「調節する」という用語は、ある作用または結果を変化させる能力に関する。特に、本発明は、抗ヒトB7-H5抗体、またはヒトB7-H5に免疫特異的に結合する、抗体の任意の抗原結合フラグメント、もしくはB7-H5に生理学特異的に結合する分子を含むポリペプチドに関し、それらは、B7-H5とその対応するリガンドとの間の結合を調節すること、および/またはB7-H5-対応カウンター受容体結合の結果として生じるシグナル伝達を調節することができる。加えて、多重特異性抗B7-H5抗体、抗B7-H5抗原結合フラグメント、およびCD28Hまたは他の細胞リガンドもしくは受容体に結合する追加の能力を有するそれらそれぞれの融合生成物は、そうしたリガンドまたは受容体を発現する細胞とCD28を発現する細胞との共局在化を促進するのに特に有用である。

【0096】

本発明は、抗体もしくはそのフラグメント、またはB7-H5に免疫特異的に結合し、インビトロまたはレシピエント被験体または患者において、B7-H5のCD28との相互作用を実質的に遮断することができる抗体もしくはフラグメントを含む融合分子に関する。本明細書で使用する場合、「B7-H5のCD28との相互作用を実質的に遮断することができる」分子とは、本明細書に開示される任意のアッセイで測定した場合に、そうした分子の供給によって、B7-H5-CD28相互作用が、50%超、一層好ましくは60%超、70%超、80%超、90%超、95%超、99%超減弱されること、または最も好ましくはそうした相互作用が完全に減弱されることを意味する。こうした抗体、フラグメントおよび融合分子は、B7-H5-CD28相互作用の生物学的効果を減弱するのに特に有用である。

【0097】

このように本発明は、ヒト化抗体およびフラグメント、またはヒト抗体およびフラグメントを含むそのような実施形態の分子に特に関する。

【0098】

最も好ましくは、そうした分子は、被験体の細胞の表面上に内因性濃度で発現した場合に、B7-H5に結合するのに十分な親和性およびアビディティを有する。「内因性濃度」という用語は、正常細胞、癌細胞、または病原体感染細胞で、分子が本来（すなわち

10

20

30

40

50

、発現ベクターまたは組換えプロモーターの非存在下で)発現するレベルをいう。

【0099】

(1) 好ましい抗ヒトB7-H5抗体およびそのCDR

本発明によれば、そうした分子はハイブリドーマ株についてヒトB7-H5に免疫特異的な抗体を産生する株をスクリーニングし、次いで、場合によってはそうした株の中で調節活性(たとえば、中和活性、促進活性、変化したシグナルの伝達活性など)を示す株をスクリーニングすることにより作製することができる。本発明は、特に、ハムスター抗ヒトB7-H5クローン:2D3および18C3を提供する。抗体2D3および18C3はヒトB7-H5に結合することができ、かつB7-H5のCD28Hとの相互作用を実質的に遮断することができる。B7-H5のCD28Hとの相互作用を実質的に遮断することができる抗体は、炎症性疾患および自己免疫疾患の治療に特に有用である。B7-H5のCD28Hとの相互作用を実質的に遮断することができない抗体は、B7-H5:CD28H相互作用の存在、場所および発現率を検出するために使用できるため、診断に特に有用である。

10

【0100】

B7-H5のCD28Hとの相互作用を遮断することができる、抗ヒトB7-H5クローンに発現する抗体の配列を決定して、その可変ドメインを明らかにした。以下に可変ドメインのCDR配列を太字および下線で示す。

抗ヒトB7-H5クローン2D3

重鎖可変領域(配列番号9):

20

QVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SHDINWVRQR PELGLEWIGW
IFPGDGSTKF NEKFKGKATL TTDKSSSTAY IQLSRLTSED SAVYFCARNS
FYSMDYWGQG TSVTVSS

重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド(配列番号10):

caggttcaac tgcaacagtc tggagctgaa ctggtaaagc ctggggcttc
 agtgaagtgg tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agccatgata
 taaactgggt gaggcagagg cctgaactgg gacttgagtg gattggatgg
 atttttcctg gggatgtag tactaagttc aatgagaagt tcaagggcaa
 ggccacactg actacagaca aatcctccag cacagcctac atacagctca
 ccaggctgac gtctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagaaactcc
 ttctactcta tggactattg ggtcaagga acctcagtca cogtctcctc
 a

30

軽鎖可変領域(配列番号11):

DIVMSQSPSS LAVSAGEKVT MSCKSSQSLI NSRTRKNOLA WYQQKPGQSP
 KLLIYWAFIR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCKQSYNL
RTFGGGTKLE IK

軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド(配列番号12):

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga
 gaaggtcact atgagctgca aatccagtca gactctgctc aacagtagaa
 cccgaaagaa ccagttggct tggtagcagc agaaaccagg acagtctcct
 aaattactga tctactgggc attcattagg gaatctgggg tccctgatcg
 cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcagtg
 tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt
 cggacgttctg gtggaggcac caagctggaa atcaaac

40

抗ヒトB7-H5クローン18C3

重鎖可変領域(配列番号13):

QVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SHDINWVRQR PEQGLEWIGW
IFPGDGSTKF NEKFKGKATL TTDKSSSTAY IQLSRLTSED SAVYFCARNS
FYSMDYWGQG TSVTVSS

重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド（配列番号14）：

caggttcaac tgcagcagtc tggagctgaa ctggtaaagc ctggggcttc
 agtgaagttg tcoctgcaagg cttctggcta caccttcaca agccatgata
 taaactgggt gaggcagagg cctgaacagg gacttgagtg gattggatgg
 attttcctg gggatggtag tactaagttc aatgagaagt tcaagggcaa
 ggccacactg actacagaca aatcctccag cacagcctac atacagctca
 gcaggtctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagaaactcc
 ttctattcta tggactactg ggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc
 a

10

軽鎖可変領域（配列番号15）：

DIVMSQSPSS LAVSAGEKVT MCKSSQSLI NSRTRKQLA WYQQKPGQSP
 KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCKQSYNL
RTFGGGTKLE IK

軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド（配列番号28）：

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga
 gaaggtcact atgagctgca aatccagtca gactctgctc aacagtagaa
 cccgaaagaa ccagttggct tggtagcagc agaaaccagg gcagctctct
 aaactgctga tctactgggc atccactagg gaactctgggg tccctgatcg
 cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcagtg
 tgcaggtctg agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt
 cggacgttgc gtggaggcac caagctggaa atcaaac

20

【0101】

(2) B7-H5：CD28H相互作用を遮断する、本発明の抗ヒトB7-H3抗体のコンセンサスCDR

コンセンサスCDR配列と、おそらく類似の結合性を与えると考えられる変異CDR配列とを特定するため、特定された抗体のCDRの解析を行った。そうした変異CDRは、表1に従いBl os um 6 2 . i i j 解析を用いてコンピューター処理した。表1は、Bl os um 6 2 . i i j 置換スコアである。スコアが高いほど、置換はより保存的になり、したがって置換が機能に影響を与える可能性が低くなる。

30

【0102】

【表 1】

表1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

10

20

30

40

【0103】

本発明は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの変異CDRを有する、新規の抗体および抗原結合フラグメントの生成を可能にする。本発明の方法が、相当数の異なるCDRを特定したため、具体的に特定されたCDRの任意の変異体に必要とされる可能性のあるCDR残基の識別が可能になる。そうした残基を表2および表3に太字で示す。比較されたCDRの中で異なることが分かっているこれらの残基については、表1の置換スコアが、許容される置換の内容を判定する手段となる。たとえば、特定のCDRの特定の残基がRまたはSとして変化することが見出されている場合、RとSが-1の置換スコアを有する以上、-1以上の置換スコアを有する、RまたはSのいかなる置換も、その特定のCDRに十分類似した結合性を有する変異CDRを生み出して、特定のCDRの代わりに使用される変異CDRが機能的な抗B7-H5抗体または抗原結合フラグメントを形成できる可能性が、観察された変異体(RまたはS)と同様にある(あるいはRまたはSよりも高い)。各位置について、より低い置換スコアを有する残基を選択するよりも、より高い置換スコアを有する残基を選択することが好ましい。

【0104】

表2は、抗B7-H5抗体の重鎖CDRの解析結果であり、本発明の、観察された好ましい変異軽鎖(「LC」)抗B7-H5のCDRのコンセンサス配列を示す。

【0105】

【表 2】

表2: 抗-B7-H5 重鎖 CDR													
重鎖 CDR1													
抗体	配列								配列番号				
2D3	G	Y	T	F	T	S	H	D			16		
18C3	G	Y	T	F	T	S	H	D			16		
HC CDR1 コンセンサス 配列:	G	Y	T	F	T	S	H	D			16		
重鎖 CDR2													
抗体	配列								配列番号				
2D3	I	F	P	G	D	G	S	T			17		
18C3	I	F	P	G	D	G	S	T			17		
HC CDR2 コンセンサス 配列:	I	F	P	G	D	G	S	T			17		
重鎖 CDR3													
抗体	配列								配列番号				
2D3	A	R	N	S	F	Y	S	M	D	Y			18
18C3	A	R	N	S	F	Y	S	M	D	Y			18
HC CDR3 コンセンサス 配列:	A	R	N	S	F	Y	S	M	D	Y			18

10

20

【 0 1 0 6 】

表 3 は、抗 B 7 - H 5 抗体の軽鎖 C D R の解析結果であり、本発明の、観察された好ましい変異抗 B 7 - H 5 重鎖 (「 H C 」) C D R のコンセンサス配列を示す。

【 0 1 0 7 】

30

【表 3】

表3: 抗-B7-H5 軽鎖 CDR													
軽鎖 CDR1													
抗体	配列											配列番号	
2D3	Q	S	L	L	N	S	R	T	R	K	N	Q	19
18C3	Q	S	L	L	N	S	R	T	R	K	N	Q	
HC CDR1 コンセンサス 配列:	Q	S	L	L	N	S	R	T	R	K	N	Q	
軽鎖 CDR2													
抗体	配列											配列番号	
2D3	W	A	F	20									
18C3	W	A	S		21								
LC CDR2 コンセンサス 配列:	W	A	X ₁		22								
X ₁ はFもしくはS、または同等以上の置換スコア(すなわち ≥ -2)を有する置換、すなわちA、C、H、I、L、M、F、S、T、W、YもしくはVである													
軽鎖 CDR3													
抗体	配列											配列番号	
2D3	K	Q	S	Y	N	L	R	T	23				
18C3	K	Q	S	Y	N	L	R	T					
LC CDR3 コンセンサス 配列:	K	Q	S	Y	N	L	R	T					

10

20

30

40

50

【0108】

したがって、抗B7-H5抗体：2D3および13C3のCDRを保有する抗体ならびにその抗原結合フラグメントに加えて、本発明は、追加的に、上記軽鎖および/または重鎖コンセンサス配列を有するCDRを保有する抗体およびその抗原結合フラグメントを提供する。

【0109】

本発明は、上記クローンのいずれかにより産生されたハムスターモノクローナル抗体の可変重鎖および/または軽鎖のアミノ酸配列に対して、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であり、かつB7-H5に対して免疫特異的結合を示す可変重鎖および/または可変軽鎖のアミノ酸配列を含む、抗体またはそのフラグメントを包含する。本発明は、さらに、上記列挙のクローンのCDRのアミノ酸配列に対して、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であり、かつB7-H5に対して免疫特異的結合を示すCDRを含む、抗体およびそのフラグメントを包含する。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントの判定は、BLASTタンパク質比較により判定することができる。

【0110】

好ましい実施形態では、抗体は、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDR、および1つ、2つまたは3つの重鎖CDR(最も好ましくは、3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR

)を含む免疫グロブリン分子(たとえば、抗体、二重特異性抗体、融合タンパク質など)であって、軽鎖CDRは:

- (1) 抗ヒトB7-H5抗体2D3/18C3の軽鎖CDR1;
 - (2) 抗ヒトB7-H5抗体2D3もしくは抗ヒトB7-H5抗体18C3の軽鎖CDR2、またはそのような抗体のCDR2のコンセンサス配列;および
 - (3) 抗ヒトB7-H5抗体2D3/18C3の軽鎖CDR3
- を含む。

【0111】

代替の好ましい実施形態では、ヒト化免疫グロブリン分子は、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDRおよび1つ、2つまたは3つの重鎖CDR(最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR)を含み、重鎖CDRは、

- (1) 抗ヒトB7-H5抗体2D3/18C3の重鎖CDR1;
- (2) 抗ヒトB7-H5抗体2D3/18C3の重鎖CDR2;および
- (2) 抗ヒトB7-H5抗体2D3/18C3の重鎖CDR3

を含む。

【0112】

特定の実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントは、上記好ましい抗体の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはより好ましくは6つすべてのCDRを含み、ヒトB7-H5への結合能力を示すであろう。

【0113】

(3) CD28H融合タンパク質

CD28H融合タンパク質は、B7-H5とCD28Hの間のシグナル伝達のアンタゴニストであり得る。したがって、CD28H融合タンパク質、および免疫システムの下方調節のためのその使用方法もまた開示される。したがって、受容体融合ポリペプチドは、通常、リガンドの膜貫通CD28Hへの結合能力を遮断し、B7-H5:CD28H仲介シグナル伝達を誘発または維持させる。

【0114】

本明細書で開示されているCD28H融合ポリペプチドは、(i)直接第2のポリペプチドに融合した、あるいは(ii)任意選択により、第2のポリペプチドに融合したリンカーペプチド配列に融合した、CD28Hポリペプチドの全部または一部を含む、第1の融合パートナーを有する。そのような融合タンパク質は二量体または多量体を形成し得る。ペプチド/ポリペプチドリカードメインは、分離したドメインであるか、または融合タンパク質の他のドメイン(CD28Hポリペプチドまたは第2のポリペプチド)の1つに含まれているかのいずれかであり得る。同様に、融合タンパク質を二量体化または多量体化する機能を有するドメインは、分離したドメインであるか、または融合タンパク質の他のドメイン(CD28Hポリペプチド、第2のポリペプチドまたはペプチド/ポリペプチドリカードメイン)の1つに含まれているかのいずれかであり得る。一実施形態では、二量体化/多量体化ドメインとペプチド/ポリペプチドリカードメインは同じものである。

【0115】

本明細書で開示された融合タンパク質は、式I: N-R₁-R₂-R₃-Cのとおりである。ここで「N」は融合タンパク質のN-末端を表し、「C」は融合タンパク質のC-末端を表す。好ましい実施形態では、「R₁」はCD28Hポリペプチドであり、「R₂」は任意にペプチド/ポリペプチドリカードメインであり、「R₃」は第2のポリペプチドである。あるいは、R₃はCD28Hポリペプチドであり得、R₁は第2のポリペプチドであり得る。

【0116】

a. 第1の融合パートナー

受容体融合タンパク質は、完全長CD28Hポリペプチドを含むことができるか、あるいは完全長CD28Hのフラグメントまたは変異体を含むことができる。好ましい実施形

10

20

30

40

50

態では、第1の融合パートナーは、CD28Hの可溶性フラグメント、たとえば、CD28Hの細胞外ドメインの一部もしくは全部、またはその変異体である。任意の哺乳類の配列CD28Hを使用することができる。一例として、上記配列のヒト配列、ならびに既知のそのアイソフォームおよび変異体が示される。いくつかの実施形態では、他の哺乳類の配列、たとえばマウス配列などが、当該技術分野で知られており、使用することができる。開示された融合タンパク質に有用な、ヒトCD28Hポリペプチドは、配列番号7に対して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の配列同一性を示すか、または、好ましくは、配列番号7の細胞外ドメインに対して、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有することができる。開示された融合タンパク質に有用な、ヒトCD28Hポリペプチドは、配列番号8に対して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の配列同一性を示すか、または、好ましくは、配列番号8の核酸配列によりコードされた細胞外ドメインに対して、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の配列同一性を示す核酸配列によりコードされ得る。

10

【0117】

b. 第2の融合パートナー

CD28Hポリペプチドは第2のポリペプチドに融合し得る。第2のポリペプチドの存在は、融合ポリペプチドの可溶性、安定性、親和性および/または結合価を変えることができる。本明細書で使用する場合、「結合価」は、1分子当たり利用できる結合部位の数をいう。一実施形態では、第2のポリペプチドは異なるソースまたは異なるタンパク質からのポリペプチドである。

20

【0118】

一実施形態では、第2のポリペプチドは、好ましくは、ヒト免疫グロブリンC1鎖のヒンジ領域、C_H2領域およびC_H3領域に、またはマウス免疫グロブリンC2a鎖のヒンジ領域、C_H2領域およびC_H3領域に対応するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン重鎖定常領域の1つまたは複数のドメインを含む。

【0119】

好ましい二量体融合タンパク質では、二量体は、二量体化した通常のIg重鎖において、ジスルフィド結合しているCys残基と同じ2つのIg重鎖のヒンジ領域で、Cys残基が共有結合することにより得られる。そのようなタンパク質は、CD28H-Igと呼ぶことができる。

30

【0120】

一実施形態では、免疫グロブリン定常ドメインは、特定の細胞型への結合を増強し、生物学的利用性を増大させ、あるいはCD28Hポリペプチド、融合タンパク質またはそのフラグメントの安定性を高める、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、削除または置換を含み得る。適切なアミノ酸の置換は、上記のように、保存的および非保存的置換を含む。

【0121】

他の実施形態では、第2のポリペプチドは、さらなる分子がそれを介してCD28H融合タンパク質に結合できる、コンジュゲーションドメインを有し得る。そのような実施形態の1つでは、コンジュゲートされた分子は、特定の器官または組織を融合タンパク質の標的にすることができる。他のそのような実施形態では、コンジュゲートされた分子は、CD28H融合タンパク質の効果を高める、または増大させることができる、別の免疫調節性作用物質である。他の実施形態では、コンジュゲートされた分子は、ポリエチレングリコール(PEG)である。

40

【0122】

融合タンパク質のFc領域は、たとえばエフェクター機能、半減期の制御、組織への到達性の向上のため、安定性などの生物物理学的特徴の増強のため、さらに製造効率の改善(および費用削減)のため、アイソタイプまたはサブクラスが異なってもよいし、キメラ

50

またはハイブリッドでもよいし、かつ/または、修飾してもよい。開示された融合タンパク質の構築に有用な多くの修飾、およびそれを行う方法については当該技術分野において知られており、たとえば、Mueller, et al., Mol. Immun., 34 (6): 441 - 452 (1997)、Swann, et al., Cur. Opin. Immun., 20: 493 - 499 (2008)、および Presta, Cur. Opin. Immun., 20: 460 - 470 (2008) を参照されたい。いくつかの実施形態では、Fc 領域はネイティブ IgG1、IgG2 または IgG4 の Fc 領域である。いくつかの実施形態では、Fc 領域はハイブリッド、たとえば IgG2 / IgG4 の Fc 定常領域からなるキメラである。Fc 領域に対する薬剤としては、Fc ガンマ受容体および補体への結合を妨げるように修飾された IgG4、1 つまたは複数の Fc ガンマ受容体への結合を改善するように修飾された IgG1、エフェクター機能を最小限に抑えるように修飾された IgG1 (アミノ酸変化)、グリカンを変化させた/含まない IgG1 (典型的には発現宿主の変更による)、および FcRn への pH 依存性結合を変化させた IgG1 が挙げられるが、これらに限定されるものではない。Fc 領域は全ヒンジ領域を含むことも、あるいは全ヒンジ領域より小さい領域を含むこともある。

10

【0123】

非ホジキンリンパ腫またはワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症用のリツキシマブ (CD20 に対するキメラマウス/ヒト IgG1 モノクローナル抗体) で治療した患者の治療結果は、ヒト IgG1 の Fc ドメインに対する固有の親和性が異なる Fc 受容体の対立遺伝子変異体の個々の発現に相関した。特に、低親和性活性化 Fc 受容体 CD16A (FcRIIA) の高親和性対立遺伝子を持つ患者は、より高い応答率を示し、非ホジキンリンパ腫の場合、無増悪生存期間が改善した。他の実施形態では、Fc ドメインは、低親和性抑制性 Fc 受容体 CD32B (FcRIIB) への結合を抑え、低親和性活性化 Fc 受容体 CD16A (FcRIIA) への野生型レベルの結合を保持または増強する、1 つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失または置換を含んでもよい。

20

【0124】

他の実施形態は、FcR への結合を抑制してある IgG2 - 4 ハイブリッドおよび IgG4 ミュータントを含み、それらの半減期が延長される。代表的な IgG2 - 4 ハイブリッドおよび IgG4 ミュータントについては、Angal, S. et al., Molecular Immunology, 30 (1): 105 - 108 (1993); Mueller, J. et al., Molecular Immunology, 34 (6): 441 - 452 (1997); および Wangらの米国特許第 6,982,323 号明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、IgG1 ドメインおよび/または IgG2 ドメインを欠失する。たとえば、Angalらは、プロリンで置換したセリン 241 を有する IgG1 および IgG2 について記載している。

30

【0125】

好ましい実施形態では、Fc ドメインは、CD16A への結合を増強するアミノ酸の挿入、欠失または置換を含む。ヒト IgG1 の Fc ドメインにおいて CD16A への結合を増加させ、CD32B への結合を減少させる多くの置換が当該技術分野において知られており、Stavenshagen, et al., Cancer Res., 57 (18): 8882 - 90 (2007) に記載されている。CD32B への結合を減少させる、および/または、CD16A への結合を増加させるヒト IgG1 Fc ドメインの変異体としては、たとえば F243L 置換、R929P 置換、Y300L 置換、V305I 置換または P296L 置換が挙げられる。これらのアミノ酸置換は、ヒト IgG1 Fc ドメインに、どのような組み合わせで存在してもよい。一実施形態では、ヒト IgG1 Fc ドメイン変異体は、F243L 置換、R929P 置換および Y300L 置換を含む。他の実施形態では、ヒト IgG1 Fc ドメイン変異体は、F243L 置換、R929P 置換、Y300L 置換、V305I 置換および P296L 置換を含む。他の実施形態では、ヒト IgG1 Fc ドメイン変異体が N297Q 置換を含むため、この突然変異は FcR 結合を消失させる。

40

50

【0126】

c. ペプチドまたはポリペプチドリノカードメイン

開示されたCD28H融合タンパク質は、任意選択により、第2のポリペプチドからCD28Hポリペプチドを分離する、ペプチドまたはポリペプチドリノカードメインを含有する。

【0127】

1. 抗体のヒンジ領域

一実施形態では、リンカードメインは免疫グロブリンのヒンジ領域を含有する。好ましい実施形態では、ヒンジ領域はヒト免疫グロブリンに由来する。ヒンジを得ることができる、適切なヒト免疫グロブリンは、IgG、IgDおよびIgAを含む。好ましい実施形態では、ヒンジ領域はヒトIgGに由来する。免疫グロブリンヒンジ領域および他のドメインのアミノ酸配列は当該技術分野でよく知られている。

10

【0128】

2. 他のペプチド/ポリペプチドリノカードメイン

他の適切なペプチド/ポリペプチドリノカードメインは、天然に存在するか、または天然には存在しないペプチドまたはポリペプチドを含む。ペプチドリノカードの配列は、少なくとも2アミノ酸長さである。好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドのドメインは、柔軟性ペプチドまたはポリペプチドである。本明細書では、「柔軟性リンカー」とは、ペプチド結合で繋がれた2つ以上のアミノ酸残基を含む、ペプチドまたはポリペプチドであって、2つの結合したポリペプチドが柔軟性リンカーの非存在下に有するであろうより、大きな回転自由度をペプチド結合で繋がれた2つのポリペプチドに与えるペプチドまたはポリペプチドをいう。そのような回転自由度は、柔軟性リンカーで繋がれた、2つ以上の抗原結合部位が、それぞれの標的抗原により効率的に接近することを可能にする。柔軟性ペプチド/ポリペプチドの例としては、アミノ酸配列Gly-Ser、Gly-Ser-Gly-Ser（配列番号16）、Ala-Ser、Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号17）、(Gly₄-Ser)₃（配列番号18）、および(Gly₄-Ser)₄（配列番号19）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらなる柔軟性ペプチド/ポリペプチド配列は当該技術分野でよく知られている。

20

【0129】

一実施形態では、第1の融合パートナーはCD28Hのフラグメントである。好ましい実施形態では、融合タンパク質は、IgのFc領域に融合したCD28Hの細胞外ドメインまたはそのフラグメントを含む。組換えCD28H-Ig融合タンパク質は、ニューロピリン、プレキシンまたはそれらのフラグメントの細胞外ドメインのコーディング領域を、先述した(Chapoval, et al., Methods Mol. Med., 45: 247-255 (2000))ように、ヒトIgG1もしくはマウスIgG2a、または適切なIgドメインに融合することにより調製することができる。

30

【0130】

d. 融合タンパク質の例

代表的なヒトCD28H-Ig融合タンパク質、CD28H-hIg4(CD28H ECD aa23-140、軽鎖カップシグナルペプチド: CD28H配列は太字で示され; 突然変異したヒトIgG4 Fc配列は下線を付して示され、セリン228からプロリンへの突然変異は二重下線で示されている)のアミノ酸配列(配列番号20)は、以下のとおりである:

40

LSVQQGPNLLQVRQGSQATLVCQVDQATAWERLRVKWTKDGAILCQPYITNGSLSLGVCGPQ
GRLSWQAPSHLTLQLDVPVSLNHSQAYVCWAAVEIPELEEAEGNITRLFVDPDDPTQESKYGP
PCPFCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

融合タンパク質は、さらに、N - 末端リーダー配列（軽鎖カッパリーダー配列）（配列番号 21 の残基 1 ~ 20）

10

MSVPTQVLGLLLLLWLT DARC

または、次のような天然に存在する CD 28 H リーダー配列（配列番号 22）：

MGSPGMVLGLLVQI WALQEASS

を含んでもよい。CD 28 H 配列は、本発明においては、ヒト Ig G 4 領域に融合したものが示されているが、そのような配列は代わりに任意の Ig アイソタイプに、または、実際のところ、任意の他のタンパク質に融合することができる。配列番号 21 のシグナル配列を含む、配列番号 20 のヒト CD 28 H - Ig をコードする DNA 配列（配列番号 23）は、以下のとおりである（配列番号 23）。

20

ATGTCCGTGCCACCCAGGTGCTGGGATTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCCT
 GTCTGTGCAGCAGGGCCCTAACCTGCTGCAAGTGCAGGCTCTCAGGCTACACTCGTGT
 GTCAGGTGGACCAGGCCACCGCTGGGAGAGACTGAGAGTGAAGTGGACCAAGGACGGCGCC
 ATCTGTGCCAGCCCTACATCACCAACGGCTCCCTGTCCCTGGGCGTGTGTGGACCTCAGGG
 CAGACTGTCTTGGCAGGCCCTTCTCACCTGACCCTGCAGCTGGACCCTGTGTCCCTGAATC
 ACTCCGGCGCCTACGTGTGTTGGGCCGCTGTGGAAATCCCCGAGCTGGAAGAGGCCGAGGGC
 AACATCACCCGGCTGTTCGTGGACCCTGACGACCCTACCCAGGAATCTAAGTACGGCCCTCC
 CTGCCCTCCTTGCCAGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAA
 AGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
 TCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGC
 CAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGTTGGTGTCCGTGCTGACCG
 TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG
 CCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTA
 CACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCACCTGACTGCTCTCGTGA
 AGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC
 TACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCCGCCTGAC
 CGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
 TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCCCGCAAGTGA

30

40

【0131】

E . 本発明の好ましい組成物の治療および予防のための使用

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置すること」、「処置」および「治療用途」という用語は、免疫反応の増大または低下から利益を受けるであろう疾患または障害の 1 つまたは複数の症状が消失、減少または軽減することをいう。本明細書で使用する場合、「治療上有効な量」とは、免疫反応の変化を媒介するのに十分な治療薬のそうした量、一層好ましくは、臨床的意義のある免疫反応の変化であり、疾患または状態の症状の減

50

少または軽減を媒介するのに十分な治療薬のそうした量をいう。ある作用は、その大きさがレシピエント被検体の健康または予後に影響を与えるのに十分である場合、臨床的意義がある。治療上有効な量とは、疾患の進行を遅延させるまたは最小限に抑える、たとえば、自己免疫応答、または炎症反応、または移植による拒絶反応を遅延させるまたは最小限に抑えるのに十分な治療薬の量をいう場合がある。治療上有効な量はまた、疾患の処置または管理において治療上の利益をもたらす治療薬の量をいうこともある。さらに、治療薬、B7-H5抗体、またはB7-H5融合タンパク質もしくはCD28H融合タンパク質に関する治療上有効な量は、疾患の処置または管理に治療上の利益をもたらす、たとえば、治療用抗体の薬効を増強するのに十分で、疾患を処置または管理するのに十分な、治療薬単独または他の療法薬と組み合わせたそうした量を意味する。

10

【0132】

本明細書で使用する場合、「予防薬」という用語は、障害または疾患の任意の症状が検出される前にそうした障害または疾患の予防に使用することができる薬をいう。「予防上有効な」量は、そうした保護作用を媒介するのに十分な予防薬の量をいう。予防上有効な量はまた、疾患の予防において予防上の利益をもたらす予防薬の量もいう。さらに、予防薬に関する予防上有効な量は、疾患の予防において予防上の利益をもたらす予防薬単独または他の薬と組み合わせたそうした量を意味する。

【0133】

本明細書に記載される投薬量および投与頻度は、治療上有効なおよび予防上有効なという用語により包含される。投薬量および頻度はさらに、典型的には投与される個々の治療薬または予防薬、癌の重症度および種類、投与経路のほか、患者の年齢、体重、反応および既往歴によって、各患者に特有の要因に応じて異なる。当業者であれば、そうした要因を考慮し、たとえば、文献に報告され、Physician's Desk Reference (56th Ed., 2002) に推奨されている投与量に従うことで好適なレジメンを選択することができる。

20

【0134】

本発明は、B7-H5に結合することにより、B7-H5の機能および/またはCD28Hへの結合を拮抗させる（すなわち、減弱化または害し）、したがってT細胞の増殖および/またはサイトカインの産生を弱めまたは害する、抗B7-H5抗体（および、B7-H5に結合するそうした抗体のフラグメント）またはCD28HIgなどの分子に関する。そのような分子の被験体への投与は、被験体の免疫系を下方調節する。

30

【0135】

そうした免疫系の下方調節は、炎症性疾患および自己免疫疾患ならびに移植による拒絶反応の処置に望ましい。本発明の抗体の投与により処置され得る自己免疫障害の例として、以下に限定されるものではないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー-皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、クレスト症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、糸球体腎炎、グレース病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑病（ITP）、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、ループスエリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、視神経脊髄炎（NMO）、1型または免疫性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、全身性紅斑性狼瘡、紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、たとえば疱疹状皮膚炎血管炎、白斑ならびにウェゲナー肉芽腫症がある。

40

50

【0136】

開示された抗B7-H5抗体、抗原結合フラグメント、およびCD28H融合タンパク質、特にそのCD28H-Ig融合タンパク質で、予防、治療または管理することができる炎症性疾患の例としては、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性のウイルス感染または細菌感染に起因する慢性炎症が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0137】

抗B7-H5抗体は、B7-H5の抗イデオタイプペプチドまたは抗体（Wallmann, J. et al. (2010) 「Anti-Ids in Allergy: Timeliness of a Classic Concept,」 World Allergy Organiz. J. 3(6):195-201; Nardi, M. et al. (2000) 「Antiidiotype Antibody Against Platelet Anti-GpIIa Contributes To The Regulation Of Thrombocytopenia In HIV-1-ITP Patients,」 J. Exp. Med. 191(12):2093-2100) または模倣体（Zang, Y. C. et al. (2003) 「Human Anti-Idiotypic T Cells Induced By TCR Peptides Corresponding To A Common CDR3 Sequence Motif In Myelin Basic Protein-Reactivate T Cells,」 Int. Immunol. 15(9):1073-1080; Loiarro, M. et al. (Epub 2010 Apr 8) 「Targeting TLR/IL-1R Signaling In Human Diseases,」 Mediators Inflamm. 2010:674363) を作製するために使用することができる。そのような分子は、B7-H5の代理として機能し、したがって、そうした分子を被験体に投与すると、CD28Hカウンター受容体を結合し、それが内因性B7-H5受容体に結合することを妨げることによって、被験体の免疫系を下方調節する。そのような分子は、移植片対宿主病、炎症性疾患および自己免疫疾患の処置に有用である。

【0138】

したがって、本発明の抗体および抗原結合フラグメントならびに融合タンパク質は、移植片対宿主病、炎症性疾患および自己免疫疾患の処置に有用である。

【0139】

同様に、そのような抗体とそのような受容体/リガンドとの間の結合を増強するアゴニスト抗体、およびB7-H5融合タンパク質のような他の受容体アゴニストは、B7-H5シグナル伝達のアゴニストとして有用であり、したがって癌および炎症性疾患の治療に有用である。したがって、本発明はまた、CD28Hに結合することにより、CD28Hの機能（すなわち、シグナル伝達）および/またはB7-H5への結合を拮抗させる、したがってT細胞増殖および/またはサイトカインの産生を増大または刺激する、B7-H5-Ig融合タンパク質などのCD28Hアゴニスト分子に関する。そのような分子を被験体に投与すると、被験体の免疫系を上方調節し、癌または感染症罹患被験体の治療に使用することができる。B7-H5経路はT細胞活性化に関連するため、そのような分子はワクチンと組み合わせると特に有用である。

【0140】

本願で提供されるCD28Hアゴニストは、一般に、免疫反応刺激療法としてインビボおよびエクシボで有用である。たとえば、CD28Hアゴニストは、被験体に一定量のCD28Hアゴニストを投与する癌の治療で、宿主の免疫反応を刺激または増強するのに有用である。提供される組成物および方法で治療し得る癌の種類としては、膀胱癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、腎臓癌、肝癌、肺癌、鼻咽頭癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、胃癌、子宮癌、卵巣癌、精巣腫瘍および血液癌が挙げられるが、これらに

10

20

30

40

50

限定されるものではない。

【0141】

本明細書では、治療し得る悪性腫瘍は、腫瘍が由来する組織の胚性起源にしたがって分類される。癌腫は、皮膚または内臓および腺の上皮内層などの、内胚葉性または外胚葉性組織から生じる腫瘍である。あまり発生しない肉腫は、骨、脂肪、軟骨などの中胚葉性結合組織由来である。白血病およびリンパ腫は骨髄の造血細胞の悪性腫瘍である。白血病は単細胞として増殖するが、リンパ腫は腫瘍塊として成長する傾向がある。悪性腫瘍は、身体の多くの器官または組織に発生し、癌を形成し得る。

【0142】

免疫不全（たとえば、HIV）、乳頭腫（たとえば、HPV）、ヘルペス（たとえばHSV）、脳炎、インフルエンザ（たとえば、ヒトインフルエンザウイルスA）および感冒（たとえば、ヒトライノウイルス）ウイルス感染症などの、局所または全身性ウイルス感染症の治療に、CD28Hアゴニストを投与することができるが、それらに限定されるものではない。たとえば、ヘルペス病変もしくは帯状疱疹または性器疣贅などのウイルス性皮膚疾患の治療に、CD28Hアゴニスト組成物を含む医薬製剤を局所的に投与することができる。AIDS、インフルエンザ、感冒または脳炎を含む、全身性ウイルス疾患の治療にも、CD28Hアゴニスト組成物の医薬製剤を投与することができるが、それらに限定されるものではない。

【0143】

治療が可能な代表的な感染症は、以下に限定されるものではないが、アクチノミセス属 (*Actinomyces*)、アナベナ属 (*Anabaena*)、バチルス属 (*Bacillus*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、ブデロビブリオ属 (*Bdellovibrio*)、ボルデテラ属 (*Bordetella*)、ボレリア属 (*Borrelia*)、カンピロバクター属 (*Campylobacter*)、カウロバクター属 (*Caulobacter*)、クラミジア属 (*Chlamydia*)、クロロビウム属 (*Chlorobium*)、クロマチウム属 (*Chromatium*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、サイトファーガ属 (*Cytophaga*)、ディノコッカス属 (*Deinococcus*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、フランシセラ属 (*Francisella*)、ハロバクテリウム属 (*Halobacterium*)、ヘリコバクター属 (*Helicobacter*)、ヘモフィルス属 (*Haemophilus*)、ヘモフィルス・インフルエンザB型 (*Hemophilus influenzae type B*) (HIB)、ヒストプラスマ属 (*Histoplasma*)、ハイフォミクロビウム属 (*Hypomicrobium*)、レジオネラ属 (*Legionella*)、リーシュマニア属 (*Leishmania*)、レプトスピロシス属 (*Leptospiriosis*)、リステリア属 (*Listeria*)、メニングコッカス (*Meningococcus*) A、BおよびC、メタノバクテリウム属 (*Methanobacterium*)、マイクロコッカス属 (*Micrococcus*)、マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*)、ミキソコッカス属 (*Myxococcus*)、ナイセリア属 (*Neisseria*)、ニトロバクテリウム属 (*Nitrobacter*)、オシラトリア属 (*Oscillatoria*)、プロクロロン属 (*Prochloron*)、プロテウス属 (*Proteus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、ロドスピリルム属 (*Rhodospirillum*)、リケッチア属 (*Rickettsia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、シゲラ属 (*Shigella*)、スピリルム属 (*Spirillum*)、スピロヘータ属 (*Spirochaeta*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、スルフォロブス属 (*Sulfolobus*)、サーモプラズマ属 (*Thermoplasma*)、チオバチルス属 (*Thiobacillus*)、およびトレポネマ属 (*Treponema*)、ピブリオ属 (*Vibrio*)、エルシニア属 (*Yersinia*)、

10

20

30

40

50

クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、ノカルジア・アステロイデス (*Nocardia asteroides*)、リケッチア・リケッチィ (*Rickettsia rickettsii*)、リケッチア・チフィ (*Rickettsia typhi*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、クラミジア・シタッシ (*Chlamydia psittaci*)、クラジミア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、膾トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*) およびマンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) などの微生物により引き起こされる感染症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0144】

開示されたCD28Hアゴニストまたはそれをコードする核酸は、単独で、または他の適切な治療と組み合わせて投与することができる。一実施形態では、CD28Hアゴニストは、ワクチン組成物と共に、またはワクチン組成物の成分として投与することができる。ワクチンの適切な成分、抗原および/またはアジュバント。開示されたCD28Hアゴニストは、ワクチンの投与の前に、同時に、または後で投与することができる。一実施形態では、CD28Hアゴニスト組成物は、ワクチンの投与と同時に投与される。

【0145】

開示されたCD28Hアゴニスト組成物は、癌被験体の腫瘍抗原などの、前から存在する抗原に対して被験体の免疫反応を開始または増強するために使用できる、予防ワクチンまたは治療ワクチンと共に投与し得る。

【0146】

予防の、治療のまたは脱感作した免疫応答の目的とする結果は、疾患によって、当該技術分野でよく知られた原理によって変化し得る。同様に、癌、アレルゲンまたは感染因子に対する免疫反応は、疾患を完全に治療し得、症状を緩和し得、あるいは疾患に対する総合的な治療介入の一面であり得る。たとえば、癌に対する免疫反応を刺激することは、治療に対して影響を与えるように、外科的、化学療法的、放射線学的、ホルモンのおよび他の免疫学的アプローチと結びついている。

【0147】

F. 投与方法

様々な送達系、たとえば、リポソーム、微小粒子、マイクロカプセルへの封入、抗体または融合タンパク質を発現することができる組換え細胞、受容体を介したエンドサイトーシス (たとえば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 を参照)、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての核酸の構築等が知られており、治療用または予防用組成物の投与に使用することができる。

【0148】

抗体および融合タンパク質の投与方法としては、非経口投与 (たとえば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下)、硬膜外投与および粘膜投与 (たとえば、経鼻経路および経口経路) があるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、抗体または融合タンパク質を筋肉内投与、静脈内投与または皮下投与する。本組成物は、任意の好都合な経路により、たとえば、注入またはボーラス注射により、上皮層または皮膚粘膜層 (たとえば、口腔粘膜、直腸および腸の粘膜等) からの吸収により投与してもよく、他の生物活性薬と一緒に投与してもよい。投与は全身性でも、あるいは局所でもよい。さらに、

たとえば、吸入器またはネブライザーの使用、およびエアロゾル化剤を用いた処方により経肺投与を利用してよい。たとえば、米国特許第6,019,968号明細書；同第5,985,20号明細書；同第5,985,309号明細書；同第5,934,272号明細書；同第5,874,064号明細書；同第5,855,913号明細書；同第5,290,540号明細書；および同第4,880,078号明細書；ならびに国際公開第92/19244号パンフレット；国際公開第97/32572号パンフレット；国際公開第97/44013号パンフレット；国際公開第98/31346号パンフレット；および国際公開第99/66903号パンフレットを参照されたい。特定の実施形態では、医薬組成物は、処置を必要とする領域に局所投与することが望ましい場合がある。これは、たとえば、以下に限定されるものではないが、局所注入、注射またはインプラントにより達成することができ、前記インプラントは、多孔性物質、非多孔性物質またはゼラチン様物質、たとえばシアラスティック膜または繊維などの膜である。好ましくは、抗体または融合タンパク質を投与するときは、抗体または融合タンパク質が吸収されない物質を使用するように注意しなければならない。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、抗体または融合タンパク質は、抗体または融合タンパク質を標的送達するためリポソームとして製剤化する。リポソームは、同心円状に重なった、内部に水相を持つリン脂質二重層からなるベジクルである。リポソームは典型的には、様々な種類の脂質、リン脂質および/または界面活性剤を含む。リポソームの成分は、二重層構造で配列しており、生体膜の脂質の配列と類似している。リポソームは、その生体適合性、低免疫原性および低毒性などのため特に好ましい送達ビヒクルである。リポソームの調製方法は、当該技術分野において公知であり、本発明に包含される。たとえば、Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688; Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4; 米国特許第4,485,045号明細書および同第4,544,545号明細書を参照されたい。

20

【0150】

米国特許第5,013,556号明細書に開示されているものなど、血清中半減期が長い、すなわち、循環時間が長いリポソームの調製方法を用いて、リポソーム抗体組成物を作製することができる。好ましいリポソームは、すぐには循環から除去されない、すなわち、単核食細胞系(MPS)に取り込まれない。本発明は、当業者に公知の一般的な方法を使用して調製される立体安定化リポソームを包含する。特定の作用機序に拘泥するつもりはないが、立体安定化リポソームは、嵩高く非常にフレキシブルな親水性部分を持つ脂質成分を含み、この親水性部分は、リポソームと血清タンパク質との望ましくない反応を抑制し、血清成分によるオプソニン化を防ぎ、MPSによる認識を低下させる。立体安定化リポソームは、好ましくはポリエチレングリコールを使用して調製される。リポソームおよび立体安定化リポソームの調製については、たとえば、Bendas et al., 2001 BioDrugs, 15(4):215-224; Allen et al., 1987 FEBS Lett. 223:42-6; Klibanov et al., 1990 FEBS Lett., 268:235-7; Blum et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029:91-7; Torchilin et al., 1996, J. Liposome Res. 6:99-116; Litzinger et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190:99-107; マルヤマ(Maruyama) et al., 1991, Chem. Pharm. Bull., 39:1620-2; Klibanov et al., 1991, Biochim Biophys Acta, 1062:142-8; Allen et al., 1994, Adv. Drug Deliv. Rev., 13:285-309を参照されたい。本発明は、特定の臓器ターゲティング、たとえば、米国特許第4,544,545号明細書を参照されたい、または特定の細胞ターゲティング、たとえば、米国特許出願公開第2005/0074403号明細書を参照され

30

40

50

たい、に適したリポソームも包含する。開示される組成物および方法に使用するのに特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。所望の直径を有するリポソームを得るには、リポソームを規定の細孔サイズのフィルターを通して押し出す。いくつかの実施形態では、以前に記載された方法を用いて、リポソームに抗体のフラグメント、たとえば、F(ab')をコンジュゲートしてもよい。たとえば、Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288を参照されたい。

【0151】

また、B7-H5抗体またはB7-H5もしくはCD28H融合タンパク質は、イムノリポソームとして製剤化してもよい。イムノリポソームとは、抗体またはそのフラグメントがリポソーム表面に共有結合または非共有結合したリポソーム組成物をいう。リポソーム表面に抗体を結合する化学は当該技術分野において公知であり、本発明に包含される。たとえば、米国特許第6,787,153号明細書; Allen et al., 1995, Stealth Liposomes, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1239: 133-144を参照されたい。最も好ましい実施形態では、開示された方法および組成物で使用するイムノリポソームは、さらに立体的に安定化されている。好ましくは、抗体または融合タンパク質は共有結合または非共有結合で、リポソームの脂質二重層に安定して根を下ろしている疎水性アンカーに結合している。疎水性アンカーの例としては、リン脂質、たとえばホスファチジルエタノールアミン(PE)、フォスファチジルイノシトール(PI)が挙げられる。抗体と疎水性アンカーを共有結合させるために、当該技術分野で知られているいかなる生化学的方法も使用することができる(たとえば、J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA, p. 399-435を参照されたい)。たとえば、抗体分子上の官能基は、リポソーム関連疎水性アンカー上の活性基と反応し得、たとえば抗体上のリシン側鎖のアミノ基は、水溶性カルボジイミドにより活性化されたりポソーム関連N-グルタリル-ホスファチジルエタノールアミンと結合し得る;あるいは還元された抗体のチオール基は、ピリジルチオプロピオニルフォスファチジルエタノールアミンなどのチオールの反応性アンカーを介してリポソームと結合することができる。たとえば、Dietrich et al., 1996, Biochemistry, 35: 1100-1105; Loughrey et al., 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901: 157-160; Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288; Martin et al., 1981, Biochemistry, 20: 4429-38を参照されたい。特定の作用機構に縛られることを意図するものではないが、抗体または融合タンパク質を含むイムノリポソーム製剤は、抗体または融合タンパク質を標的細胞の細胞質に、すなわち抗体または融合タンパク質が結合する受容体を含む細胞に送達するものであるから、治療薬剤として特に有効である。イムノリポソームは、血液中で、特に標的細胞中で長い半減期を有し、標的細胞の細胞質中へ内部移行することができ、それにより治療薬の損失またはリソソーム内経路による変質を回避することが好ましい。

【0152】

イムノリポソーム組成物は、1つまたは複数の小嚢形成性脂質、抗体、そのフラグメントもしくは誘導体、または融合タンパク質および任意に親水性ポリマーを含む。小嚢形成性脂質は、アシル鎖などの2つの炭化水素鎖および極性先端基を有する脂質であることが好ましい。小嚢形成性脂質の例としては、リン脂質、たとえば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリンおよび糖脂質、たとえば、セレブロシド、ガングリオシドが挙げられる。当業者には、製剤に有用なさらなる脂質が知られており、本発明に含まれる。いくつか

10

20

30

40

50

の実施形態では、イムノリポソーム組成物は、リポソームの漿液半減期を延長する親水性ポリマー、たとえば、ポリエチレングリコールおよびガングリオシドGM1をさらに含む。親水性ポリマーをリポソームにコンジュゲートする方法は当該技術分野でよく知られており、本発明に包含される。イムノリポソームのレビューおよびその調製方法については、たとえば、米国特許出願公開第2003/0044407号明細書、国際公開第97/38731号パンフレット、Vingerhoads et al., 1994, Immunomethods, 4:259-72; Maruyama, 2000, Biol. Pharm. Bull. 23(7):791-799; Abra et al., 2002, Journal of Liposome Research, 12(1&2):1-3; Park, 2002, Bioscience Reports, 22(2):267-281; Bendaset al., 2001 BioDrugs, 14(4):215-224, J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA, p. 399-435を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0153】

抗体および融合タンパク質は、抗体の量を表示する、アンプルまたはサッシェ(sachette)などの密封容器にパッケージすることができる。一実施形態では、抗体は、乾燥滅菌した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として密封容器に提供され、たとえば、水または食塩水で被検体への投与に適した濃度に再構成することができる。好ましくは、抗体または融合タンパク質は、乾燥滅菌凍結乾燥粉末として、少なくとも5mg、一層好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位投薬量で密封容器に提供される。凍結乾燥抗体または融合タンパク質は、その本来の容器で2~8の間にて保存する必要がある。抗体は、再構成後12時間以内、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内または1時間以内に投与すべきである。代替の実施形態では、抗体または融合タンパク質は、抗体、融合タンパク質またはコンジュゲートされた分子の量および濃度を表示する密封容器に液体形態で提供される。好ましくは、液体形態の抗体または融合タンパク質は、密封容器に抗体または融合タンパク質を少なくとも1mg/ml、一層好ましくは少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも100mg/ml、少なくとも150mg/ml、少なくとも200mg/mlで提供される。

【0154】

また、処方用いられる正確な用量は投与経路および状態の重篤度によって異なり、開業医の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿することができる。抗体および融合タンパク質の場合、患者に投与される投薬量は典型的には、0.0001mg/kg患者体重~100mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、0.0001mg/kg患者体重~20mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重~10mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重~5mg/kg患者体重、0.0001~2mg/kg患者体重、0.0001~1mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重~0.75mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重~0.5mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重~0.25mg/kg患者体重、0.0001~0.15mg/kg患者体重、0.0001~0.10mg/kg患者体重、0.001~0.5mg/kg患者体重、0.01~0.25mg/kg患者体重または0.01~0.10mg/kg患者体重である。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫反応により人体内で他の種由来の抗体より長い半減期を有する。このため、ヒト抗体の投薬量を少なくし、投与頻度を低くすることが可能である場合が多い。さらに、抗体もしくはそのフラグメントまたは融合タンパク質の投薬量

および投与頻度は、修飾、たとえば、脂質化などにより抗体または融合タンパク質の取り込みおよび組織移行性を高めることで抑えてもよい。

【0155】

なお別の実施形態では、本組成物は、放出制御システムまたは持続放出システムで送達してもよい。当業者に公知の任意の技術を使用して、1つまたは複数の抗体または融合タンパク質を含む持続放出製剤を製造することができる。たとえば、米国特許第4,526,938号明細書；国際公開第91/05548号パンフレット；国際公開第96/20698号パンフレット；Ning et al., 1996, 「Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel,」 *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., 1995, 「Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions,」 *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, 「Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application,」 *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; および Lam et al., 1997, 「Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,」 *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760を参照されたい。一実施形態では、放出制御システムにポンプを使用してもよい(Langer, supra; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; および Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574を参照)。別の実施形態では、高分子材料を使用して、抗体の放出制御を達成してもよい(たとえば、*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61を参照; さらに、Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); 米国特許第5,679,377号明細書；米国特許第5,916,597号明細書；米国特許第5,912,015号明細書；米国特許第5,989,463号明細書；米国特許第5,128,326号明細書；国際公開第99/15154号パンフレット；および国際公開第99/20253号パンフレットも参照)。持続放出製剤に使用されるポリマーの例として、ポリ(2-ヒドロキシメタクリル酸エチル)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-*co*-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-*co*-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルがあるが、これに限定されるものではない。なお別の実施形態では、放出制御システムを治療標的(たとえば、肺)の近くに導入し、それにより必要とされるのは、全身用量のごく一部のみである(たとえば、Goodson, in *Medical Applications of Control*

ed Release, supra, vol. 2, pp. 115 - 138 (1984) を参照)。別の実施形態では、Dunn et al. (米国特許第 5,945,155 号明細書を参照) に従い、放出制御インプラントとして有用なポリマー組成物を使用する。この特定の方法は、ポリマーシステムからの生理活性材料のインサイツ放出制御の治療効果に基づく。移植は一般に、治療処置を必要とする患者体内のどこで行ってもよい。別の実施形態では、被検体体内の非ポリマーインプラントを薬物送達システムとして使用する、非ポリマー持続送達システムを使用する。体内に移植すると、インプラントの有機溶媒が組成物から周囲の組織液に散逸、分散または浸出し、非ポリマー材料が徐々に凝固または沈殿して固体の微孔性マトリックスを形成する(米国特許第 5,888,533 号明細書を参照)。放出制御システムについては、Langer (1990, Science 249:1527-1533) による概説で考察されている。当業者に公知の任意の技術を使用して 1 つまたは複数の治療薬、すなわち、B7-H5 抗体または CD28H 融合タンパク質を含む持続放出製剤を製造することができる。たとえば、米国特許第 4,526,938 号明細書; 国際公開第 91/05548 号パンフレットおよび国際公開第 96/20698 号パンフレット; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; および Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 を参照されたい。

10

20

30

【0156】

治療用または予防用組成物が、B7-H5 抗体もしくはその抗原結合フラグメントをコードする核酸、または CH28H 融合タンパク質、たとえば、CH28HIg 融合タンパク質をコードする核酸である特定の実施形態では、核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、たとえば、レトロウイルスベクターを使用して(米国特許第 4,980,286 号明細書を参照)、または直接注射により、または微小粒子銃を使用して(たとえば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でコーティングして、または核に進入することが分かっているホメオボックス様ペプチドに連結して核酸を投与して(たとえば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 を参照)、細胞内に移行するように投与することにより、核酸をインビボ投与してコードされている抗体の発現または融合を促進してもよい。あるいは、相同組換えにより発現させるため、核酸を細胞内に導入し、宿主細胞 DNA に組み込ませてもよい。

【0157】

治療上または予防上有効な量の抗体または融合タンパク質を用いた被検体の処置は、単回処置を含んでもよいし、あるいは、好ましくは何回かの処置を含んでもよい。

【0158】

G. 医薬組成物

組成物は、医薬組成物の製造に有用なバルク薬剤組成物(たとえば、不純物を含むまたは非無菌の組成物)、および単位剤形の調製に使用することができる医薬組成物(すなわち、被検体または患者への投与に好適な組成物)を含む。そうした組成物は、本明細書に開示された予防上または治療上有効な量の予防薬および/または治療薬、またはそうした薬と薬学的に許容されるキャリアとの組み合わせを含む。好ましくは、開示される組成物は、予防上または治療上有効な量の抗体または融合タンパク質および薬学的に許容されるキャリアを含む。

【0159】

特定の実施形態では、「薬学的に許容される」という用語は、米国連邦政府または州政府

50

府の規制当局により承認されている、または動物、より詳細にはヒトにおける使用について米国薬局方または他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「キャリア」という用語は、療法剤と共に投与される希釈液、アジュバント（たとえば、フロイントアジュバント（完全および不完全）、賦形剤またはビヒクルをいう。そうした薬学的キャリアは、無菌液、たとえば水、および、たとえば石油起源、動物起源、植物起源または合成起源の油、たとえばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油および同種のものであってもよい。医薬組成物を静脈投与する場合、水は好ましいキャリアである。また、特に注射溶液の液体キャリアとして食塩水溶液、ならびにデキストロスおよびグリセロール水溶液を使用してもよい。好適な医薬品賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールおよび同種のもので挙げられる。本組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤をさらにも含む。これらの組成物は、溶液剤、懸濁剤、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出製剤および同種のもの形態をとってもよい。

10

20

30

40

50

【0160】

一般に、組成物の成分は、たとえば、密封容器、たとえば有効成分の量を表示するアンブルまたはサッシュェ (sachette) に乾燥凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、別々に提供されるか、あるいは単位剤形中に混ぜ合わされる。本組成物を注入により投与する場合、無菌の医薬品グレードの水または食塩水を含む輸液ボトルに組成物を混注してもよい。組成物を注射により投与する場合、無菌注射用水または食塩水のアンブルを用意して、投与前に成分を混合できるようにしてもよい。

【0161】

組成物は、中性形態として製剤化しても、あるいは塩形態として製剤化してもよい。薬学的に許容される塩として、アニオンとで形成される塩、たとえば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等から得られる塩、およびカチオンとで形成される塩、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から得られる塩があるが、これに限定されるものではない。

【0162】

H. キット

一実施形態は、抗体または融合タンパク質が入った1つまたは複数の容器を含む医療パックまたはキットを提供する。加えて、医療パックまたはキットには、疾患の処置に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬がさらにも含まれていてもよい。一実施形態は、医薬組成物の成分の1つまたは複数が入った1つまたは複数の容器を含む医療パックまたはキットを提供する。そうした容器には任意に、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関より定められた形式の注意書が添付されていてもよい。注意書には、ヒト投与を目的とした製造、使用または販売に関するその機関の承認が反映される。

【0163】

本発明は、上記の方法に使用することができるキットを提供する。一実施形態では、キットは、1つまたは複数のヒト化抗体または融合タンパク質を含む。別の実施形態では、キットは、癌の処置に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬を1つまたは複数の容器にさらにも含む。別の実施形態では、キットは、癌に関連する1つまたは複数の癌抗原に結合する1つまたは複数の細胞傷害性抗体をさらにも含む。ある種の実施形態では、他の予防薬または治療薬は化学療法剤である。他の実施形態では、予防薬または治療薬は、生物療法剤またはホルモン療法剤である。

【0164】

I. 診断方法

B7-H5抗体およびその抗原結合フラグメントは、B7-H5の発現に関連する疾患

、障害または感染症を検出、診断またはモニターすることなど、診断目的に使用することができる。本発明は、疾患、障害または感染症、特に自己免疫疾患の検出または診断を提供し、それは、(a)被検体の細胞または組織サンプルにおけるB7-H5の発現を、そうした抗原に免疫特異的に結合する1つまたは複数の抗体(またはそのフラグメント)を使用してアッセイすること;および(b)抗原のレベルを対照レベル、たとえば、正常組織サンプルのレベルと比較することによって実施することができ、抗原の対照レベルと比較した、アッセイされた抗原レベルの上昇または低下から疾患、障害または感染症が示唆される。そうした抗体およびフラグメントは、好ましくはイムノアッセイ、たとえば酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および蛍光活性化セルソーティング(FACS)に利用される。

10

【0165】

一実施形態は、そうした抗体およびフラグメント、特にヒトB7-H5に結合するそうした抗体およびフラグメントの、インビトロまたはインサイツ組織サンプルの細胞、またはインビボでの細胞におけるIHC解析の試薬としての使用に関する。以上のように、本発明の抗体およびフラグメントは、ヒトの疾患、障害または感染症の検出および診断に有用である。一実施形態では、そうした診断は、a)B7-H5に免疫特異的に結合する有効量の標識抗体または抗原結合フラグメントを被検体に(たとえば、非経口、皮下または腹腔内)投与すること;b)投与後、B7-H5が発現する被検体の部位に標識分子が優先的に濃縮する(および、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルまで除去される)ことができる時間間隔を置くこと;c)バックグラウンドレベルを判定すること;およびd)被検体の標識抗体を検出することを含み、標識抗体のバックグラウンドレベルを上回る検出から、被検体が疾患、障害または感染症であることが示唆される。この実施形態では、当業者に公知のイメージングシステムを用いて検出が可能なイメージング部分で抗体を標識する。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を個々のシステムに対して以前に判定された標準値と比較するなど様々な方法により判定することができる。

20

【0166】

当該技術分野においては、被検体の大きさおよび使用するイメージングシステムにより、診断画像を得るのに必要なイメージング部分の量が決定されることが理解されよう。インビボでの腫瘍イメージングについては、S.W.Burchiel et al.,「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W.Burchiel and B.A.Rhodes, eds., Masson Publishing Inc.(1982))に記載されている。

30

【0167】

投与後、標識分子が被検体の部位に優先的に濃縮でき、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルまで除去される時間間隔は、使用する標識の種類および投与モードなどいくつかの変数に応じて、6~48時間または6~24時間または6~12時間である。別の実施形態では、投与後の時間間隔は5~20日または5~10日である。

40

【0168】

一実施形態では、疾患、障害または感染症のモニタリングは、疾患、障害または感染症の診断方法を、たとえば、最初の診断から1ヶ月後、最初の診断から6ヶ月後、最初の診断から1年後等に繰り返すことにより行う。

【0169】

被検体における標識分子の存在は、インビボスキャンニングのための当該技術分野において公知の方法を用いて検出することができる。こうした方法は、使用する標識の種類によって異なる。当業者であれば、特定の標識を検出するのに適切な方法を決定することができる。開示された診断方法に使用してもよい方法および装置として、コンピューター断層

50

撮影 (C T)、全身スキャン、たとえばポジション断層法 (P E T)、磁気共鳴イメージング (M R I) および超音波検査があるが、これに限定されるものではない。

【 0 1 7 0 】

特定の実施形態では、分子を放射性同位元素で標識し、患者において放射線応答性手術装置を用いて検出する (T h u r s t o n e t a l . 米国特許第 5 , 4 4 1 , 0 5 0 号明細書)。別の実施形態では、分子を蛍光性化合物で標識し、患者において蛍光応答性スキャン装置を用いて検出する。別の実施形態では、分子をポジトロン放出金属で標識し、患者においてポジトロン断層法を用いて検出する。なお別の実施形態では、分子を常磁性標識で標識し、患者において磁気共鳴イメージング (M R I) を用いて検出する。

【 0 1 7 1 】

これまで本発明について一般的に記載してきたが、以下の例を参照することで本発明をより容易に理解することができるであろう。以下の例は例示として提供するものであり、記載がない限り、本発明を限定することを意図するものではない。

【 実施例 】

【 0 1 7 2 】

実施例 1

抗ヒト B 7 - H 5 抗体の単離および特性評価

ハムスターに B 7 - H 5 を接種し、B 7 - H 5 免疫反応性抗体を発現するハイブリドーマを単離することによって抗ヒト B 7 - H 5 抗体を得た。抗体産生クローン 2 D 3 および 1 8 C 3 を単離した。図 4 A ~ 4 B に、クローン 2 D 3 および 1 8 C 3 によって産生された抗体の、C H O トラnsフェクタントによって発現されたヒト B 7 - H 5 に結合する能力を示す。

【 0 1 7 3 】

単離された抗体の B 7 - H 5 : C D 2 8 H 相互作用に対する遮断能力を、そのような抗体の存在下、ヒト B 7 - H 5 発現 C H O トラnsフェクタントをインキュベートし、C D 2 8 H I g (配列番号 2 0) および抗ヒト I g P E の濃度を増大させることによって測定した。

【 0 1 7 4 】

そのような実験において、非遮断性抗体の存在下でインキュベートした細胞は、C D 2 8 H I g に結合することができる (第 2 の移動ピークとして見られる) (図 5 A ~ 5 B)。抗体 2 D 3 および 1 8 C 3 は、B 7 - H 5 : C D 2 8 H 相互作用を遮断することが分かった。

【 0 1 7 5 】

本発明の抗 B 7 - H 5 抗体 (2 D 3) の B 7 - H 5 : C D 2 8 H 相互作用に対する遮断能力を試験した。B 7 - H 5 I g 融合を作製し、C D 2 8 H に結合し、それにより T 細胞反応を促進することができることが分かった (図 6)。融合タンパク質は、マウス I g G 2 a 配列に融合した、以下の B 7 - H 5 の細胞外ドメインである (配列番号 2 6) である。

```
IFPLAFFIYVPMNEQIVIGRLDEDIILPSSFERGVSEVVIHWKYQDSYKVVHSYYKGSDDLHLESQ
DPRYANRTSLFYNEIQNGNASLFFRRVSLLDDEGIYTCYVGTAIQVITNKVVVLKVGVLFTPV
KYEKRNNSFLICSVLSVYPRPIITWKMDNTPISENNMEETGSLDSFSINSPLNITGSSSY
ECTIENSLKQWTWTGRWTMKDGLHKMQSEHVSLSQPVNDYFSPNQDFKVTWSRMKSGTFSV
LAYLLSSSQNTIINESRFSWNKELINQSDFSMNLMDLNLSDSGEYLCNISSDEYTLTITHTV
HVEPSQET
```

I g G 2 a 配列は以下のとおりであり得る (配列番号 2 7)。

10

20

30

40

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLISLSPIVTCVVV
 DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM
 SGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPOVYVLPPEEEMTKKQVT
 LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEK
 KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSFSTRTPGK

【0176】

mIgG2aは、Fab腕またはC末端Lysの欠失の安定化のために、S->P修飾（以下に詳細に説明、配列番号20に示す）を必要としない。融合タンパク質はまた、他のIg配列、たとえばヒトIgG4とともに作製することができる。ヒトIgG4では、好ましくは、上述したヒトIgG4の例で説明したように、S->P修飾および/または最終Lys残基の欠失を含み得る。

10

【0177】

融合タンパク質は、CD33シグナルペプチド（天然シグナルペプチドではない）をコードするベクターから発現された。

【0178】

実施例2

図7に、サイトカイン（IL-2、IFN- およびIL-10）を誘発し、それによってB7-H5 Igの能力を示す。これにより、その分子の免疫系を刺激する能力が確認される。抗B7-H5抗体2D3の供給によってそうした刺激が阻害された（図8）。抗体はまた、同種T細胞反応を阻害することができることが分かった（図9）。これらの結果は、B7-H5に結合して、B7-H5がCD28Hと相互作用する能力を遮断することができる、本発明のそれらの抗体が、免疫系の活性化の生理的低下を仲介し得ることを示している。

20

【0179】

抗ヒトB7-H5抗体は、インビボにおいて、活性化T細胞の割合を低下させる

抗ヒトB7-H5抗体のインビボでの効果を調べるために、2000万個の末梢血単核細胞（PBMC）をNOD scid IL2受容体ガンマ鎖ノックアウト（NSG）マウス（たとえば、Iorns, E. et al. (Epub 2012 Oct 31) 「A New Mouse Model For Study Of Human Breast Cancer Metastasis」, PLoS One 7(10): e47995; Misharin, A. V. et al. (2012) 「Development Of A New Humanized Mouse Model To Study Acute Inflammatory Arthritis」, J. Transl. Med. 10:190; Waldron-Lynch, F. et al. (Epub 2012 Aug 17) 「Analysis Of Human Biologics With A Mouse Skin Transplant Model In Humanized Mice」, Amer. J. Transplant. 12(10): 2652-2662; Volk, A. et al. (2012) 「Comparison Of Three Harmonized Mouse Models For Adoptive T Cell Transfer」, J. Gene Med. 14(8): 540-548; Racki, W. J. et al. (2010) 「NOD-scidIL2rgamma(null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection」, Transplantation 89(5) 527-536を参照)の腹腔内に注入した。リン酸緩衝食塩水（PBS）または抗ヒトB7-H5抗体（2D3）を動物の尾の静脈に注入し、CD45RO⁺細胞中のCD28H⁺細胞の割合を測定した。

30

40

【0180】

50

図10Aおよび図10Bに示すように、脾臓(図10A)および末梢血(図10B)における活性化(CD45RO⁺)ヒトT細胞中のCD28H⁺細胞の割合は抗ヒトB7-H5抗体(図10A)による処理により低下した。このようにB7-H5抗体による処理は、インビボにおいて、活性化T細胞の割合を低下させる。その一方、そのような処理は、ナイーブ(CD45RO⁻)T細胞集団に対しては限られた効果を示しただけであった(図11Aおよび図11B)。

【0181】

実施例3

組換え抗ヒトB7-H5抗体は抗原特異性を保持する

IgG4抗体は特有の構造特性および機能特性を有し、インビボで「半抗体交換(half-antibody exchange)」を受け、2つの異なる結合特異性からなる組換え抗体が形成される(Nirula, A. et al. (2011)「What Is IgG4? A Review Of The Biology Of A Unique Immunoglobulin Subtype」, Curr. Opin. Rheumatol. 23(1):119-124; . Aalberse, et al. (2009)「Immunoglobulin G4: An Odd Antibody」, Clin. Exp. Allergy 39(4):469-477)。Ser228がProに変化して腕が安定化する。キメラhIgG4Pは「半抗体交換(half-antibody exchange)」をしない。

【0182】

本発明の抗ヒトB7-H5結合抗体(抗体2D3および18C3)を、それらのネイティブハムスターアイソタイプから、組換え技術のよって、ヒトIgG4Pアイソタイプに変換した。その後、ヒトB7-H5を発現するCHOトランスフェクタントを、組換え抗体の存在下でインキュベートした。図12A~Cに示すように、両ヒトIgG4P誘導体抗体は、ヒトB7-H5に免疫特異的に結合する能力、およびB7-H5-CD28H相互作用を妨げる遮断能力を保持していることが分かった(図13、パネルA~C)。図14A~14Bは、抗体2D3および18C3が、B7-H5とCD28Hとの相互作用を仲介する(図14C)、B7-H5の第1のIgVドメインを認識していることを示している。図15は、CHO細胞の表面に発現しているヒトB7-H5に対する、抗体2D3および18C3の結合親和性を比較したものである。

【0183】

実施例4

B7-H5:CD28H相互作用の遮断は、破傷風トキソイド(TT)特異的T細胞反応を阻害する

メモリー特異的T細胞リコールに対するB7-H5:CD28H相互作用の効果を調べるために、ヒトPBMCと自己樹状細胞で再構成したNSGマウスに破傷風トキソイド(「TT」)ワクチンを接種した。同日に、マウスを対照Igまたは抗ヒトB7-H5抗体2D3で処理した。7日後、腹腔内の細胞を採取し、TT抗原で再刺激した。T細胞の分裂をBrdUを取り込ませることによって分析した。培養上清中のサイトカインをヒトTh1/Th2 CBAキットにより試験した。

【0184】

そのような試験結果を図16A~16Bに示す。これらの図に示すように、内因性B7-H5:CD28H相互作用は、BrdUの取り込みによって示されるように、B7-H5遮断性mAb 2D3のマウスへの注入によって、TTワクチンで誘導されるT細胞の増殖が顕著に阻害されることから、TT特異的メモリーT細胞のリコールに重要であると考えられる(図16A、パネルA~B)。その結果、培養上清中のIFN-、IL-5およびIL-10などのサイトカインはいずれも2D3 mAbによって実質的に減少した(図16B、パネルA~B)。まとめると、この結果はB7-H5:CD28H相互作用がメモリーT細胞のリコールに重要な役割を果たしていることを示している。

【0185】

10

20

30

40

50

実施例 5

B7-H5 : CD28H相互作用の遮断は、同種T細胞反応を阻害する

インビボでの同種反応に対するB7-H5 : CD28H相互作用の効果を調べるために、ヒト化NSGマウスに同種ヒトマクロファージを注入した。同日に、マウスを対照または2D3 mAbとともにインキュベートした。7日目に、脾細胞を採取し、同種のCD4およびCD8のT細胞の増殖を、細胞内染色によりKi-67の発現を観察することによって評価した。

【0186】

そのような試験結果を図17に示す。図17に示すように、内因性B7-H5 : CD28H相互作用は、Ki-67発現によって示されるように、B7-H5遮断性mAb 2D3のマウスへの注入によって、CD8+ (図17A)およびCD4+ (図17B)の両T細胞の増殖が顕著に阻害されることから、同種T細胞反応に重要であると考えられる。

10

【0187】

実施例 6

B7-H5 : CD28H相互作用の遮断は、ヒトT細胞におけるAKT活性化を阻害する

そのような試験結果を図18に示す。図18に示すように、内因性B7-H5 : CD28H相互作用は、TCRシグナルの存在下でのAKT経路の活性化に重要であると考えられる。TCRとB7-H5融合タンパク質の同時架橋は、刺激後30分にAKTリン酸化反応を誘起したが、TCR単独の架橋ではAKTリン酸化反応の誘起は最小限であった。B7-H5遮断性抗体2D3が含まれることによって、AKT活性化が妨げられ、これによりB7-H5遮断がT細胞AKT経路の活性化を遮断し得ることが示された。

20

【0188】

実施例 7

B7-H5 : CD28H相互作用の遮断は、癌細胞に対する細胞傷害性Tリンパ球の殺活性を抑制する

そのような試験結果を図19に示す。図19に示すように、おとり受容体融合タンパク質によるB7-H5-CD28H経路の遮断は、いくつかのエフェクター対標的(E:T)比の条件でCTL殺活性を阻害するため、癌に関連するB7-H5と、CD28Hを発現する細胞障害性T細胞との相互作用は細胞障害性殺活性を共刺激する。

30

【0189】

実施例 8

B7-H5 : CD28H相互作用の遮断は、ナチュラルキラー細胞活性を抑制する

そのような試験結果を図20A~Bに示す。図20Aに示すように、可溶性組換えヒトIL-2の存在下でのナチュラルキラー細胞(NK)上のCD16およびB7-H5融合タンパク質の同時架橋は、NK活性化および脱顆粒を誘発した(CD107a表面の上方制御)が、CD16結合単独では、さほど顕著なNKの脱顆粒は誘発されなかった。B7-H5抗体2D3によるB7-H5-CD28H経路の遮断は、NKの脱顆粒を抑制し(図20B)、これはB7-H5がNKの活性化を共刺激することを示すものである。

【0190】

本明細書に言及した刊行物および特許はすべて、1つ1つの刊行物または特許出願を、その全体を援用するために具体的に個々に示してあるのと同じ程度に本明細書に援用する。本発明についてその特定の実施形態と共に記載してきたが、本発明はさらに修正を行うことができ、本出願は、一般に本発明の原理に従う本発明の任意の変更、使用または適合を包含することを意図しており、さらに本発明の属する技術分野において既知または一般的な慣行の範囲内にあり、上記に記載した本質的特徴に適用し得る本開示からの逸脱を含むことが理解されよう。

40

【 図 1 】

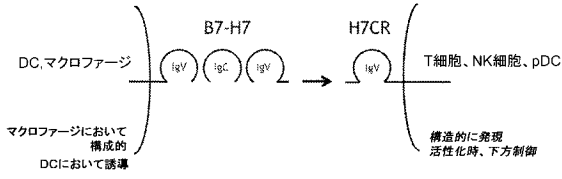


図1

【 図 2 】

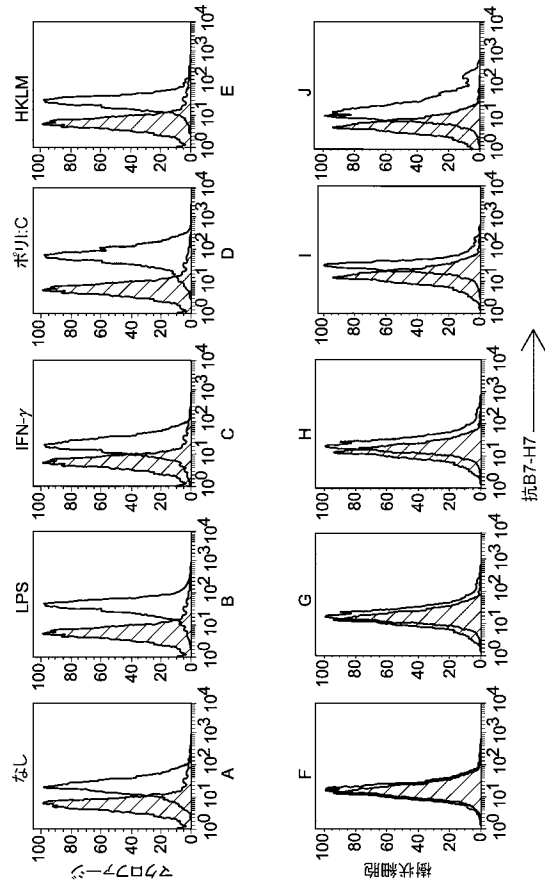
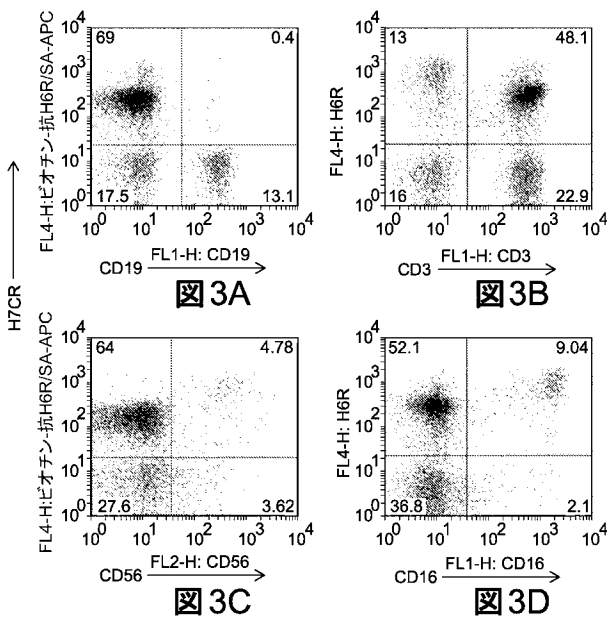


図2

【 図 3 】



【 図 4 】

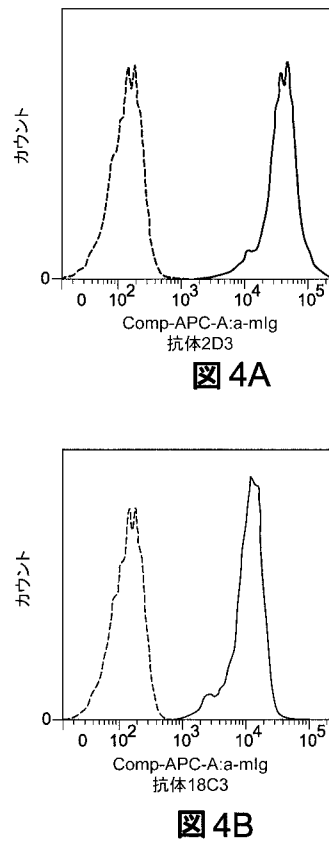


図4A

図4B

【 図 5 】

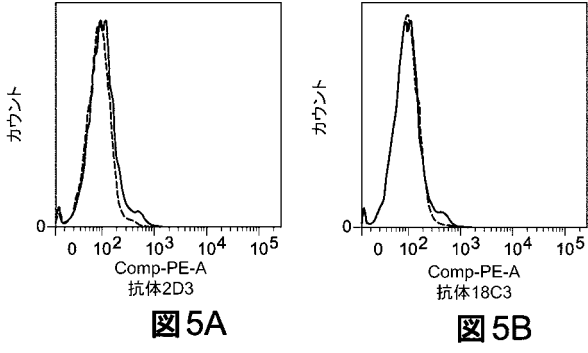


図 5A

図 5B

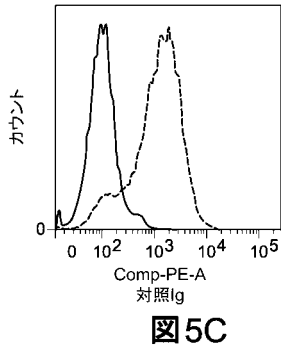


図 5C

【 図 6 】

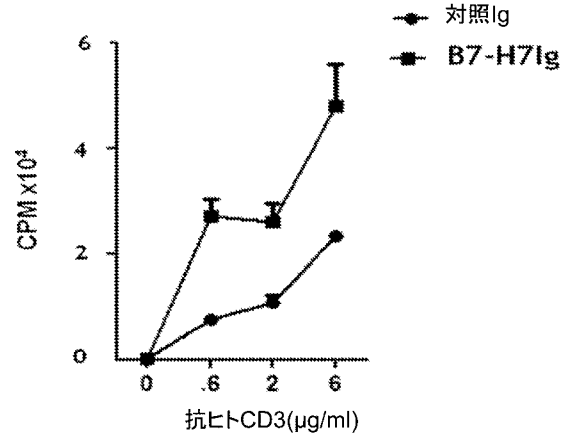


図 6

【 図 7 】

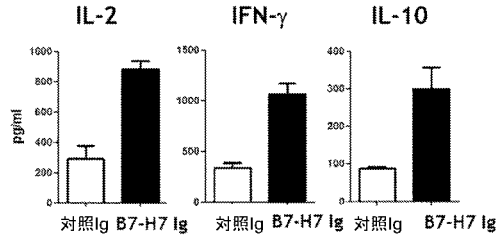


図 7

【 図 8 】

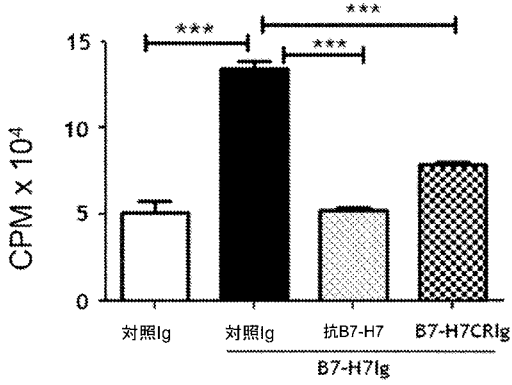


図 8

【 図 9 】

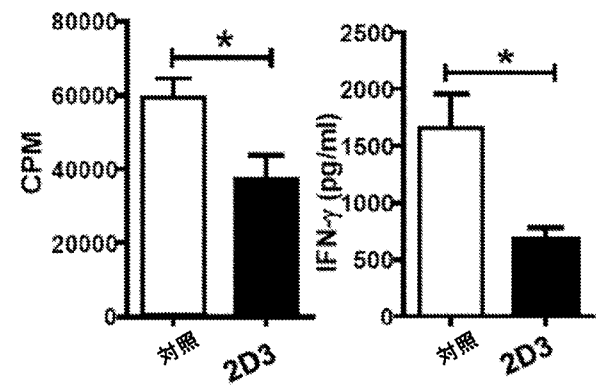


図 9

【 図 1 0 】

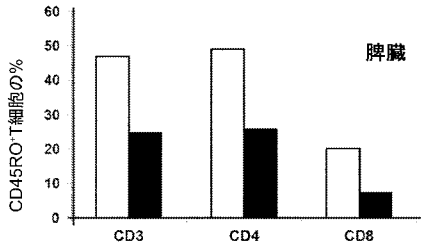


図10A

【 図 1 1 】

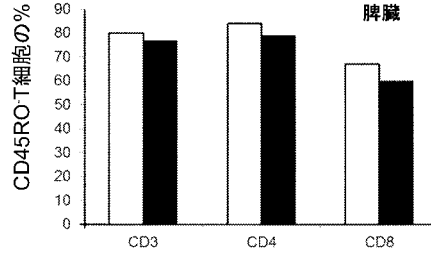


図11A

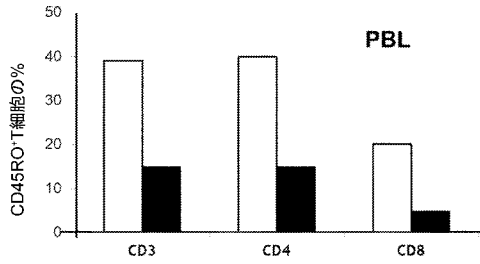


図10B

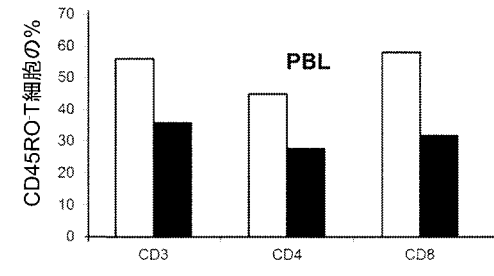
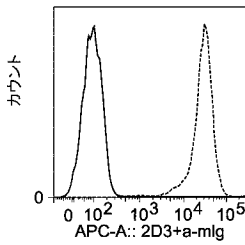


図11B

□ PBS
■ 抗B7-H7抗体

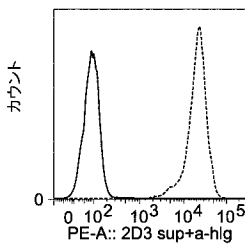
□ PBS
■ 抗B7-H7抗体

【 図 1 2 】



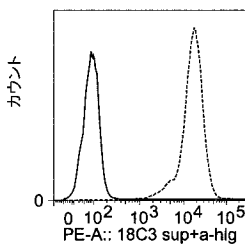
精製抗ヒト
B7-H7抗体2D3

図12A



組換え抗ヒトB7-H7
キメラ抗体2D3(hlgG4)

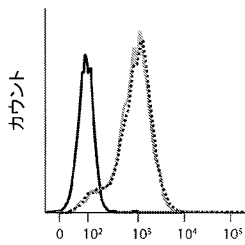
図12B



組換え抗ヒトB7-H7
キメラ抗体18C3(hlgG4)

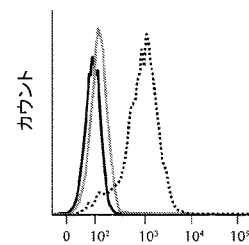
図12C

【 図 1 3 】



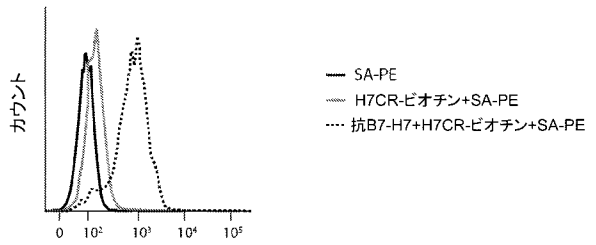
PE-A::対照+H7CR-ビオチン+SA

パネルA
対照



PE-A::2D3+H7CR-ビオチン+SA

パネルB
抗体2D3



PE-A::18C3+H7CR-ビオチン+SA

パネルC
抗体18C3

図13

【 図 1 4 】

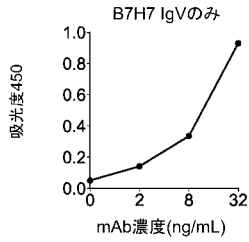


図14A

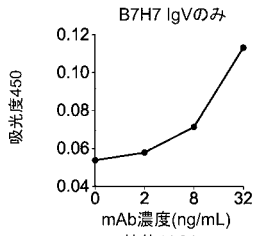


図14B

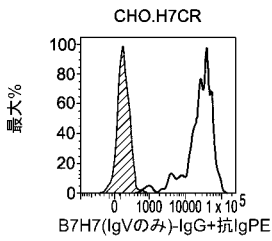


図14C

【 図 1 5 】

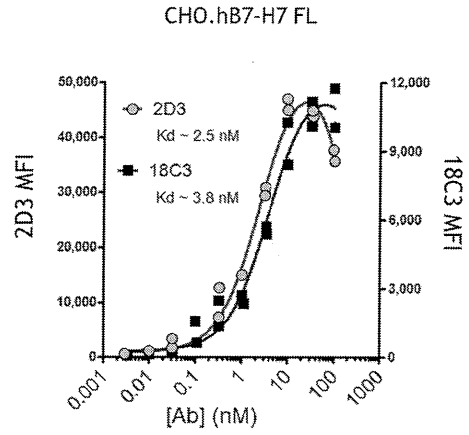
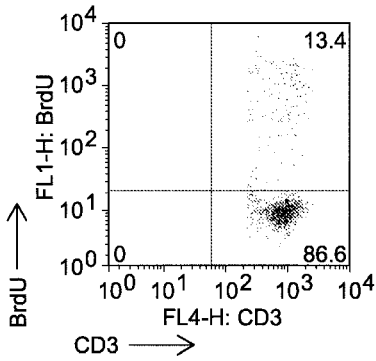
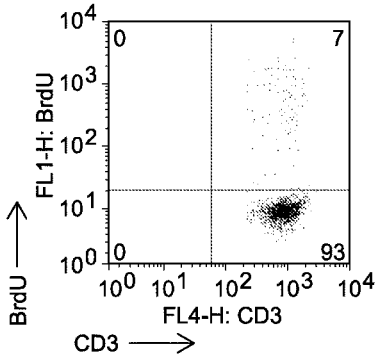


図15

【 図 1 6 A 】



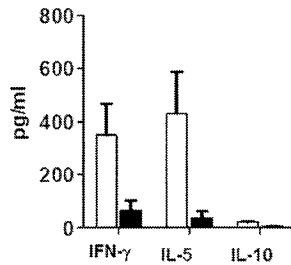
パネルA:対照



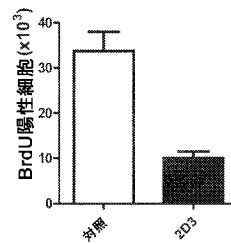
パネルB:抗体2D3

図16A

【 図 1 6 B 】



パネルA: サイトカインレベル



パネルB: BrdU陽性細胞

図16B

【 図 17 】

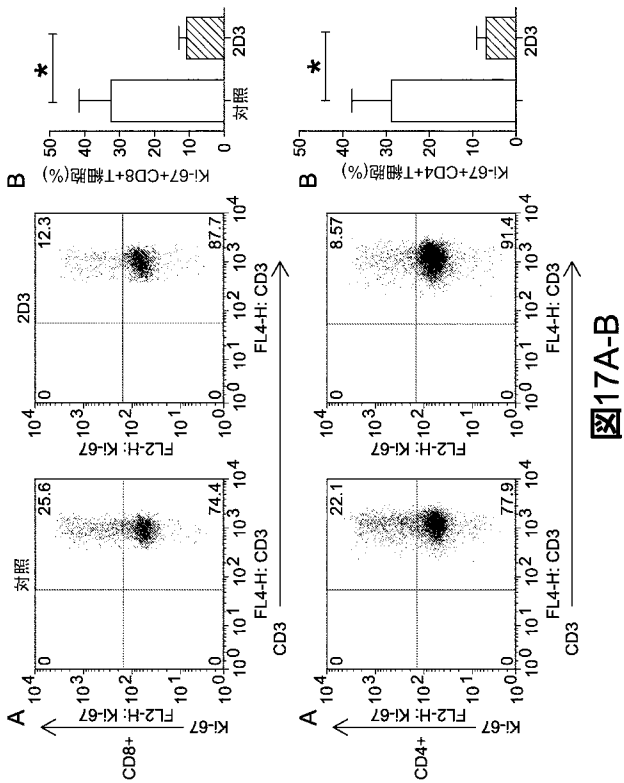


図17A-B

【 図 18 】

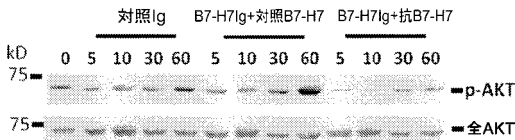


図18

【 図 19 】

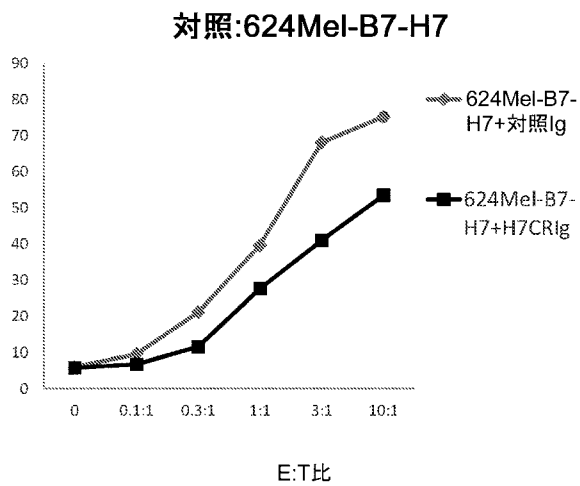


図19

【 図 20 A 】

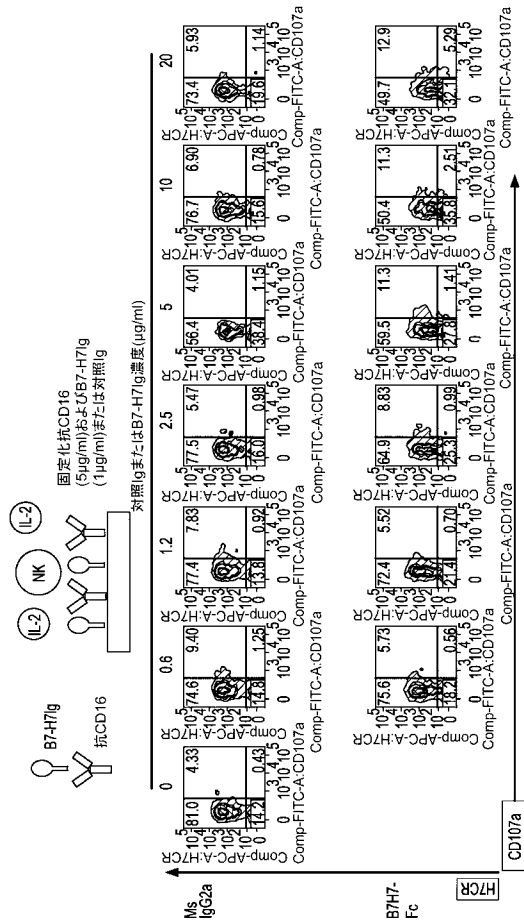


図20A

【 図 20B 】

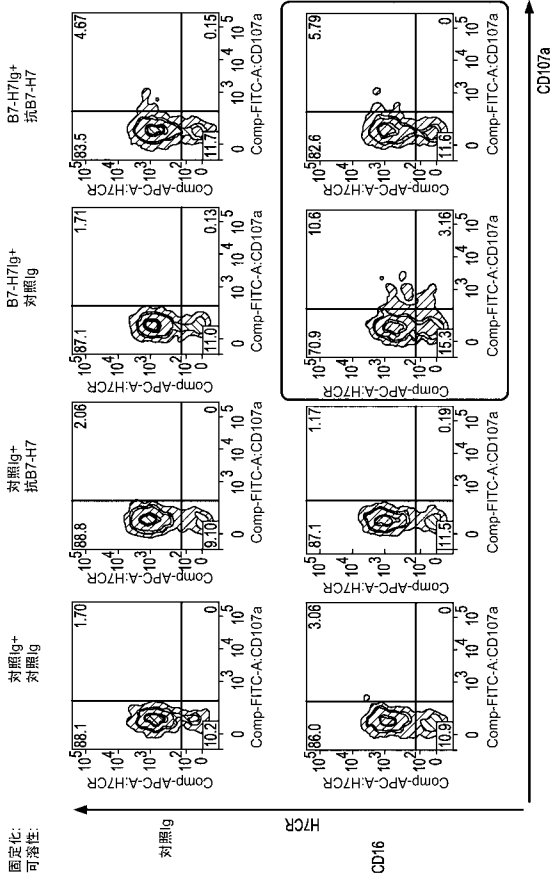


图 20B

【 配列表 】

2016527187000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/039621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C07K16/28 A61K39/00 ADD.		
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) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L. WANG ET AL: "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 8, no. 6, 14 March 2011 (2011-03-14), pages 467-592, XP055080701, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/nri2326 abstract ----- -/--	1-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 22 September 2014		Date of mailing of the international search report 06/03/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Turri, Matteo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/039621**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-50(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/039621

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D. B. FLIES ET AL: "Cutting Edge: A Monoclonal Antibody Specific for the Programmed Death-1 Homolog Prevents Graft-versus-Host Disease in Mouse Models", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 187, no. 4, 18 July 2011 (2011-07-18) , pages 1537-1541, XP055140738, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1100660 -----	1-50
A	MOUSTAFA A. SAKR ET AL: "GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase", CANCER SCIENCE, vol. 101, no. 11, 13 July 2010 (2010-07-13), pages 2368-2374, XP055140743, ISSN: 1347-9032, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01675.x -----	1-50
A	WO 2011/020024 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; CHEN LIEPING [US]) 17 February 2011 (2011-02-17) paragraph [0153] paragraph [0656] - paragraph [0659] -----	1-50
A	LINSLEY PETER S ET AL: "The clinical utility of inhibiting CD28-mediated costimulation", May 2009 (2009-05), IMMUNOLOGICAL REVIEWS, VOL. 229, PAGE(S) 307-321, XP055139830, ISSN: 0105-2896 -----	1-50
A	MARTIN F FLAJNIK ET AL: "Evolution of the B7 family: co-evolution of B7H6 and Nkp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC", IMMUNOGENETICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 64, no. 8, 11 April 2012 (2012-04-11) , pages 571-590, XP035083875, ISSN: 1432-1211, DOI: 10.1007/S00251-012-0616-2 -----	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/039621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011020024 A2	17-02-2011	AU 2010282340 A1	01-03-2012
		CA 2769822 A1	17-02-2011
		EP 2464661 A2	20-06-2012
		JP 2013501814 A	17-01-2013
		US 2012219559 A1	30-08-2012
		WO 2011020024 A2	17-02-2011

International Application No. PCT/ US2014/ 039621

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-50(partially)

All subject-matter relating the antibody binding to B7-H5 and characterized by heavy chain variable region SEQ ID NO:9 and light chain variable region SEQ ID NO:11 (clone 2D3); pharmaceutical compositions comprising the antibodies, uses of the antibodies, methods.

2. claims: 1-50(partially)

All subject-matter relating the antibody binding to B7-H5 and characterized by heavy chain variable region SEQ ID NO:13 and light chain variable region SEQ ID NO:15 (clone 18C3); pharmaceutical compositions comprising the antibodies, uses of the antibodies, methods.

3. claims: 24-37, 48-50(all partially)

All subject-matter relating to CD28H: pharmaceutical compositions comprising a CD28H-Ig fusion. Use of a CD28H-Ig fusion protein in the manufacture of a medicament. Pharmaceutical compositions for use in methods of treating subjects for diseases characterized by increased expression of CD28H.

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	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	5/38 (2006.01)	A 6 1 P	5/38	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
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	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
		C 1 2 N	15/00	A

(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

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100188271

弁理士 塚原 優子

(72)発明者 チェン, リーピン

アメリカ合衆国 0 6 5 1 4 コネチカット州, ハムデン, カンターベリー ロード 5 1

(72)発明者 ヤオ, シェン

アメリカ合衆国 2 1 0 4 4 メリーランド州, コロンビア, プライス オーバールック コート

1 1 7 4 8

(72)発明者 リウ, リンダ

アメリカ合衆国 2 1 0 2 9 メリーランド州, クラークスビル, ティップアラリー コート 6 5
1 2

(72)発明者 ランガーマン, ソロモン

アメリカ合衆国 2 1 2 1 5 メリーランド州, バルティモア, クロス カントリー ブルバード
6 6 0 6

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4C085 AA14 AA16 BB11 BB36 CC23 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA30 BA41 BA70 BA72 CA40 DA50 DA76 EA20 EA50

FA71 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016527187A5	公开(公告)日	2017-07-06
申请号	JP2016515141	申请日	2014-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司 约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司 约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	チェンリーピン ヤオシエン リウリンダ ランガーマンソロモン		
发明人	チェン,リーピン ヤオ,シエン リウ,リンダ ランガーマン,ソロモン		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P37/02 A61P17/14 A61P7/06 A61P25/00 A61P17/02 A61P1/04 A61P13/12 A61P11/00 A61P5/38 A61P5/14 A61P7/04 A61P9/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P27/02 A61P11/06 A61P37/08 A61P31/04 A61P19/08 A61P31/12 A61P37/06 G01N33/53 C12P21/08 C07K14/705 C07K19/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/2827 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 A61K2039/505		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.N A61P37/02 A61P17/14 A61P7/06 A61P25/00 A61P17/02 A61P1/04 A61P13/12 A61P11/00 A61P5/38 A61P5/14 A61P7/04 A61P9/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P3/10 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P11/06 A61P37/08 A61P31/04 A61P19/08 A61P31/12 A61P37/06 G01N33/53.Y C12P21/08 C07K14/705 C07K19/00 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB36 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/827216 2013-05-24 US		
其他公开文献	JP2016527187A JP6682426B2		

摘要(译)

本发明涉及抗体及其抗原结合片段, 以及能够与B7-H5: CD28H途径的B7-H5配体免疫特异性结合的其他分子, 以及自身免疫性疾病, 移植排斥和 它涉及这种分子在治疗和诊断其他炎性疾病中的用途。 [选型图]图1

