

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6002659号
(P6002659)

(45) 発行日 平成28年10月5日(2016.10.5)

(24) 登録日 平成28年9月9日(2016.9.9)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 19 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-505106 (P2013-505106)	(73) 特許権者	300056347
(86) (22) 出願日	平成23年4月13日(2011.4.13)		セルデックス・セラピューティクス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2013-531970 (P2013-531970A)		アメリカ合衆国O2194マサチューセッツ州ニーダム、フォース・アベニュー119番
(43) 公表日	平成25年8月15日(2013.8.15)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/032355		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02011/130434	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開日	平成23年10月20日(2011.10.20)		弁理士 春名 雅夫
審査請求日	平成26年4月10日(2014.4.10)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	61/471,459		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成23年4月4日(2011.4.4)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	61/323,720		
(32) 優先日	平成22年4月13日(2010.4.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトCD27に結合する抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトCD27に結合する、単離されたモノクローナル抗体であって、配列番号38を含む重鎖可変領域のCDR1、配列番号39を含む重鎖可変領域のCDR2、配列番号40を含む重鎖可変領域のCDR3、配列番号44を含む軽鎖可変領域のCDR1、配列番号45を含む軽鎖可変領域のCDR2、および配列番号46を含む軽鎖可変領域のCDR3を含む、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項2】

抗体が、

(i)それぞれ、配列番号37および43に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域および軽鎖可変領域；または

(ii) それぞれ、配列番号35および41に示される核酸配列と少なくとも95%同一である核酸配列によってコードされる、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項3】

抗体が、それぞれ配列番号37および43に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項1または2に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項4】

抗体が、それぞれ、配列番号35および41に示される核酸配列によってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項1または2に記載の単離されたモノク

10

20

ーナル抗体。

【請求項 5】

抗体が、

(i) IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgE抗体；ならびに/または

(ii) ヒト抗体、ヒト化抗体、もしくはキメラ抗体

から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体を含む二重特異性分子であって、該抗体とは異なる結合特異性を有する第 2 の分子と連結している前記二重特異性分子。

10

【請求項 7】

第2の分子が、Fc受容体、NK受容体、またはCD3、CD40、およびCD25から選択されるT細胞受容体に結合する、請求項 6 に記載の二重特異性分子。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 6 もしくは 7 に記載の二重特異性分子、および担体を含む、組成物。

20

【請求項 11】

さらに以下を含む、請求項 10 に記載の組成物：

(i) アジュバントおよび/もしくは免疫賦活剤；または

(ii) 免疫抑制剤、別の抗体、および/もしくは抗原。

【請求項 12】

免疫賦活剤が、CD40リガンド、FLT3リガンド、サイトカイン、コロニー刺激因子、抗CTL A-4抗体、LPS (エンドトキシン)、ssRNA、dsRNA、カルメット - ゲラン桿菌 (BCG)、塩酸レバミソール、静注用免疫グロブリン、およびトール様受容体 (TLR) 作動薬から選択される、請求項 11 記載の組成物。

30

【請求項 13】

トール様受容体 (TLR) 作動薬が、TLR3作動薬、TLR4作動薬、TLR5作動薬、TLR7作動薬、TLR8作動薬、およびTLR9作動薬から選択される、請求項 12 記載の組成物。

【請求項 14】

抗原が、病原体の成分、アレルゲン、自己抗原、または腫瘍抗原を含む、請求項 11 記載の組成物。

【請求項 15】

腫瘍抗原が、hCG、gp100またはPmel17、HER2/neu、WT1、メソテリン、CEA、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、NY-BR-1、NY-CO-58、MN (gp250)、イディオタイプ、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-A3、チロシナーゼ、テロメラゼ、SSX2抗原、MUC-1抗原、および生殖細胞由来の腫瘍抗原から選択される、請求項 14 記載の組成物。

40

【請求項 16】

白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性 (顆粒球性) 白血病、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、真性多血症リンパ腫 (Polycythemia vera Lymphoma)、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫および癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫 (endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫 (lymp

50

hangioendoteliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫(colon sarcoma)、結腸直腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系(CNS)癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮体癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌(小細胞、大細胞)、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌、口唇癌、舌癌、口癌、咽頭癌、卵巣癌、膀胱癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、ならびに泌尿器系の癌から成る群から選択される癌を治療する方法において使用するための、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項17】

生物学的試料中のCD27の存在または非存在を検出するための方法であって、

(a) 生物学的試料と、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体とを接触させる段階であって、該抗体は、検出可能な物質で標識されている、段階；および

(b) CD27に結合した抗体を検出して、該生物学的試料中のCD27の存在または非存在を検出する段階を含む、方法。

20

【請求項18】

白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ球性白血病、マンテル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、真性多血症リンパ腫(Polycythemia vera Lymphoma)、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫および癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioendoteliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫(colon sarcoma)、結腸直腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系(CNS)癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮体癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌(小細胞、大細胞)、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌、口唇癌、舌癌、口癌、咽頭癌、卵巣癌、膀胱癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、ならびに泌尿器系の癌から成る群から選択される癌を治療する方法において使用するための、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体を含む薬学的組成物。

30

40

【請求項19】

白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ球性白血病、マンテル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、真性多血症リンパ腫(Polycythemia vera Lymphoma)、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロ

50

ブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫および癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioendotheliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫(colon sarcoma)、結腸直腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系(CNS)癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮体癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌(小細胞、大細胞)、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌、口唇癌、舌癌、口癌、咽頭癌、卵巣癌、膀胱癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、ならびに泌尿器系の癌から成る群から選択される癌を治療する方法において使用するための薬学的組成物を製造するための、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

20

発明の背景

T細胞と抗原提示細胞との間の相互作用は、免疫応答の発生を促進する種々のアクセサリ分子を伴う。1つのそのような分子は、CD27であり、これは、CD70と結合し、腫瘍壊死因子受容体(TNF-R)スーパーファミリーに属する(Ranheim EA, et al., Blood. 1995 June 15; 85(12): 3556-65(非特許文献1))。CD27は、一般的に、グリコシル化I型膜貫通タンパク質として存在し、しばしば、2つの単量体を連結するジスルフィド架橋を伴うホモ二量体の形態である。ジスルフィド架橋は、膜に近い細胞外ドメインの中にある(Camerini et al., J. Immunol. 147: 3165-69(1991)(非特許文献2))。CD27は、可溶形態で発現する場合もある(例えば、van Oers MH, et al., Blood. 1993 Dec 1; 82(11): 3430-6(非特許文献3)、およびLoenen WA, et al., Eur. J. Immunol. 22: 447, 1992(非特許文献4)を参照されたい)。T細胞上でCD27抗原を架橋させることで、T細胞受容体架橋と協調してT細胞の増殖および細胞免疫活性化を誘発することができる、共刺激シグナルを提供する。

30

【0002】

CD27は、成熟胸腺細胞、大部分のCD4⁺およびCD8⁺末梢血T細胞、ナチュラルキラー細胞、およびB細胞上で発現する(Kobata T, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1995 Nov 21; 92(24): 11249-53(非特許文献5))。CD27はまた、B細胞非ホジキンリンパ腫およびB細胞慢性リンパ球性白血病に対して高発現する(Ranheim EA, et al., Blood. 1995 Jun 15; 85(12): 3556-65(非特許文献1))。加えて、可溶性CD27タンパク質の増加したレベルは、寄生虫感染、サイトメガロウイルス(CMV)感染、サルコイドーシス、多発性硬化症、およびB細胞慢性リンパ球性白血病における血清または疾患活性の部位で同定されている(Loenen WA, et al., Eur. J. Immunol. 22: 447, 1992(非特許文献4))。

40

【0003】

CD27に対する作動性モノクローナル抗体は、近年、T細胞応答を促進することを示しており、抗癌治療法として有望である(例えば、Sakanishi T, et al

50

. , Biochem Biophys Res Commun . 2010 Feb 18 (非特許文献6)、および国際公開公報第2008/051424号(特許文献1)を参照されたい)。しかしながら、これまでに得られた結果は、免疫治療のための有用な目標としてCD27を確立しているが、抗CD27モノクローナル抗体のどの特定の特徴が治療目的に特に好都合であるのか知られていない。よって、当技術分野では、抗CD27抗体を治療上有効なものにする特定の機能的性質のさらなる洞察、ならびに疾患の治療および/または予防にさらに有効である、CD27に対する改善された治療抗体の必要性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0004】

【特許文献1】国際公開公報第2008/051424号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Ranheim EA, et al., Blood . 1995 June 15; 85(12): 3556-65

【非特許文献2】Camerini et al., J. Immunol . 147: 3165-69 (1991)

【非特許文献3】van Oers MH, et al., Blood . 1993 Dec 1; 82(11): 3430-6 (非特許文献3)

20

【非特許文献4】Loenen WA, et al., Eur. J. Immunol . 22: 447, 1992

【非特許文献5】Kobata T, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A . 1995 Nov 21; 92(24): 11249-53

【非特許文献6】Sakanishi T, et al., Biochem Biophys Res Commun . 2010 Feb 18

【発明の概要】

【0006】

本発明は、とりわけ、有利で望ましい治療効果と結び付けることができる特定の機能的性質を有する、単離された抗CD27抗体を提供する。具体的には、(例えば、抗原特異的T細胞応答の誘発または増強によって明らかにされるように) T細胞媒介性免疫応答を上方制御することが可能であり、特に、ワクチン療法との組み合わせに好適である、抗CD27モノクローナル抗体が、本発明によって生成されて特徴付けられた。一実施形態において、作動性抗CD27抗体は、活性ワクチン接種との組み合わせによって、または内因性免疫応答を増強することによって、癌または感染性疾患に対する免疫応答を増強することができる。そのような抗体はまた、サイトカイン発現を直接的または間接的に誘発し得る。加えて、T細胞媒介性免疫応答を下方制御し、特に、移植片拒絶反応、アレルギー、および自己免疫性疾患等の免疫障害の治療に好適である、抗CD27抗体が生成されて特徴付けられた。さらに、直接細胞殺傷機構(例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞介在性細胞傷害性(CDCC))によってCD27発現細胞の増殖を阻害し、特に、細胞増殖を伴う様々な疾患(例えば、癌)を治療する際に有効である、抗CD27抗体が生成されて特徴付けられた。

30

40

【0007】

一実施形態において、本発明の抗CD27抗体は、以下の性質のうちの1つ以上を呈する:

(a) 10 μ g/mLの抗体濃度で、CD27へのsCD70の結合を少なくとも約70%遮断する、

(b) 10⁻⁹ M以下の平衡解離定数K_dで、または代替として、10⁺⁹ M⁻¹以上の平衡会合定数K_aで、ヒトCD27に結合する、

(c) 3 μ g/mLの抗体濃度および約6%のウサギ血清補体で、少なくとも10%の

50

CD27発現細胞の特異的補体媒介性細胞傷害性(CDC)を誘発する、

(d) 3 μg/mLの抗体濃度および75:1のエフェクター細胞対標的細胞の比率で、少なくとも10%のCD27発現細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)特異的溶解を誘発する、

(e) 腫瘍細胞(5 × 10⁵個のRaji細胞または1 × 10⁶個のDaudi細胞)のインビボ接種後の重症複合免疫不全症(SCID)マウスにおいて、3週間にわたって少なくとも週に2回、0.3 mgを投与(腹腔内)した場合に、抗体が投与されないマウスと比較して生存期間中央値を少なくとも20%向上させる、

(f) ワクチンまたは内因性抗原との組み合わせで、抗原特異的免疫応答を誘発または増強する、

(g) ワクチンまたは内因性抗原との組み合わせで、抗原特異的TH1免疫応答を誘発または増強する、

(h) ワクチンまたは内因性抗原との組み合わせで、抗原特異的T細胞の増殖または活性化を誘発または増強する、

(i) T細胞の増殖または活性化を低減または阻害する、

(j) 同時の、別々の、または連続的なTCR活性化と組み合わせた場合に、T細胞活性を誘発または増強する、

(k) 10 μg/mLの抗体濃度で、CD27へのsCD70の結合を少なくとも約70%遮断し、かつFc受容体に結合できないか、またはFc受容体への結合が低減されている場合に、T細胞活性を低減または阻害する、

(l) マカクにおいて、29日間にわたって3 mg/kgで投与(静脈内)した場合に、投与直後にCD3+T細胞(NK細胞以外)の減少が50%を下回る結果となる、または

(m) マカクにおいて、29日間にわたって3 mg/kgで投与(静脈内)した場合に、投与直後に記憶B細胞の減少が50%を下回る結果となる。

【0008】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、これらの機能的性質の組み合わせを呈する。

【0009】

故に、一態様において、本発明は、免疫応答(例えば、T細胞媒介性免疫応答)を誘発および/または増強する、抗CD27抗体を提供する。さらなる実施形態において、抗体は、細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害する。これらの性質の組み合わせを有する特定の抗体としては、それぞれ配列番号37および/または43を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含むmAb 1F5が挙げられる。代替として、抗体は、細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害しない。これらの性質の組み合わせを有する特定の抗体としては、それぞれ配列番号7および/もしくは13、またはそれぞれ配列番号7および/もしくは19を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含むmAb 3H8が挙げられる。そのような抗CD27抗体はまた、T細胞受容体(例えば、CD3、CD25、CD137、CD154)、もしくはFc受容体(例えば、FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32)、FcRIIB1(CD32)、FcRIIB2(CD32)、FcRIIIA(CD16a)、FcRIIB(CD16b)、FcRI、FcRII(CD23)、FcRI(CD89)、Fc/μR、およびFcRn)、もしくはNK受容体(例えば、CD56)、またはB細胞受容体(例えば、CD19、CD20)等の、抗体とは異なる結合特異性を有する第2の分子(例えば、二重特異性分子として)と連結していてもよい。

【0010】

本発明に従って免疫応答の誘発または増強に使用することを意図した抗体は、Fc受容体への結合を可能にする機能的Fcドメインを有してもよく、また、増加したレベルのFc受容体への結合を有する変異Fcドメインを含んでもよい。

【0011】

10

20

30

40

50

別の態様において、本発明は、CD70へのCD27の結合を、これらのタンパク質を発現する細胞上で阻害することによってT細胞媒介性免疫応答を下方制御する、抗CD27抗体を提供する。特定の実施形態において、抗体は、少なくとも約70%、CD27発現細胞への可溶性CD70(sCD70)の結合を阻害する。この種類の範囲に入る特定の抗体としては、例えば、配列番号37および/もしくは43(mAb 1F5)、配列番号49および/もしくは55(mAb 1H8)、または配列番号103および/もしくは109(mAb 3H12)を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含むmAbが挙げられる。

【0012】

さらに別の態様において、本発明は、エフェクター細胞機能(例えば、ADCCまたはCDCを介した細胞殺傷)を誘発または増強する、抗CD27抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、10μg/mLの抗体濃度で、ADCCを介してCD27発現細胞の特異的溶解を少なくとも約30%誘発し、および/または10μg/mLの濃度で、CD27発現細胞のCDCを少なくとも約30%誘発する。ADCCエフェクター機能を呈するこの種類の範囲に入る特定の抗体としては、例えば、配列番号61および/もしくは67(mAb 1G5)、配列番号85および/もしくは91、85および/もしくは97(mAb 3A10)、配列番号:37および/もしくは43(mAb 1F5)、配列番号7および/もしくは13、7および/もしくは19(mAb 3H8)、配列番号49および/もしくは55(mAb 1H8)、または配列番号103および/もしくは109(mAb 3H12)を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含むmAbが挙げられる。さらなる実施形態において、抗体はまた、細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害する。これらの性質の組み合わせを有する特定の抗体としては、例えば、配列番号37および/または43(mAb 1F5)、配列番号49および/または55(mAb 1H8)、配列番号103および/または109(mAb 3H12)を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含むmAbが挙げられる。代替として、抗体は、前述のようにADCCおよび/またはCDCを誘発するが、細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害しない。これらの特徴を有する特定の抗体としては、例えば、配列番号61および/または67(mAb 1G5)、配列番号85および/または91、85および/または97(mAb 3A10)、配列番号7および/または13、7および/または19(mAb 3H8)を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含むmAbが挙げられる。エフェクター細胞機能(例えば、ADCCおよび/またはCDC)を誘発または増強することが可能な抗CD27抗体はまた、特異的Fc受容体(例えば、FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32)、FcRIIB1(CD32)、FcRIIB2(CD32)、FcRIIIA(CD16a)、FcRIIIB(CD16b)、FcRI、FcRII(CD23)、FcRI(CD89)、Fc/μR、およびFcRn)に対する結合特異性に適切に寄与するFc領域を含むように構築することができる。

【0013】

さらなる実施形態では、i)抗CD27抗体、およびii)抗原を対象に投与することによる、抗原に対する免疫応答をそれを必要とする対象において増強する方法であって、該抗CD27抗体が、該抗原とは別々に、かつ該抗原が投与される前に投与される、方法を提供する。

【0014】

一般的に、そのような方法において、抗CD27抗体は、抗原の少なくとも2時間前~96時間前に投与されてもよい。例えば、そのような方法において、抗CD27抗体は、抗原の少なくとも2時間前に、例えば、抗原の少なくとも12時間前に、好適には、抗原の少なくとも24時間前に、抗原の少なくとも48時間前に、または抗原の少なくとも72時間前に投与されてもよい。TLR作動薬は、TLR3作動薬である。

【0015】

さらなる実施形態では、i)抗CD27抗体、ii)TLR作動薬、およびiii)任

10

20

30

40

50

意で、抗原を対象に同時に、別々に、または連続的に投与することによる、抗原に対する免疫応答をそれを必要とする対象において増強するための方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

そのような方法の好ましい実施形態において、TLR作動薬は、例えば、ポリIC:L Cであるが、これに限定されない、TLR3作動薬である。

【 0 0 1 7 】

CD27発現細胞としては、CD27を発現する、任意および全ての細胞が挙げられ、B細胞、NK細胞、およびT細胞が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、CD27発現細胞としては、Jurkat細胞、Raji細胞、Ramos細胞、およびDauidi細胞等の、癌細胞株が挙げられる。別の実施形態において、CD27発現細胞は、腫瘍細胞または癌細胞である。別の実施形態において、CD27発現細胞としては、B細胞、NK細胞、および腫瘍浸潤リンパ球とも呼ばれる、腫瘍に浸潤することが分かっているT細胞を含む、T細胞が挙げられる。

10

【 0 0 1 8 】

本発明の特定の抗体は、特定のヒト生殖系列を利用する、すなわち、生殖系列遺伝子によってコードされるが、抗体成熟中に起こる遺伝的再編成および変異（例えば、体細胞変異）を含む、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。一実施形態において、本発明の抗体の重鎖可変領域は、ヒト生殖系列3-7または3-33遺伝子に由来する。別の実施形態において、抗体の軽鎖可変領域は、ヒト生殖系列3-20、3-11、24、1D-16、または1-13遺伝子に由来する。特定の実施形態において、抗体の重鎖可変領域は、ヒト生殖系列V_H3-7またはV_H3-33遺伝子由来であり、抗体の軽鎖可変領域は、ヒト生殖系列V_K3-20、V_K3-11、V_K1D-16、またはV_K1-13遺伝子に由来する。

20

V_H3-33生殖系列配列は、以下のように提供される（Genbankアクセッション番号：AAP44382）。

1 vqlvesgggv vqprslrls caasgffst ygmhwvrqap gkglewvaih wfdgsntyya
61 dsrgrftis rdssrktlyl emkslrvedt avyycak (配列番号3)

V_H3-7生殖系列配列は、以下のように提供される（Genbankアクセッション番号：AAP44389）。

30

1 vqlvesgggl vqpgslrls caasgffsn symtwvrqap gkglewvani kpdgsdknyi
61 nsrgrftis rdnaekssyl qmnsraedt aiyycvl (配列番号4)

【 0 0 1 9 】

別の実施形態において、重鎖可変領域のCDR3の配列は、配列番号10、28、40、52、64、76、88、106、およびそれらの保存的配列改変体（例えば、保存的アミノ酸置換体）から成る群から選択される。抗体は、配列番号16、22、34、46、58、70、82、94、100、112、およびそれらの保存的配列改変体から成る群から選択される、軽鎖可変領域のCDR3の配列をさらに含んでもよい。別の実施形態において、重鎖のCDR2の配列および重鎖のCDR1の配列は、それぞれ、配列番号9、27、39、51、63、75、87、105、および配列番号8、26、38、50、62、74、86、104、ならびにそれらの保存的配列改変体から選択される。軽鎖のCDR2の配列および軽鎖のCDR1の配列は、それぞれ、配列番号15、21、33、45、57、69、81、93、99、111、および配列番号14、20、32、44、56、68、80、92、98、110、ならびにそれらの保存的配列改変体から選択される。

40

【 0 0 2 0 】

さらに別の実施形態において、本発明は、CD27に結合し、かつ以下から成る群から選択される重軽鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む、単離された抗体を提供する：

50

(i) 配列番号 3 8 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 3 9 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 4 0 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 4 4 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 4 5 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 4 6 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、

(i i) 配列番号 5 0 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 5 1 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 5 2 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 5 6 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 5 7 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 5 8 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、

10

(i i i) 配列番号 1 0 4 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 1 0 5 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 1 0 6 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 1 1 0 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 1 1 1 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 1 1 2 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、

20

(i v) 配列番号 8 6 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 8 7 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 8 8 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 9 2 もしくは 9 8 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 9 3 もしくは 9 9 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 9 4 もしくは 1 0 0 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、

(v) 配列番号 2 6 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 2 7 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 2 8 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 3 2 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 3 3 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 3 4 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、

30

(v i) 配列番号 7 4 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 7 5 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 7 6 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 8 0 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 8 1 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 8 2 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、

40

(v i i) 配列番号 8 を含む重鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 9 を含む重鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 1 0 を含む重鎖可変領域の C D R 3、
 配列番号 1 4 もしくは 2 0 を含む軽鎖可変領域の C D R 1、
 配列番号 1 5 もしくは 2 1 を含む軽鎖可変領域の C D R 2、
 配列番号 1 6 もしくは 2 2 を含む軽鎖可変領域の C D R 3、または
 それらの保存的配列改変体、および

(v i i i) 配列番号 6 2 を含む重鎖可変領域の C D R 1、

50

配列番号 63 を含む重鎖可変領域の CDR2、
 配列番号 64 を含む重鎖可変領域の CDR3、
 配列番号 68 を含む軽鎖可変領域の CDR1、
 配列番号 69 を含む軽鎖可変領域の CDR2、
 配列番号 70 を含む軽鎖可変領域の CDR3、または
 それらの保存的配列改変体。

【0021】

別の実施形態において、重鎖可変領域の CDR3 の配列は、コンセンサス配列 R (G , E , D) (S , L , G , -) (G , L , T , W , -) (N , A , T , H , -) (V , T , -) (M , P , -) (G , V , -) (R , -) (G , M , -) (D , H , L , T , W) (A , G , N , W) (D , F , V , Y) (F , L) (D , E) (H , I , L , Y) (配列番号 113) から選択されるアミノ酸配列を含み、配列中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残基も存在しないという選択肢を示す。抗体は、コンセンサス配列 Q (F , R , Y) (N , S) (N , T , S) (Y , W) P (F , L , P , R) T (配列番号 114) から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域の CDR3 をさらに含んでもよく、配列中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残基も存在しないという選択肢を示す。別の実施形態において、重鎖可変領域の CDR2 の配列は、コンセンサス配列 I (K , W) (Y , N , Q) D G S (E , N) (K , Q) (配列番号 115) から選択されるアミノ酸配列を含み、配列中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残基も存在しないという選択肢を示し、軽鎖可変領域の CDR2 の配列は、コンセンサス配列 (A , D) A S (配列番号 116) から選択されるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、重鎖可変領域の CDR1 の配列は、コンセンサス配列 G F (T , S) (F , L) (S , N) (I , S , H) (Y , H) (配列番号 117) から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR1 の配列は、コンセンサス配列 Q (D , G , S) (I , V) (D , S) (R , S) (A , W , Y) (配列番号 118) から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0022】

別の実施形態において、本発明の単離された抗体は、ヒト CD27 に結合し、かつ配列番号 6、7、24、25、36、37、48、49、60、61、72、73、84、85、102、103、およびそれらの保存的配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。抗体は、配列番号 12、13、18、19、30、31、42、43、54、55、66、67、78、79、90、91、96、97、108、109、およびそれらの保存的配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含んでもよい。

【0023】

さらなる実施形態において、本発明の単離された抗体は、ヒト CD27 に結合し、かつ以下から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む：

(a) それぞれ、配列番号 37 および / または 43、ならびにそれらの保存的配列改変体、

(b) それぞれ、配列番号 49 および / または 55、ならびにそれらの保存的配列改変体、

(c) それぞれ、配列番号 103 および / または 109、ならびにそれらの保存的配列改変体、

(d) それぞれ、配列番号 85 および / または 91、および / または 97、ならびにそれらの保存的配列改変体、

(e) それぞれ、配列番号 25 および / または 31、ならびにそれらの保存的配列改変体、

(f) それぞれ、配列番号 73 および / または 79、ならびにそれらの保存的配列改変体、

10

20

30

40

50

(g) それぞれ、配列番号 7 および / または 13、および / または 19、ならびにそれらの保存的配列改変体、ならびに、

(h) それぞれ、配列番号 61 および / または 67、ならびにそれらの保存的配列改変体。

【0024】

本発明はまた、前述の配列のいずれかに対して少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、またはそれ以上の配列同一性を有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、単離された抗体も含む。また、前述の値の中間値、例えば、前述の配列のいずれかに対して少なくとも 80~85%、85~90%、90~95%、または

10

【0025】

また、CD27 への結合について、本発明の抗体と競合する、単離された抗体も、本発明に包含される。特定の実施形態において、本抗体は、CD27 への結合について、それぞれ、配列番号 37 および 43、配列番号 49 および 55、配列番号 103 および 109、配列番号 85 および 91、配列番号 85 および 97、配列番号 25 および 31、配列番号 73 および 79、配列番号 7 および 13、配列番号 7 および 19、配列番号 61 および 67 で記述されるアミノ酸配列、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。別の実施形態において、本抗体は、CD27 への結合について、配列番号 37 および 43 (1F5)、配列番号 49 および 55 (1H8)、または配列番号 103 および 109 (3H12) で記述されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。別の実施形態において、本抗体は、CD27 への結合について、配列番号 25 および 31 (2C2)、配列番号 7 および 13 (3H8)、配列番号 7 および 19 (3H8)、配列番号 61 および 67 (1G5)、または配列番号 73 および 79 (2G9) で記述されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。さらに別の実施形態において、本抗体は、CD27 への結合について、配列番号 85 および 91 (3A10) または配列番号 85 および 97 (3A10) で記述されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。

20

30

【0026】

本発明の他の抗体は、本明細書で説明される抗体によって認識される CD27 上のエピトープに結合する。別の特定の実施形態において、本抗体は、それぞれ、配列番号 37 および 43、配列番号 49 および 55、配列番号 103 および 109、配列番号 85 および 91、配列番号 85 および 97、配列番号 25 および 31、配列番号 73 および 79、配列番号 7 および 13、配列番号 7 および 19、配列番号 61 および 67 で記述されるアミノ酸配列、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体によって認識される CD27 上のエピトープに結合する。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 37 および 43 (1F5)、配列番号 49 および 55 (1H8)、または配列番号 103 および 109 (3H12) で記述されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体によって認識される CD27 上のエピトープに結合する。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 25 および 31 (2C2)、配列番号 7 および 13 (3H8)、配列番号 7 および 19 (3H8)、配列番号 61 および 67 (1G5)、または配列番号 73 および 79 (2G9) で記述されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体によって認識される CD27 上のエピトープに結合する。さらに別の実施形態において、本抗体は、配列番号 85 および 91 (3A10)、または配列番号 85 および 97 (3A10) で記述されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む抗体によって認識される CD27 上のエピトープに結合する。

40

50

【 0 0 2 7 】

本発明の抗体は、完全長とするか、例えば、アイソタイプ：I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g A s e c、I g D、およびI g Eのいずれかとすることができる。代替として、抗体は、抗原結合部分等の断片、または1本鎖抗体（例えば、F a b、F (a b ')₂、F v、1本鎖F v断片、単離された相補性決定領域（C D R）、または、2つ以上の単離されたC D Rの組み合わせ）とすることができる。抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体が挙げられるが、これらに限定されない、任意の種類抗体とすることができる。

【 0 0 2 8 】

本発明によって用いられる（例えば、本発明の抗C D 2 7抗体と組み合わせて使用されるワクチン中の）腫瘍抗原としては、腫瘍細胞上に存在（またはこれと関連）するが一般的に正常な細胞上には存在しない任意の抗原もしくは抗原決定基、または正常な（非腫瘍）細胞上よりも多く腫瘍細胞上に存在するまたはこれと関連する抗原もしくは抗原決定基、または正常な（非腫瘍）細胞上で見られる形態とは異なる形態で腫瘍細胞上に存在する抗原もしくは抗原決定基が挙げられる。そのような抗原としては、腫瘍特異性膜抗原を含む腫瘍特異抗原、腫瘍関連抗原を含む腫瘍関連膜抗原、腫瘍上の胎児抗原、成長因子受容体、成長因子リガンド、および癌と関連する任意の他の種類の抗原が挙げられる。腫瘍抗原は、例えば、上皮癌抗原（例えば、乳房、胃腸、肺）、前立腺特異的癌抗原（P S A）もしくは前立腺特異的膜抗原（P S M A）、膀胱癌抗原、肺（例えば、小細胞肺）癌抗原、結腸癌抗原、卵巣癌抗原、脳腫瘍抗原、胃癌抗原、腎細胞癌抗原、膵癌抗原、肝癌抗原、食道癌抗原、頭頸部癌抗原、または結腸直腸癌抗原であってもよい。例えば、抗原としては、h C G、g p 1 0 0またはP m e l 1 7、C E A、g p 1 0 0、T R P - 2、N Y - B R - 1、N Y - C O - 5 8、M N (g p 2 5 0)、イディオタイプ、チロシナーゼ、テロメラゼ、S S X 2、M U C - 1、M A G E - A 3、および高分子量メラノーマ関連抗原（H M W M A A）M A R T 1等の腫瘍抗原、m e l a n - A、E G F R v I I I、N Y - E S O - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、W T 1、H e r 2、またはメソテリンが挙げられる。本発明によって用いられる（例えば、本発明の抗C D 2 7抗体と組み合わせて使用されるワクチン中の）腫瘍抗原としては、ウイルス、細菌、寄生虫、および真菌等の感染性疾患の病原体由来の抗原が挙げられ、その例は、本明細書で開示される。

【 0 0 2 9 】

本発明はまた、本発明の抗体とは異なる結合特異性を有する第2の機能的部分と連結している本発明の抗体を含む、二重特異性分子も提供する。例えば、一実施形態において、第2の分子は、T細胞受容体（例えば、C D 3、C D 4 0）に結合してもよい。

【 0 0 3 0 】

また、薬学的に許容される担体とともに調合される、本明細書で説明される抗体または二重特異性分子を含む組成物も提供する。組成物は、アジュバント、免疫賦活剤（例えば、C D 4 0リガンド、F L T 3リガンド、サイトカイン、コロニー刺激因子、抗C T L A - 4抗体、抗P D 1抗体、抗4 1 B B抗体、抗O X - 4 0抗体、L P S（エンドトキシン）、s s R N A、d s R N A、カルメット-ゲラン桿菌（B C G）、塩酸レバミソール、静注用免疫グロブリン、およびトール様受容体（T L R）作動薬（例えば、ポリI C等のT L R 3作動薬、T L R 4作動薬、T L R 5作動薬、T L R 7作動薬、T L R 8作動薬、およびT L R 9作動薬）、免疫抑制剤、別の抗体、または抗原をさらにも含む。例示的な抗原としては、病原体の成分、腫瘍抗原（例えば、h C G、g p 1 0 0またはP m e l 1 7、H E R 2 / n e u、W T 1、メソテリン、C E A、g p 1 0 0、M A R T 1、T R P - 2、m e l a n - A、N Y - E S O - 1、N Y - B R - 1、N Y - C O - 5 8、M N (g p 2 5 0)、イディオタイプ、M A G E - 1、M A G E - 3、M A G E - A 3、チロシナーゼ、テロメラゼ、S S X 2抗原、M U C - 1抗原、および生殖細胞由来の腫瘍抗原）、感染性疾患抗原（例えばウイルス抗原、細菌抗原、および寄生虫抗原）アレルゲン、または自己抗原が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で開示される抗原のいずれをも、本発明の組成物に含むことができる。

10

20

30

40

50

【0031】

また、本発明の抗体をコードする核酸分子、ならびにそのような核酸を含む発現ベクターおよびそのような発現ベクターを含む宿主細胞も、本発明に包含される。例えば、一実施形態において、本発明は、ヒトCD27に結合し、かつ(a)それぞれ、配列番号5および11、(b)それぞれ、配列番号5および17、(c)それぞれ、配列番号23および29、(d)それぞれ、配列番号35および41、(e)それぞれ、配列番号47および53、(f)それぞれ、配列番号59および65、(g)それぞれ、配列番号71および77、(h)配列番号83および89、(i)配列番号83および95、(j)それぞれ、配列番号101および107から成る群から選択される核酸配列、または(a)~(h)の核酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する核酸配列によってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体を提供する。

10

【0032】

別の実施形態において、本発明は、本明細書で説明される抗体(例えば、完全長抗体)、組成物、または二重特異性分子の有効量を対象に投与することによる、対象における抗原に対する免疫応答(例えば、T細胞媒介性免疫応答、および/またはNK細胞媒介性免疫応答、および/またはB細胞媒介性免疫応答)を誘発または増強するための方法を提供する。そのような方法は、特にワクチン療法での使用に適切である。

【0033】

本発明の抗体および他の組成物はまた、CD27発現細胞と、(例えば、癌の治療において)CD27発現細胞の増殖を阻害するのに有効な量の抗体または組成物とを接触させることによって、CD27発現細胞の増殖を阻害するために使用することができる。CD27発現細胞の増殖を阻害するのに有用な抗体としては、完全長抗体およびその断片、ならびにFc受容体に対する第2の結合特異性を備える抗体が挙げられる。一実施形態においては、CD27発現細胞を、エフェクター細胞の存在下、標的細胞の抗体依存性細胞介在性細胞傷害性(ADCC)を誘発するのに十分な条件下で抗体と接触させる(例えば、抗体は、10μg/mLの濃度で、CD27発現細胞の特異的溶解を少なくとも約40%誘発し、かつ配列番号61、67、85、91、97、37、および/または43を含む)。別の実施形態においては、細胞を、該細胞の補体媒介性細胞傷害性(CDC)を誘発するのに十分な条件下で抗体と接触させる(例えば、抗体は、10μg/mLの濃度で、CD27発現細胞の補体媒介性細胞傷害性(CDC)を少なくとも約40%誘発し、かつ

20

30

【0034】

さらなる実施形態において、CD27発現細胞の増殖を阻害するために用いられる抗体は、さらなる機能的特徴を持っていても(またはそれが欠如していても)よい。例えば、抗体はまた、CD27へのCD70の結合をこれらのタンパク質を発現する細胞上で阻害してもよい(例えば、配列番号37および/もしくは43(mAb 1F5)、配列番号49および/もしくは55(mAb 1H8)、または配列番号103および/もしくは109(mAb 3H12)を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含む、mAb)。代替として、抗体は、そのような細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害しなくてもよい(例えば、配列番号61および/もしくは67(mAb 1G5)、配列番号85および/もしくは91、85および/もしくは97(mAb 3A10)、または配列番号:7および/もしくは13、7および/もしくは19(mAb 3H8)を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含む、mAb)。

40

【0035】

CD27発現細胞としては、B細胞、NK細胞、およびT細胞を含む、CD27を発現する任意および全ての細胞が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、CD27発現細胞としては、Jurkat細胞、Raji細胞、Ramos細胞、およびDauid細胞等の、細胞株が挙げられる。別の実施形態において、CD27発現細胞は、腫瘍細胞または癌細胞である。別の実施形態において、CD27発現細胞としては、B細胞、NK細胞、および腫瘍浸潤リンパ球とも呼ばれる、腫瘍または癌細胞に浸潤

50

することが分かっている、T細胞が挙げられる。

【0036】

本明細書で説明される、CD27発現細胞の増殖を阻害する方法は、様々な疾患および障害を治療および予防するために使用することができる。例えば、一実施形態において、本方法は、癌を治療または予防するために使用することができる（例えば、白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、マンテル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、真性多血症リンパ腫（Polycythemia vera Lymphoma）、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーママクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫、および癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（endotheliosarcoma）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（lymphangiendotheliosarcoma）、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫（colon sarcoma）、結腸直腸癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系（CNS）癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮体癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌（小細胞、大細胞）、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌（例えば、口唇、舌、口、および咽頭）、卵巣癌、膵癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、および泌尿器系の癌、から成る群から選択される癌）。好ましい癌としては、慢性リンパ球性白血病、マンテル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、および辺縁帯B細胞リンパ腫から成る群から選択されるCD27発現腫瘍が挙げられる。別の実施形態において、本方法は、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス感染症、または寄生虫感染症を治療または予防するために使用することができる。

【0037】

本発明は、本発明で説明される抗体または組成物を対象に投与することによる、障害を有する対象における細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害するための方法、ならびに、本発明で説明される抗体または組成物を対象に投与することによる、障害を有する個人におけるT細胞応答を下方制御する方法をさらに提供する。これらの方法は、移植片拒絶反応、自己免疫疾患、およびアレルギー等の免疫障害の治療での使用に理想的に適している。これらの方法において有用な抗体は、Fab断片を含むのみならず、抗体がFc受容体に結合しないかまたは有意に低減したFc受容体への結合を呈するように変異されたFc領域を含む。特定の実施形態において、抗体は、配列番号37および/もしくは43（mAb 1F5）、配列番号49および/もしくは55（mAb 1H8）、または配列番号103および/もしくは109（mAb 3H12）を含む重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域配列を含む。

【0038】

細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害するための、およびT細胞応答を下方制御するための本明細書で説明される方法は、移植片拒絶反応、アレルギー、および自己免疫疾患が挙げられるが、これらに限定されない、様々な疾患および障害を治療するために使用することができる。特定の実施形態において、疾患は、自己免疫疾患である（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、1型糖尿病、乾癬、クローン病および潰瘍性大腸炎等の他の炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス（SLE）、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力

10

20

30

40

50

症（MG）、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体による強皮症、混合性結合組織疾患、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫関連性の不妊、糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、乾癬性関節炎、インスリン抵抗性、自己免疫性糖尿病、自己免疫性肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、ギラン・バレー症候群、動脈硬化、およびアルツハイマー病）。

【0039】

本発明は、本明細書で説明される抗体、組成物、および二重特異性分子の特定の使用をさらに提供する。例えば、一実施形態において、本発明は、対象における抗原に対する免疫応答を誘発または増強するための薬剤の製造における抗体、組成物、または二重特異性分子の使用を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、CD27発現細胞の増殖を阻害するための薬剤の製造における抗体または組成物の使用、障害を有する対象における細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害するための薬剤の製造における抗体または組成物の使用、および障害を有する個人におけるT細胞応答を下方制御するための薬剤の製造における抗体または組成物の使用を提供する。本発明は、対象における抗原に対する免疫応答を誘発または増強する際に使用するための抗体、組成物、または二重特異性分子；CD27発現細胞の増殖を阻害する際に使用するための抗体または組成物；障害を有する対象における細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害する際に使用するための抗体または組成物；障害を有する個人におけるT細胞応答を下方制御する際に使用するための抗体または組成物をさらに含む。

10

20

【0040】

本発明はまた、（1）生物学的試料と、本明細書で説明される抗体（該抗体は、検出可能な物質で標識されている）とを接触させることと、（2）CD27に結合した抗体を検出することとによる、生物学的試料中のCD27の存在または非存在を検出するための方法も提供する。

【0041】

また、本発明の組成物（例えば、抗体および/または二重特異性分子）、および任意で使用説明書を含むキットも、本発明の範囲内である。このキットは、サイトカインまたは補体等の少なくとも1つのさらなる試薬、または本発明の1つ以上のさらなる抗体をさらに含むことができる。

30

【0042】

[本発明1001]

ヒトCD27に結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体であって、以下の性質のうちの少なくとも1つを呈する前記抗体：

（a）10 μ g/mLの抗体濃度で、CD27へのsCD70の結合を少なくとも約70%遮断する、

（b）10 $^{-9}$ M以下の平衡解離定数K_dで、または代替として、10 $^{+9}$ M $^{-1}$ 以上の平衡会合定数K_aで、ヒトCD27に結合する、

40

（c）3 μ g/mLの抗体濃度および約6%のウサギ血清補体で、少なくとも10%のCD27発現細胞の特異的補体媒介性細胞傷害性（CDC）を誘発する、

（d）3 μ g/mLの抗体濃度および75：1のエフェクター細胞対標的細胞の比率で、少なくとも10%のCD27発現細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）特異的溶解を誘発する、

（e）腫瘍細胞（5 \times 10 5 個のRaji細胞または1 \times 10 6 個のDauidi細胞）のインビボ接種後の重症複合免疫不全症（SCID）マウスにおいて、3週間にわたって少なくとも週に2回、0.3mgを投与（腹腔内）した場合に、抗体が投与されないマウスと比較して生存期間中央値を少なくとも20%向上させる、

（f）ワクチンまたは内因性抗原との組み合わせで、抗原特異的免疫応答を誘発または

50

増強する、

(g) ワクチンまたは内因性抗原との組み合わせで、抗原特異的 T H1 免疫応答を誘発または増強する、

(h) ワクチンまたは内因性抗原との組み合わせで、抗原特異的 T 細胞の増殖または活性化を誘発または増強する、

(i) T 細胞の増殖または活性化を低減または阻害する、

(j) 同時の、別々の、または連続的な T C R 活性化と組み合わせた場合に、T 細胞活性を誘発または増強する、

(k) 10 μ g / m L の抗体濃度で、C D27 への s C D70 の結合を少なくとも約 70% 遮断し、かつ F c 受容体に結合できないか、または F c 受容体への結合が低減されている場合に、T 細胞活性を低減または阻害する、

(l) マカクにおいて、29 日間にわたって 3 m g / k g で投与 (静脈内) した場合に、投与直後に C D3 + T 細胞 (N K 細胞以外) の減少が 50% を下回る結果となる、または

(m) マカクにおいて、29 日間にわたって 3 m g / k g で投与 (静脈内) した場合に、投与直後に記憶 B 細胞の減少が 50% を下回る結果となる。

[本発明1002]

ヒト C D27 に結合し、かつ抗原に対する免疫応答を誘発または増強する、単離されたモノクローナル抗体。

[本発明1003]

T H1 免疫応答を誘発または増強する、本発明1002の抗体。

[本発明1004]

ヒト C D27 に結合し、かつ抗原に対する免疫応答を誘発または増強する、単離されたモノクローナル抗体であって、T 細胞の増殖または活性化を誘発または増強する前記抗体。

[本発明1005]

C D8 + T 細胞の増殖または活性化を誘発または増強する、本発明1004の抗体。

[本発明1006]

細胞上の C D27 への C D70 の結合をさらに阻害する、本発明1004または1005の抗体。

[本発明1007]

配列番号37および/または43を含む、本発明1002 ~ 1006のいずれかの抗体。

[本発明1008]

ヒト C D27 に結合し、かつ細胞上の C D27 への C D70 の結合を有意には阻害しない、本発明1002 ~ 1005のいずれかの抗体。

[本発明1009]

配列番号7、13、および/または19を含む、本発明1008の抗体。

[本発明1010]

F c 受容体への有効な結合が可能な F c 領域を含む、本発明1002 ~ 1009のいずれかの抗体。

[本発明1011]

本発明1002 ~ 1010のいずれかの抗体を含む二重特異性分子であって、該抗体とは異なる結合特異性を有する第2の分子と連結している前記二重特異性分子。

[本発明1012]

第2の分子が T 細胞受容体に結合する、本発明1011の二重特異性分子。

[本発明1013]

T 細胞受容体が、C D3、C D40、および C D25 から成る群から選択される、本発明1012の二重特異性分子。

[本発明1014]

第2の分子が F c 受容体に結合する、本発明1011の二重特異性分子。

[本発明1015]

第2の分子が N K 受容体に結合する、本発明1011の二重特異性分子。

[本発明1016]

10

20

30

40

50

ヒトCD27に結合し、かつ細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害する、単離されたモノクローナル抗体であって、10 μ g/mLの抗体濃度で、CD27発現細胞へのsCD70の結合を少なくとも約70%阻害し、かつ抗原に対する免疫応答を阻害または低減する前記抗体。

[本発明1017]

T細胞の増殖または活性化を阻害または低減する、本発明1016の抗体。

[本発明1018]

CD8+ T細胞の増殖または活性化を阻害または低減する、本発明1016または1017の抗体。

[本発明1019]

配列番号37、43、49、55、103、および/または109を含む、本発明1016~1018のいずれかの抗体。

[本発明1020]

配列番号37および/または43を含む、本発明1016~1018のいずれかの抗体。

[本発明1021]

機能的Fcドメインを含まない断片である、本発明1016~1020のいずれかの抗体。

[本発明1022]

Fc受容体への低減した結合を示すか、またはFc受容体への結合を示さない変異Fc領域を含む、本発明1016~1020のいずれかの抗体。

[本発明1023]

ヒトCD27に結合し、かつエフェクター細胞機能を誘発または増強する、単離されたモノクローナル抗体であって、10 μ g/mLの抗体濃度で、CD27発現細胞のADCC特異的溶解を少なくとも約40%誘発するか、または10 μ g/mLの濃度で、CD27発現細胞の補体媒介性細胞傷害性(CDC)を少なくとも約40%誘発する前記抗体。

[本発明1024]

配列番号61、67、85、91、97、37、43、49、55、19、49、55、103、および/または109を含む、本発明1023の抗体。

[本発明1025]

細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害する、本発明1023~1024のいずれかの抗体。

[本発明1026]

配列番号37、43、49、55、19、103、および/または109を含む、本発明1025の抗体。

[本発明1027]

細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害しない、本発明1023または1024の抗体。

[本発明1028]

配列番号61、67、85、91、97、7、13、および/または19を含む、本発明1027の抗体。

[本発明1029]

配列番号37、43、7、13、および/または19を含む、本発明1028の抗体。

[本発明1030]

完全長抗体である、本発明1023~1029のいずれかの抗体。

[本発明1031]

Fc受容体に対する第2の結合特異性を備える、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1032]

CD27発現細胞がB細胞である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1033]

CD27発現細胞がT細胞である、本発明1001~1031のいずれかの抗体。

[本発明1034]

CD27発現細胞がCD8+ T細胞である、本発明1001~1031のいずれかの抗体。

[本発明1035]

CD27発現細胞が、Jurkat細胞、Raji細胞、Ramos細胞、およびDauid細胞から成る群から選択される、前記本発明のいずれかの抗体。

10

20

30

40

50

[本発明1036]C D 27発現細胞が腫瘍細胞である、前記本発明のいずれかの抗体。[本発明1037]I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、および I g E 抗体から成る群から選択される、前記本発明のいずれかの抗体。[本発明1038]ヒト C D 27に結合し、かつヒト生殖系列 V_H 3 - 7または V_H 3 - 33遺伝子由来の重鎖可変領域を含む、
単離されたモノクローナル抗体。[本発明1039]ヒト C D 27に結合し、かつヒト生殖系列 V_K 3 - 20、V_K 3 - 11、V_K 1 D - 16、または V_K 1 - 13遺伝子由来の軽鎖
可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体。[本発明1040]ヒト C D 27に結合し、かつヒト生殖系列 V_H 3 - 7または V_H 3 - 33遺伝子由来の重鎖可変領域と、ヒト生殖系列 V_K 3 - 20、V_K 3 - 11、V_K 1 D - 16、または V_K 1 - 13遺伝子由来の軽鎖可変領域とを含む、
単離されたモノクローナル抗体。[本発明1041]ヒト C D 27に結合し、かつC D R 1、C D R 2、および C D R 3の配列を含む重鎖可変領域と、C D R 1、C D R 2、
および C D R 3の配列を含む軽鎖可変領域とを含む、単離されたモノクローナル抗体であって、該重鎖可変領域の C D R 3の配列が、コンセンサス配列 R (G , E , D) (S , L , G
, -) (G , L , T , W , -) (N , A , T , H , -) (V , T , -) (M , P , -) (G , V , -) (R , -) (G , M , -) (D , H , L , T , W) (A , G , N , W) (D
, F , V , Y) (F , L) (D , E) (H , I , L , Y) (配列番号113) から選択されるアミノ酸配列を含み、配列中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残
基も存在しないという選択肢を示す、前記抗体。[本発明1042]軽鎖可変領域の C D R 3の配列が、コンセンサス配列 Q (F , R , Y) (N , S) (N
, T , S) (Y , W) P (F , L , P , R) T (配列番号114) から選択されるアミノ酸配列を含み、配列中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残基も存在し
ないという選択肢を示す、本発明1041の抗体。[本発明1043]重鎖可変領域の C D R 2の配列が、コンセンサス配列 I (K , W) (Y , N , Q) DG S (E , N) (K , Q) (配列番号115) から選択されるアミノ酸配列を含み、配列
中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残基も存在しないという選択肢を示し、軽鎖可変領域の C D R 2の配列が、コンセンサス配列 (A , D) A S (配列番
号116) から選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1042の抗体。[本発明1044]重鎖可変領域の C D R 1の配列が、コンセンサス配列 G F (T , S) (F , L) (S, N) (I , S , H) (Y , H) (配列番号117) から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の C D R 1の配列が、コンセンサス配列 Q (D , G , S) (I , V) (D ,
S) (R , S) (A , W , Y) (配列番号118) から選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1043の抗体。[本発明1045]

10

20

30

40

50

ヒトCD27に結合し、かつ

以下から成る群から選択される重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む、

単離されたモノクローナル抗体：

(i) コンセンサス配列 G F (T , S) (F , L) (S , N) (I , S , H) (Y , H) (配列番号117) から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域のCDR1、

(ii) コンセンサス配列 I (K , W) (Y , N , Q) D G S (E , N) (K , Q) (配列番号115) から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域のCDR2、

(iii) コンセンサス配列 R (G , E , D) (S , L , G , -) (G , L , T , W , -) (N , A , T , H , -) (V , T , -) (M , P , -) (G , V , -) (R , -) (G , M , -) (D , H , L , T , W) (A , G , N , W) (D , F , V , Y) (F , L) (D , E) (H , I , L , Y) (配列番号113) から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域のCDR3、

(iv) コンセンサス配列 Q (D , G , S) (I , V) (D , S) (R , S) (A , W , Y) (配列番号118) から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域のCDR1、

(v) コンセンサス配列 (A , D) A S (配列番号116) から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域のCDR2、

(vi) コンセンサス配列 Q (F , R , Y) (N , S) (N , T , S) (Y , W) P (F , L , P , R) T (配列番号114) から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域のCDR3、

配列中、「 - 」は、そのコンセンサス位置にいかなるアミノ酸残基も存在しないという選択肢を示す。

[本発明1046]

ヒトCD27に結合し、かつ

CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、

単離されたモノクローナル抗体であって、

(a) 該重鎖可変領域のCDR3の配列が、配列番号10、28、40、52、64、76、88、106、およびそれらの保存的アミノ酸配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、

(b) 該軽鎖可変領域のCDR3の配列が、配列番号16、22、34、46、58、70、82、94、100、112、およびそれらの保存的アミノ酸配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、

前記抗体。

[本発明1047]

重鎖可変領域のCDR2の配列が、配列番号9、27、39、51、63、75、87、105、およびそれらの保存的アミノ酸配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のCDR2の配列が、配列番号15、21、33、45、57、69、81、93、99、111、およびそれらの保存的アミノ酸配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1046の抗体。

[本発明1048]

重鎖可変領域のCDR1の配列が、配列番号8、26、38、50、62、74、86、104、およびそれらの保存的アミノ酸配列改変体から成る群から選択されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のCDR1の配列が、配列番号14、20、32、44、56、68、80、92、98、110、およびそれらの保存的アミノ酸配列改変体から成る群から選択される、本発明1047の抗体。

[本発明1049]

ヒトCD27に結合し、かつ以下を含む、単離されたモノクローナル抗体：

(i) 配列番号38を含む重鎖可変領域のCDR1、

配列番号39を含む重鎖可変領域のCDR2、

配列番号40を含む重鎖可変領域のCDR3、

10

20

30

40

50

<u>配列番号44を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号45を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号46を含む軽鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>(i i) 配列番号50を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号51を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号52を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>配列番号56を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号57を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号58を含む軽鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>(i i i) 配列番号104を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	10
<u>配列番号105を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号106を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>配列番号110を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号111を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号112を含む軽鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>(i v) 配列番号86を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号87を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号88を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>配列番号92もしくは98を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号93もしくは99を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	20
<u>配列番号94もしくは100を含む軽鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>(v) 配列番号26を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号27を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号28を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>配列番号32を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号33を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号34を含む軽鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>(v i) 配列番号74を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号75を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号76を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	30
<u>配列番号80を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号81を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号82を含む軽鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>(v i i) 配列番号8を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号9を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号10を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>配列番号14もしくは20を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号15もしくは21を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号16もしくは22を含む軽鎖可変領域のCDR3、または</u>	
<u>(v i i i) 配列番号62を含む重鎖可変領域のCDR1、</u>	40
<u>配列番号63を含む重鎖可変領域のCDR2、</u>	
<u>配列番号64を含む重鎖可変領域のCDR3、</u>	
<u>配列番号68を含む軽鎖可変領域のCDR1、</u>	
<u>配列番号69を含む軽鎖可変領域のCDR2、および</u>	
<u>配列番号70を含む軽鎖可変領域のCDR3。</u>	

[本発明1050]

ヒトCD27に結合し、かつ

配列番号6、7、24、25、36、37、48、49、60、61、72、73、84、85、102、および103から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、

単離されたモノクローナル抗体。

[本発明1051]

ヒトCD27に結合し、かつ

配列番号12、13、18、19、30、31、42、43、54、55、66、67、78、79、90、91、96、97、108、および109から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

単離されたモノクローナル抗体。

[本発明1052]

ヒトCD27に結合し、かつ

以下から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、

10

単離されたモノクローナル抗体：

(a) それぞれ、配列番号37および43、

(b) それぞれ、配列番号49および55、

(c) それぞれ、配列番号103および109、

(d) それぞれ、配列番号85および91、

(e) それぞれ、配列番号85および97、

(f) それぞれ、配列番号25および31、

(g) それぞれ、配列番号73および79、

(h) それぞれ、配列番号7および13、

20

(i) それぞれ、配列番号7および19、ならびに

(j) それぞれ、配列番号61および67。

[本発明1053]

ヒトCD27に結合し、かつ以下を含む、単離されたモノクローナル抗体：

(a) 配列番号37もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号43もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

(b) 配列番号49もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号55もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

(c) 配列番号103もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号109もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

30

(d) 配列番号85もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号91もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

(e) 配列番号85もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号97もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

(f) 配列番号25もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号31もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

(g) 配列番号73もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号79もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

(h) 配列番号7もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号13もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、

40

(i) 配列番号7もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号19もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域、または

(j) 配列番号61もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、重鎖可変領域、および配列番号67もしくはその保存的アミノ酸置換体を含む、軽鎖可変領域。

[本発明1054]

ヒトCD27への結合について本発明1052の抗体と競合する、単離された抗体。

[本発明1055]

本発明1052の抗体によって結合されるエピトープに結合する、単離された抗体。

[本発明1056]

50

ヒト抗体またはヒト化抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1057]

ヒトCD27に結合し、かつ

以下を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体と、結合について競合する、単離された抗体：

(a) それぞれ、配列番号37および43、

(b) それぞれ、配列番号49および55、

(c) それぞれ、配列番号103および109、

(d) それぞれ、配列番号85および91、

(e) それぞれ、配列番号85および97、

(f) それぞれ、配列番号25および31、

(g) それぞれ、配列番号73および79、

(h) それぞれ、配列番号7および13、

(i) それぞれ、配列番号7および19、または

(j) それぞれ、配列番号61および67。

10

[本発明1058]

以下を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体によって結合されるヒトCD27上のエピトープ

に結合する、単離された抗体：

(a) それぞれ、配列番号37および43、

(b) それぞれ、配列番号49および55、

(c) それぞれ、配列番号103および109、

(d) それぞれ、配列番号85および91、

(e) それぞれ、配列番号85および97、

(f) それぞれ、配列番号25および31、

(g) それぞれ、配列番号73および79、

(h) それぞれ、配列番号7および13、

(i) それぞれ、配列番号7および19、または

(j) それぞれ、配列番号61および67。

20

[本発明1059]

ヒトCD27に結合し、かつ

(a) それぞれ、配列番号5および11、

(b) それぞれ、配列番号5および17、

(c) それぞれ、配列番号23および29、

(d) それぞれ、配列番号35および41、

(e) それぞれ、配列番号47および53、

(f) それぞれ、配列番号59および65、

(g) それぞれ、配列番号71および77、

(h) 配列番号83および89、

(i) 配列番号83および95、ならびに

(j) それぞれ、配列番号101および107

から成る群から選択される核酸配列、または

(a) ~ (j) の核酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する核酸配列

によってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、

単離されたモノクローナル抗体。

30

40

[本発明1060]

本発明1050または1051のヒトCD27に結合する抗体の軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖双方の可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。

[本発明1061]

本発明1060の発現ベクターで形質転換された細胞。

50

[本発明1062]

I g G1、I g G2、I g G3、I g G4、I g M、I g A1、I g A2、I g A s e c、I g D、およびI g E抗体から成る群から選択される、本発明1001～1010または本発明1016～1059のいずれかの抗体。

[本発明1063]

ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、本発明1001～1010または本発明1016～1059のいずれかの抗体。

[本発明1064]

本発明1001～1059のいずれかの抗体または二重特異性分子と、担体とを含む、組成物。

[本発明1065]

アジュバントをさらに含む、本発明1064の組成物。

[本発明1066]

免疫賦活剤をさらに含む、本発明1064または1065の組成物。

[本発明1067]

免疫賦活剤が、C D40リガンド、F L T3リガンド、サイトカイン、コロナー刺激因子、抗C T L A - 4抗体、L P S (エンドトキシン)、s s R N A、d s R N A、カルメット-ゲラン桿菌(B C G)、塩酸レバミソール、静注用免疫グロブリン、およびツール様受容体(T L R)作動薬から成る群から選択される、本発明1066の組成物。

[本発明1068]

ツール様受容体作動薬が、T L R3作動薬、T L R4作動薬、T L R5作動薬、T L R7作動薬、T L R8作動薬、およびT L R9作動薬から成る群から選択される、本発明1067の組成物。

[本発明1069]

免疫抑制剤をさらに含む、本発明1064の組成物。

[本発明1070]

別の抗体をさらに含む、本発明1064の組成物。

[本発明1071]

抗原をさらに含む、本発明1064の組成物。

[本発明1072]

抗原が病原体の成分を含む、本発明1071の組成物。

[本発明1073]

抗原が、腫瘍抗原、アレルゲン、または自己抗原を含む、本発明1071の組成物。

[本発明1074]

抗原が腫瘍抗原を含む、本発明1071の組成物。

[本発明1075]

腫瘍抗原が、h C G、g p100またはP m e l17、H E R2 / n e u、W T1、メソテリン、C E A、g p100、M A R T1、T R P - 2、m e l a n - A、N Y - E S O - 1、N Y - B R - 1、N Y - C O - 58、M N (g p250)、イディオタイプ、M A G E - 1、M A G E - 3、M A G E - A3、チロシナーゼ、テロメラゼ、S S X2抗原、M U C - 1抗原、および生殖細胞由来の腫瘍抗原から成る群から選択される、本発明1074の組成物。

[本発明1076]

抗原に対する免疫応答を誘発または増強するのに有効な量の前記本発明のいずれかの抗体、組成物、または二重特異性分子を対象に投与することを含む、対象における抗原に対する免疫応答を誘発または増強するための方法。

[本発明1077]

抗体が、細胞上のC D27へのC D70の結合を阻害する、本発明1077の方法。

[本発明1078]

抗体が配列番号37および/または43を含む、本発明1077の方法。

[本発明1079]

抗体が、細胞上のC D27へのC D70の結合を阻害しない、本発明1076の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1080]抗体が配列番号7、13、および/または19を含む、本発明1079の方法。[本発明1081]抗体が完全長抗体である、本発明1076～1080のいずれかの方法。[本発明1082]C D 27発現細胞と、C D 27発現細胞の増殖を阻害するのに有効な量の前記本発明のいずれかの抗体または組成物とを接触させることを含む、C D 27発現細胞の増殖を阻害する方法。[本発明1083]細胞を、エフェクター細胞の存在下、標的細胞の抗体依存性細胞介在性細胞傷害性 (A D C C) を誘発するのに十分な条件下で抗体と接触させる、本発明1082の方法。

10

[本発明1084]抗体が、10 μ g / m L の濃度で、C D 27発現細胞の A D C C 媒介性特異的溶解を少なくとも約40%誘発し、かつ配列番号61、67、85、91、97、37、および/または43を含む、本発明1083の方法。[本発明1085]細胞を、該細胞の C D C を誘発するのに十分な条件下で抗体と接触させる、本発明1082の方法。[本発明1086]抗体が、10 μ g / m L の濃度で、C D 27発現細胞の C D C を少なくとも約40%誘発し、かつ配列番号7、13、19、49、55、103、および/または109を含む、本発明1085の方法。

20

[本発明1087]抗体が、ヒト C D 27に結合し、かつ細胞上の C D 27への C D 70の結合を遮断または防止する、本発明1082の方法。[本発明1088]抗体が配列番号37、43、7、13、19、103、および/または109を含む、本発明1087の方法。[本発明1089]抗体が、ヒト C D 27に結合し、かつ細胞上の C D 27への C D 70の結合を遮断または防止しない、本発明1082の方法。

30

[本発明1090]抗体が配列番号61、67、85、91、97、7、13、および/または19を含む、本発明1089の方法。[本発明1091]抗体が配列番号37、43、7、13、および/または19を含む、本発明1082の方法。[本発明1092]抗体が完全長抗体である、本発明1082～1091のいずれかの方法。[本発明1093]抗体が、F c 受容体に対する第2の結合特異性を備える、本発明1082～1091のいずれかの方法。

40

[本発明1094]細胞が腫瘍細胞である、本発明1082～1091のいずれかの方法。[本発明1095]障害が、白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性 (顆粒球性) 白血病、慢性リンパ球性白血病、マンテル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯 B 細胞リンパ腫、真性多血症リンパ腫 (P o l y c y t h e m i a v e r a L y m p h o m a) 、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫、および癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管

50

肉腫、内皮肉腫 (endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫 (lymphangioendotheliosarcoma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫 (colon sarcoma)、結腸直腸癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系 (CNS) 癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮体癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌 (小細胞、大細胞)、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌 (例えば、口唇、舌、口、および咽頭)、卵巣癌、膵癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、ならびに泌尿器系の癌から成る群から選択される癌である、本発明1082の方法。

10

[本発明1096]

障害が、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、および辺縁帯B細胞リンパ腫から成る群から選択される癌である、本発明1082の方法。

[本発明1097]

障害が、細菌、真菌、ウイルス、および寄生虫感染性の疾患から成る障害の群から選択される、本発明1082の方法。

20

[本発明1098]

前記本発明のいずれかの抗体、二重特異性分子、または組成物を対象に投与することによる、障害を有する対象における細胞上のCD27へのCD70の結合を阻害する方法。

[本発明1099]

前記本発明のいずれかの抗体、二重特異性分子、または組成物を対象に投与することによる、障害を有する個人におけるT細胞応答を下方制御する方法。

[本発明1100]

配列番号37、43、49、55、103、および/または109を含む抗体が対象に投与される、本発明1098の方法。

30

[本発明1101]

抗体が配列番号37および/または43を含む、本発明1100の方法。

[本発明1102]

抗体がFab断片である、本発明1098~1101のいずれかの方法。

[本発明1103]

抗体が変異Fc領域を含む、本発明1098~1101のいずれかの方法。

[本発明1104]

障害が、移植片拒絶反応、アレルギー、および自己免疫疾患から成る群から選択される、本発明1098~1101のいずれかの方法。

40

[本発明1105]

自己免疫疾患が、多発性硬化症、関節リウマチ、1型糖尿病、乾癬、クローン病および潰瘍性大腸炎等の他の炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス (SLE)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (MG)、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体による強皮症、混合性結合組織疾患、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫関連性の不妊、糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、乾癬性関節炎、インスリン抵抗性、自己免疫性糖尿病、自己免疫性肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、自己免疫性肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、ギラ

50

ン・バレー症候群、動脈硬化、ならびにアルツハイマー病から成る群から選択される、本発明1104の方法。

[本発明1106]

生物学的試料中のCD27の存在または非存在を検出するための方法であって、

(a) 生物学的試料と、検出可能な物質で標識されている本発明1001～1010または本発明1016～1059のいずれかの抗体とを接触させることと、

(b) CD27に結合した該抗体を検出し、それによって、該生物学的試料中のCD27の存在または非存在を検出することと

を含む前記方法。

[本発明1107]

i) ヒト抗CD27抗体またはヒト化抗CD27抗体、および

ii) 抗原

を対象に投与することによる、該抗原に対する免疫応答をそれを必要とする対象において増強するための方法であって、

該抗CD27抗体が、該抗原とは別々に、かつ該抗原が投与される前に投与される、前記方法。

[本発明1108]

抗CD27抗体が、抗原の少なくとも2時間前に投与される、本発明1107の方法。

[本発明1109]

抗CD27抗体が、抗原の少なくとも12時間前に投与される、本発明1107の方法。

[本発明1110]

抗CD27抗体が、抗原の少なくとも24時間前に投与される、本発明1107の方法。

[本発明1111]

抗CD27抗体が、抗原の少なくとも48時間前に投与される、本発明1107の方法。

[本発明1112]

抗CD27抗体が、抗原の少なくとも72時間前に投与される、本発明1107の方法。

[本発明1113]

抗CD27抗体が、抗原の少なくとも2時間前～96時間前に投与される、本発明1107の方法。

[本発明1114]

i) ヒト抗CD27抗体またはヒト化抗CD27抗体、

ii) TLR作動薬、および

iii) 任意で、抗原

を対象に同時に、別々に、または連続的に投与することによる、該抗原に対する免疫応答をそれを必要とする対象において増強するための方法。

[本発明1115]

TLR作動薬がTLR3作動薬である、本発明1114の方法。

[本発明1116]

TLR作動薬がポリIC:LCである、本発明1114の方法。

本発明の他の特徴および利点は、以下の発明を実施するための形態および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】組換えヒトCD27をチップ上に固定した状態で、Biacore(商標)BiaEvaluationソフトウェア(Biacore AB)によって判定したときの、mAb 1G5、1H8、3H12、3H8、2G9、1F5、3A10、2C2、ms 1A4、ms 9F4、およびms M-T271の親和性および動力学的パラメータを表す図である。

【図2】ELISAを使用した、組換え精製したヒトCD27へのヒト抗CD27抗体(2C2、3H8、1F5、1G5、1H8、2G9、3A10、および3H12)の結合

10

20

30

40

50

を示すグラフである。

【図3】ELISAによる、組換え精製したヒトまたはサル（マカク）CD27への1F5の結合を示すグラフである。

【図4】ELISAによる、CD27タンパク質への可溶性CD70（sCD70）の結合に対する、ヒト抗CD27抗体（2C2、3H8、1F5、1G5、1H8、2G9、3A10、および3H12）およびMsIgG（1A4、9F4およびM-T271）の効果を示すグラフである（遮断率（%）で示す）。

【図5】ヒトリンパ芽球様細胞株への1F5の結合、およびsCD70結合の遮断のフローサイトメトリー分析を示す図である。

【図6】図6A～Dは、フローサイトメトリーによって評価したときの、Jurkat細胞（図4A）、Raji細胞（図4B）、Ramos細胞（図4C）、およびDaudi細胞（図4D）上のCD27へのヒト抗CD27抗体（2C2、3H8、および1F5）の結合を示すグラフである。

【図7】フローサイトメトリーによって評価したときの、Daudi細胞上のCD27へのヒト抗CD27抗体（2C2、3H8、1F5、1G5、1H8、2G9、3A10、および3H12）の結合を示すグラフである。

【図8】抗CD27の交差遮断のELISA実験の結果を示す棒グラフであり、抗体1F5、1H8、および3H12が互いに交差遮断し、したがって同じエピトープに結合することを実証している。

【図9】抗CD27の交差遮断のELISA実験の結果を示す棒グラフであり、抗体2C2、3H8、1G5、および2G9が互いに交差遮断し、したがって同じエピトープに結合することを実証している。

【図10】抗CD27の交差遮断のELISA実験の結果を示す棒グラフであり、CD27への抗体3A10の結合は、試験した他の抗CD27抗体のいずれによっても完全には交差遮断されず、したがって、3A10は、固有のエピトープに結合するが、3A10の結合は、抗体1F5、1H8、および3H12によって部分的に交差遮断されることを示し、3A10に対するエピトープは、抗体1F5、1H8、および3H12が結合したエピトープに近いものであり得ることを実証している。

【図11】mAb 1F5、2C2、3H8、1G5、1H8、2G9、3A10、および3H12を使用した、補体依存性細胞介在性細胞傷害性（CDC）アッセイの結果を表すグラフである。

【図12】mAb 1F5を使用した、さらなる補体依存性細胞介在性細胞傷害性（CDC）アッセイの結果を表すグラフである。

【図13】mAb 2C2、1F5、3H8、1G5、1H8、2G9、3A10、3H12、リツキサン（Rituxan）、およびHu1gGを使用した、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）アッセイの結果を表すグラフである。

【図14】mAb 1F5を使用した、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）アッセイの結果を表すグラフである。

【図15】ヒト抗CD27抗体（1F5、1G5、1H8、2C2、2G9、3A10、3H12、および3H8）のVH配列のアラインメントの図である。

【図16】ヒト抗CD27抗体（1F5、1G5、1H8、2C2、2G9、3A10、3H12、および3H8）のVL配列のアラインメントの図である。

【図17】mAb 1F5を使用した、インビボの非ヒト霊長類研究による結果を示す図である。具体的には、図17は、単回投薬後の循環リンパ球上の1F5を示す。

【図18】mAb 1F5を使用した、インビボの非ヒト霊長類研究による結果を示す図である。具体的には、図18は、1F5が循環リンパ球を有意には減少させないことを示す。

【図19】マウス末梢血球および脾細胞に関する五量体染色アッセイの結果を表す図である。

【図20】抗CD27抗体を使用した、ELISPOTアッセイの結果および増強したI

10

20

30

40

50

IFN 産生を表す図である。

【図21】五量体染色およびIFN ELISPOTによる、トランスジェニックマウスモデルにおけるワクチン抗原に対するT細胞応答の、抗CD27 mAbによる増強を示す図である。

【図22】図22A~Cは、抗CD27が、APC標的ワクチン(-DEC205-OVA)に対するT細胞応答を増強することを示す、実験のプロトコルおよび結果の図である。図22Aは、実験のプロトコルを示す図である。図22Bは、抗原特異的T細胞を測定するための四量体染色実験の結果を示す図である。図22Cは、抗原特異的T細胞を測定するためのIFN-ガンマELISPOTアッセイの結果を示す図である。

【図23】図23A~Dは、TLR3作動薬PolyIC(25 μ g、50 μ g、または100 μ g)と組み合わせた抗CD27が、APC標的ワクチン(-DEC205-OVA)に対するT細胞応答を増強することを示す、実験の結果を示す図である。図23Aは、ポリICおよび抗CD27 mAb 1F5で治療した野生型マウス、ポリICおよび対照ヒトIgG1抗体で治療したhucD27トランスジェニックマウス、またはポリICおよび抗CD27 mAb 1F5で治療したhucD27トランスジェニックマウスのいずれかの、CD8+T細胞のうちのIFN-陽性細胞の割合を示すグラフである。

【図24】TLR作動薬の存在下または非存在下でのワクチン接種前の抗CD27 mAbの投与の研究による結果を示し、また、ワクチンに対する抗体の投与のタイミングの有意性を示す図である。

【図25】TLR作動薬の存在下または非存在下でのワクチン接種前の抗CD27 mAbの投与の研究による結果を示し、また、ワクチンに対する抗体の投与のタイミングの有意性を示す図である。

【図26】増殖およびサイトカイン産生によって示される、ヒトCD27トランスジェニックマウス由来のTCR活性化イオン(activation ion)T細胞と組み合わせた抗CD27 mAbの投与による結果を示す図である。

【図27】増殖およびサイトカイン産生によって示される、ヒトCD27トランスジェニックマウス由来のTCR活性化イオン(activation ion)T細胞と組み合わせた抗CD27 mAbの投与による結果を示す図である。

【図28】図28A~Dは、抗CD27が、MO4(B16-OVA)メラノーマチャレンジモデルにおける-DEC205-OVAワクチンの有効性を増強することを示す、実験のプロトコルおよび結果を示す図である。図28Aは、実験のためのプロトコルを示す。図28Bは、処置しなかったマウスにおける腫瘍接種後の日数に対する腫瘍サイズ(mm²)をプロットしたグラフである。図28Cは、ワクチンで単独で処置したマウスにおける腫瘍接種後の日数に対する腫瘍サイズ(mm²)をプロットしたグラフである。図28Dは、抗CD27抗体と組み合わせたワクチンで処置したマウスにおける腫瘍接種後の日数に対する腫瘍サイズ(mm²)をプロットしたグラフである。

【図29】図29AおよびBは、同一遺伝子のリンパ腫によるチャレンジ、および種々の用量の抗CD27 mAb 1F5の投与後の、ヒトCD27トランスジェニックマウス(腫瘍モデル)の延長された生存を示すグラフである。

【図30】SCIDマウスのRaji異種移植モデルにおける抗CD27治療の効果を試験する実験の結果を示す図である。図30Aは、処置をしなかったマウス、対照ヒトIgG1抗体で処置したマウス、または抗CD27 1F5および3H8抗体で処置したマウスの、腫瘍接種後の日数に対する腫瘍サイズ(mm³)をプロットした図である。矢印は、腹腔内注射によって抗体治療が与えられた日を示す。図30Bは、生存をカプラン-マイヤープロットで示す図である。

【図31】SCIDマウスのRaji異種移植モデルにおける抗CD27治療の効果を試験する実験の結果を示す図である。図31Aは、処置をしなかったマウス、対照ヒトIgG1抗体で処置したマウス、または抗CD27 1F5抗体で処置したマウスの、腫瘍接種後の日数に対する腫瘍サイズ(mm³)をプロットした図である。矢印は、腹腔内注射

10

20

30

40

50

によって抗体治療が与えられた日を示す。図31Bは、生存をカプラン - マイヤープロットで示す図である。

【図32】SCIDマウスのRaji異種移植モデルにおける抗CD27治療の効果を試験するさらなる実験の結果をカプラン - マイヤープロットで示す図である。

【図33】SCIDマウスのDauid異種移植モデルにおける抗CD27処置の効果を試験する実験の結果を示す図である。図33Aは、対照ヒトIgG1抗体で処置したマウス、または抗CD27-1F5抗体で処置したマウス(0.1mgまたは0.3mg)の、腫瘍接種後の日数に対する腫瘍サイズ(mm³)のプロットである。矢印は、腹腔内注射によって抗体治療が与えられた日を示す。図33Bは、生存をカプラン - マイヤープロットで示す図である。

【図34】ELISPOTアッセイの結果を示し、IgGのFc部分がFc受容体に係合できない場合、抗CD27抗体を用いる増強された抗原特異的IFN γ の産生が、抑制されることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0044】

発明の詳細な説明

本発明は、免疫機能(例えば、ワクチン療法にあるようなT細胞媒介性免疫応答、癌治療におけるNK活性化)の上方制御、細胞増殖(例えば、癌治療において)の阻害、およびT細胞媒介性免疫応答(例えば、自己免疫性治療において)の下方制御を含む、顕著な治療効果と相関する特定の機能的性質を呈する、抗CD27抗体を提供する。これらの機能的特徴としては、例えば、(1)CD27発現細胞への可溶性CD70の結合の、少なくとも約70%、さらには、例えば、少なくとも80%または少なくとも90%の阻害(例えば、完全なまたは部分的な遮断)、(2)1×10⁻⁹M以下のK_DでのヒトCD27への結合、(3)10 μ g/mLの濃度での、CD27発現細胞の、少なくとも約40%の補体媒介性細胞傷害性(CDC)の誘発、(4)10 μ g/mLの濃度での、ADCによるCD27発現細胞の、少なくとも約40%の特異的溶解(さらには、例えば、少なくとも約50%、少なくとも約60%、または少なくとも約70%の特異的溶解)の誘発、(5)免疫応答、特にTH1応答の誘発または増強、および/または(6)T細胞活性、特に特異的CD8⁺T細胞の数および/または活性の誘発または増強が挙げられる。他の実施形態において、抗体は、特定の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、ならびに/またはCDRの配列を含む。

【0045】

本発明がより容易に理解され得るように、最初に、特定の用語が定義される。さらなる定義は、発明を実施するための形態の全体を通して記述される。

【0046】

「CD27」という用語(「CD27分子」、「CD27L受容体」、「S1521」、「T細胞活性化抗原CD27」、「TNFRSF7」、「MGC20393」、「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー7」、「T細胞活性化抗原S152」、「Tp55」、「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー7」、「CD27抗原」、および「T細胞活性化抗原CD27」とも称される)は、リガンドCD70に結合する、TNF-受容体スーパーファミリーのメンバーである受容体を指す。CD27は、T細胞免疫の生成および長期にわたる維持に必要とされ、B細胞活性化および免疫グロブリン合成を調節する際に重要な役割を果たす。「CD27」という用語は、細胞によって自然に発現するCD27の任意の変異体またはアイソフォームを含む(例えば、GENBANK(登録商標)アクセッション番号AAH12160.1で寄託されるヒトCD27)。故に、本発明の抗体は、ヒト以外の種由来のCD27と交差反応し得る。代替として、抗体は、ヒトCD27に特異的であってもよく、他の種との任意の交差反応性を呈しなくてもよい。CD27または任意の変異体およびそのアイソフォームは、それらを自然に発現する細胞または組織から単離されてもよく、または当技術分野でよく知られている手法および/または本明細書で説明される手法を使用して組換えにより産生されてもよい。好まし

10

20

30

40

50

くは、抗体は、正常なグリコシル化パターンを有する h C D 2 7 を標的とする。

【 0 0 4 7 】

Genbank (登録商標) (アクセッション番号 AAH12160.1) は、以下の
ように、ヒト CD 2 7 のアミノ酸配列を報告している (配列番号 1)。

1 marphpwwlc vlgltvlglsa tpaqksper hywaqgkcc qmcepgtflv kdcdqhrkaa

61 qcdpcipgvs fspdhhrph ceschrhensg llvrnctita naecacmgw qcrdkectec

121 dplpnpslta rssqalsph qpthlpyvse mlearthagm qtladfrqlp artlsthwpp

181 qrslessdfi rilvifsgmf lvftlagalf lhqrrkyrsn kgespvpeae pcryscpree

241 egstipiqed yrkpepacsp

【 0 0 4 8 】

「CD 7 0」という用語 (「CD 7 0 分子」、「CD 2 7 L」、「CD 2 7 L G」、「
TNFSF 7」、「腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリーメンバー 7」、「CD
2 7 リガンド」、「CD 7 0 抗原」、「表面抗原 CD 7 0」、「腫瘍壊死因子リガンドス
ーパーファミリー、メンバー 7」、「Ki - 2 4 抗原」、および「CD 2 7 - L」とも称
される) は、CD 2 7 のリガンドを指す (例えば、Bowman MR et al.,
J. Immunol. 1994 Feb 15; 152 (4): 1756 - 61 を参照されたい)。CD 7 0 は、腫瘍壊死因子 (TNF) リガンドファミリーに属する、II 型膜
貫通タンパク質である。それは、共刺激された T 細胞の増殖を誘発し、細胞溶解性 T 細胞
の生成を増強し、T 細胞活性化に寄与する、T および B リンパ球上の表面抗原である。C
D 7 0 は、B 細胞の活性化、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害性機能、および免疫グロブ
リンの合成に関与することも示唆されている (Hintzen RQ et al., J.
Immunol. 1994 Feb 15; 152 (4): 1762 - 73)。

【 0 0 4 9 】

Genbank (登録商標) (アクセッション番号 NP_001243) は、以下のよ
うに、ヒト CD 7 0 のアミノ酸配列を報告している (配列番号 2)。

1 mpeegsgcsvg rrrpygcvlr aalvplvagl viclvciqr faqaqqqlpl eslgwdvael

61 qlnhtgpqqd prlywqggpa lgrsflhpe ldkgqlrihr dgiymvhiqv tlaicsstta

121 srhhpttlav gicspasrsi slrlsfhqq ctiasqrtp largdtlctn ltgtllpsrn

181 tdetffgvqw vrp

【 0 0 5 0 】

本明細書で参照される「抗体」という用語は、抗体全体および任意の抗原結合断片 (す
なわち、「抗原結合部分」)、またはその単一鎖を含む。「抗体」は、好ましい一実施形
態において、ジスルフィド結合によって相互接続する少なくとも 2 つの重 (H) 鎖および
2 つの軽 (L) 鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖
可変領域 (本明細書では、V_H と略記される) および重鎖定常領域から成る。重鎖定常領
域は、3 つのドメイン、すなわち、CH 1、CH 2、および CH 3 から成る。各軽鎖は、
軽鎖可変領域 (本明細書では、V_L と略記される) および軽鎖定常領域から成る。軽鎖定
常領域は、1 つのドメイン、すなわち、CL から成る。V_H 領域および V_L 領域は、「相
補性決定領域」(CDR) と称される超可変性の領域にさらに細分化することができ、「
フレームワーク領域」(FR) と称される、より保存された領域とともに散在している。
各 V_H および V_L は、3 つの CDR と、4 つの FR とから成り、FR 1、CDR 1、FR
2、CDR 2、FR 3、CDR 3、FR 4 の順序で、アミノ末端からカルボキシル末端ま
で配列される。重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、抗原と相互作用する、結合領域を含
む。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞 (例えば、エフェクター細胞) および古典的
補体系の第 1 の成分 (C1q) を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を
媒介し得る。

10

20

30

40

50

【0051】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」（または単純に「抗体部分」という用語は、抗原（例えば、ヒトCD27）に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上の断片を指す。そのような「断片」は、例えば、約8個～約1500個の間の長さのアミノ酸、適切には、約8個～約745個の間の長さのアミノ酸、適切には、約8個～約300個、例えば約8個～約200個のアミノ酸、または約10個～約50個もしくは100個の長さのアミノ酸である。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行うことができることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に含まれる結合断片の例としては、(i) Fab断片、すなわち、V_L、V_H、CL、およびCH1ドメインから成る一価の断片、(ii) F(ab')₂断片、すなわち、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結される2個のFab断片を含む二価の断片、(iii) V_HおよびCH1ドメインから成るFd断片、(iv) 抗体の単一の腕のV_LおよびV_Hドメインから成るFv断片、(v) V_Hドメインから成るdAb断片(Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546)、(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)、または(vii) 合成リンカーによって任意で連結されてもよい、2つ以上の単離CDRの組み合わせ、が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるV_L、およびV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、それらを、組換え方法を使用して、V_L領域およびV_H領域を一对にして、単鎖Fv(scFv)として知られている一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製することを可能にする、合成リンカーによって連結することができる。例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426、および Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい。そのような1本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の手法を使用して得られ、該断片は、無傷の抗体と同じ様式で、有用性がスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換えDNA手法によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって産生することができる。

【0052】

「二重特異性」または「二機能性抗体」は、2つの異なる重鎖/軽鎖の対および2つの異なる結合部位を有する、人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab断片の連結を含む種々の方法によって産生することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990)、Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)を参照されたい。

【0053】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す、抗体を指す。故に、「ヒトのモノクローナル抗体」という用語は、単一の結合特異性を示し、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および任意で定常領域を有する、抗体を指す。一実施形態において、ヒトのモノクローナル抗体は、不死化した細胞と融合させた、ヒト重鎖導入遺伝子と軽鎖導入遺伝子とを含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物（例えば、トランスジェニックマウス）から得られるB細胞を含む、ハイブリドーマによって産生される。

【0054】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製される、発現させる、作成される、または単離される、全てのヒト抗体を含み、すなわち、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマル動物（例えばマウス）から、またはそれから調製したハイブリドーマから単離される抗体、(b) 抗体を発現するように形質転換した宿主細胞、例えばトランスフェクターマから単離される抗体、(c) 組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体、および(d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングするこ

とを含む、任意の他の手段によって調製される、発現させる、作成される、または単離される抗体、等である。そのような組換えヒト抗体は、生殖系列遺伝子によってコードされる特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列を利用するが、例えば抗体成熟中に起こる、以降の再編成および変異を含む、可変領域および定常領域を含む。当技術分野で知られているように（例えば、Lonberg (2005) Nature Biotech. 23 (9) : 1117 - 1125 を参照されたい）、可変領域は、再編成して異種抗原に特異的な抗体を形成する種々の遺伝子によってコードされる、抗原結合ドメインを含む。再編成に加えて、可変領域は、異種抗原に対する抗体の親和性を増加させるために、複数の単一アミノ酸変化（体細胞変異または超変異と称される）によってさらに改変することができる。定常領域は、さらに、抗原にさらに応答して変化する（すなわち、アイソタイプスイッチ）。したがって、抗原に応答して軽鎖および重鎖免疫グロブリンポリペプチドをコードする、再編成されて体細胞的に変異させた核酸分子は、元の核酸分子との配列同一性を有しない場合があるが、代わりに、実質的に同一であるかまたは類似する（すなわち、少なくとも80%の同一性を有する）。

【0055】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の可変領域および定常領域（存在する場合）を有する抗体を含む。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（インビトロのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボの体細胞変異によって導入される変異）を含むことができる（Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474) : 856 - 859）、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 : 49 - 101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 : 65 - 93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764 : 536 - 546）を参照されたい。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、マウス等の別の哺乳類の種の生殖系列由来のCDRの配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体（すなわち、ヒト化抗体）を含まない。

【0056】

本明細書で使用される「異種抗体」は、そのような抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物から成らない生物に見られるものに対応する、アミノ酸配列またはコード核酸配列を有し、概して、トランスジェニック非ヒト動物のアミノ酸配列以外の種に由来する抗体を指す。

【0057】

本明細書で使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体（例えば、ヒトCD27に特異的に結合する単離された抗体は、ヒトCD27以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）を指すことを意図している。しかしながら、エピトープに特異的に結合する単離された抗体は、異なる種由来の他のCD27タンパク質に対する交差反応性を有し得る。しかしながら、抗体は、好ましくは常時ヒトCD27に結合する。加えて、単離された抗体は、一般的に、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まない。本発明の一実施形態では、異なるCD27特異性を有する「単離された」抗体の組み合わせは、明確な組成で組み合わせられる。

【0058】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する、抗原上の部位を指す。エピトープは、隣接するアミノ酸、またはタンパク質の三次折り畳みによって並置される隣接しないアミノ酸のどちらからも形成することができる。隣接するアミノ酸から形成されるエピトープは、一般的に、変性溶媒への暴露の際に保持される一方で、三次折り畳みによって形成されるエピトープは、一般的に、変性溶媒での処理によって失われる。エピトープは、一般的に、少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個の

10

20

30

40

50

アミノ酸を特有の空間的高次構造で含む。所与の抗体がどのようなエピトープに結合したのかを判定するための方法（すなわち、エピトープマッピング）は、当技術分野でよく知られており、例えば、免疫プロット法および免疫沈澱アッセイが挙げられ、CD27由来の重複または隣接するペプチドは、所与の抗CD27抗体との反応性について試験される。エピトープの空間的高次構造を決定する方法としては、当技術分野の手法および本明細書で説明されるもの、例えばX線結晶学および2次元核磁気共鳴が挙げられる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい）。

【0059】

また、本明細書で説明される特定の抗体によって認識されるエピトープの全てまたは一部（例えば、同じもしくは重複領域、または領域の間、もしくは領域にまたがる）を含む、CD27上のエピトープに結合する抗体も、本発明に包含される。

【0060】

また、同じエピトープに結合する抗体、および/またはヒトCD27への結合について本明細書で説明される抗体と競合する抗体も、本発明に包含される。同じエピトープを認識するか、または結合に対して競合する抗体は、通常的手法を使用して同定することができる。そのような手法としては、例えば、ある抗体が、標的抗原への別の抗体の結合を遮断する能力を示す、免疫アッセイ、すなわち、競合的結合アッセイが挙げられる。競合的結合は、試験中の免疫グロブリンが、CD27等の共通抗原への参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイで判定される。数多くの種類の競合的結合アッセイが知られており、例えば、固相直接または間接放射免疫アッセイ（RIA）、固相直接または間接酵素免疫アッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)を参照されたい）、固相直接ピオチン-アビジンEIA（Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)を参照されたい）、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)を参照されたい）、I-125標識を使用した固相直接標識RIA（Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)を参照されたい）、固相直接ピオチン-アビジンEIA（Cheung et al., Virology 176:546 (1990)を参照されたい）、および直接標識RIA（Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)）である。一般的に、そのようなアッセイは、非標識試験免疫グロブリンおよび標識参照免疫グロブリンのいずれかを保有する固体表面または細胞に結合した精製した抗原の使用を含む。競合的阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合する標識の量を判定することによって測定される。通常、試験免疫グロブリンは、過度に存在する。通常、競合抗体が過剰に存在するときには、少なくとも50~55%、55~60%、60~65%、65~70%、70~75%、またはそれ以上、共通抗原への参照抗体の特異的結合を阻害する。

【0061】

他の手法としては、例えば、エピトープの原子分解を提供する抗原-抗体複合体の結晶のX線分析等の、エピトープマッピング法が挙げられる。他の方法は、抗原の断片または抗原の変異バリエーションへの抗体の結合を監視し、抗原配列内のアミノ酸残基の改変による結合の喪失は、しばしば、エピトープ成分の指標とみなされる。加えて、エピトープマッピングのための計算的コンビナトリアル方法も使用することができる。これらの方法は、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから特異的短ペプチドを親和性単離する、関心の抗体の能力に依存する。よって、ペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために使用される抗体に対応するエピトープの定義に関する手がかりであると考えられる。エピトープマッピングについて、高次構造的な非連続性工

10

20

30

40

50

ピトープをマップすることが分かっている、計算アルゴリズムも開発されている。

【0062】

本明細書で使用される「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」という用語は、所定の抗原上のエピトープへの抗体結合を指す。一般的に、抗体は、検体として組換えヒトCD27を使用し、リガンドとして本抗体を使用して、BIACORE 2000計測器の表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって判定したときに、約 10^{-7} M未満(約 10^{-8} M未満、約 10^{-9} M未満、約 10^{-10} M未満、またはそれより少ない等)の平衡解離定数(K_D)で結合し、また、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)への結合に関するその親和性よりも少なくとも2倍大きい親和性で所定の抗原に結合する。本明細書では、「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という句は、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同じ意味で使用される。

10

【0063】

本明細書で使用される「 K_D 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指すことを意図している。一般的に、本発明のヒト抗体は、検体として組換えヒトCD27を使用し、リガンドとして本抗体を使用して、BIACORE 2000計測器の表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって判定したときに、約 10^{-8} M以下(約 10^{-9} M未満、約 10^{-10} M未満、またはそれより少ない等)の平衡解離定数(K_D)でCD27に結合する。

【0064】

本明細書で使用される「 k_d 」という用語は、抗体-抗原複合体からの抗体の解離に関するオフレート定数を指すことを意図している。

20

【0065】

本明細書で使用される「 k_a 」という用語は、抗体と抗原との会合に関するオンレート定数を指すことを意図している。

【0066】

本明細書で使用される「EC50」という用語は、最大応答の50%、すなわち、最大応答と基線との間の中間である応答を、インビトロまたはインビボアッセイのいずれかで誘発する、抗体またはその抗原結合部分の濃度を指す。

【0067】

本明細書で使用される「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる、抗体クラス(例えば、IgMまたはIgG1)を指す。一実施形態において、本発明のヒトモノクローナル抗体は、IgG1アイソタイプである。別の実施形態において、本発明のヒトモノクローナル抗体は、IgG2アイソタイプである。

30

【0068】

「固定化CD27に結合する」という用語は、例えば細胞の表面上で発現させた、または固体支持体に付着したCD27に結合する、本発明のヒト抗体の能力を指す。

【0069】

本明細書で使用される「交差反応する」という用語は、異なる種由来のCD27に結合する、本発明の抗体の能力を指す。例えば、ヒトCD27に結合する本発明の抗体はまた、CD27の別の種に結合し得る。本明細書で使用される交差反応性は、結合アッセイ(例えば、SPR、ELISA)において、精製した抗原との特異的反応性の検出によって、またはCD27を生理学的に発現する細胞との結合、もしくはそうでなければそれとの機能的相互作用の検出によって測定する。交差反応性を判定するための方法としては、例えばBiacore(商標)2000SPR計測器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用したBiacore(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析、またはフローサイトメトリー法による、本明細書で説明される標準的な結合アッセイが挙げられる。

40

【0070】

本明細書で使用される「アイソタイプスイッチング」は、抗体のクラスまたはアイソタ

50

イブが、ある I g クラスから別の I g クラスの 1 つに変化する現象を指す。

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される「非スイッチングアイソタイプ」は、いかなるアイソタイプスイッチングも行われなかったときに産生される、重鎖のアイソタイプクラスを指し、非スイッチングアイソタイプをコードする C H 遺伝子は、一般的に、機能的に再編成された V D J 遺伝子のすぐ下流の第 1 の C H 遺伝子である。アイソタイプスイッチングは、古典的または非古典的アイソタイプスイッチングに分類されている。古典的アイソタイプスイッチングは、導入遺伝子の少なくとも 1 つのスイッチ配列領域を含む組換え事象によって起こる。非古典的アイソタイプスイッチングは、例えばヒト μ とヒト μ との間の相同的組換え（関連欠失）によって起こり得る。とりわけ、導入遺伝子間および/または染色体間組換え等の代替的な非古典的スイッチング機構が起こり、アイソタイプスイッチングを達成することがあり得る。

10

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される「スイッチ配列」という用語は、スイッチ組換えを担う D N A 配列を指す。「スイッチドナー」配列、一般的に μ スwitch領域は、スイッチ組換え中に削除される構成領域の 5'（すなわち上流）側となる。「スイッチ受容体」領域は、削除される構成領域と置換定常領域（例えば、 μ 、 δ 等）の間となる。組換えが常時起こる特異的な部位はないので、最終的な遺伝子配列は、一般的に、構築体からは予測できないと考えられる。

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される「グリコシル化パターン」は、タンパク質、より具体的には、免疫グロブリンタンパク質に共有結合した、糖質ユニットのパターンとして定義される。異種抗体のグリコシル化パターンは、当業者が、該異種抗体のグリコシル化パターンが、導入遺伝子の C H 遺伝子が由来する種のグリコシル化のパターンよりも、非ヒトトランスジェニック動物の種の該パターンに類似していると認識する場合に、非ヒトトランスジェニック動物の種によって産生される抗体に自然発生するグリコシル化パターンに実質的に類似していると特徴付けられうる。

20

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用される、物体に適用される「自然発生の」という用語は、ある物体を天然で見出すことができるという事実を指す。例えば、天然の源から単離することができ、かつ実験者によって意図的に改変されていない、生物（ウイルスを含む）の中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然発生である。

30

【 0 0 7 5 】

本明細書で使用される「再編成した」という用語は、重鎖または軽鎖免疫グロブリン座の構成を指し、その構成において、V セグメントは、完全な V_H または V_L ドメインを本質的にコードする高次構造において D - J または J セグメントに直接隣接して位置する。再編成した免疫グロブリン遺伝子座は、生殖系列 D N A との比較によって同定することができ、再編成した座は、少なくとも 1 つの再び組み合わせた七量体 / 九量体相同性要素を有する。

【 0 0 7 6 】

V セグメントに関して本明細書で使用される「非再編成」または「生殖系列構成」という用語は、V セグメントが D または J セグメントに直接隣接するように再び組み合わされていない構成を指す。

40

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される「核酸分子」という用語は、D N A 分子および R N A 分子を含むことを意図している。核酸分子は、1 本鎖または 2 本鎖であってもよいが、好ましくは 2 本鎖 D N A である。

【 0 0 7 8 】

C D 2 7 に結合する抗体または抗体部分（例えば、V_H、V_L、C D R 3）をコードする核酸に関して本明細書で使用される「単離された核酸分子」という用語は、抗体または

50

抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、CD27以外の抗原に結合する抗体または抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列を含まない核酸分子を指すことを意図しており、他の配列は、ヒトゲノムDNAの核酸において自然に隣接してもよい。例えば、配列番号35および41、47および53、101および107、83および89、83および95、23および29、71および77は、それぞれ、抗CD27抗体モノクローナル抗体1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8および1G5の重鎖(V_H)可変領域および軽鎖(V_L)可変領域を含む、ヌクレオチド配列に対応する。

【0079】

本発明はまた、配列番号5～112で記述される配列の「保存的配列改変」、すなわち、ヌクレオチド配列によってコードされるか、またはアミノ酸配列を含む抗体の抗原への結合を排除しない、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の改変も包含する。そのような保存的配列改変としては、保存的ヌクレオチドおよびアミノ酸置換、ならびにアミノ酸付加および欠失が挙げられる。例えば、改変は、部位特異的突然変異およびPCR媒介性変異誘発等の当技術分野で知られている標準的な手法によって、配列番号5～112の中に導入することができる。保存的アミノ酸置換としては、アミノ酸残基を、類似する側鎖を有するアミノ酸残基と置換したものが挙げられる。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖を伴うアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を伴うアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、ヒト抗CD27抗体中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基と置換される。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は当技術分野においてよく知られている、（例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993)、Kobayashi et al., Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999)、およびBurks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照されたい）。

【0080】

代替として、別の実施形態において、変異は、飽和変異誘発等によって抗CD27抗体の全部または一部に沿って無作為に導入することができ、結果として生じる改変された抗CD27抗体は、結合活性についてスクリーニングすることができる。

【0081】

核酸について、「実質的な相同性」という用語は、最適に配列して比較したときに、2つの核酸またはその指定された配列が、適切なヌクレオチド挿入体または欠失体と、少なくとも約80%のヌクレオチド、通常は少なくとも約90%～95%、より好ましくは約98%～99.5%のヌクレオチドが同一であることを示す。代替として、実質的な相同性は、選択的ハイブリッド形成条件下で、セグメントが相補鎖にハイブリッド形成するとき存在する。

【0082】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要がある、ギャップの数、および各ギャップの長さを考慮した、配列が共有する同一の位置の数の関数（すなわち、同一性% = 同一の位置の数 ÷ 位置の総数 × 100）である。配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの判定は、下記の限定的でない例で説明されるように、数学アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0083】

10

20

30

40

50

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWS gap dna . CMP 行列、40、50、60、70、または80のギャップウェイト、および1、2、3、4、5、または6の長さウェイトを使用した、GCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>で入手可能)のGAPプログラムを使用して決定することができる。2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、PAM120ウェイト残基表、12のギャップ長さペナルティ、および4のギャップペナルティを使用した、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれたE. Meyers and W. Millerのアルゴリズム(CABIOS, 4:11-17(1989))を使用して決定することもできる。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossum62行列またはPAM250行列のいずれか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイト、および1、2、3、4、5、または6の長さウェイトを使用した、GCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>で入手可能)のGAPプログラムに組み込まれたNeedleman and Wunsch(J. Mol. Biol. (48):444-453(1970))アルゴリズムを使用して決定することができる。

10

【0084】

本発明の核酸配列およびタンパク質配列は、例えば関連する配列を同定するために、公共データベースに対する検索を行うための「クエリ配列」としてさらに使用することができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して行うことができる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラムで、スコア=100、ワード長=12によって行って、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムで、スコア=50、ワード長=3によって行って、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸を得ることができる。比較の目的でギャップアラインメントを得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402で説明されるように、Gapped BLASTを使用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを使用するときには、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを使用することができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

20

30

【0085】

核酸は、全細胞の中に、細胞溶解物中に、または部分的に精製した形態もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動、および当技術分野でよく知られている他の技術を含む、標準的な技術によって、他の細胞成分または他の夾雑物(例えば、他の細胞核酸またはタンパク質)から精製されたときに、核酸は、「単離される」か、または「実質的に純粋になる」。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

40

【0086】

cDNA、ゲノム、またはその混合物のいずれか由来の本発明の核酸組成物は、天然配列(改変された制限部位等を除く)であることが多いが、遺伝子配列を提供するための標準的な技術に従って変異させてもよい。コード配列については、これらの変異は、所望に応じてアミノ酸配列に影響を及ぼし得る。具体的には、天然のV配列、D配列、J配列、定常配列、スイッチ配列、および本明細書で説明される他のそのような配列と実質的に相同であるか、またはこれらに由来するDNA配列を企図している(「由来する」は、ある配列が別の配列と同一であるか、別の配列から改変されていることを示す)。

【0087】

50

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係におかれているときに、「機能的に連結されている」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合に、コード配列に機能的に連結されている。転写調節配列に関して、「機能的に連結されている」とは、連結されているDNA配列が連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合には、連続し、かつ読み枠中に存在していることを意味する。スイッチ配列について、「機能的に連結されている」とは、配列がスイッチ組換えを生じさせることが可能であることを示す。

【0088】

本明細書で使用する「ベクター」という用語は、そこに連結された別の核酸を輸送することが可能である核酸分子を指すことを意図している。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントがライゲーションされてもよい環状の2本鎖DNAループを指す。ベクターの別の型は、さらなるDNAセグメントをウイルスゲノムにライゲーションしてもよい、ウイルスベクターである。ある特定のベクターは、ベクターが導入される宿主細胞において自律複製することが可能である（例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクター、および哺乳類のエピソームベクター）。他のベクター（例えば、哺乳類の非エピソームベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムの中に組み込むことができ、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、ベクターに機能的に連結された遺伝子の発現を指示することが可能である。そのようなベクターを、本明細書では、「組換え発現ベクター」（または、単に、「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA手法において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」が同じ意味で使われる場合がある。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター等のそのような他の発現ベクターの形態（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス）を含むことを意図している。

【0089】

本明細書で使用される「組換え宿主細胞」（または、単に、「宿主細胞」という用語は、そこに組換え発現ベクターが導入されている細胞を指すことを意図している。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も指すことを意図していることを理解されたい。変異または環境の影響のいずれかにより特定の改変が後世で起こる場合があるので、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一でなくてもよいが、それでも、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

【0090】

本明細書で使用される「抗原」という用語は、タンパク質、ペプチド、またはハプテン等の、任意の天然または合成の免疫原性物質を指す。本発明で使用するための（例えば、本発明の抗CD27抗体と組み合わせたワクチン中の）適切な抗原としては、例えば、その抗原に対して保護的または治療的な応答が所望される、感染性疾患抗原および腫瘍抗原（例えば、腫瘍細胞もしくは病原性生物によって発現する抗原、または感染性疾患抗原）が挙げられる。例えば、適切な抗原としては、癌の予防または治療のための腫瘍関連抗原が挙げられる。腫瘍関連抗原の例としては、hCG、gp100またはPmel17、HER2/neu、WT1、メソテリン、CEA、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、イディオタイプ、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-A3、チロシナーゼ、テロメラゼ、SSX2、およびMUC-1抗原、ならびに生殖細胞由来の腫瘍抗原の配列の全部または一部を含む配列が挙げられるが、これらに限定されない。腫瘍関連抗原には、血液型抗原、例えば、Le^a、Le^b、Le^X、Le^Y、H-2、B-1、B-2抗原も挙げられる。代替として、2つ以上の抗原を、本発明の抗原-抗体構築体の中を含むことができる。例えば、MAGE抗原は、GM-CSFまたはIL-12等のアジュバントとともに、melaninA、チロシナーゼ、およびgp100等の他の抗原と組み合わせて、抗APC抗体に連結させることができる。

【0091】

他の適切な抗原としては、ウイルス疾患の予防または治療のためのウイルス抗原が挙げられる。ウイルス抗原の例としては、HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV（表面抗原またはコア抗原）、HPV、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2、およびORF3抗原が挙げられるが、これらに限定されない。細菌抗原の例としては、トキソプラズマ・ゴンジまたは梅毒トレポネーマが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体-細菌抗原コンジュゲートは、炭疽熱、ボツリヌス中毒症、破傷風、クラミジア、コレラ、ジフテリア、ライム病、梅毒、および結核等の、種々の細菌疾患の治療または予防で使用することができる。ウイルス、細菌、寄生虫、および真菌等の感染性疾患病原体由来の、他の適切な抗原を下記に開示する。

10

【0092】

前述の抗原の配列は、当技術分野でよく知られている。例えば、MAGE-3 cDNA配列の例は、米国特許第6,235,525号(Ludwig Institute for Cancer Research)で提供され、NY-ESO-1核酸配列およびタンパク質配列の例は、米国特許第5,804,381号および米国特許第6,069,233号(Ludwig Institute for Cancer Research)で提供され、Melan-A核酸配列およびタンパク質配列の例は、米国特許第5,620,886号および米国特許第5,854,203(Ludwig Institute for Cancer Research)で提供され、NY-BR-1核酸配列およびタンパク質配列の例は、米国特許第6,774,226号および米国特許第6,911,529号(Ludwig Institute for Cancer Research)で提供され、NY-CO-58核酸配列およびタンパク質配列の例は、国際公開公報第02090986号(Ludwig Institute for Cancer Research)で提供され、HER-2/neuタンパク質のアミノ酸配列の例は、GENBANK(登録商標)アクセッション番号AAA58637で利用可能であり、ヒト癌胎児性抗原様1(CEA-1)のヌクレオチド配列(mRNA)は、GENBANK(登録商標)アクセッション番号NM_020219で利用可能である。

20

【0093】

本発明の組成物および方法で使用してもよいHPV抗原としては、例えば、HPV-16抗原、HPV-18抗原、HPV-31抗原、HPV-33抗原、ならびに/またはHPV-35抗原が挙げられ、HPV-16抗原および/またはHPV-18抗原が適切である。HPV-16のゲノムは、Virology, 145:181-185(1985)で説明されており、HPV-18をコードするDNA配列は、米国特許第5,840,306号で説明されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。HPV-16抗原(例えば、HPV-16のE1および/またはE2タンパク質の血清反応性領域)は、米国特許第6,531,127号で説明されており、HPV-18抗原(例えば、HPV-18のL1および/またはL2タンパク質の血清反応性領域)は、米国特許第5,840,306号で説明されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。同様に、HBVの完全なゲノムは、GENBANK(登録商標)アクセッション番号NC_003977で利用可能であり、その開示は、本明細書に組み込まれる。HCVのゲノムは、欧州特許出願第318216号で説明されており、その開示は、本明細書に組み込まれる。PCT/US90/01348号は、HCVゲノムのクローンの配列情報、HCVウイルスタンパク質のアミノ酸配列、ならびにHCVタンパク質およびこれに由来するペプチドを含むHCVワクチンのための組成物の作製方法、およびそのような組成物の使用方法を開示しており、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0094】

タンパク質の抗原ペプチド(すなわち、T細胞エピトープを含むもの)は、当技術分野でよく知られている種々の様式で同定することができる。例えば、T細胞エピトープは、ウェブに基づく予測アルゴリズム(BIMAS & SYFPEITHI)を使用してタンパク質配列を分析して、CTLによって以前に定義した10,000の十分に特徴付け

50

られたMHC結合ペプチドの内部データベースに適合する潜在的なMHCクラスIおよびクラスII結合ペプチドを生成することによって予測することができる。高スコアのペプチドをランク付けして、所与のMHC分子に対する高親和性に基づいて、「関心対象」として選択することができる。

【0095】

別の方法では、T細胞エピトープ含有抗原ペプチドを同定する方法は、組換えにより、合成により、または一定の制限された条件下でのタンパク質の化学的切断により産生することができる所望の長さの非重複ペプチドまたは所望の長さの重複ペプチドへとタンパク質を分割し、免疫原性、例えばT細胞応答の誘発（すなわち、増殖またはリンホカイン分泌）について試験することによる。

10

【0096】

例えば、細密なマッピング手法によってタンパク質の正確なT細胞エピトープを判定するために、T細胞の生物学的手法によって判定したときに、T細胞刺激活性を有し、したがって、少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチドを、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでのアミノ酸残基の付加または欠失によって改変して、改変ペプチドに対するT細胞反応性の変化を判定するように試験することができる。T細胞の生物学的手法によって判定したときに、天然タンパク質配列の重複領域を共有する2つ以上のペプチドがヒトT細胞刺激活性を有することが分かった場合に、そのようなペプチドの全部または一部を含むさらなるペプチドを産生することができ、これらのさらなるペプチドは、類似する手順で試験することができる。この手法に従って、ペプチドが選択されて、組換えまたは合成によって産生される。ペプチドは、ペプチドに対するT細胞応答の強度（例えば、刺激指数）を含む、種々の要因に基づいて選択される。次いで、これらの選択されたペプチドの物理的および化学的性質（例えば、溶解性、安定性）を試験して、ペプチドが治療組成物での使用に適切であるかどうか、またはペプチドが改変を必要とするかどうかを判定することができる。

20

【0097】

「抗原提示細胞」または「APC」という用語は、その表面上でMHCと複合化する異種抗原を示す細胞である。T細胞は、T細胞受容体（TCR）を用いてこの複合体を認識する。APCの例としては、樹状細胞（DC）、末梢単核細胞（PBMC）、単球（THP-1等）、Bリンパ芽球様細胞（C1R.A2、1518B-LCL等）、および単球由来樹状細胞（DC）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかのAPCは、食作用または受容体媒介エンドサイトーシスのいずれかによって抗原を内在化する。APC受容体の例としては、ヒト樹状細胞および上皮細胞205受容体（CD27）等のC型レクチン、およびヒトマクロファージマンノース受容体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0098】

「抗原提示」という用語は、APCが抗原を捕捉し、例えばMHC-Iコンジュゲートおよび/またはMHC-IIコンジュゲートの成分として、T細胞によってそれらを認識することが可能である過程を指す。

【0099】

「MHC分子」は、2種類の分子、すなわち、MHCクラスIおよびMHCクラスIIを含む。MHCクラスI分子は、特異的CD8+T細胞に抗原を提示し、MHCクラスII分子は、特異的CD4+T細胞に抗原を提示する。APCに外因的に送達された抗原は、主にMHCクラスIIとの会合のために処理される。対照的に、APCに内因的に送達された抗原は、主にMHCクラスIとの会合のために処理される。

40

【0100】

本明細書で使用される「免疫賦活剤」という用語は、DCおよびマクロファージ等のAPCを刺激することが可能な化合物を含むが、これらに限定されない。例えば、本発明で使用するための適切な免疫賦活剤は、APCの成熟過程が加速され、APC増殖を増加させ、ならびに/または共刺激分子（例えば、CD80、CD86、ICAM-1、MHC

50

分子、およびCCR7)および炎症誘発性サイトカイン(例えば、IL-1、IL-6、IL-12、IL-15、およびIFN-)の動員または放出が上方制御されるように、APCを刺激することが可能である。適切な免疫賦活剤はまた、T細胞増殖を増加させることも可能である。そのような免疫賦活剤としては、CD40リガンド;FLT3リガンド;IFN-、IFN-、IFN-、およびIL-2等のサイトカイン;G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)およびGM-CSF(顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)等のコロニー刺激因子;抗CTLA-4抗体、抗PD1抗体、抗41BB抗体、または抗OX-40抗体;LPS(エンドトキシン);ssRNA;dsRNA;カルメット-ゲラン桿菌(BCG);塩酸レバミソール;および静注用免疫グロブリンが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、免疫賦活剤は、トール様受容体(TLR)作動薬であってもよい。例えば、免疫賦活剤は、2本鎖イノシン:シトシンポリヌクレオチド(Poly I:C、例えば、Hemispherex Bipharma, PA, USからAmpligen(商標)として、またはOncovirからPoly I:C:LCとして入手可能)、またはPoly A:U等のTLR3作動薬;モノホスホリル脂質A(MPL)またはRC-529(例えば、GSK, UKから入手可能である)等のTLR4作動薬;フラジェリン等のTLR5作動薬;イミダゾキノリンTLR7またはTLR8作動薬(例えば、イミキモド(例えば、Aldara(商標))またはレシキモドおよび関連するイミダゾキノリン剤(例えば、3M Corporationから入手可能))等のTLR7またはTLR8作動薬;または非メチル化CpGモチーフ(いわゆる「CpGs」、例えば、Coley Pharmaceuticalから入手可能)を伴うデオキシヌクレオチド等のTLR9作動薬であってもよい。好ましい免疫賦活剤は、TLR3作動薬、好ましくは、Poly I:Cである。そのような免疫賦活剤は、本発明の抗体および構築体と同時に、別々に、または連続的に投与されてもよく、抗体および構築体に物理的に連結されてもよい。

【0101】

本明細書で使用する「連結された」という用語は、2つ以上の分子の会合を指す。連結は、共有結合性または非共有結合性であり得る。連結はまた、遺伝的でもあり得る(すなわち、組換えによって融合している)。そのような連結は、化学的コンジュゲーションおよび組換えタンパク質産生等の、当該分野で認識される様々な技術を使用して達成することができる。

【0102】

本明細書で使用される抗原「交差提示」という用語は、APC上のMHCクラスIおよびクラスII分子を介した、T細胞への外因性タンパク質抗原の提示を指す。

【0103】

本明細書で使用される「T細胞媒介性応答」という用語は、エフェクターT細胞(例えば、CD8⁺細胞)およびヘルパーT細胞(例えば、CD4⁺細胞)を含む、T細胞によって媒介される任意の応答を指す。T細胞媒介性応答としては、例えば、T細胞傷害性および増殖が挙げられる。

【0104】

本明細書で使用される「細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答」という用語は、細胞傷害性T細胞によって誘発される免疫応答を指す。CTL応答は、主にCD8⁺T細胞によって媒介される。

【0105】

本明細書で使用される「阻害する」または「遮断する」という用語(例えば、細胞上のCD27へのCD70の結合の阻害/遮断を指す)は、同じ意味で使用され、部分的および完全な阻害/遮断を包含する。好ましくは、CD70の阻害/遮断は、阻害または遮断を伴わずにCD70の結合が起こったときに起こる正常なレベルまたは種類の活性を、低減または変更する。阻害および遮断はまた、抗CD27抗体と接触していないCD70と比較して、抗CD27抗体と接触したときのCD70の結合親和性における任意の測定可能な減少を含むことも意図しており、例えば、CD70の結合を、少なくとも約10%、

10

20

30

40

50

15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%阻害する。好ましい実施形態において、抗CD27抗体は、CD70の結合を少なくとも約70%阻害する。別の実施形態において、抗CD27抗体は、CD70の結合を少なくとも約80%阻害する。

【0106】

本明細書で使用する（例えば、細胞に関して）「増殖を阻害する」という用語は、細胞の増殖の任意の測定可能な減少、例えば、細胞の増殖の、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または100%の阻害を含むことを意図している。

10

【0107】

「免疫応答を誘発すること」および「免疫応答を増強すること」という用語は、同じ意味で使用され、特定の抗原に対する免疫応答の刺激（すなわち、受動的または順応的）を指す。CDCまたはADCCを誘発することに関して使用される「誘発する」という用語は、特定の直接細胞殺傷機構の刺激を指す。例えば、一実施形態において、抗体は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、CD27発現細胞のCDCを介した溶解を少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、または60%誘発する。好ましい実施形態において、抗体は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、CD27発現細胞のCDCを介した溶解を少なくとも約40%誘発する。別の実施形態において、抗体は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、CD27発現細胞のADCCを介した溶解（すなわち、特異的溶解）を少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%誘発する。好ましい実施形態において、抗体は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、CD27発現細胞のADCCを介した溶解を少なくとも約40%誘発する。

20

【0108】

本明細書で使用される「治療する」、「治療すること」、および「治療」という用語は、本明細書で説明される治療的または予防的手段を指す。本「治療」方法は、障害または再発性障害の1つ以上の症状を予防するか、治癒させるか、遅延させるか、その重篤性を低減するか、もしくは改善するために、または治療を行わない場合の予想を超えて患者の生存を延長するために、本発明のヒト抗体を、そのような治療を必要とする対象（例えば、特定の抗原に対する増強された免疫応答を必要とする対象、または最終的にそのような障害を受け得る対象）に投与することを指す。

30

【0109】

「有効用量」または「有効投薬量」という用語は、所望の効果を達成するか、または少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。「治療上有効用量」という用語は、既に疾患を罹患している患者の疾患およびその合併症を治癒させるか、少なくとも部分的に抑制するのに十分な量として定義される。この用途に対する有効な量は、治療されている障害の重篤性および患者自身の免疫系の一般的な状態に依存する。

【0110】

「患者」という用語は、予防的または治療的な処置を受ける、ヒトおよび他の哺乳類の対象を含む。

40

【0111】

本明細書で使用される「対象」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。例えば、本発明の方法および組成物は、免疫障害を伴う対象を治療するために使用することができる。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等の、哺乳動物および非哺乳動物を含む。

【0112】

本開示の種々の態様を以下のサブセクションでさらに詳細に説明する。

【0113】

I. CD27に対する抗体の産生

50

本発明は、抗体、例えばCD27に結合する完全なヒト抗体（例えば、ヒトCD27）を包含する。CD27に結合する例示的なモノクローナル抗体としては、1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5が挙げられる。本発明のモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975)によって説明される標準的な体細胞ハイブリッド形成手法等の、種々の既知の手法を使用して産生することができる。体細胞ハイブリッド形成手順が好ましいが、基本的に、モノクローナル抗体を産生するための他の手法、例えば、Bリンパ球のウイルス形質転換または癌化、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを使用したファージディスプレイ技術も使用することができる。

【0114】

故に、一実施形態では、ヒトCD27に結合する抗体を産生するために、ハイブリドーマ法が使用される。この方法では、免疫化のために使用される抗原に特異的に結合する抗体を産生するか、産生することが可能であるリンパ球を誘発するために、マウスまたは他の適切な宿主動物を適切な抗原で免疫化することができる。代替として、リンパ球は、インビトロで免疫化されてもよい。次いで、リンパ球を、ポリエチレングリコール等の適切な融合剤を使用して骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成することができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地を、抗原を対象とするモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限界希釈手順によってサブクローン化し、標準的な方法によって増殖させてもよい(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、D-MEM培地またはRPMI-1640培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物の腹水腫瘍としてインビボで増殖させてもよい。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィ等の、従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地、腹水液、または血清から分離することができる。

【0115】

別の実施形態において、ヒトCD27に結合する抗体および抗体の一部は、例えば、McCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)、Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)、およびHoet et al. (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348、Ladner他への米国特許第5,223,409号、第5,403,484号、および第5,571,698号、Dower他への米国特許第5,427,908号および第5,580,717号、McCafferty他への米国特許第5,969,108号および第6,172,197号、およびGriffiths他への米国特許第5,885,793号、第6,521,404号、第6,544,731号、第6,555,313号、第6,582,915号、および第6,593,081号で説明される手法を使用して、生成した抗体ファージライブラリーから単離することができる。加えて、鎖シャフリング(Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783(1992))、ならびに非常に大きいファージライブラリーを構築するための方策としてのコンビナトリアル感染およびインビボの組換え(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))による、高親和性(nM範囲)ヒト抗体の産生が使用されてもよい。

【0116】

特定の実施形態において、ヒトCD27に結合する抗体は、前掲のHo et al. によって説明されるファージディスプレイ手法を使用して産生される。この手法は、ヒトドナーから単離された免疫グロブリン配列の特有の組み合わせを有し、かつ重鎖のCDRに合成の多様性を有する、ヒトFabライブラリーが生成されることを含む。次いで、このライブラリーを、ヒトCD27に結合するFabについてスクリーニングする。

【0117】

本発明の抗体を産生するハイブリドーマを生成するための好ましい動物系は、マウス系である。免疫化プロトコル、および免疫化された脾細胞を単離して融合させるための手法を含む、マウスにおけるハイブリドーマの産生は、当技術分野でよく知られている。

【0118】

一実施形態において、CD27を対象とする抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を担持するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソーマルマウスを使用して生成する。一実施形態において、本発明は、内因性 μ および δ 鎖座を不活化する標的化された変異とともに、非再編成ヒト重鎖(μ および δ)および κ 鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリンミニ遺伝子座を含む、本明細書で「HuMAbマウス」と称する、トランスジェニックマウスを使用する(Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859)。故に、マウスは、マウスIgMまたは δ の減少した発現を呈し、そして、免疫化に应答して、導入されたヒト重鎖および κ 鎖導入遺伝子は、クラススイッチングおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgGモノクローナル抗体を生成する(前掲のLonberg, N. et al. (1994)、概説として、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101、Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546)。HuMAbマウスの調製は、下記セクションIIで、およびTaylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295、Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656、Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724、Choi et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123、Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830、Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920、Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101、Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591、Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546、Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851で詳細に説明されている。さらに、米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,789,650号、第5,877,397号、第5,661,016号、第5,814,318号、第5,874,299号、および第5,770,429号(全て、LonbergおよびKay、ならびにGenPharm Internationalに付与)、Surani他への米国特許第5,545,807号、1998年6月11日に公開の国際公開公報第98/24884号、1994年11月10日に公開の国際公開公報第94/25585号、1993年6月24日に公開の国際公開公報第93/1227号、1992年12月23日に公開の国際公開公報第92/2264

10

20

30

40

50

5号、1992年3月19日に公開の国際公開公報第92/03918号を参照されたい。

【0119】

免疫化

CD27に対する完全なヒト抗体を生成するために、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソーマルマウス(例えば、HC012マウス、HC07マウス、またはKMマウス)を、例えば、Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474):856-859、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851、および国際公開公報第98/24884号によって説明されているように、CD27抗原の精製した調製物もしくは富化した調製物、および/またはCD27を発現する細胞で免疫化することができる。本明細書で説明されるように、HuMAbマウスは、免疫原としての組換えCD27タンパク質またはCD27を発現する細胞株のいずれかで免疫化される。代替として、マウスは、ヒトCD27をコードするDNAで免疫化することができる。好ましくは、マウスは、最初の注入時に6~16週齢である。例えば、組換えCD27抗原の精製した調製物または富化した調製物(5~50 μ g)を使用して、HuMAbマウス腹腔内で免疫化することができる。CD27抗原の精製した調製物または富化した調製物を使用した免疫化によって抗体が得られなかった場合は、免疫応答を促進するために、CD27を発現する細胞(例えば、細胞株)でマウスを免疫化することもできる。例示的な細胞株としては、CD27を過剰発現する安定したCHO細胞株およびRaj i細胞株が挙げられる。

10

20

【0120】

種々の抗原による累積された経験は、最初に完全なフロイントアジュバント中の抗原により腹腔内(IP)または皮下(SC)で免疫化し、続いて、1週間おきに、不完全なフロイントアジュバント中の抗原によりIP/SCで免疫化したとき(合計10回まで)に、HuMAbトランスジェニックマウスが最良に応答することを示した。免疫応答を、眼窩後出血によって得られた血漿試料による一連の免疫化プロトコルにわたって監視することができる。血漿は、ELISA(以下で説明する)によってスクリーニングすることができる。十分な力価の抗CD27ヒト免疫グロブリンを伴うマウスを融合に使用することができる。マウスを、屠殺して脾臓を取り出す3日前に、抗原により静脈内で追加免疫することができる。

30

【0121】

CD27に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

CD27に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、免疫化マウス由来の脾細胞およびリンパ節細胞を単離して、マウス骨髄腫細胞株等の適切な不死化細胞株に融合することができる。次いで、結果として生じるハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングすることができる。例えば、免疫化マウス由来の脾臓リンパ球の単一細胞懸濁物を、50%のPEG(w/v)で、SP2/0-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL1580)に融合することができる。細胞は、平底マイクロタイタープレート中で約 1×10^5 個を平板培養し、続いて、通常の試薬の他に、10%の胎児クローン血清、5~10%のOrigenハイブリドーマクローニング因子(IGEN)、および1X HAT(Sigma)を含有する選択培地中で2週間インキュベートすることができる。約2週間後に、細胞は、HATをHTと置換した培地中で培養することができる。次いで、個々のウェルは、ヒト抗CD27モノクローナルIgM抗体およびIgG抗体についてELISAによってスクリーニングするか、またはCD27を発現する細胞、例えばCD27を発現するCHO細胞株の表面への結合について、FLISA(蛍光結合免疫吸着アッセイ)によってスクリーニングすることができる。大規模なハイブリドーマ増殖が起こると、通常10~14日後に培地を観察することができる。抗体分泌ハイブリドーマを再度平板培養し、再度スクリーニングし、それでもIgGについて陽性であった場合、抗CD27モノクローナル抗体は、限界希釈

40

50

によって少なくとも2回サブクローン化することができる。次いで、安定したサブクローンをインビトロで培養して、特徴付けのために、組織培養培地中で抗体を生成することができる。

【0122】

CD27に対するモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターの生成

本発明の抗体はまた、当技術分野でよく知られているように、例えば、組換えDNA手法と遺伝子形質移入法との組み合わせを使用して、宿主細胞トランスフェクター中で産生することもできる(Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

【0123】

例えば、一実施形態において、関心の遺伝子(例えば、ヒト抗体遺伝子)は、国際公開公報第87/04462号、国際公開公報第89/01036号、およびEP338841号で開示されているGS遺伝子発現系、または当技術分野でよく知られている他の発現系等によって使用される、真核生物発現プラスミド等の発現ベクターにライゲーションすることができる。クローン化抗体遺伝子を伴う精製したプラスミドは、CHO細胞もしくはNSO細胞、または代替として、植物由来の細胞、真菌、もしくは酵母細胞のような他の真核細胞等の、真核生物宿主細胞に導入することができる。これらの遺伝子を導入するために使用される方法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、またはリポフェクタミン等の当技術分野で説明される方法とすることが可能である。これらの抗体遺伝子を宿主細胞に導入した後に、抗体を発現する細胞を同定および選択することができる。これらの細胞は、トランスフェクターを表し、これらは、次いで、その発現レベルのために増幅して、抗体を産生するために規模拡大することができる。組換え抗体は、これらの培養上清および/または細胞から単離および精製することができる。

【0124】

代替として、これらのクローン化抗体遺伝子は、大腸菌等の他の発現系または完全な生物中で発現させるか、合成的に発現させることができる。

【0125】

無傷の抗体を発現させるための部分抗体配列の使用

抗体は、主に6つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域(CDR)の中に位置するアミノ酸残基を通して、標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも個々の抗体間で多様である。CDRの配列は、大部分の抗体-抗原相互作用を担うので、異なる性質を伴う異なる抗体由来のフレームワーク配列上に移植される特異的な自然発生する抗体由来のCDRの配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的な自然発生する抗体の性質を模倣する、組換え抗体を発現することが可能である(例えば、Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327、Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525、およびQueen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033を参照されたい)。そのようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む、公開DNAデータベースから得ることができる。これらの生殖系列配列は、B細胞成熟中にV(D)J連結によって形成される完全に組み立てられた可変遺伝子を含まないため、成熟抗体遺伝子配列とは異なる。生殖細胞遺伝子配列はまた、可変領域全体にわたって、それぞれにおいて高親和性二次レパートリー抗体の配列と均一に異なる。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部分では比較的頻度が少ない。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部分およびフレームワーク領域4のカルボキシ末端部分では比較的頻度が少ない。さらに、多くの体細胞変異は、抗体の結合性を有意には変化させない。このため、元の抗体に類似する結合特性を有する無傷の組換え抗体を再作成するために、特定の抗体の全DNA配列を得る必要はない(1999年3月12日に出願のPCT/US99/05535号を参照されたい)。一般的に、この目的には、CDR領域に及ぶ部分的な重鎖および軽鎖の配列で十分である。この部分的な配列を使用して、どの生

10

20

30

40

50

殖系列の可変および連結遺伝子セグメントが組換え抗体可変遺伝子に寄与したのかを決定する。次いで、生殖系列配列を使用して、可変領域の喪失部分を埋める。重鎖および軽鎖のリーダー配列は、タンパク質成熟中に開裂され、最終的な抗体の性質に寄与しない。喪失配列を加えるために、クローン化cDNA配列を、ライゲーションまたはPCR増幅によって合成オリゴヌクレオチドと組み合わせることができる。代替として、全可変領域を、一組の短い重複したオリゴヌクレオチドとして合成し、PCR増幅によって組み合わせ、完全合成の可変領域クローンを作成することができる。この過程は、特定の制限部位の除去もしくは包含、または特定のコドンの最適化等の一定の利点を有する。

【0126】

ハイブリドーマ由来の重鎖転写物および軽鎖転写物のヌクレオチド配列が、一組の重複した合成オリゴヌクレオチドを設計して、天然の配列と同一のアミノ酸コード能を伴う合成V配列を作成するために使用される。合成重鎖およびカッパ鎖配列は、以下の3つの点で天然配列と異なり得る。すなわち、オリゴヌクレオチドの合成およびPCR増幅を容易にするために、一連の繰り返しヌクレオチド塩基が中断されていること、Kozak規則に従って最適な翻訳開始部位が組み込まれていること(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870)、およびHindIII部位が翻訳開始部位の上流に操作されていること、である。

【0127】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域の双方について、最適化されたコードストランド配列および対応する非コードストランド配列を、対応する非コードオリゴヌクレオチドのほぼ中間で、30個~50個のヌクレオチドに分解する。したがって、各鎖について、オリゴヌクレオチドを、150個~400個のヌクレオチドのセグメントに及ぶ複数組の重複2本ストランドに組み立てることができる。次いで、このプールを、150個~400個のヌクレオチドのPCR増幅産物を産生するために、テンプレートとして使用する。一般的には、単一組の可変領域オリゴヌクレオチドを、2つのプールに分解して、別々に増幅させて、2つの重複PCR産物を生成する。次いで、これらの重複産物をPCR増幅によって組み合わせ、完全な可変領域を形成する。また、発現ベクター構築体の中へと容易にクローン化することができるフラグメントを生成するために、PCR増幅の際に、重鎖定常領域または軽鎖定常領域の重複フラグメント(カッパ軽鎖のBbsI部位、またはガンマ重鎖の場合はAgeI部位を含む)を含むことが望ましい場合もある。

【0128】

次いで、再構築した重鎖可変領域および軽鎖可変領域を、クローン化プロモーター配列、リーダー配列、翻訳開始配列、リーダー配列、定常領域配列、3'非翻訳配列、ポリアダニル化配列、および転写終結配列と組み合わせ、発現ベクター構築体を形成する。重鎖発現構築体および軽鎖発現構築体は、単一のベクターに組み合わせてもよく、宿主細胞に共形質移入してもよく、連続的に形質移入してもよく、または別々に形質移入し、次いで、それを融合させてどちらの鎖も発現する宿主細胞を形成してもよい。

【0129】

発現ベクターの構築で使用するためのプラスミドは、PCR増幅したV重鎖cDNA配列およびVカッパ軽鎖cDNA配列を、完全な重鎖ミニ遺伝子および軽鎖ミニ遺伝子を再構築するために使用できるように構築した。これらのプラスミドは、完全なヒトIgG₁またはIgG₄抗体を発現させるために使用することができる。本発明の完全なヒト抗体およびキメラ抗体としては、IgG₂、IgG₃、IgE、IgA、IgM、およびIgD抗体も挙げられる。類似するプラスミドを、他の重鎖アイソタイプの発現のために、またはラムダ軽鎖を含む抗体の発現のために構築することができる。

【0130】

したがって、本発明の別の態様において、本発明の抗CD27抗体の構造的特徴は、本発明の抗体の少なくとも1つの機能的性質を保持する、構造的に関連する抗CD27抗体を作成するために使用される。該機能的性質は、例えば、

(1) CD27発現細胞へのCD70の結合を少なくとも約70% (例えば、10 μg /

10

20

30

40

50

mL抗体濃度で、少なくとも約70%、または少なくとも70%)阻害すること、
 (2) 10^{-9} M以下の平衡解離定数K_dで、または代替として、 10^{+9} M⁻¹以上の平衡会合定数K_aで、ヒトCD27に結合すること、
 (3) 10 μg/mLの濃度で、CD27発現細胞の補体媒介性細胞傷害性(CDC)を少なくとも約30%誘発する(または10 μg/mLの濃度で、CD27発現細胞のCDCを少なくとも30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも40%誘発すること)、
 (4) 10 μg/mLの濃度で、CD27発現細胞の特異的ADCC媒介性溶解を少なくとも約30%誘発する(または10 μg/mLの濃度で、CD27発現細胞の特異的ADCC媒介性溶解を少なくとも30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも40%誘発すること)、
 (5) 異種移植モデルにおけるCD27発現腫瘍細胞の増殖を防止または阻害する(例えば、インビボで0.5 mgの腫瘍細胞を腹腔内接種して20日目の重症複合免疫不全症(SCID)マウスにおいて、少なくとも6日目に、腫瘍のサイズが少なくとも約50%低減すること)、
 (6) ワクチンまたは他の抗原と組み合わせた場合に、抗原特異的免疫応答を誘発または増強すること、
 (7) 特にTH1免疫応答が挙げられるが、これに限定されない、免疫応答を誘発または増強すること、
 (8) 特に特異的CD8+T細胞の数もしくは機能活性が挙げられるが、これに限定されない、T細胞の活性、またはT細胞の増殖もしくは活性化を誘発または増強すること、および/または
 (9) T細胞の増殖または活性化を低減または阻害すること、等である。一実施形態では、本発明の抗体の1つ以上のCDR領域を、既知のフレームワーク領域およびCDRと組換えにより組み合わせて、さらなる組換えにより操作された本発明の抗CD27抗体を作成することができる。重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域は、同一であるかまたは異なる抗体配列に由来することができる。抗体配列は、自然発生的な抗体の配列とすることができ、または複数の抗体のコンセンサス配列とすることができ、Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773(1991)、Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971(1993)、およびCarter et al., 国際公開公報第92/22653号を参照されたい。

【0131】

故に、別の実施形態において、本発明は、(1)重鎖のフレームワーク領域および重鎖のCDR(少なくとも1つの重鎖のCDRが、配列番号8、9、10、26、27、28、38、39、40、50、51、52、62、63、64、74、75、76、86、87、88、104、105、106で示されるCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む)と、(2)軽鎖のフレームワーク領域および軽鎖のCDR(少なくとも1つの軽鎖のCDRが、配列番号14、15、16、20、21、22、32、33、34、44、45、46、56、57、58、68、69、70、80、81、82、92、93、94、98、99、100、110、111、112で示されるCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む)と、を含み、CD27に結合する能力を保持する、抗CD27抗体を調製するための方法を提供する。抗体がCD27に結合する能力は、実施例で記述されているような、標準的な結合アッセイ(例えば、ELISAまたはFLISA)を使用して判定することができる。

【0132】

抗体の重鎖および軽鎖のCDR3ドメインが、抗原に対する抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすことは、当技術分野でよく知られている(Hallett et al., J. Immunol., 149:1605-1612(1992)、Polymenis et al., J. Immunol., 152:5318-5329(19

10

20

30

40

50

94)、Jahn et al., Immunobiol., 193:400-419 (1995)、Klimka et al., Brit. J. Cancer, 83:252-260 (2000)、Beiboer et al., J. Mol. Biol., 296:833-849 (2000)、Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915 (1998)、Barbas et al., J. Am. Chem. Soc., 116:2161-2162 (1994)、Ditzel et al., J. Immunol., 157:739-749 (1996)を参照されたい)。故に、前述のように調製される本発明の組換え抗体は、好ましくは、抗体1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5の重鎖および/または軽鎖のCDR3を含む。抗体は、さらに、抗体1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5のCDR2を含むことができる。抗体は、さらに、抗体1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5のCDR1を含むことができる。抗体は、CDRの任意の組み合わせをさらに含むことができる。

10

【0133】

故に、別の実施形態において、本発明は、(1)重鎖のフレームワーク領域、重鎖のCDR1領域、重鎖のCDR2領域、および重鎖のCDR3領域(重鎖のCDR3領域は、1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5のCDR3から選択される)と、(2)軽鎖のフレームワーク領域、軽鎖のCDR1領域、軽鎖のCDR2領域、および軽鎖のCDR3領域(軽鎖のCDR3領域は、1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5のCDR3から選択される)と、を含み、CD27に結合する、抗CD27抗体をさらに提供する。抗体は、抗体1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5の重鎖のCDR2および/または軽鎖のCDR2をさらに含んでもよい。抗体は、抗体1F5、1H8、3H12、3A10、2C2、2G9、3H8、および1G5の重鎖のCDR1および/または軽鎖のCDR1をさらに含んでもよい。

20

【0134】

改変配列を有する抗体の生成

別の実施形態において、本発明の抗CD27抗体の可変領域配列またはその一部分は、結合(すなわち、未改変抗体と同じエピトープへの)を保持し、したがって、機能的に同等である、構造的に関連する抗CD27抗体を作成するために改変される。抗原結合を除去せずに変化させることができる残基を同定するための方法は、当技術分野においてよく知られている(例えば、Marks et al. (Biotechnology (1992) 10(7):779-83 (monoclonal antibodies diversification by shuffling light chain variable regions, then heavy chain variable regions with fixed CDR3 sequence changes)、Jespers et al. (1994) Biotechnology 12(9):899-903 (selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen)、Sharon et al. (1986) PNAS USA 83(8):2628-31 (site-directed mutagenesis of an invariant amino acid residue at the variable-diversity segments junction of an antibody)、Casson et al. (1995) J. Immunol. 155(12):5647-54 (evolution of loss and change of specificity resulting from random mutagenesis of an antibody heavy chain variable region)を参照されたい)。

30

40

50

【 0 1 3 5 】

故に、本発明の一態様において、前述した操作された抗体の C D R 1、C D R 2、および/または C D R 3 領域は、本明細書で開示される抗体 1 F 5、1 H 8、3 H 1 2、3 A 1 0、2 C 2、2 G 9、3 H 8、および 1 G 5 の配列のような、正確なアミノ酸配列を含むことができる。しかしながら、本発明の他の態様において、抗体は、正確な 1 F 5、1 H 8、3 H 1 2、3 A 1 0、2 C 2、2 G 9、3 H 8、および 1 G 5 の C D R 配列由来の誘導体を含み、依然として効率的に C D 2 7 に結合する能力を保持する。そのような配列改変体は、1 つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換、例えば、前述したような保存的配列改変を含んでもよい。配列改変体はまた、抗体 1 F 5、1 H 8、3 H 1 2、3 A 1 0、2 C 2、2 G 9、3 H 8、および 1 G 5 の特定の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列について前述したコンセンサス配列に基づいてもよい。

10

【 0 1 3 6 】

故に、別の実施形態において、操作された抗体は、例えば、抗体 1 F 5、1 H 8、3 H 1 2、3 A 1 0、2 C 2、2 G 9、3 H 8、および 1 G 5 の 1 つ以上の C D R と 9 0 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 . 5 % 同一である 1 つ以上の C D R から構成されてもよい。中間から前述の値までの範囲、例えば前述の配列の 1 つ以上に対して 9 0 ~ 9 5 %、9 5 ~ 9 8 %、または 9 8 ~ 1 0 0 % の同一性である C D R も、本発明に包含することを意図している。

【 0 1 3 7 】

別の実施形態において、C D R の 1 つ以上の残基は、結合を改変して、より好ましいオンレート結合、より好ましいオフレート結合、またはその両方を達成するために変化させてもよく、よって、理想的な結合定数が達成される。この方策を使用して、例えば 10^{10} M^{-1} 以上の、非常に高い結合親和性を有する抗体を達成することができる。当技術分野で知られており、本明細書で説明される親和性成熟手法は、C D R 領域を変化させ、続いて、結果として生じた結合分子を所望の結合の変化についてスクリーニングするために使用することができる。故に、C D R が変化したときの、結合親和性および免疫原性の変化を監視してスコアリングすることができ、よって、最良に組み合わせた結合および低い免疫原性のために最適化された抗体が達成される。

20

【 0 1 3 8 】

C D R 内の改変に加えてまたはその代わりに、これらの改変が抗体の結合親和性を排除しない限り、抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のフレームワーク領域 F R 1、F R 2、F R 3、および F R 4 のうちの 1 つ以上において改変を行うこともできる。例えば、本発明の抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のフレームワーク領域の中の 1 つ以上の非生殖系列アミノ酸残基が、生殖系列アミノ酸残基（すなわち、抗体が有意な配列同一性を有する、重鎖可変領域または軽鎖可変領域のヒト生殖系列配列の中の対応するアミノ酸残基）で置換される。例えば、抗体鎖は、有意な配列同一性を共有する生殖系列抗体鎖にアラインメントすることができ、抗体フレームワーク配列と生殖系列鎖のフレームワークとの間で一致しないアミノ酸残基を、生殖系列配列由来の対応する残基と置換することができる。抗体可変フレームワーク領域と、対応するヒト生殖系列配列可変フレームワーク領域との間でアミノ酸が異なるときに、アミノ酸が以下のカテゴリーのうちの 1 つに該当することが合理的に予想される場合、抗体フレームワークアミノ酸は、通常、等価なヒト生殖系列配列アミノ酸によって置換されるべきである。

30

- (1) 抗原に直接非共有結合するアミノ酸残基、
- (2) C D R 領域に隣接するアミノ酸残基、
- (3) 別の場合であれば C D R 領域と相互作用する（例えば、コンピュータモデリングによって判定したときに、C D R 領域の約 3 ~ 6 の範囲である）アミノ酸残基、または
- (4) V L - V H 界面に關与するアミノ酸残基。

40

【 0 1 3 9 】

「抗原に直接非共有結合する」残基としては、確立された化学力、例えば水素結合、ファンデルワールス力、および疎水性相互作用等に従って、抗原上のアミノ酸と直接相互作用

50

用する可能性が高いフレームワーク領域の中の適所のアミノ酸が挙げられる。故に、一実施形態において、本発明の抗体のフレームワーク領域の中のアミノ酸残基は、抗原に直接非共有結合する、対応する生殖系列アミノ酸残基で置換される。

【0140】

「CDR領域に隣接する」残基としては、抗体の一次配列の中のCDRの1つ以上に直接隣接する位置、例えば、Kabatによって定義されるようなCDR、またはChothiaによって定義されるようなCDRに直接隣接する位置のアミノ酸残基が挙げられる。(例えば、Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901 (1987)を参照されたい)。故に、一実施形態において、本発明の抗体のフレームワーク領域の中のアミノ酸残基は、CDR領域に隣接する、対応する生殖系列アミノ酸残基で置換される。

10

【0141】

「別の場合であればCDR領域と相互作用する」残基としては、二次構造分析によって、CDR領域に影響を及ぼすのに十分な空間的配向にあると判定される残基が挙げられる。そのようなアミノ酸は、概して、CDRの中のいくつかの原子の約3オングストローム単位()の範囲内に側鎖原子を有することになり、また、上記に列記したような確立された化学力に従って、CDR原子と相互作用することが可能である原子を含まなければならない。故に、一実施形態において、本発明の抗体のフレームワーク領域の中のアミノ酸残基は、別の場合であればCDR領域と相互作用する、対応する生殖系列アミノ酸残基で置換される。

20

【0142】

フレームワークの中の複数の位置のアミノ酸は、多数の抗体における(例えば、CDRと相互作用することが可能な)CDR確認の判定に重要であることが分かっている(前掲のChothia and Lesk、前掲のChothia et al.、およびTramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)。これらは全て参照により本明細書に組み込まれる)。これらの著者は、複数の既知の抗体の構造の分析によって、CDR高次構造に重要な保存されたフレームワーク残基を同定した。分析した抗体は、CDRの高次構造に基づいて、限定された数の構造的または「カノニカル」なクラスに分類した。カノニカルクラスのメンバー内の保存されたフレームワーク残基を、「カノニカル」残基と称する。カノニカル残基としては、軽鎖の残基2、25、29、30、33、48、64、71、90、94、および95、ならびに重鎖の残基24、26、29、34、54、55、71、および94が挙げられる。さらなる残基(例えば、CDR構造決定残基)は、Martin and Thornton (1996) J. Mol. Biol. 263:800の方法論に従って同定することができる。特に、軽鎖の位置2、48、64、および71、ならびに重鎖の位置26~30、71、および94のアミノ酸(Kabatによる番号付け)は、多数の抗体の中のCDRとの相互作用が可能であることが分かっている。軽鎖における位置35のアミノ酸、ならびに重鎖における位置93および103もまた、CDRと相互作用する可能性が高い。CDRの高次構造に影響を及ぼし得るさらなる残基は、Foot and Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487の方法論に従って同定することができる。そのような残基は、「バーニア」残基と称され、CDRに密接した基礎となる(すなわち、CDRの下に「プラットフォーム」を形成する)フレームワーク領域の中の残基である。

30

40

【0143】

「VL-VH界面に関与する」残基または「パッキング残基」としては、例えば、Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985)または前掲のChothia et al.によって定義されるような、VLとVHとの間の界面の残基が挙げられる。

【0144】

特定のアミノ酸が前述のカテゴリーの1つ以上に含まれるかどうかについて、いくらか不正確なこともある。そのような場合、一方がその特定の置換を有し、他方はそれを持た

50

ない、別の変異抗体が産生される。このように産生された別の変異抗体は、本明細書で説明されるアッセイのいずれかで、所望の活性について試験し、好ましい抗体を選択することができる。

【0145】

フレームワーク領域内の置換のさらなる候補は、その位置で抗体に対して通常でない、すなわち「稀な」アミノ酸である。これらのアミノ酸は、ヒト生殖系列配列の対応する位置由来の、またはより典型的な抗体の等価な位置由来のアミノ酸で置換することができる。例えば、抗体のフレームワーク領域の中のアミノ酸がその位置について稀であり、かつ生殖系列配列の中の対応するアミノ酸が免疫グロブリン配列の中のその位置について一般的であるとき、または、抗体の中のアミノ酸がその位置について稀であり、かつ他の配列と比較して、生殖系列配列の中の対応するアミノ酸も稀であるときには、置換が望ましい場合がある。通常でないアミノ酸を、抗体に典型的に発生する生殖系列配列由来のアミノ酸で置換することによって、抗体の免疫原性を低くし得ることを企図している。

10

【0146】

本明細書で使用される「稀な」という用語は、代表的な試料の配列において、配列の約20%未満、好ましくは約10%未満、より好ましくは約5%未満、さらに好ましくは約3%未満、さらに好ましくは約2%未満、さらに好ましくは約1%未満で、その位置に生じるアミノ酸を示す。本明細書で使用される「一般的な」という用語は、代表的な試料における配列の約25%を超えるが、通常約50%を超えて生じる、アミノ酸を示す。例えば、全ての軽鎖可変領域配列および重鎖可変領域配列は、それぞれ、相互に特異的に相同であり、特定の重要な位置に同じアミノ酸を有する配列の「サブグループ」に分類される（前掲の Kabat et al.）。抗体配列の中のアミノ酸が配列の中で「稀」であるか「一般的」であるかを判定するときには、しばしば、抗体配列と同じサブグループの中の配列だけを考慮することが好ましいと考えられる。

20

【0147】

概して、抗体のフレームワーク領域は、通常、それらが由来したヒト生殖系列配列のフレームワーク領域と実質的に同一であり、より通常には、同一である。当然、フレームワーク領域の中のアミノ酸の多くは、抗体の特異性または親和性にほとんどまたは全く直接的に寄与しない。したがって、フレームワーク残基の多数の個々の保存的置換は、結果として生じる免疫グロブリンの特異性または親和性の大幅な変化を伴わずに許容することができる。したがって、一実施形態において、抗体の可変フレームワーク領域は、ヒト生殖系列可変フレームワーク領域配列またはそのような配列のコンセンサスに対して少なくとも85%の配列同一性を共有する。別の実施形態において、抗体の可変フレームワーク領域は、ヒト生殖系列可変フレームワーク領域配列またはそのような配列のコンセンサスに対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を共有する。

30

【0148】

単純にCD27に結合することに加えて、抗体は、本発明の抗体の他の機能的性質のその保持のために選択されてもよい。該機能的性質は、例えば、

(1) CD27発現細胞へのCD70の結合を少なくとも約70%阻害する（例えば、完全にまたは部分的に遮断する）こと、

40

(2) 10^{-9} M以下の平衡解離定数Kdで、または代替として、 10^{-9} M⁻¹以上の平衡会合定数Kaで、ヒトCD27に結合すること、

(3) 10 µg/mLの濃度で、CD27発現細胞の補体媒介性細胞傷害性(CDC)を少なくとも約40%誘発すること、および/または

(4) 10 µg/mLの濃度で、CD27発現細胞のADCC媒介性特異的溶解を少なくとも約40%誘発すること、等である。

【0149】

CD27に対するモノクローナル抗体の特徴付け

本発明のモノクローナル抗体は、種々の既知の手法を使用して、CD27への結合につ

50

いて特徴付けることができる。一般には、抗体を、最初にELISAによって特徴付ける。簡潔に述べると、マイクロタイタープレートを、精製したPBS中のCD27で被覆し、次いで、PBSで希釈したウシ血清アルブミン(BSA)等の、無関係なタンパク質で遮断することができる。CD27で免疫化したマウス由来の血漿の希釈物を各ウェルに加えて、37で1~2時間インキュベートする。プレートをPBS/Tween20で洗浄し、次いで、37で1時間、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬とともにインキュベートする。洗浄後、プレートをABTS基質で発色させて、OD405で分析する。好ましくは、最も高い力価を生じるマウスを融合に使用する。

【0150】

前述のようなELISAアッセイを使用して、抗体についてスクリーニングし、したがって、CD27免疫原と陽性反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマについてスクリーニングすることができる。次いで、好ましくは高親和性でCD27に結合するハイブリドーマをサブクローン化し、さらに特徴付けることができる。次いで、親細胞の反応性を保持する(ELISAによる)各ハイブリドーマ由来の1つのクローンを、細胞バンクを作製するために、および抗体精製のために選択することができる。

【0151】

抗CD27抗体を精製するために、選択したハイブリドーマは、ローラーボトル、2リットルのスピナーフラスコ、または他の培養系で増殖させることができる。上清は、濾過して濃縮した後、プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)による親和性クロマトグラフィを行ってタンパク質を精製することができる。緩衝剤をPBSに交換した後、濃度は、吸光係数1.43を使用したOD₂₈₀によって、または好ましくは比濁分析によって決定することができる。IgGは、ゲル電気泳動および抗原特異的方法によって確認することができる。

【0152】

選択した抗CD27モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを判定するために、各抗体は、市販の試薬(Pierce, Rockford, IL)を使用してピオチン化することができる。ピオチン化したMAb結合は、ストレプトアビジン標識プローブで検出することができる。精製した抗体のアイソタイプを判定するために、当該分野で認識された技術を使用してアイソタイプELISAを行うことができる。例えば、マイクロタイタープレートのウェルを、4で一晩、10µg/mLの抗Igにて被覆することができる。5%のBSAで遮断した後、周囲温度で2時間、プレートを10µg/mLのモノクローナル抗体または精製したアイソタイプ対照と反応させる。次いで、ウェルを、IgG1または他のアイソタイプ特異的コンジュゲートプローブのいずれかと反応させることができる。前述のようにプレートを発色させて、分析する。

【0153】

CD27を発現する生細胞へのモノクローナル抗体の結合を試験するために、フローサイトメトリーを使用することができる。簡潔に述べると、膜結合CD27を発現する細胞株および/またはヒトPBMC(標準的な増殖条件下で増殖させたもの)を、4で1時間、0.1%のBSAを含有するPBS中で種々の濃度のモノクローナル抗体と混合する。洗浄後、細胞を、一次抗体染色と同じ条件下で、フルオレセイン標識した抗IgG抗体と反応させる。試料は、単一の細胞をゲートするための光散乱性および側方散乱性を使用したFACScan装置によって分析して、標識抗体の結合を判定することができる。フローサイトメトリーアッセイ(に加えてまたはその代わりに)、蛍光顕微鏡法を使用した代替のアッセイを使用してもよい。細胞は、前述と全く同様に染色して、蛍光顕微鏡法によって検査することができる。この方法は、個々の細胞を視覚化することが可能であるが、抗原の密度に依存して感度が低下する場合がある。

【0154】

抗CD27 IgGは、ウエスタンブロット法によって、CD27抗原との反応性についてさらに試験することができる。簡潔に述べると、CD27を発現する細胞由来の細胞

10

20

30

40

50

抽出物を調製して、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離した抗原を、ニトロセルロース膜に移し、20%のマウス血清で遮断して、試験すべきモノクローナル抗体でプローブする。IgGの結合は、抗IgGアルカリホスファターゼを使用して検出し、BCIP/NBT基質タブレット(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)で発色させることができる。

【0155】

種々の抗CD27抗体の結合親和性、交差反応性、および結合反応速度を分析するための方法としては、技術分野で知られている標準的なアッセイ、例えば、本明細書の実施例2で説明されるBiacore(商標)2000SPR計測器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用したBiacore(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析が挙げられる。

10

【0156】

II. 免疫毒素

別の実施形態において、本発明の抗体は、例えば細胞毒素、薬物、または放射性同位体等の治療部分に連結させる。細胞毒素とコンジュゲートさせた場合、これらの抗体コンジュゲートを「免疫毒素」と称する。細胞毒素または細胞毒性剤には、細胞に有害な(例えば、死滅させる)任意の薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、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センジオン、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、グルココルチコイド、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、ならびにその類似体または相同体が挙げられる。治療薬としては、代謝拮抗物質(例えば、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(例えば、メクロレタミン、チオエパ(thioepa)クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、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、ならびにcis-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(例えば、ダウノルピシン(以前は、ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前は、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))、および有糸分裂阻害剤(例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、放射性同位体(例えば、放射性ヨウ素)とコンジュゲートさせて、自己免疫疾患または炎症性疾患等の樹状突起関連の障害、または移植片対宿主疾患を治療するための細胞毒性放射性医薬を生成することができる。

20

30

【0157】

本発明の抗体コンジュゲートは、所与の生物学的応答を改変するために使用することができ、薬物部分は、古典的な化学治療薬に制限されないと解釈されたい。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。そのようなタンパク質としては、例えば、酵素活性毒素またはその活性部分(アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素等)、タンパク質(腫瘍壊死因子またはインターフェロン等)、または生物学的応答調節物質(例えば、リンホカイン、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」)、または他の成長因子等)が挙げられる。

40

【0158】

そのような治療部分を抗体とコンジュゲートするための手法はよく知られており、例えば、Arnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer The

50

rapy」, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」, in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985)、 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985)、および Thorpe et al., 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」, Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982) を参照されたい。

【0159】

III. 組成物

別の実施形態において、本発明は、組成物、例えば、担体（薬学的に許容される担体）とともに調合される、本発明のモノクローナル抗体の1つまたは組み合わせを含有する組成物を提供する。本発明の抗体を含む二重特異性分子を含有する組成物も提供する。一実施形態において、組成物は、複数の（例えば、2つ以上の）本発明の単離された抗体の組み合わせを含む。好ましくは、組成物の抗体のそれぞれは、CD27の、予め選択した異なるエピトープに結合する。

【0160】

本発明の薬学的組成物はまた、併用療法で、すなわち、他の薬剤と組み合わせで投与することもできる。例えば、併用療法は、抗炎症薬、DMARD（疾患修飾性抗リウマチ薬）、免疫抑制剤、および化学療法剤等の、少なくとも1つ以上のさらなる治療薬を伴う、本発明の組成物を含むことができる。本発明の薬学的組成物はまた、放射線療法と併せて投与することもできる。他の抗体との共投与もまた、本発明によって包含される。

【0161】

本明細書で使用される「担体」および「薬学的に許容可能な担体」という用語は、生理学的に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤等を含む。好ましくは、担体は、（例えば、注射または注入による）静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮投与に適切である。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち、抗体、二重特異性分子、および多重特異性分子は、材料を被覆して、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から該化合物を保護してもよい。

【0162】

本発明の抗体および構築体とともに使用してもよいアジュバントの例としては、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Mich.)、Merckアジュバント65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.)、AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.)、アルミニウム塩（水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウム等）、カルシウム塩、鉄塩、または亜鉛塩、アシル化チロシンの不溶性懸濁液、アシル化糖、カチオンまたはアニオン

誘導体化ポリサッカリド、ポリホスファゼン、生分解性微小球、サイトカイン（GM-CSF、インターロイキン-2、-7、-12、および他の同様の因子等）、3D-MPL、CpGオリゴヌクレオチド、およびモノホスホリル脂質A（例えば、3-デオ-アシル化モノホスホリル脂質A）が挙げられる。

【0163】

MPLアジュバントは、Corixa Corporationから入手可能である（Seattle, Wash. 例え、米国特許第4,436,727号、第4,877,611号、第4,866,034号、および第4,912,094号を参照されたい）。CpG含有オリゴヌクレオチド（CpGジヌクレオチドがメチル化されていない）がよく知られており、例えば、国際公開公報第96/02555号、国際公開公報第99/33488号、ならびに米国特許第6,008,200号および第5,856,462号で説明されている。また、例えば、Sato et al., Science 273:352, 1996によって、免疫賦活剤のDNA配列も説明されている。

10

【0164】

さらなる別のアジュバントとしては、例えば、サポニン（QS21およびQS7（Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.）を含む、QuilAまたはその誘導体等）；エスシン；ジギトニン；またはジブソフィリアもしくはケノボジキノアサポニン；Montanide ISA 720（Seppic, France）；SAF（Chiron, California, United States）；ISCOM（CSL）、MF-59（Chiron）；SBASシリーズのアジュバント（例えば、SBAS-2またはSBAS-4（SmithKline Beecham, Rixensart, Belgiumから入手可能）；Detox（Enhanzyn（商標））（Corixa, Hamilton, Mont.）；RC-529（Corixa, Hamilton, Mont.）および他のアミノアルキルグルコサミニド4-リン酸（AGP）；ポリオキシエチレンエーテルアジュバント（国際公開公報第99/52549A1号で説明されるもの等）；イミキモド[S-26308, R-837]等の合成イミダゾキノリン（Harrison, et al., Vaccine 19:1820-1826（2001））；およびレシキモド[S-28463, R-848]（Vasilakos, et al., Cellular Immunology 204:64-74, 2000）；ツカレソール等（Rhodes, J. et al., Nature 377:71-75, 1995）の、抗原提示細胞およびT細胞表面上で構成的に発現するカルボニルおよびアミンのシッフ塩基；タンパク質またはペプチドのいずれかとしてのサイトカイン、ケモカイン、および共刺激分子（例えば、炎症促進性サイトカイン（インターフェロン、GM-CSF、IL-1アルファ、IL-1ベータ、TGF-アルファ、およびTGF-ベータ等）、Th1誘発剤（インターフェロンガンマ、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、およびIL-21等）、Th2誘発剤（IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、およびIL-13、および他のケモカイン等）、および共刺激遺伝子（MCP-1、MIP-1アルファ、MIP-1ベータ、RANTES、TCA-3、CD80、CD86、およびCD40L等）を含む）；免疫賦活剤標的リガンド（CTLA-4およびL-セレクチン、アポトーシス刺激タンパク質、ならびにFas等のペプチド等）；合成脂質ベースのアジュバント（Vaxfectin（Reyes et al., Vaccine 19:3778-3786, 2001）、スクアレン、アルファ-トコフェロール、ポリソルベート80、DOPC、およびコレステロール等）；内毒素、[LPS]（Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3:23-30, 2000）；Th1誘発性サイトカインを産生するようにToll受容体を誘発するリガンド（合成マイコバクテリウムリポタンパク質、マイコバクテリウムタンパク質p19、ペプチドグリカン、テイコ酸、および脂質A等）；ならびにCT（コレラ毒素のサブユニットAおよびB）およびLT（大腸菌由来の易熱性エンテロトキシンのサブユニットAおよびB）、熱ショックタンパク質ファミリー（HSP）、およびLLO（リステリオリシンO；国際公

20

30

40

50

開公報第01/72329号)が挙げられる。これらのおよび種々のさらなるトール様受容体(TLR)作動薬は、例えばKanzler et al., Nature Medicine, May 2007, Vol. 13, No. 5で説明されている。本発明の抗CD27抗体と組み合わせて使用するための好ましい免疫賦活剤は、ポリIC等のTLR3作動薬である。

【0165】

「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、かついかなる望ましくない毒物学的影響も与えない塩を指す(例えば、Berger, S.M., et al., (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい)。そのような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、および亜リン酸等の非毒性無機酸に由来するもの、ならびに、脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、ならびに脂肪族スルホン酸および芳香族スルホン酸等の非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属由来のもの、ならびに、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等の非毒性有機アミン由来のものが挙げられる。

10

【0166】

本発明の組成物は、当技術分野で知られている種々の方法によって投与することができる。当業者に認識されるように、投与の経路および/または様式は、所望の結果に応じて変化する。活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化した送達系を含む放出制御製剤等の、化合物を迅速な放出から保護する担体とともに調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸等の、生分解性で生体適合性のポリマーを使用することができる。そのような製剤を調製するための多数の方法は、特許を受けているか、または当業者に一般に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

20

30

【0167】

一定の投与経路によって本発明の化合物を投与するために、その不活性化を防止する物質で化合物を被覆するか、または化合物と共投与することが必要になり得る。例えば、化合物は、適切な担体、例えば、リポソームまたは希釈剤中で対象に投与してもよい。許容される希釈剤としては、食塩および水性緩衝液が挙げられる。リポソームとしては、水中油中水型CGF乳濁液、ならびに従来のリポソーム(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)が挙げられる。

【0168】

担体としては、注射可能な無菌溶液または無菌分散体の即時調製のための、無菌水溶液または分散液、および無菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのそのような培地および薬剤の使用は、当技術分野で知られている。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除き、本発明の薬学的組成物中でのその使用が意図される。また、補助的な活性化合物をこの組成物に組み込むことができる。

40

【0169】

治療組成物は、一般的に、製造および貯蔵の条件下で無菌であり、かつ安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に適切な他の秩序構造として調合することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等)およびその適切な混合物を含有する、溶媒または分散媒とすることができる。適切な流動性は、例えば、レシチン等の被覆の使用、分散液の場合は必要とされる粒径

50

の維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール類（マンニトール、ソルビトール等）、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによってもたすことができる。

【0170】

無菌の注射可能な溶液は、必要とされる量の活性化化合物を上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせを伴う適切な溶媒中に組み込み、必要に応じてその後に滅菌精密濾過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、塩基性分散媒および上記に列挙される必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルの中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、その予め濾過滅菌した溶液から有効成分および任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

10

【0171】

投薬量/投薬計画は、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与してもよく、複数の分割した用量を経時的に投与してもよく、または治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例的に増加または低減させてもよい。例えば、本発明の抗体は、皮下注射もしくは筋肉内注射によって週に1回もしくは2回投与されてもよく、または皮下注射もしくは筋肉内注射によって月に1回もしくは2回投与されてもよい。

20

【0172】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で非経口組成物を調合することが特に有利である。本明細書で使用される投薬単位形態は、治療される対象の単位投薬量として適している物理的に不連続な単位を指し、各単位は、必要とされる薬学的担体と共同して所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化化合物を含有する。本発明の単位投薬形態の仕様は、(a) 活性化化合物の固有の特性および達成すべき特定の治療効果、ならびに(b) 個人の感受性を治療するためのそのような活性化化合物を調合する技術に固有の制限によって決定され、これらに直接依存する。

【0173】

薬学的に許容可能な抗酸化剤の例としては、(1) 水溶性抗酸化剤（アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、および亜硫酸ナトリウム等）、(2) 油溶性抗酸化剤（パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、プロピルガレート、および α -トコフェロール等）、および(3) 金属キレート剤（クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、およびリン酸等）、が挙げられる。

30

【0174】

治療組成物について、本発明の製剤としては、経口、鼻腔内、局所（口内および舌下を含む）、直腸、腔内、および/または非経口投与に適切な製剤が挙げられる。製剤は、好都合に単位投薬形態で提示されてもよく、薬学の分野で知られている任意の方法によって調製されてもよい。単回投薬形態を生成するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、治療されている対象および特定の投与様式に応じて変動する。単回投薬形態を生成するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、一般に、治療効果を生じる組成物の量である。一般に、100パーセントのうち、この量は、約0.001パーセント～約90パーセントの有効成分、好ましくは約0.005パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約0.01パーセント～約30パーセントの範囲となる。

40

【0175】

腔内投与に適切な本発明の製剤としては、当技術分野で知られているような担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、泡沫、または噴霧製剤が挙げられる。本発明の組成物の局所投与または経皮投与のための投薬形態としては、粉末、噴霧

50

、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入が挙げられる。活性化化合物は、無菌状態で、薬学的に許容される担体と混合し、そして必要であり得る任意の防腐剤、緩衝剤、または噴射剤と混合してもよい。

【0176】

本明細書で使用される「非経口投与」および「非経口的に投与する」という句は、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内注射および注入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

本発明の薬学的組成物で使用されてもよい適切な水性担体および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、およびその適切な混合物、オリーブ油等の植物油、ならびにオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチン等の被覆材料の使用、分散液の場合は必要とされる粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

【0178】

これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤等のアジュバントを含有してもよい。微生物の存在の予防は、前掲の滅菌手順、および例えば、パラベン、クロロブタノール、およびフェノールソルビン酸等の種々の抗菌剤および抗真菌剤の包含の両方によって確保することができる。また、糖および塩化ナトリウム等の等張剤を組成物中に含むことが望ましい場合もある。加えて、注射可能な薬学的形態の持続的吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン等の吸収を遅延させる薬剤を含むことによってもたすことができる。

【0179】

本発明の化合物を医薬としてヒトおよび動物に投与するときに、本発明の化合物は、単独で与えるか、または例えば、薬学的に許容可能な担体と組み合わせて、0.001~90%（より好ましくは、0.01~30%等の0.005~70%）の有効成分を含有する薬学的組成物として与えることができる。

【0180】

選択した投与経路に関わらず、適切な水和形態で使用されてもよい本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物は、当業者に知られている従来の方法によって薬学的に許容可能な投薬形態に調合される。

【0181】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬レベルは、患者に有毒になることなく、特定の患者に対する所望の治療応答、組成物、および投与様式を達成するのに有効である活性成分の量を得るように変化させてもよい。選択される投薬量レベルは、用いられる特定の発明の組成物、またはエステル、その塩もしくはアミド、投与経路、投与時間、用いられている特定の化合物の排泄速度、治療期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および/または材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康、および事前の病歴、ならびに医学分野でよく知られている類似する要因を含む、種々の薬物動態学的要因に依存する。当分野の通常の技術を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定して、処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物で用いられる本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルから始めて、所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることが可能である。一般に、本発明の組成物の適切な1日の用量は、治療効果を生じる最も低い用量である化合物の量となる。そのような有効用量は、一般に、前述した要因に依存する。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であることが好ましく、好ましくは、標的部位の近位に投与する。所望であれば、治療組成物の有効な1日の用量は、任意で単位投薬形態で、1日を通し

10

20

30

40

50

て適切な間隔で別々に投与される2回、3回、4回、5回、6回の、またはそれを超える副用量として投与することができる。本発明の化合物は、単独で投与することが可能であるが、本化合物は、薬学的製剤（組成物）として投与することが好ましい。

【0182】

治療組成物は、当技術分野で知られている医療デバイスで投与することができる。例えば、好ましい実施形態において、本発明の治療組成物は、米国特許第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号、または第4,596,556で開示されているデバイス等の、無針皮下注射デバイスで投与することができる。本発明において有用なよく知られているインプラントおよびモジュールの例としては、米国特許第4,487,603号（制御された速度で薬物を分注するための移植可能なマイクロ注入ポンプを開示）、米国特許第4,486,194号（皮膚を通して薬物を投与するための治療デバイスを開示）、米国特許第4,447,233号（正確な注入速度での薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示）、米国特許第4,447,224号（薬物持続送達のための移植可能な可変流量注入装置を開示）、米国特許第4,439,196号（多室区画を有する浸透性薬物送達システムを開示）、および米国特許第4,475,196号（浸透性薬物送達システムを開示）が挙げられる。数多くの他のそのようなインプラント、送達システム、およびモジュールは、当業者に知られている。

【0183】

一定の実施形態において、本発明の抗体は、インビボでの適切な分布を確保するように調合することができる。例えば、血液脳障壁（BBB）は、多数の高親水性化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBを通過することを確保するために（それを所望する場合）、該治療化合物は、例えば、リポソーム中に調合することができる。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第4,522,811号、第5,374,548号、および第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官の中に選択的に輸送される1つ以上の部分を含んでもよく、したがって、標的型薬物送達を増強する（例えば、V.V.Ranade(1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。例示的な標的部分としては、葉酸またはピオチン（例えば、Low他への米国特許第5,416,016号を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（P.G.Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140；M.Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；界面活性プロテインA受容体（Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134）、その異なる種は、本発明の製剤、ならびに本発明の分子の成分を含み得る；p120（Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）が挙げられる。また、K.Keinanen、M.L.Laukkanen(1994) FEBS Lett. 346:123；J.J.Killion、I.J.Fidler(1994) Immunomethods 4:273も参照されたい。本発明の一実施形態において、本発明の治療的な化合物は、リポソーム中に調合され、より好適な一実施形態において、リポソームは、標的部分を含む。最も好ましい実施形態において、リポソーム中の治療化合物は、ポラス注射によって腫瘍または感染の近位の部位に送達される。組成物は、容易な注射可能性が存在する程度に流動的でなければならない。組成物は、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない。細菌および真菌等の微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。

【0184】

化合物が癌を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系で評価することができる。代替として、組成物のこの性質は、化合物がそのような阻害を阻害する能力を、当業者に知られているアッセイによってインビトロで試験することによって評価することができる。治療上有効量の治療化合物は、対象における腫瘍サイズを減少させ

10

20

30

40

50

ることができるか、またはそうでなければ、症状を改善することができる。当業者は、対象のサイズ、対象の症状の重篤性、および選択した特定の組成物または投与経路等の要因に基づいて、そのような量を決定することが可能であると考えられる。

【0185】

組成物は、無菌であり、かつ組成物を注射器によって送達できる程度の流動性がなくてはならない。水に加えて、担体は、等張緩衝化生理食塩水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびその適切な混合物とすることができる。適切な流動性は、例えば、レシチン等の被覆の使用、分散液の場合は必要とされる粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール類（マンニトール、またはソルビトール等）、および塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによってもたすことができる。

10

【0186】

前述のように、活性化化合物が適切に保護されたときに、化合物は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な可食性担体とともに経口的に投与されてもよい。

【0187】

IV. 本発明の用途および方法

一実施形態において、本発明の抗体、二重特異性分子、および組成物は、種々の疾患および状態を治療および/または予防（例えば、それらに対して免疫化）するために使用することができる。

20

【0188】

治療することができる主な疾患適応症の1つは、癌である。具体的には、免疫応答を誘発または増強する抗CD27抗体を、癌の治療で使用することができる。癌の種類としては、白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯B細胞リンパ腫、真性多血症リンパ腫、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫、および癌腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫、結腸直腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系（CNS）癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮体癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌（小細胞、大細胞）、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌（例えば、口唇、舌、口、および咽頭）、卵巣癌、膀胱癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、ならびに泌尿器系の癌が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい癌としては、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、および辺縁帯B細胞リンパ腫から成る群から選択される、CD27発現腫瘍が挙げられる。

30

40

【0189】

免疫応答を誘発または増強する抗CD27抗体を使用する他の疾患適応症としては、細菌、真菌、ウイルス、および寄生虫感染性の疾患が挙げられる。免疫応答を阻害または低

50

減する抗CD27抗体を使用する他の疾患適応症としては、移植片拒絶反応、アレルギー、および自己免疫性疾患が挙げられる。

【0190】

例示的な自己免疫性疾患としては、多発性硬化症、関節リウマチ、1型糖尿病、乾癬、クローン病および潰瘍性大腸炎等の他の炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス(SLE)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症(MG)、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体による強皮症、混合性結合組織疾患、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫関連性の不妊、糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、乾癬性関節炎、インスリン抵抗性、自己免疫性糖尿病、自己免疫性肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)、自己免疫性肝炎、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、ギラン・バレー症候群、動脈硬化、ならびにアルツハイマー病が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なアレルギー性障害としては、アレルギー性結膜炎、春季結膜炎、春季角結膜炎、および巨大乳頭結膜炎；アレルギー性鼻炎および副鼻腔炎を含む鼻アレルギー性障害；耳管搔痒を含む耳性アレルギー性障害；内因性喘息および外因性喘息を含む上気道および下気道のアレルギー性障害；皮膚炎、湿疹、および蕁麻疹を含む皮膚のアレルギー性障害；ならびに胃腸管のアレルギー性障害が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0191】

別の態様において、本発明の抗体は、ワクチンと組み合わせ、ワクチン抗原、例えば、腫瘍抗原(それによって、腫瘍に対する免疫応答を増強する)、または感染性疾患病原体由来の抗原(それによって、感染性疾患病原体に対する免疫応答を増強する)に対する免疫応答を増強するために投与される。故に、この実施形態において、ワクチン抗原は、例えば、腫瘍に対する、またはウイルス、細菌、寄生虫、または真菌等の感染性疾患病原体に対する免疫応答を誘発することが可能な抗原または抗原組成物を含むことができる。1つまたは複数の抗原は、例えば、ペプチド/タンパク質、多糖類、および/または脂質とすることができる。1つまたは複数の抗原は、本明細書で以前に開示した種々の腫瘍抗原等のように、腫瘍に由来し得る。代替として、1つまたは複数の抗原は、本明細書で以前に開示した病原体抗原等のように、種々のウイルス、細菌、寄生虫、および/または真菌等の病原体に由来することができる。適切な病原体抗原のさらなる例としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0192】

ウイルス抗原または抗原決定基は、例えば、サイトメガロウイルス(特にヒト、gBまたはその誘導体等)、エプスタインバーウイルス(gp350等)、フラビウイルス(例えば、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス)、肝炎ウイルス(B型肝炎ウイルス(例えば、PreS1、PreS2およびEP-A-414374で説明されるS抗原、EP-A-0304578、およびEP-A-198474等のB型肝炎表面抗原)、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびE型肝炎ウイルス等)、HIV-1(tat、nef、gp120、またはgp160等)、ヒトヘルペスウイルス(HSV1またはHSV2由来のICP27等の、gDもしくはその誘導体、または前初期タンパク質等)、ヒト乳頭腫ウイルス(例えば、HPV6、11、16、18)、インフルエンザウイルス(生存全ウイルスもしくは不活性化ウイルス、卵もしくはMDCK細胞、またはペロ細胞の中で増殖させたスプリットインフルエンザウイルス、または全flupirozom(Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920で説明されるもの)、またはNP、NA、HA、もしくはMタンパク質等のその精製したタンパク質もしくは組換えタンパク質)、麻疹ウイルス、耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(Fタンパク質およびGタンパク質等)、ロタウイルス(生弱毒化ウイルスを含む)、天然痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス(gpI、gpII、およびIE63等)、ならびに子宮頸癌の原因とな

30

40

50

るHPVウイルス（例えば、タンパク質D担体と融合して、HPV16由来のタンパク質D-E6もしくはE7融合体を形成する、初期タンパク質E6もしくはE7、またはその組み合わせ）、またはE6またはE7のL2との組み合わせ（例えば、国際公開公報第96/26277号を参照されたい）に由来することができる。

【0193】

細菌抗原または抗原決定基は、例えば、バチルス・アンスラシス (*B. anthracis*) (例えば、ボツリヌス毒素) を含むバチルス属の種；ボルデテラ・パータシス (*B. pertussis*) (例えば、パータクチン、百日咳毒素、フィラメンテアス、血球凝集素、アデニレートシクラーゼ、フィムプリエ) を含むボルデテラ属の種；ボレリア・ブルグドフェリ (*B. burgdorferi*) (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、ボレリア・ガリニ (*B. garinii*) (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、ボレリア・アフゼリ (*B. afzelii*) (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、ボレリア・アンダーソニー (*B. andersonii*) (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、ボレリア・ヘルムシ (*B. hermsii*) を含むボレリア属の種；カンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*) (例えば、毒素、アドヘシンおよびインベイン) およびカンピロバクター・コリを含むカンピロバクター属の種；クラミジア・トラコマチス (*C. trachomatis*) (例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質)、クラミジア・ニューモニア (*C. pneumoniae*) (例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質)、クラミジア・シッタシ (*C. psittaci*) を含むクラミジア属の種；クロストリジウム・テタニ (*C. tetani*) (破傷風毒素等)、クロストリジウム・ボツリナム (*C. botulinum*) (例えば、ボツリヌス毒素)、クロストリジウム・ディフィシル (*C. difficile*) (例えば、クロストリジウム毒素AまたはB) を含むクロストリジウム属の種；コリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*) (例えば、ジフテリア毒素) を含むコリネバクテリウム属の種；エールリヒア・エクイ (*E. equi*) およびヒト顆粒球エールリヒア症の作用因子；リケッチア・リケッチ (*R. rickettsii*) などのリケッチア属の種；エンテロコッカス・ファカリス (*E. faecalis*)、エンテロコッカス・ファシウム (*E. faecium*) などのエンテロコッカス属の種；腸毒性大腸菌 (例えば、コロニー形成因子、熱不安定毒素もしくはその誘導体、または熱安定毒素)、腸管出血性大腸菌、病原性大腸菌 (例えば、志賀毒素様毒素) を含むエシェリシア属の種；B型インフルエンザ菌 (例えば、PRP)、非分類性インフルエンザ菌、例えば、OMP26、高分子量アドヘシン、P5、P6、タンパク質Dおよびリポタンパク質D、ならびにフィンブリンおよびフィンブリン由来ペプチド (米国特許第5,843,464号を参照されたい) を含むヘモフィルス属の種；ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) (例えば、ウレアーゼ、カタラーゼ、空胞化毒素) を含むヘリコバクター属の種；シュードモナス・エルギノーサ (*P. aeruginosa*) を含むシュードモナス属の種；レジオネラ・ニューモフィラ (*L. pneumophila*) を含むレジオネラ属の種；レプトスピラ・インテロガンズ (*L. interrogans*) を含むレプトスピラ属の種；リステリア・モノサイトジェニス (*L. monocytogenes*) を含むリステリア属の種；モラクセラ・カタラリス (*M. catarrhalis*) (ブランハメラ・カタラリス (*Branhamella catarrhalis*) としても知られる) を含むモラクセラ属の種 (例えば、高分子量および低分子量アドヘシンおよびインベイン)；モレクセラ・カタラリス (*Moraxella Catarrhalis*) (その外膜小胞、およびOMP106 (例えば、国際公開公報第97/41731号を参照されたい) を含む)；マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*M. tuberculosis*) (例えば、ESAT6、85A、-Bもしくは-C抗原)、マイコバクテリウム・ボビス (*M. bovis*)、マイコバクテリウム・レプラ (*M. leprae*)、マイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*)、マイコバクテリウム・パラツベルクロシス (*M. paratuberculosis*)、マイコバクテリウム・スメングマティス (*M. smegmatis*) を含むマイコバクテリウム属の種；ナ

10

20

30

40

50

イセリア・ゴノレア (*N. gonorrhoea*) およびナイセリア・メニンギティディス (*N. meningitidis*) を含むナイセリア属の種 (例えば、莢膜多糖類およびそのコンジュゲート、トランスフェリン結合タンパク質、ラクトフェリン結合タンパク質、PilC、アドヘシン); ナイセリア・メニンギティディス B (*Neisseria meningitidis B*) (その外膜小胞、および *NspA* (例えば、国際公開公報第 96/29412 号を参照されたい) を含む); サルモネラ・ティフィ (*S. typhi*)、サルモネラ・パラティフィ (*S. paratyphi*)、サルモネラ・コレラシス (*S. choleraesuis*)、サルモネラ・エンテリティディス (*S. enteritidis*) を含むサルモネラ属の種; シゲラ・ソネイ (*S. sonnei*)、シゲラ・ディセンテリエ (*S. dysenteriae*)、シゲラ・フレクスネリ (*S. flexnerii*) などのシゲラ属の種; スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*S. epidermidis*) を含むスタフィロコッカス属の種; ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) (例えば、莢膜多糖類およびそのコンジュゲート、*PsaA*、*PspA*、ストレプトリジン、コリン結合タンパク質) およびタンパク質抗原ニューモリシン (*Biochem Biophys Acta*, 1989, 67, 1007, Rubins et al., *Microbial Pathogenesis*, 25, 337-342)、ならびにその変異無毒化誘導体 (例えば、国際公開公報第 90/06951 号、国際公開公報第 99/03884 号を参照されたい) を含むストレプトコッカス属の種; トレポネーマ・パリダム (*T. pallidum*) (例えば、外膜タンパク質)、トレポネーマ・デンティコラ (*T. denticola*)、トレポネーマ・ハイオディセンテリー (*T. hydysenteriae*) を含むトレポネーマ属の種; ビブリオ・コレラ (*V. cholera*) (例えば、コレラ毒素) を含むビブリオ属の種; ならびにエルシニア・エンテロコリティカ (*Y. enterocolitica*) (例えば、*Yop* タンパク質)、エルシニア・ペスティス (*Y. pestis*)、エルシニア・シュードツベルクロシス (*Y. pseudotuberculosis*) などのエルシニア属の種、に由来することができる。

【0194】

寄生虫/真菌抗原または抗原決定基は、例えば、バベシア・ミクロチ (*B. microti*) を含むバベシア属の種、カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*) を含むカンジダ属の種、クリプトコッカス・ネオフォーマンス (*C. neoformans*) を含むクリプトコッカス属の種、エントアメーバ・ヒストリティカ (*E. histolytica*) を含むエントアメーバ属の種、ジアルジア・ランブリア (*G. lamblia*) を含むジアルジア属の種、レーシュマニア・メジャー (*L. major*) を含むレーシュマニア属の種、プラスモディウム・ファルシパラム (*Plasmodium falciparum*) (*MSP1*、*AMA1*、*MSP3*、*EBA*、*GLURP*、*RAP1*、*RAP2*、*Sequestrin*、*PfEMP1*、*Pf332*、*LSA1*、*LSA3*、*STARP*、*SALSA*、*PfEXP1*、*Pfs25*、*Pfs28*、*PFS27/25*、*Pfs16*、*Pfs48/45*、*Pfs230*、およびプラスモディウム属の種におけるそれらの類似体)、ニューモシステイス・カリニ (*P. carinii*) を含むニューモシステイス属の種、 Manson 住血吸虫 (*S. mansoni*) を含むシストゾーマ属の種、トリコモナス・バギナリス (*T. vaginalis*) を含むトリコモナス属の種、トキソプラズマ・ゴンジ (*T. gondii*) (例えば、*SAG2*、*SAG3*、*Tg34*) を含むトキソプラズマ属の種、トリパノソーマ・クルージ (*T. cruzi*) を含むトリパノソーマ属の種、に由来することができる。

【0195】

本発明のこの態様によれば、抗原および抗原決定基は、数多くの異なる形態で使用されることが認識される。例えば、抗原または抗原決定基は、(例えば、いわゆる「サブユニットワクチン」の形態で) 単離されたタンパク質またはペプチドとして、または、例えば、(例えば、生きたまたは殺傷された病原体株において) 細胞関連もしくはウイルス関連

10

20

30

40

50

抗原または抗原決定基として存在することができる。生存病原菌は、好ましくは、既知の様式で弱毒化される。代替として、抗原または抗原決定基は、抗原または抗原決定基をポリヌクレオチドでコードすること（いわゆる、「DNAワクチン接種」）によって、対象においてインサイツで生成されてもよい。ただし、この手法とともに使用することができるポリヌクレオチドは、DNAに限定されず、前述のようにRNAおよび改変ポリヌクレオチドを含んでもよいことが理解されるであろう。

【0196】

一実施形態において、ワクチン抗原はまた、例えば、特定の細胞型または特定の組織を標的とすることもできる。例えば、ワクチン抗原は、例えば国際公開公報第2009/061996号（Cellidex Therapeutics, Inc）で論じられるようなDEC-205、または例えば国際公開公報第03040169号（Medarex, Inc.）で論じられるようなマンノース受容体（CD206）等の、抗原提示細胞（APC）表面受容体を標的とする抗体等の薬剤を使用して、APCを標的とすることができる。

10

【0197】

治療で使用するために、本発明の抗体は、単独で、または免疫賦活剤、ワクチン、化学療法、もしくは放射線療法等の他の治療とともに、直接（すなわち、インピボで）対象に投与することができる。全ての場合において、抗体、二重特異性抗体、組成物、および免疫賦活性薬剤、ならびに他の治療は、それらの所望の治療効果を及ぼすための有効量で投与される。「有効量」という用語は、所望の生物学的効果を実現するのに必要であるか、または十分な量を指す。例えば、有効量は、腫瘍、癌、または細菌、ウイルス、もしくは真菌の感染を排除するのに必要な量であり得る。いかなる特定の適用に対する有効量も、治療されている疾患もしくは状態、投与されている特定の抗体、対象のサイズ、または疾患もしくは状態の重篤性等の要因に応じて変化させることができる。当業者は、過度の実験を必要とせず特定の分子の有効量を経験的に決定することができる。

20

【0198】

ワクチンの好ましい投与経路としては、例えば、注射（例えば、皮下、静脈内、非経口、腹腔内、髄腔内）が挙げられる。注射は、ポラス注入または持続注入とすることができる。投与の他の経路としては、経口投与が挙げられる。

【0199】

本発明の抗体および二重特異性分子はまた、アジュバントおよび他の治療薬と共投与することもできる。本明細書で使用される「共投与される」という用語は、投与計画の一部としての投与を含む、アジュバントおよび他の薬剤を伴う本発明の抗体およびコンジュゲートの一部または全部の同時の投与、別々の投与、または連続的な投与を含むことが認識される。抗体は、一般的に、単独で、またはそのような薬剤と組み合わせて担体中に調合される。そのような担体の例としては、溶液、溶媒、分散媒、遅延剤、乳濁液等が挙げられる。薬学的活性物質に対するそのような媒体の使用は、当技術分野でよく知られている。分子との使用に適切ないかなる他の従来のも、本発明の範囲内に含まれる。

30

【0200】

抗体、コンジュゲート、二重特異体、および組成物との共投与のための適切な薬剤としては、他の抗体、細胞毒素、および/または薬物、ならびにアジュバント、免疫賦活性剤、および/または免疫抑制剤が挙げられる。一実施形態において、薬剤は、化学療法剤である。抗体、二重特異体、および組成物は、放射線と組み合わせて投与することができる。

40

【0201】

腫瘍の治療における本発明の抗体およびコンジュゲートとの共投与に適切な化学療法剤としては、例えば、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、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センジオン、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、

50

グルココルチコイド、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、ならびにその類似体または相同体が挙げられる。さらなる薬剤としては、例えば、代謝拮抗剤（例えば、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（例えば、メクロレタミン、チオエバクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、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、ならびにシス-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（例えば、ダウノルピシン（以前はダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、ならびにアントラマイシン（AMC））、および有糸分裂阻害剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）、ならびにテモゾロミドが挙げられる。

10

【0202】

また、例えば、免疫細胞（例えば、調節性T細胞、NK細胞、マクロファージ、骨髄由来サプレッサー細胞、未成熟または抑制性樹状細胞）または腫瘍もしくは腫瘍の局所微小環境中の宿主細胞によって産生される抑制因子（例えば、TGFベータ、インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ-IDO）による免疫抑制活性を欠失または阻害する薬剤が、本発明の抗体およびコンジュゲートとともに投与されてもよい。そのような薬剤としては、抗体および小分子薬物（1メチルトリプトファンまたは誘導体等のIDO阻害剤等）が挙げられる。

20

【0203】

そのような免疫障害を治療するための本発明の抗体との共投与に適切な薬剤としては、例えば、ラパマイシン、シクロスポリン、およびFK506等の免疫抑制剤、エタネルセプト、アダリムマブ、およびインフリキシマブ等の抗TNF α 剤、ならびにステロイドが挙げられる。特異的天然ステロイドおよび合成ステロイドの例としては、例えば、アルドステロン、ベクロメタゾン、ベータメタゾン、ブデソニド、クロブレドノール、コルチゾン、コルチバゾール、デオキシコルチゾン、デソニド、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフルオロコルトロン、フルクロロロン、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノロン、フルオシノニド、フルオコルチンブチル、フルオロコルチゾン、フルオロコルトロン、フルオロメトロン、フルランドレノロン、フルチカゾン、ハルシノニド、ヒドロコルチゾン、イコメタゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾン、パラメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾン、チキソコルトール、およびトリアムシノロンが挙げられる。

30

【0204】

免疫応答を誘発または増強するための本発明の抗体および二重特異体との共投与に適切な薬剤としては、例えば、アジュバントおよび/または免疫賦活剤が挙げられ、その限定的でない例が、上文に開示されている。好ましい免疫賦活剤は、ポリIC等のTLR3作動薬である。

【0205】

本発明を以下の実施例によってさらに例証するが、これらの実施例を、本発明をさらに限定するものとして解釈すべきではない。本出願の全体を通して引用される配列表、図面、ならびに全ての参考文献、特許および特許出願公開の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

40

【実施例】

【0206】

実施例 1

CD27特異的ヒトモノクローナル抗体の生成

ヒト抗CD27モノクローナル抗体は、HuMAb（登録商標）トランスジェニックマウス（「HuMAb」は、Medarex, Inc., Princeton, New Jerseyの商標である）のHC2/KC07株を、可溶性ヒトCD27抗原で免疫化することによって生成した。HC2/KC07 HuMAbマウスを、米国特許第5,77

50

0, 429号および同第5, 545, 806号(その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)で説明されるように作製した。

【0207】

抗原および免疫化：抗原は、抗体Fcドメイン(組換えヒトCD27-Fcキメラタンパク質(R&D Systems))と融合させたCD27細胞外ドメインを含む、可溶性融合タンパク質であった。抗原を、最初の免疫化のために、完全フロイント(Sigma)アジュバントと混合した。その後、抗原を、不完全フロイント(Sigma)と混合した。さらなるマウスを、RIBI MPLプラスTDMアジュバント系(Sigma)中の可溶性CD27タンパク質で免疫化した。PBS中の5~25マイクログラムの可溶性組換えCD27抗原、またはPBS中のヒトCD27の表面発現のために形質移入した 5×10^6 個のCHO細胞を、アジュバントと1:1で混合した。100マイクロリットルの調製した抗原を14日毎にマウスの腹腔内に注射した。融合の3~4日前に、10マイクログラムの可溶性組換えCD27抗原を、抗CD27力価を生じた動物に静脈内注射した。マウスの脾臓を採取し、単離した脾細胞をハイブリドーマの調製に使用した。

10

【0208】

ハイブリドーマの調製：P3x63Ag8.653マウス骨髄腫細胞株(ATCC CRL1580)を融合に使用した。10%のFBSを含有するRPMI1640(Invitrogen)を使用して、骨髄腫細胞を培養した。追加の培地用サプリメントをハイブリドーマ増殖培地に加えた。この培地は、3%のOrigon-ハイブリドーマクロニング因子(Igen)、10%のFBS(Sigma)、L-グルタミン(Gibco)、0.1%のゲンタマイシン(Gibco)、2-メルカプトエタノール(Gibco)、HAT(Sigma; 1.0×10^{-4} Mのヒポキサンチン、 4.0×10^{-7} Mのアミノプテリン、 1.6×10^{-5} Mのチミジン)、またはHT(Sigma; 1.0×10^{-4} Mのヒポキサンチン、 1.6×10^{-5} Mのチミジン)培地を含むものであった。

20

【0209】

脾臓細胞を、6:1の比率でP3x63Ag8.653骨髄腫細胞と混合し、遠心分離によってペレット化した。融合を促進するために、慎重に混合しながらポリエチレングリコールを滴下した。ハイブリドーマを、目に見えるコロニーが確立されるまで、1~2週間増殖させた。上清を採取し、ヒトカップ鎖特異的捕捉を使用したELISAおよびヒトFc特異的検出を介したヒトIgGの初期スクリーニングに使用した。次いで、IgG陽性上清を、抗CD27を検出するために、フローサイトメトリーを介してまたはELISAを使用して、CD27の特異性についてアッセイした。

30

【0210】

特異的ヒトモノクローナル抗体(ヒトmAb; IgG)を産生するハイブリドーマを、サブクローン化して拡大した。次いで、産生したヒトmAbを、標準的な条件に従って、プロテインAカラムクロマトグラフィによって精製し、特に関心の、いくつかの抗体の単離をもたらした。これらの抗体は、4B7-1B3(本明細書では、4B7とも称される)、3H12-1C8(本明細書では、3H12とも称される)、1F5-1H5(本明細書では、1F5とも称される)、2C2-1A10(本明細書では、2C2とも称される)、2G9-1D11(本明細書では、2G9とも称される)、1H8-B4(本明細書では、1H8とも称される)、3H12-1E12(本明細書では、3H12とも称される)、3G1-1A11(本明細書では、3G1とも称される)(1B10)、4A2-B11(本明細書では、4A2とも称される)、3A10-G10(本明細書では、3A10とも称される)、2G11-B5(本明細書では、2G11とも称される)、4H11-G11(本明細書では、4H11とも称される)、2H3-E8(本明細書では、2H3とも称される)、4A7-B3(本明細書では、4A7とも称される)、3H8-1B11(本明細書では、3H8とも称される)および1G5-1B9(本明細書では、1G5とも称される)と命名した。

40

【0211】

また、ハイブリドーマを、アカゲザルマカクCD27との交差反応性についてスクリー

50

ニングしたが、全て、結合について陽性であった。

【0212】

実施例2

表面プラズモン共鳴 (SPR) によるヒトmAb親和定数および速度定数の決定

実施例1由来の種々のヒト抗CD27抗体の結合親和性および結合反応速度を、製造者のガイドラインに従って、Biacore (商標) 2000 SPR計測器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を使用して、Biacore (商標) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によって検査した。

【0213】

精製した組換えヒトCD27/TNFRSF7/Fcキメラ (R&D Systems カタログ番号: 382-CD) のタンパク質を、製造者のガイドラインに従ってBiacoreによって提供されるAmine Coupling Kit (BIAcore製品番号BR-1000-50、カップリング試薬のN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) を含む) による標準的なアミンカップリング化学を使用して、Biacore (商標) CM5 センサチップ (金の表面に共有結合させたカルボキシメチル化デキストラン; Biacore製品番号BR-1000-14) に共有結合的に連結させた。低レベルのリガンドを固定して、観察される R_{MAX} がほぼ100~400RU程度であるように、動態パラメータに対する分析物の任意の物質移動効果を制限した。

【0214】

HBS-EP緩衝液 (HBS-EP緩衝液、Biacore製品番号BR-1001-88:4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES) 0.01M、塩化ナトリウム0.15M、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 3mM、界面活性剤P20 0.005%) 中のセンサチップ上に、180秒間、1.56~50nMの範囲の濃度および30 μ L/分の流量で抗体を流すことによって、結合を測定した。抗原-抗体の会合速度および解離速度を480秒間、またはより遅い解離速度を伴う抗体については1200秒間、追跡した。

【0215】

それぞれの場合において、「バックグラウンド」の減算のためにいかなるタンパク質も固定化していないブランクフローセルを使用して、対応する対照を行った。研究の全体を通じた再生条件として、10秒間50 μ L/分での10mMのHCl、その後の30秒間50 μ L/分での10mMのグリシン (pH2.0) の連続注入を用いた。

【0216】

それぞれの場合において、Biacore BIAevaluationソフトウェア、バージョン3.2 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を使用して、HBS-EPランニング緩衝剤で希釈した検体の濃度系列から動態パラメータを導いた。製造者のガイドラインに従って、Biacore (商標) BIAevaluationソフトウェア (Biacore AB) を使用して、会合および解離曲線を1:1ラングミュア結合モデルに当てはめた。

【0217】

判定した親和性パラメータおよび動態パラメータ (バックグラウンドの減算を伴う) を図1に示す。

【0218】

各抗体について、示される図は、それぞれの場合において別々に調製したフローセルを使用した、2つの別々の一連の実験の平均である (k_a = 会合速度定数、 k_d = 解離速度定数、 K_D = 解離平衡定数 (親和性の測定)、 K_A = 会合平衡定数、 R_{max} = 最大SPR応答シグナル)。

【0219】

実施例3

CD27に対するヒトmAb結合特性を判定するためのELISAアッセイ

マイクロタイタープレートを、PBS中の可溶性または組換えヒトもしくはマカクCD27で被覆し、次いで、PBS中の5%のウシ血清アルブミンで遮断した。プロテインA精製したヒトmAbおよびアイソタイプ対照を、飽和濃度で加え、37℃でインキュベートした。プレートを、PBS/Tweenで洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼとコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬とともに37℃でインキュベートした。洗浄後、プレートを、pNPP基質(1mg/mL)で発色させて、マイクロタイタープレートリーダーを使用してOD405-650で分析した。代表的な結合曲線を図2に示す。この結果を使用して、下記表1に示されるように、50%飽和濃度(4パラメータ適合曲線のC値)も推定した。

【0220】

カニクイザルマカクが抗CD27mAbを試験するための適切なモデルであることを確立するために、種々の濃度の精製したマカクCD27またはヒトCD27を、抗Flag抗体を用いてELISAプレートに捕捉し、続いて、抗ヒトCD27mAbとともにインキュベーションした。ヤギ抗ヒトIgG Fc-HRP抗体および基質Super Blue TMBを、検出のために使用した。結果を表1に示すが、結果は、マカクおよびヒト由来のCD27への類似した結合を示している。抗体1F5の代表的な結合曲線を図3に示す。

【0221】

(表1) 選択した抗CD27mAbの特徴付け

mAb	ヒトCD27に対する 最大半量の 結合(M)**	ヒトCD27に対する 最大半量の 結合($\mu\text{g/ml}$)**	サルCD27に対する 最大半量の 結合($\mu\text{g/ml}$)**
1G5	4.9E-10	0.074	0.065
1H8	4.3E-10	0.064	0.105
3H12	5.7E-10	0.085	0.123
3H8	4.6E-10	0.069	0.065
2G9	4.3E-10	0.064	0.069
1F5	3.9E-10	0.059	0.12
3A10	6.3E-10	0.094	結合なし
2C2	3.0E-10	0.045	0.034

** ELISA形式で、CD27を被覆したプレートへの結合によって算定した。

【0222】

さらなる実験において、末梢血液細胞に対する1F5結合の類似した分布を確立するために、PBMCを、3人のヒトおよび3匹のカニクイザルマカクの全血から単離した。細胞を、マーカーとともに1F5 mAbで染色して、CD27を発現する主なT細胞およびB細胞集団を描写した。以下の表(表2)は、細胞発現CD27の割合(%)および発現強度(MFI)に関してヒト細胞およびマカク細胞の結果の平均±標準誤差を要約する。これらのデータは、ヒトおよびサル由来の末梢血液細胞に対する1F5結合の類似した分布を確立する。

【0223】

(表2)

分析	CD4+ T細胞		CD8+ T細胞		B細胞(CD20+)		NK細胞	
	ヒト	サル	ヒト	サル	ヒト	サル	ヒト	サル
% CD27 ^b	84±5	81±1	70±12	90±1	37±4	15±1	11±4	88±6
MFI ^c	1517±123	416±14	1415±153	519±11	893±101	491±113	667±28	1050±42

【0224】

実施例4

4A: ELISAによるsCD70の結合の遮断

10

20

30

40

50

可溶性CD70 (sCD70) のCD27タンパク質への結合に対する実施例1によるヒトmAbの影響を、ELISAによって測定した。マイクロタイタープレートを、1 µg/mLの可溶性組換えヒトCD27および1 µg/mLのFcキメラ (R&D Systems) で被覆し、次いで、5%のPBAで遮断した。抗CD27抗体 ([最終] = 25 µg/mL) を、可溶性ヒト組換えCD70 - ビオチン (US Biologicals) ([最終] = 0.5 µg/mL) と事前に混合して、プレートに加えた。CD27捕捉rCD70を、ストレプトアビジン - HRPおよび基質Super Blue TMBで検出した。示される対照とともに結果 (遮断割合 (%)) で示される) を図4に示す。これらの結果は、抗体のいくつか (1F5、1H8、3H12、および1A4を含む) が、sCD70の結合を遮断するか、または少なくとも有意に阻害する性質を有したことを示している。

10

【0225】

4B: CD27 mAbは、ヒトリンパ芽球様細胞株上のCD27に結合して、リガンド (CD70) の結合を遮断する

ヒトリンパ芽球様細胞株への抗ヒトCD27 mAb 1F5の結合と、sCD70の結合の遮断とを、Becton Dickinson FACSCanto IIフローサイトメーターを使用して、フローサイトメトリーによって分析した。図5に示される結果は、1F5が種々の細胞株と効果的に結合して、sCD70の結合を、競合的に阻害することを示す。

【0226】

20

実施例5

ヒトCD27を発現する細胞へのヒトmAbの結合

抗CD27ヒトmAbがヒトCD27を発現する細胞上でそれらの表面でCD27に結合する能力を、以下のようにフローサイトメトリーによって調査した。

【0227】

抗体は、ヒトCD27を発現するヒト細胞株へ、それらの表面での結合について試験した。プロテインA精製したヒトmAb 2C2、3H8、および1F5を、4 で、ヒトCD27を発現するJurkat細胞、Raji細胞、Ramos細胞、およびDaudi細胞、ならびに対照細胞とともにインキュベートした。全ての抗体は、飽和濃度で使用した。1時間後、細胞を0.1%のBSAおよび0.05%のNaN₃ (PBA) を含有するPBSで洗浄し、結合した抗体を、4 で、PEで標識したヤギ抗ヒトIgG Fc特異的プローブとともに細胞をインキュベートすることによって検出した。過剰なプローブを細胞からPBAで洗浄し、細胞関連蛍光を、製造業者の指示に従って、LSR (商標) 計測器 (BD Biosciences, NJ, USA) を使用した分析によって判定した。

30

【0228】

図6および図7に示されるように、ヒトmAbが、ヒトCD27を発現する細胞に高レベルで結合することを実証した。これらのデータは、これらの抗体が、対照細胞と比較して、生細胞上で発現するヒトCD27に効率的かつ特異的に結合することを実証している。

【0229】

40

実施例6

ELISAによって判定されるヒトmAbの交差遮断/競合

マイクロタイタープレートを、組換えヒトCD27 - Fcキメラ融合タンパク質で被覆し、次いで、PBS中の5%のBSAで遮断した。非コンジュゲートヒトmAb (20 µg/mL) を西洋わさびペルオキシダーゼで標識した二次抗体 (0.5 µg/mL) と混合し、次いで、プレートに加えて、37 でインキュベートした。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、TMB基質で発色させて、マイクロタイタープレートリーダーを使用してOD450で分析した。図8~10に示される結果は、第1のヒトmAb組 (mAb 1F5、1H8、および3H12を含む) が相互に交差競合したことを示し (図8を参照されたい)、さらなるヒトmAb組 (mAb 2C2、3H8、1G5、および2G9

50

を含む)も相互に交差競合したことを示し(図9を参照されたい)、また、ヒトmAb 3A10は、固有のエピトープに結合するが、mAb 1F5、1H8、および3H12がCD27への3A10の結合を部分的に交差遮断することが可能であるので、これらの抗体の結合部位とは異なる部位であるが、可能性としてその近くに結合し得ることを示している(図10を参照されたい)。

【0230】

実施例7

補体依存性細胞介在性細胞傷害性(CDCCまたはCDC)

標的細胞(リンパ腫Raji細胞)を、150 μ Lの最終体積で、抗CD27抗体およびウサギ補体(1:15の最終希釈割合)の存在下で、37 $^{\circ}$ C、5%のCO₂で1~2時間(AIM-V培地中で)培養した。同様に、漏出シグナル(標的のみ)および最大シグナル(4%の最終濃度に対して12%のLysol(商標)洗浄剤を伴う標的)を伴う適切な対照も含めた。細胞を、1 \times 10⁶個/mLに調整し、(50,000個/ウェルの細胞を得るように)50 μ Lを各ウェルに加えた。次いで、ウェルを再懸濁し、100 μ Lの細胞懸濁液を不透明な白色のプレートに移した。これらのウェルのそれぞれに対して、100 μ LのPromega CellTiter Glo試薬を加え、プレートを室温で2分間混合した。プレートを、10分間インキュベートして、発光シグナルを安定させた。発光を、Perkin Elmer Victor X4プレートリーダー上で記録した。細胞傷害性を、次式で判定した。(100 - ((試料 - 最大) / (漏出 - 最大))) \times 100。結果(溶解%で示す)を図11に示す。この結果から、数多くの抗CD27抗体がかなりのCDCC活性を示したことが分かる。

【0231】

さらなる実験では、標的細胞(Ramos細胞)を洗浄して、Calcein AM(Molecular Probes)を充填した。次いで、充填された細胞を、再度洗浄し、培養培地(RPMI+10%のFBS)中で1 \times 10⁶個/mLに再懸濁した。標的細胞を、150 μ Lの最終体積で、抗CD27抗体およびウサギ補体(1:15の最終希釈割合)の存在下で、37 $^{\circ}$ C、5%のCO₂で2時間培養した。漏出シグナル(標的のみ)および最大シグナル(2%の最終濃度に対して20%のTriton X-100を伴う標的)を伴う適切な対照も含めた。インキュベーションに続いて、ウェルから75 μ Lの上清を、不透明な黒色のプレートに移した。蛍光(Ex:485、Em:535)を、Perkin Elmer Victor X4プレートリーダー上で記録した。特異的細胞傷害性を、次式を使用して判定した。(実験 - 自発的溶解) / (最大溶解 - 自発的溶解) \times 100。図12に示される結果は、抗CD27mAb(1F5)が、3 μ g/mLの抗体濃度で、Ramos細胞において少なくとも10%、CDCC活性を示したことを示している。

【0232】

実施例8

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)

標的細胞(リンパ腫Raji細胞)を洗浄して、BATDA試薬(Perkin Elmer)を充填した。次いで、充填された細胞を、再度洗浄し、培養培地(RPMI+10%のFBS)中で2 \times 10⁵個/mLに再懸濁した。エフェクター細胞を、エフェクターと標的との所望の比率(100:1~50:1)を得るように、培養培地中で適切な濃度に調製および調整した。丸底プレートにおいて、150 μ Lの最終体積で、標的細胞、エフェクター細胞、および抗体を加えた。漏出シグナル(標的のみ)、自発的溶解シグナル(標的+エフェクター)、および最大溶解シグナル(4%の最終濃度に対して12%の標的+Lysol(商標)洗浄剤を伴う標的)を含む、適切な対照を使用した。細胞を、プレート中でペレット化して、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で2時間インキュベートした。インキュベーションに続いて、ウェルから20 μ Lの上清を、不透明な白色のプレートに移した。これらのウェルのそれぞれに対して、200 μ LのEuropium溶液(Perkin Elmer)を加え、プレートを15分間混合した。時間分解蛍光を、Perkin

Elmer Victor X4プレートリーダー上で記録した。特異的細胞傷害性を、次式を使用して判定した。(実験 - 自発的溶解) / (最大溶解 - 自発的溶解) × 100。結果(溶解割合で示す)を図13に示す。この結果から、数多くの抗CD27抗体がかなりのADCC活性を示したことが分かる。

【0233】

さらなる実験において、標的細胞(リンパ腫Ramos細胞およびDaudi細胞)を洗浄して、Calcein AM(Molecular Probes)を充填した。次いで、充填された細胞を、再度洗浄し、培養培地(RPMI + 10%のFBS)中で1 × 10⁵個/mLに再懸濁した。エフェクター細胞を、エフェクターと標的との所望の比率(75 : 1)を得るように、培養培地中で適切な濃度に調製および調整した。丸底プレートにおいて、150 μLの最終体積で、標的細胞、エフェクター細胞、および抗体を加えた。漏出シグナル(標的のみ)、自発的溶解シグナル(標的 + エフェクター)、および最大溶解シグナル(2%の最終濃度に対して20%の標的 + Triton X-100を伴う標的)を含む、適切な対照を使用した。細胞を、プレート中でペレット化して、37、5%CO₂で4時間インキュベートした。インキュベーションに続いて、ウェルから75 μLの上清を、不透明な黒色のプレートに移した。蛍光(Ex : 485、Em : 535)を、Perkin Elmer Victor X4プレートリーダー上で記録した。特異的細胞傷害性を、次式を使用して判定した。(実験 - 自発的溶解) / (最大溶解 - 自発的溶解) × 100。図14に示される結果は、抗CD27mAb(1F5)が、3 μg/mLの抗体濃度および75 : 1のエフェクターと標的との比率で、Daudi細胞およびRamos細胞において少なくとも10%、ADCC活性(特異的細胞傷害性として測定される)を示したことを示している。

10

20

【0234】

実施例9

抗体の配列決定

実施例1において前述したように、特異的ヒトmAb IgGを産生するハイブリドーマ由来のヒトmAbをプロテインAカラムクロマトグラフィによって精製し、特に関心の抗体のパネル(ヒトmAb)を単離した。ヒトmAb 4B7、3H12、1F5、2C2、2G9、1H8、3H12、3G1(1B10)4A2、3A10、2G11、4H11、2H3、4A7、3H8、および1G5のV_HおよびV_Lコード領域を、対応するハイブリドーマ由来のRNAを使用して同定した。RNAをcDNAに逆転写し、Vコード領域をPCRによって増幅し、PCR産物を配列決定した。以下は、ヒトmAbのV_HおよびV_L領域の核酸配列およびアミノ酸配列である(アミノ酸配列の場合、相補性決定領域(CDR)に下線を引いている)。

30

【0235】

3H8 V_H (V_H 3 - 7 ; D7 - 27 ; JH2)

V_H 核酸配列(配列番号5)

atggagtggggctgagctgggttttcttctgtgctattttagaagggtgtccagtgtagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcttggtccagcctgggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcaccttagtagtattggatggcctgggtccgccaggctccagggaaaggctggagtggctgggcaatataaagcaagatggaagtgagaatactatgtggactctgtgaaggccgattcacctcctccagagacaacgccaagaactcactgtatctacaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgagggaa ctgggagtgactgtacttcgatctctggggccgtggcaccctggctactgtctctca

40

V_H アミノ酸配列(配列番号6)(下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む) :

MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYWMAWVR QAPGKGLEWLGNIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRELGMDWYFDLWGRGTLVTVSS

シグナルペプチドを除くV_H「成熟」アミノ酸配列(配列番号7) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMAWVRQAPGKGLEWLGNIKQDG
SEKYVVDVSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRELGMDWYFDLWG
RGTLVTVSS

V_H CDR1 (配列番号8): GFTFSSYW

V_H CDR2 (配列番号9): IKQDGSEK

10

V_H CDR3 (配列番号10): VRELGMDWYFDL

【 0 2 3 6 】

3 H 8 V K # 2 (V K 3 - 1 1 ; J K 1)

V_L 核酸配列 (配列番号 1 1)

Atggaagccccagctcagcttctctctctctgctactctggtccagataccaccggagaaattgtgtgacacagctctccagccac
cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctctctgagggccagtcagagtggtgacagctacttagcctgtaccaacagaaac
ctggccaggtctccaggtctctctctatgatgcacccaacagggccactggcaccagccaggttcagtgccagtggtctggga
cagacttctctcaccatcagcaacctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctccgacgttcg
gccaagggaccaaggtggaaatcaaa

20

V_L アミノ酸配列 (配列番号 1 2) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)
:

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLA^WYQQ
KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPP
TFGQGTKVEIK

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 1 3) :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLA^WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 14): QSVDSY

30

V_L CDR2 (配列番号 15): DAS

V_L CDR3 (配列番号 16): QQRSNWPP

【 0 2 3 7 】

3 H 8 V K # 3 (V K 3 - 1 1 ; J K 1)

以下のようにさらなる軽鎖が活性であることも分かった(ただし、上述の実施例では、
上述の軽鎖(3 H 8 - 1 B 1 1 V K # 2)だけを使用した):

V_L 核酸配列 (配列番号 1 7)

Atggaagccccagctcagcttctctctctctgctactctggtccagataccaccggagaaattgtgtgacacagctctccagccac
cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctctctgagggccagtcagagtggtgacagctacttagcctgtaccaacagaaac
ctggccaggtctccaggtctctctctatgatgcacccaacagggccactggcaccagccaggttcagtgccagtggtctggga
cagacttctctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgattactgtcagcagcgtagcaactggcctccgacgttcg
gccaagggaccaaggtggaaatcaaa

40

V_L アミノ酸配列 (配列番号 1 8) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)
:

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA^WYQQK
PGQAPRLLIYDASSNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF
GQGTKVEIK

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 1 9) :

50

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 20): QSVSSY

V_L CDR2 (配列番号 21): DAS

V_L CDR3 (配列番号 22): QQRSNWPPT

【 0 2 3 8 】

2 C 2 V H (V H 3 - 3 3 ; D 1 - 7 ; J H 4)

10

V_H 核酸配列 (配列番号 23)

Atggagtttgggctgagctgggtttctctgttctctttaaagaggtgtccagtgtcaggtgcaactggtggagtctgggggagggcgtg
gtccagcctgggaggtccctgcgactctctgtgcagcgtctggattcacctcagtagctatgacatacactgggtccgccaggctcc
aggcaaggggctggagtgggtggcagttatggaatgatggaagtaataaactatgcagactcctggaagggccgattcaccatc
tccagagacaattccacgaactcgtgtttctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattattgtgtggaggaaac
tctgacctgaacactgggaccagggaacctggtcaccgtctctca

V_H アミノ酸配列 (配列番号 24) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVR
QAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVY
YCVGGTADLEHWDQGLTVTVSS

20

シグナルペプチドを除く V_H アミノ酸配列 (配列番号 25) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVGGTADLEHWDQGL
TVTVSS

V_H CDR1 (配列番号 26): GFTFSSYD

V_H CDR2 (配列番号 27): IWNDGSNK

V_H CDR3 (配列番号 28): VGGTADLEHWDQ

30

【 0 2 3 9 】

2 C 2 V K (V K 1 D - 1 6 ; J K 4)

V_L 核酸配列 (配列番号 29)

Atgagggtcctcgtcagctcctgggctcctgctctgttcccagtgccagatgtgacatccagatgacctcctcctcctcctc
actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttctcgggcgagtcagggattagcagctggtagcctggatcagcagaaac
cagagaaaagcccctaaagtcctgatctatgctgcatccagtttgcaagtggggtccatcaagggtcagcggcagtgatctgggac
agattcacttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgcaacttactgccaacagtataatgattaccctctcactttcggcg
gagggaccaaggtggagatcaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 30) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ
KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLT
FGGGTKVEIK

40

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 31) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 32): QGISSW

V_L CDR2 (配列番号 33): AAS

V_L CDR3 (配列番号 34): QQYNSYPLT

【 0 2 4 0 】

1 F 5 V H (V H 3 - 3 3 ; D 7 - 2 7 ; J H 4)

10

V_H 核酸配列 (配列番号 35)

Atggagtttgggctgagctgggtttctcgtgctctttaaagaggtgccagtgccaggtgcagctggaggagctctgggggagggcgt
gggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcacctcagtagttatgacatgactgggtccgccaggtc
caggcaaggggctggagtggtggcagttatgtgtatgatggaagtaataaataactatgcagactccgtgaagggccgattcaccat
ctccagagacaattccaagaacacgctgtatctcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggt
agtggtaactgggtttcttactactggggccagggaacctggtcaccgtctctca

V_H アミノ酸配列 (配列番号 36) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWV
RQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGSGNWGFFDYWGQGLVTVSS

20

シグナルペプチドを除く V_H アミノ酸配列 (配列番号 37) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYD
GNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWG
QGLVTVSS

V_H CDR1 (配列番号 38): GFTFSSYD

V_H CDR2 (配列番号 39): IWIYDGSNK

30

V_H CDR3 (配列番号 40): ARGSGNWGFFDY

【 0 2 4 1 】

1 F 5 V K # 2 (V K 1 D - 1 6 ; J K 1)

V_L 核酸配列 (配列番号 41)

Atgagggtcctcgtcagctcctggggctcctgctgctctgttcccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctc
actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcgagtcaggggtattagcaggtggttagcctggatcagcagaaac
cagagaaagcccctaaagtcctgactatgctgcatccagttgcaaagtgggtccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggac
agatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttattactccaacagtataatactaccctcgacgttcggcc
aagggaccaaggtggaatcaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 42) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQ
KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRT
FGQGTKVEIK

40

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 43) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 44): QGISRW

V_L CDR2 (配列番号 45): AAS

V_L CDR3 (配列番号 46): QQYNTYPRT

【 0 2 4 2 】

1 H 8 V H (V H 3 - 3 3 ; D 7 - 2 7 ; J H 4)

10

V_H 核酸配列 (配列番号 47)

Atggagtttgggctgagctgggttctctgttctctttaaagaggtgtccaggtgcaggtgcagctggaggagctggggaggcgt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcgtctggattcacctcaatatgatgcactgggtccgccaggctc
caggcaaggggctggagtggtggcagttatggtatgatggaagtaataactatgcagactccgtgaagggccgattcaccat
ctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacattttgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagga
ctcactgggggtactttgactactggggccagggaacctgtcaccgtctcctca

V_H アミノ酸配列 (配列番号 48) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNIYDMHWVR
QAPGKGLEWVAVIIWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNILRAEDTAV
YYCARGTHWGYFDYWGQGLTVTVSS

20

シグナルペプチドを除く V_H アミノ酸配列 (配列番号 49) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNIYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIIWYDG
SNQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCARGTHWGYFDYWGQ
GTLTVTVSS

V_H CDR1 (配列番号 50): GFTFNIYD

V_H CDR2 (配列番号 51): IWYDGSNQ

30

V_H CDR3 (配列番号 52): ARGTHWGYFDY

【 0 2 4 3 】

1 H 8 V K (V K 1 D - 1 6 ; J K 1)

V_L 核酸配列 (配列番号 53)

Atgagggctctctgctcagctctctgggctctctgctgctctgttcccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctc
actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcgagtcagggattagcagctggttagcctggtatcagcagaaac
cagagaaagcccctaatgctcctgatctatgctgcatccaatttgcaagtggggtccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggac
agatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttactgccaacagtataatagttaccctcggacgttcggcc
aagggaccaaggtggaatcaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 54) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

40

:

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ
KPEKAPKSLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPRT
FGQGTKVEIK

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 55) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASNLSQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 56): QGISSW

V_L CDR2 (配列番号 57): AAS

V_L CDR3 (配列番号 58): QQYNSYPRT

【 0 2 4 4 】

1 G 5 V H (V H 3 - 3 3 ; D 6 - 1 9 ; J H 2)

10

V_H 核酸配列 (配列番号 59)

Atggagtttgggctgagctgggtttctctgttctctttaaagaggtgtccagtgtcaggtgcaactgggtggagtctgggggagcgtg
gtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcgtctggattcagcttagctatggcatgcactgggtccgagcgtcc
aggcaagggactggagtgggtggcacttctatggtatgatgtagccataaagactttgcagactccggaagggccgattcaccatc
ccagagacaattccaagaacacgctagatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagag
ggttagcagtagctgtcactgttactctggtgggcccgtggcaccctgtcactgtctctca

V_H アミノ酸配列 (配列番号 60) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVR
QAPGKGLEWVALLWYDGSHKDFADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTAV
YYCAREGLAVPGHWYFDLWGRGTLVTVSS

20

シグナルペプチドを除く V_H アミノ酸配列 (配列番号 61) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALLWYDG
SHKDFADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLAVPGHWYFDL
WGRGTLVTVSS

V_H CDR1 (配列番号 62): GFSFSSYG

V_H CDR2 (配列番号 63): LWYDGSHK

V_H CDR3 (配列番号 64): AREGLAVPGHWYFDL

30

【 0 2 4 5 】

1 G 5 V K (V K 1 - 1 3 ; J K 1)

V_L 核酸配列 (配列番号 65)

Atgagggtcccccgtcagctctctgggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgccatccagttgaccagctctccatcctc
cctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagggcattagcagtgcttagcctgggtatcagcagaaac
cagggaaagctcctaagctctgatctatgatgcctccagttggaaagtggggtccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggac
agatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatacttaccctcggacgttcggcc
aagggaccaaggtggaatcaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 66) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQK
PGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNTYPRTF
GQGTKVEIK

40

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 67) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNTYPRTFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 68): QGISSA

V_L CDR2 (配列番号 69): DAS

V_L CDR3 (配列番号 70): QQFNTYPR

【 0 2 4 6 】

2 G 9 V H (V H 3 - 3 3 ; D 1 - 7 ; J H 4)

10

V_H 核酸配列 (配列番号 71)

Atggagtttgggctgagctgggtttctctgttctctttaaagaggtgtccagtgtcaggtgcagttggtggagtctgggggaggcgtg
gtccagcctgggaggtccctgcgactctctgtgcagcgtctggattcaccctcagtagccatgacatactgggtccgccaggctc
caggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggaatgatggaagtaataatactatgcagactcctggaagggccgattcaccat
ctccagagacaattccacgaactcgtgtttctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattattgtgagaggaa
ctgctgacctgaactgggaccagggaacctgtgaccgtctctca

V_H アミノ酸配列 (配列番号 72) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSHDIHWVR
QAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVY
YCVRGTADLEHWDQGLTVSS

20

V_H アミノ酸配列 (配列番号 73) シグナルペプチドを除く:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSHDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVRGTADLEHWDQGL
TVSS

V_H CDR1 (配列番号 74): GFTLSSHD

V_H CDR2 (配列番号 75): IWNDGSNK

30

V_H CDR3 (配列番号 76): VRGTADLEHWDQ

【 0 2 4 7 】

2 G 9 V K (V K 1 D - 1 6 ; J K 4)

V_L 核酸配列 (配列番号 77)

Atgagggctctcgtcagctcctgggctctgctgctctgttcccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctc
actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagggattagcagctggttagcctggtatcagcagaaac
cagagaaaagcccctaaagtcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtggggtccatcaaggtcagcggcagtgatctgggac
agattcactcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttattactccaacagtataatgattaccctcactttcggcg
gagggaccaaggtggagatcaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 78) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGISSWLAWYQQ
KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYNSYPLT
FGGGTKVEIK

40

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 79) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 80): QGISSW

V_L CDR2 (配列番号 81): AAS

V_L CDR3 (配列番号 82): QQYNSYPLT

【 0 2 4 8 】

3 A 1 0 V H (V H 3 - 3 3 ; D 3 - 1 0 ; J H 3)

10

V_H 核酸配列 (配列番号 83)

Atggagtttgggctgagctgggtttctctggtgctcttttaagaggtgctcagtgctcaggtgcagctggtggagctgggggagggcgt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcgtctggattcaccttcagtcattatggcatgactgggtccgccaggctc
caggcaagggggccggagtggtggcaattatggtatgatggaagtaataataactatgcagactccgtgaagggccgattcacat
ctccagagacaattccaagaacacgctggatctgcaaatgaacagcctgagagccgagggacacggctgtgtattactgtgcgagaga
tggatggactactatggttcggggacttaatgttttgatctggggccaagggacaatggtcaccgtctctca

V_H アミノ酸配列 (配列番号 84) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHYGMHWW
RQAPGKGPEWVAIIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGWTTMVRGLNVFDIWGQGTMTVSS

20

シグナルペプチドを除く V_H アミノ酸配列 (配列番号 85) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHYGMHWWRQAPGKGPEWVAIIWYDG
SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCARDGWTTMVRGLNV
FDIWGQGTMTVSS

V_H CDR1 (配列番号 86): GFTFSHYG

V_H CDR2 (配列番号 87): IWYDGSNK

V_H CDR3 (配列番号 88): ARDGWTTMVRGLNVFDI

30

【 0 2 4 9 】

3 A 1 0 V K # 1 (V K 1 D - 1 6 ; J K 5)

V_L 核酸配列 (配列番号 89)

Atgagggtcctctgctcagctcctggggctctctgctgctctgttcccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctc
actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcgagtcaggatattagcagctggttagcctggtatcagcagaaac
cagagaaaagcccctaaagtcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtggggctccatcaaggtcagcggcagtggtatctgggac
agatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctcccacctggcc
aagggacacgactggagattaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 90) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む)

:

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQ
KPEKAPKSLIYAAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPT
FGQGTRLEIK

40

V_L アミノ酸配列 (配列番号 91) シグナルペプチドを除く :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTRLEIK

V_L CDR1 (配列番号 92): QDISSW

V_L CDR2 (配列番号 93): AAS

V_L CDR3 (配列番号 94): QQYNSYPPT

【 0 2 5 0 】

3 A 1 0 V K # 4 (V K 1 - 1 3 ; J K 5)

10

以下のようにさらなる軽鎖が活性であることも分かった（ただし、上述の実施例では、
上述の軽鎖（3 H 8 - 1 B 1 1 V K # 1）だけを使用した）：

V_L 核酸配列（配列番号 9 5）

Atgaggggtcctcgtcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgcatccaagttgaccagctcctcctc
cctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttggcgggcaagtcagggcattagcagtgctttagcctggatcagcagaaac
cagagaaagcccctaaagtcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtggggtccatcaaggttcagcggcagtgatctgggac
agatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttactccaacagataatgttaccctcccacttcggcc
aagggacacgactggagattaaa

V_L アミノ酸配列（配列番号 9 6）（下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む）

:

MRVLAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQK
PEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTF
GQGTRLEIK

20

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列（配列番号 9 7）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTRLEIK

V_L CDR1 (配列番号 98): QGISSA

V_L CDR2 (配列番号 99): AAS

30

V_L CDR3 (配列番号 100): QQYNSYPPT

【 0 2 5 1 】

3 H 1 2 V H (V H 3 - 3 3 ; D 7 - 2 7 ; J H 4)

V_H 核酸配列（配列番号 1 0 1）

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttctcttttaagaggtgctcagtgctcaggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtg
gtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcaacgtctggattcacctcagtagctatgacatgactgggtccgccaggtcc
aggcaaggggctggagtggtggcagttatttggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcacatct
ccagagacaattccaagaacacgctgtatctccaaatgaacagcctgggagacgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggtg
gtgtaactggggtttcttactactggggccaggggaacctgtcaccgtctcctca

40

V_H アミノ酸配列（配列番号 1 0 2）（下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む）：

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSSYDMHWVR
QAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLGDDEDTAV
YYCARGSGNWGFFDYWGQGLVTVSS

V_H アミノ酸配列（配列番号 1 0 3）シグナルペプチドを除く：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLGDEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGLTLTVSS

V_H CDR1 (配列番号 104): GFTFSSYD

V_H CDR2 (配列番号 105): IWYDGSNK

V_H CDR3 (配列番号 106): ARGSGNWGFFDY

【 0 2 5 2 】

3 H 1 2 V K # 2 (V K 1 D - 1 6 ; J K 1)

V_L 核酸配列 (配列番号 107)

Atgagggtcctcgtcagctcctggggtcctcgtcgtctgtttccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcggggcagtcagggtattagcaggtggttagcctggatcagcagaaacagagaaagcccctaaagtcctgatctatgctgcatccagtttcaaaagtggggtccatcaaggttcagcggcagtggtctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttactccaacagtataatacttaccctcggacgttcggccaaaggaccaaggtgaaatcaaa

V_L アミノ酸配列 (配列番号 108) (下線付きイタリック体のシグナルペプチドを含む) :

MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK

シグナルペプチドを除く V_L アミノ酸配列 (配列番号 109) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (配列番号 110): QGISRW

V_L CDR2 (配列番号 111): AAS

V_L CDR3 (配列番号 112): QQYNTYPRT

アラインメントを図 15 および図 16 に示す。

【 0 2 5 3 】

実施例 10

非ヒト霊長類のインビボ研究

非ヒト霊長類における抗ヒト CD 27 mAb 1 F 5 の耐容性を評価するために、3匹のカニクイザルを 1、3、または 10 mg / kg の 1 F 5 の単回静脈内投薬で処置した。動物を 29 日にわたって観察した。総リンパ球 (側方散乱および前方散乱サイズに基づく)、記憶 B 細胞 (CD 20 + および CD 95 ブライト)、および単球 (側方散乱および前方散乱サイズに基づく) を、抗ヒト Ig G 抗体 (太字線) で染色して、未染色の対照 (陰影のあるヒストグラム) と比較した。結果を図 17 に示す。これらの結果は、1 F 5 mAb が、試験期間全体にわたって、CD 27 を発現することが分かっている循環リンパ球の表面に結合したことを示している。CD 27 を発現しない細胞である単球は、1 F 5 を結合させなかった。

【 0 2 5 4 】

加えて、循環リンパ球集団に対する 1 F 5 の影響を判定するために、リンパ球をサブセットのマーカーで染色し、異なる用量 (四角い点 = 1 mg / kg、丸い点 = 3 mg / kg、三角の点 = 10 mg / kg) で処置した各動物について、図 17 に、時間に対して陽性細胞の割合 (%) をプロットした。結果を図 18 に示す。

【 0 2 5 5 】

10

20

30

40

50

まとめると、図17および図18に示されるこれらの試験による結果は、1~10mg/kgの単回投与の後に、1F5が、十分に耐受性を示し、循環リンパ球を有意には減少させなかった(NK細胞のいくつかの一過性の減少を除く)ことを実証している。加えて、体温の上昇はなく、また、いかなる検出可能なレベルのTNF-、IL-6、またはIL-1もなかった。

【0256】

実施例11

抗CD27mAbは、抗原特異的CD8+T細胞の増殖および活性化を増強したマウス末梢血液細胞および脾細胞の五量体染色

ヒトCD27トランスジェニックマウス(huCD27-Tg)に、5mgのニワトリオバルブミンおよび実施例1のように生成したヒトCD27(CD27ヒトmAb)を認識する完全ヒト抗体のパネルを注射した。ラット抗マウスCD27クローンAT124および無関係なヒトIgG1を、それぞれ、陽性対照および陰性対照として含めた。各抗体(250μg)を、0日目にオバルブミンと共注射し、さらに1日目に250μgの抗体を単独で注射した。末梢血液および脾臓細胞を、7日目に採取した。脾細胞(1×10⁶個)または全血(100μL)を、染色に使用した。Fc受容体の遮断後に、細胞を、室温で30分間、10μLのH-2Kb/SIINFEKL、オバルブミン(Beckman Coulter)由来のペプチドT細胞エピトープと複合体化したマウスMHCの四量体複合体もしくは類似する五量体複合体(ProImmune)、抗CD8(eBioscience)、および抗huCD27mAbもしくは抗msCD27mAb(BD Biosciences)で染色した。次いで、細胞を、RBC溶解し、洗浄し、固定して、フローサイトメーターLSR(BD Biosciences)で少なくとも100,000イベントを得た。CD8⁺またはCD27⁺のゲートした集団中の四量体または五量体陽性細胞の画分を判定した。結果を図19および図21に示す。これらの結果から、抗CD27抗体が免疫応答を有意に増強したことが分かる。

【0257】

実施例12

ELISPOTアッセイ

上述の実施例8の五量体染色にて調製したものの由来の脾細胞(2.5×10⁵個および0.5×10⁵個)を、RBC溶解の後に、3つ一組のウェルで抗IFNモノクローナル抗体(mAb)を被覆したプレートに配置した。SIINFEKLペプチドを、2μg/mLの最終濃度で加えた。バックグラウンド対照を、ペプチドの非存在下で、3つ一組の各試料について準備した。刺激を、組織培養恒温器中で、37°Cで一晩維持した。製造業者のプロトコルに従って、ELISPOTキット(BD Biosciences)を使用して、ELISPOT検出を行った。IFN-スポット数を数えた。結果を図20および図21に示す。これらの結果から、抗CD27mAbがT細胞活性を有意に増強したことがわかる。

【0258】

実施例13

抗CD27mAbは、ワクチン抗原に対するT細胞応答を増強する

HuCD27トランスジェニックマウスを、種々の用量(25、50、100、200、または400μg)で、抗CD27ヒトmAb 1F5(腹腔内)と組み合わせて、オバルブミン(OVA)に融合させた抗マウスDEC-205 IgG抗体(-mDEC-205-OVAと称する)を含む、5μgのAPC標的ワクチンで(皮下)免疫化した。1週間後、それぞれ、実施例8および実施例9で概ね説明されている手順によって、四量体染色によるOVA SIINFEKLペプチド(OVAペプチド257~264)、およびINF-ELISPOTに対するCD8+T細胞の反応性(全CD8+の四量体陽性の割合(%))で示す)について分析した。結果を図22A~Cに示すが、図22Aは、使用したプロトコルを示し、図22Bは、四量体染色実験の結果を示し、図22Cは、INF-ELISPOT実験の結果を示す。これらの結果は、共投与したヒトmAb

1 F 5 が、投与されたワクチン成分に対する T 細胞応答を有意に増強したことを示す。

【 0 2 5 9 】

実施例 1 4

ワクチン（抗 D E C 2 0 5 - O V A）への T 細胞応答に対する、抗 C D 2 7 m A b（1 F 5）および T L R 作動薬（ポリ I C）の相乗効果

3 日前に、抗 C D 2 7 m A b 1 F 5（5 0 μ g）を h u C D 2 7 - T g（トランスジェニック）マウスおよび野生型（W T）マウス同腹子に腹腔内注射し、次いで、0 日目に、抗 m D e c 2 0 5 - O V A（5 μ g）+ ポリ I C（0、2 5、5 0、または 1 0 0 μ g）を 4 つの足から皮下注射した。脾臓を、7 日目に採集し、四量体染色、I F N - E L I S P O T、および I F N - I C S によって評価した。1 群あたり 3 匹のマウス由来のゲートした C D 8 T 細胞の中の陽性 I F N - I C S の平均 ± 標準偏差を計算し、代表的なドットプロットのパネルを収集した。図 2 3 A ~ D に示される結果は、抗 C D 2 7 ヒト m A b が、T L R 3 作動薬ポリ I C と相乗的に作用して、投与されたワクチンの成分に対する T 細胞応答を増強したことを示している。

10

【 0 2 6 0 】

実施例 1 5

T L R 作動薬の非存在または存在における、D e c 2 0 5 標的ワクチン前の抗 C D 2 7 m A b の投与

図 2 8 で示されるようにワクチンに関連して、種々の日数に抗 C D 2 7 m A b（5 0 μ g）を h u C D 2 7 - T g マウスおよび野生型（W T）同腹子に腹腔内注射し、そして 0 日目に、抗 m D e c 2 0 5 - O V A（5 μ g）を T L R 作動薬ポリ I C - L C（2 0 μ g）とともに、またはそれを含めずに 4 つの足から皮下注射した。脾臓を、7 日目に採集し、四量体染色および I F N - E L I S P O T によって評価した。ゲートした C D 8 T 細胞の中の四量体染色の代表パネルを図 2 4 および図 2 5 に示す。I F N - E L I S P O T は、類似したパターンを示した。

20

【 0 2 6 1 】

これらの結果は、驚くべきことに、抗 C D 2 7 抗体が、T L R 作動薬の存在下または非存在下で、ワクチンと組み合わせて投与された場合、T 細胞の活性化は、ワクチンの前に、例えば、ワクチン（抗体）が投与される日またはそれよりも前に抗体が投与されたときにより大きくなることを示している。

30

【 0 2 6 2 】

実施例 1 6

T C R 活性化と組み合わせた抗 C D 2 7 m A b は、ヒト C D 2 7 トランスジェニックマウス由来の T 細胞を活性化する

1 F 5 m A b の T 細胞活性化能力を評価するために、T 細胞を、ビーズによる負の選択によって h C D 2 7 - T g マウスの脾臓から精製した。細胞は、C F S E で標識し、3 日間、0 . 2 μ g / m L の抗 C D 2 7 ヒト m A b 1 F 5 またはアイソタイプ対照とともにインキュベートした。使用前に、架橋抗ヒト I g G をエンドトキシン除去カラムに通過させた。C D 8 および C D 4 T 細胞の中の I F N - I C および C S F E 希釈を、図 2 6 および図 2 7 に示す。T N F a - I C は、I F N g と同じパターンを示した。図 2 6 および図 2 7 に示されるように、T C R 活性化と組み合わせた場合に、1 F 5 m A b は、インビトロでの増殖および T 細胞からのサイトカイン産生を誘発する。データは、抗ヒト I g G による架橋および抗 C D 3 m A b による T 細胞受容体の活性化が、どちらも 1 F 5 誘発増殖およびサイトカイン産生に必要であったことを示している。

40

【 0 2 6 3 】

実施例 1 7

抗 C D 2 7 m A b は、M O 4 メラノーマチャレンジモデルにおけるワクチンの有効性を増強する

インビボでの抗腫瘍活性を評価するために、0 日目に、0 . 3 × 1 0 ⁵ 個の M O 4 細胞を、h u C D 2 7 - T g および W T 対照（1 群あたり 8 匹のマウス）に皮下接種した。5

50

日目および12日目に、抗CD27mAb 1F5 (50 μg)を、これらのマウスに腹腔内注射した。8日目および15日目に、CD27 HuMab (50 μg)をさらに投与し、抗mDec205-OVA (5 μg)を接種した。腫瘍成長を、週2回カリパスで測定した。結果を図24に示す。

【0264】

さらなる試験において、0日目に、 1×10^5 個のMO4細胞を、huCD27-TgおよびWT対照(1群あたり5匹のマウス)に皮下接種した。5日目および12日目に、抗mDec205-OVA (5 μg)およびTLR作動薬ポリIC-LC (10 μg)を、これらのマウスに腹腔内ワクチン接種した。6日目および13日目に、抗CD27mAb 1F5 (50 μg)をマウスに注射した。腫瘍成長は、図285Aで例示されるプロトコルで示されるように、週に2回カリパスで測定した。図28B、28C、および28Dに示される結果は、腫瘍接種後の日数の関数として、マウスの腫瘍サイズに関する、処置なし(図28B)、ワクチン単独治療(図28C)、または抗CD27治療と組み合わせたワクチン治療(図28D)の効果を示す。結果は、抗CD27mAb (1F5)との組み合わせ治療が、腫瘍チャレンジしたマウスの生存を有意に延長したことを実証している。

10

【0265】

実施例18

1F5は、BCL₁ Bリンパ腫の同系トランスジェニックマウスの腫瘍チャレンジモデルにおいて、強力な抗腫瘍活性を呈する

20

インビボでの1F5の抗腫瘍活性を評価するために、群あたり9~10のhCD27トランスジェニックマウス(Balb/cバックグラウンド)を、0日目に、静脈内投与した 10^7 個のBCL₁ Bリンパ腫細胞でチャレンジした。次いで、動物を、示されるように、5用量の抗ヒトCD27mAb 1F5で処置した。図29Aおよび29Bに示されるように、用量に依存する様式で、腫瘍チャレンジしたマウスの生存を有意に延長した。

【0266】

実施例19

Raji異種移植片SCIDマウスモデルにおける腫瘍の殺傷

CB.17 SCIDマウス(Taconicから購入)を、病原体を含まないマウス施設で維持した。リンパ腫Raji細胞(1×10^5 個)を、SCIDマウス(1群あたり4匹のマウス)に皮下注射した。6日目に、これらのマウスをCD27ヒトmAbsで処置し、3週間にわたって投与1回あたり0.5mgで週2回投与した。腫瘍の成長を、週3回カリパスで測定した。腫瘍の成長およびカプラン-マイヤー分析の結果を図30Aおよび30Bに示す。これらの結果から、抗CD27mAbが、腫瘍チャレンジしたマウスの生存を有意に延長したことが分かる。

30

【0267】

さらなる実験において、CB.17 SCIDマウス(Taconicから購入)を、病原体を含まないマウス施設で維持した。ヒトリンパ腫Raji細胞(5×10^5 個)を、0日目に、SCIDマウス(1群あたり6匹のマウス)に皮下注射した。5日目に、これらのマウスを、抗CD27mAb 1F5で処置し、3週間にわたって投与1回あたり0.033、0.1、または0.3mgで週2回投与した。腫瘍成長を、週2回カリパスで測定した。

40

【0268】

図31Aに示される結果は、抗CD27mAb (1F5)が、腫瘍成長を有意に阻害し、したがって、腫瘍チャレンジしたマウスの生存を有意に延長したことを示している。また、データの Kaplan-Meier 生存プロットを図31Bに示す。この図は、生存期間中央値が、対照群と比較して、処置群からのマウスにおいて少なくとも10日増加したことを示している。さらなる異種移植実験を1G5で行い、その結果を図32に示す。

【0269】

50

実施例 2 0

D a u d i 異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍の殺傷

C B . 1 7 S C I D マウス (T a c o n i c から購入) を、病原体を含まないマウス施設で維持した。ヒトリンパ腫 D a u d i 細胞 (1×10^6 個) を、0 日目に、S C I D マウス (1 群あたり 6 匹のマウス) に皮下注射した。5 日目に、これらのマウスを、抗 C D 2 7 ヒト m A b 1 F 5 で処置し、3 週間にわたって投与 1 回あたり 0 . 0 3 3、0 . 1、または 0 . 3 m g で週 2 回投与した。腫瘍成長を、週 2 回カリパスで測定した。

【 0 2 7 0 】

図 3 3 に示される結果は、抗 C D 2 7 m A b (1 F 5) が腫瘍成長を有意に阻害したことを示し (図 3 3 A)、したがって、腫瘍チャレンジしたマウスの生存を有意に延長したことを示している (図 3 3 B のカプラン - マイヤープロット)。

10

【 0 2 7 1 】

実施例 2 1

受容体に結合しないように操作した抗 C D 2 7 m A b は、ワクチン抗原に対する T 細胞応答を増強しない

H u C D 2 7 トランスジェニックマウスを、抗 C D 2 7 ヒト m A b 1 F 5 (腹腔内) もしくは m A b 1 F 5 変異株 (F c 受容体結合を予防するように、F c 部分を変異させた)、または対照 I g G m A b と組み合わせて、オバルブミン (O V A) (- m D E C - 2 0 5 - O V A と称する) に融合させた抗マウス D E C - 2 0 5 I g G 抗体を含む、5 μ g の A P C 標的ワクチンで (皮下) 免疫化した。1 週間後、一般に説明される手順によって、O V A S I I N F E K L ペプチド (O V A ペプチド 2 5 7 ~ 2 6 4) および I N F - E L I S P O T に対する C D 8 + T 細胞の反応性について分析した。

20

【 0 2 7 2 】

図 3 4 に示される結果は、変化させたヒト m A b 1 F 5 が、ワクチンに対する T 細胞応答を増強せず、C D 7 0 / C D 2 7 経路を遮断するための有効な薬剤となることを実証している。

【 0 2 7 3 】

等価物

当業者は、日常の実験を超えるものを用いなくても、本明細書で説明される本発明の特定の実施形態には多くの等価物があることを認識するであろうし、または確認することが可能であろう。このような等価物は、以下の請求項によって包含されることが意図される。

30

【 0 2 7 4 】

配列表の要約

配列番号	説明	
1	ヒトCD27 (GenBankアクセッション番号: AAH12160.1)	
2	ヒトCD70 (GenBankアクセッション番号: NP_001243)	
3	V _H 3-33 生殖系列配列が提供される(Genbankアクセッション番号 AAP44382)	
4	V _H 3-7 生殖系列配列が提供される(Genbankアクセッション番号 AAP44389)	
5	3H8-1B11 VH 核酸	
6	3H8-1B11 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸	
7	3H8-1B11 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	10
8	3H8-1B11 VH CDR1 アミノ酸	
9	3H8-1B11 VH CDR2 アミノ酸	
10	3H8-1B11 VH CDR3 アミノ酸	
11	3H8-1B11 VL #2 核酸	
12	3H8-1B11 VL #2 シグナルペプチドを含むアミノ酸	
13	3H8-1B11 VL #2 シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	20
14	3H8-1B11 VL #2 CDR1 アミノ酸	
15	3H8-1B11 VL #2 CDR2 アミノ酸	
16	3H8-1B11 VL #2 CDR3 アミノ酸	
17	3H8-1B11 VL #3 核酸	
18	3H8-1B11 VL #3 シグナルペプチドを含むアミノ酸	30
19	3H8-1B11 VL #3 シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	
20	3H8-1B11 VL #3 CDR1 アミノ酸	
21	3H8-1B11 VL #3 CDR2 アミノ酸	
22	3H8-1B11 VL #3 CDR3 アミノ酸	
23	2C2-1A10 VH 核酸	
24	2C2-1A10 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸	40
25	2C2-1A10 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	

配列番号	説明
26	2C2-1A10 VH CDR1 アミノ酸
27	2C2-1A10 VH CDR2 アミノ酸
28	2C2-1A10 VH CDR3 アミノ酸
29	2C2-1A10 VL 核酸
30	2C2-1A10 VL シグナルペプチドを含むアミノ酸
31	2C2-1A10 VL シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
32	2C2-1A10 VL CDR1 アミノ酸
33	2C2-1A10 VL CDR2 アミノ酸
34	2C2-1A10 VL CDR3 アミノ酸
35	1F5-1H5 VH 核酸
36	1F5-1H5 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸
37	1F5-1H5 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
38	1F5-1H5 VH CDR1 アミノ酸
39	1F5-1H5 VH CDR2 アミノ酸
40	1F5-1H5 VH CDR3 アミノ酸
41	1F5-1H5 VL #2 核酸
42	1F5-1H5 VL #2 シグナルペプチドを含むアミノ酸
43	1F5-1H5 VL #2 シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
44	1F5-1H5 VL #1 CDR1 アミノ酸
45	1F5-1H5 VL #2 CDR2 アミノ酸
46	1F5-1H5 VL #2 CDR3 アミノ酸
47	1H8-B4 VH 核酸
48	1H8-B4 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸

10

20

30

40

配列番号	説明
49	1H8-B4 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
50	1H8-B4 VH CDR1 アミノ酸
51	1H8-B4 VH CDR2 アミノ酸
52	1H8-B4 VH CDR3 アミノ酸
53	1H8-B4 VL 核酸
54	1H8-B4 VL シグナルペプチドを含むアミノ酸
55	1H8-B4 VL シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
56	1H8-B4 VL CDR1 アミノ酸
57	1H8-B4 VL CDR2 アミノ酸
58	1H8-B4 VL CDR3 アミノ酸
59	1G5-1B9 VH 核酸
60	1G5-1B9 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸
61	1G5-1B9 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
62	1G5-1B9 VH CDR1 アミノ酸
63	1G5-1B9 VH CDR2 アミノ酸
64	1G5-1B9 VH CDR3 アミノ酸
65	1G5-1B9 VL 核酸
66	1G5-1B9 VL シグナルペプチドを含むアミノ酸
67	1G5-1B9 VL シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
68	1G5-1B9 VL CDR1 アミノ酸
69	1G5-1B9 VL CDR2 アミノ酸
70	1G5-1B9 VL CDR3 アミノ酸
71	2G9-1D11 VH 核酸
72	2G9-1D11 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸

10

20

30

40

配列番号	説明	
73	2G9-1D11 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	
74	2G9-1D11 VH CDR1 アミノ酸	
75	2G9-1D11 VH CDR2 アミノ酸	
76	2G9-1D11 VH CDR3 アミノ酸	
77	2G9-1D11 VL 核酸	10
78	2G9-1D11 VL シグナルペプチドを含むアミノ酸	
79	2G9-1D11 VL シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	
80	2G9-1D11 VL CDR1 アミノ酸	
81	2G9-1D11 VL CDR2 アミノ酸	
82	2G9-1D11 VL CDR3 アミノ酸	20
83	3A10-1G10 VH 核酸	
84	3A10-1G10 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸	
85	3A10-1G10 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	
86	3A10-1G10 VH CDR1 アミノ酸	
87	3A10-1G10 VH CDR2 アミノ酸	
88	3A10-1G10 VH CDR3 アミノ酸	30
89	3A10-1G10 VL #1 核酸	
90	3A10-1G10 VL #1 シグナルペプチドを含むアミノ酸	
91	3A10-1G10 VL #1 シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸	
92	3A10-1G10 VL #1 CDR1 アミノ酸	
93	3A10-1G10 VL #1 CDR2 アミノ酸	
94	3A10-1G10 VL #1 CDR3 アミノ酸	40
95	3A10-1G10 VL #4 核酸	

配列番号	説明
96	3A10-1G10 VL #4 シグナルペプチドを含むアミノ酸
97	3A10-1G10 VL #4 シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
98	3A10-1G10 VL #4 CDR1 アミノ酸
99	3A10-1G10 VL #4 CDR2 アミノ酸
100	3A10-1G10 VL #4 CDR3 アミノ酸
101	3H12-1E12 VH 核酸
102	3H12-1E12 VH シグナルペプチドを含むアミノ酸
103	3H12-1E12 VH シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
104	3H12-1E12 VH CDR1 アミノ酸
105	3H12-1E12 VH CDR2 アミノ酸
106	3H12-1E12 VH CDR3 アミノ酸
107	3H12-1E12 VL #2 核酸
108	3H12-1E12 VL #2 シグナルペプチドを含むアミノ酸
109	3H12-1E12 VL #2 シグナルペプチドを除く「成熟」アミノ酸
110	3H12-1E12 VL #2 CDR1 アミノ酸
111	3H12-1E12 VL #2 CDR2 アミノ酸
112	3H12-1E12 VL #2 CDR3 アミノ酸
113	VH CDR3 コンセンサス
114	VL CDR3 コンセンサス
115	VH CDR2 コンセンサス
116	VL CDR2 コンセンサス
117	VH CDR1 コンセンサス
118	VL CDR1 コンセンサス

10

20

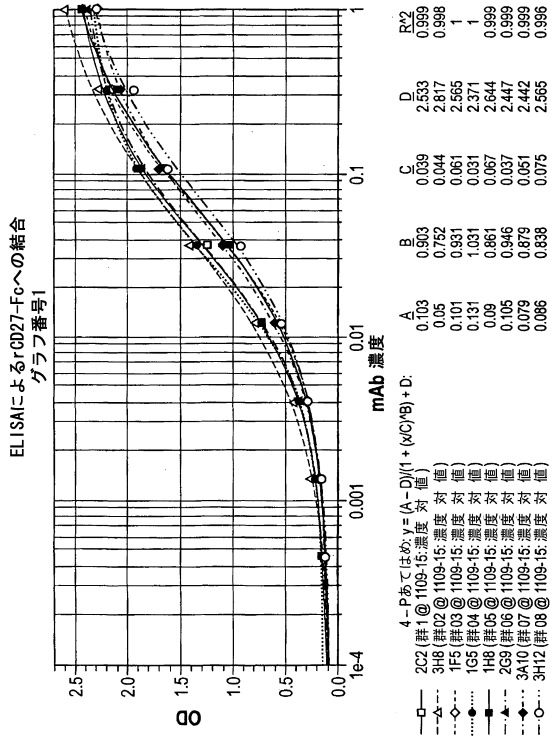
30

【 図 1 】

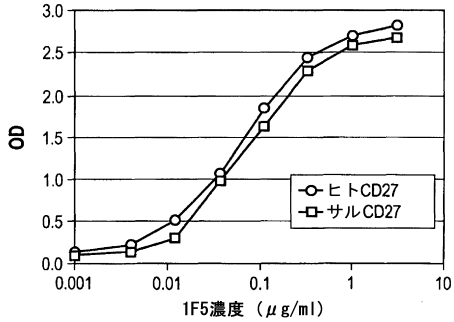
ヒトCD27mAbのBiacore分析

クローン	解離時間 (秒)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU) Fc2-1	Rmax (RU) Fc4-3	KA (1/M)	KD (M)
1G5	480	2.23E+05	8.98E-05	236	177	2.55E+09	4.02E-10
1H8	480	2.18E+05	3.44E-05	313	226	6.39E+09	1.58E-10
3H12	480	1.74E+05	6.23E-05	298	205	2.80E+09	3.58E-10
3H8	1200	1.12E+05	6.19E-06	126	96	1.81E+10	5.56E-11
2G9	1200	1.74E+05	2.65E-07	97	75	6.60E+11	1.53E-12
1F5	480	3.07E+05	5.72E-05	312	206	5.37E+09	1.86E-10
3A10	480	1.74E+06	3.51E-04	113	79	4.97E+09	2.02E-10
2C2	480	5.03E+05	4.23E-05	54	40	1.20E+10	8.41E-11

【 図 2 】

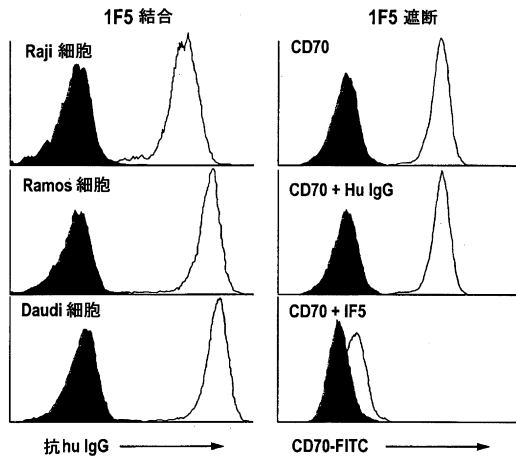


【 図 3 】

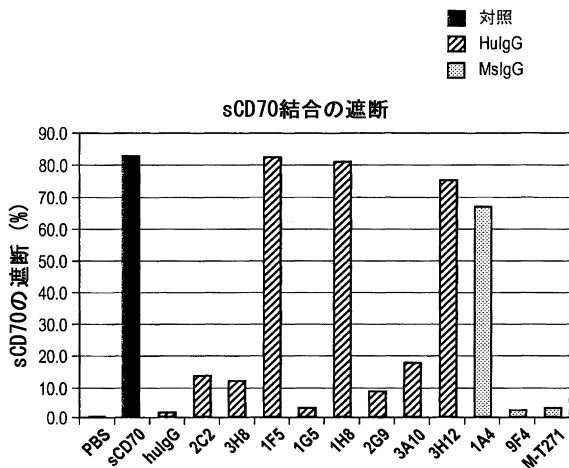


【 図 5 】

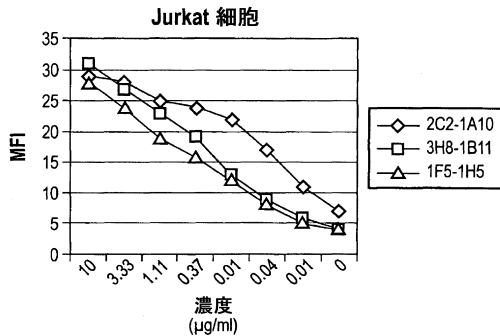
ヒトmAb 1F5は主要な開発候補である



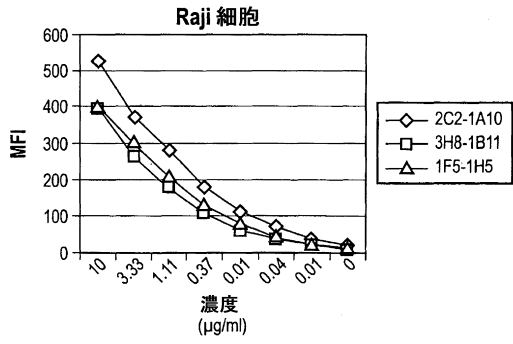
【 図 4 】



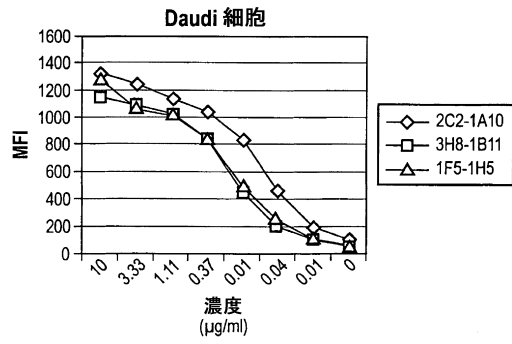
【 図 6 A 】



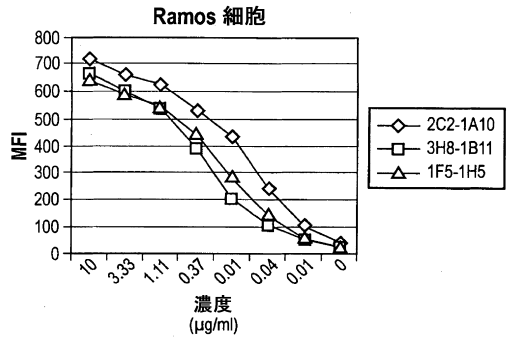
【 図 6 B 】



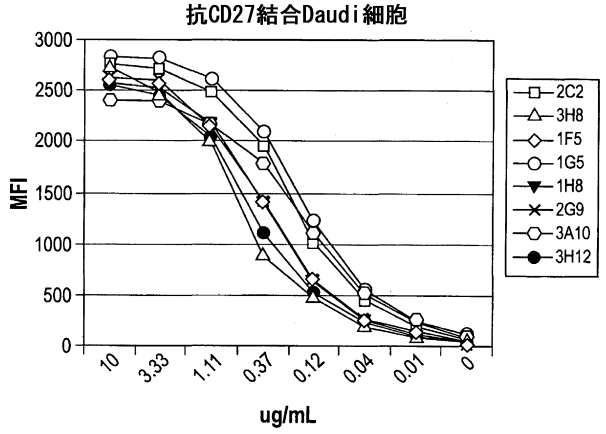
【 図 6 D 】



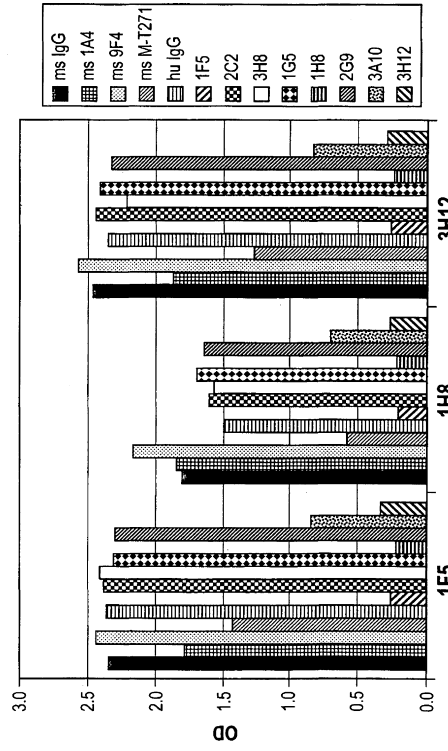
【 図 6 C 】



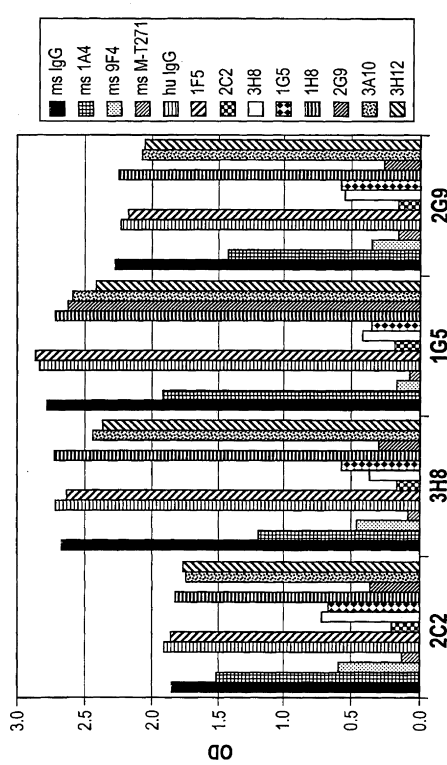
【 図 7 】



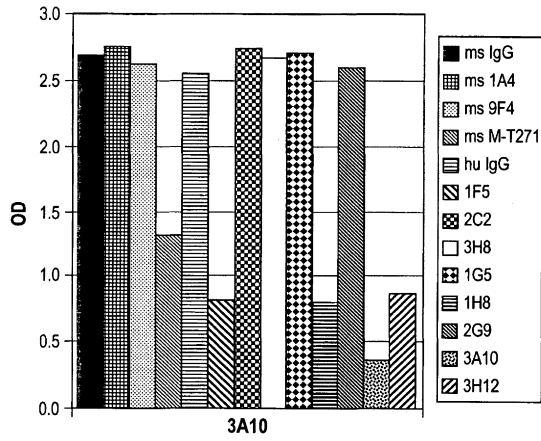
【 図 8 】



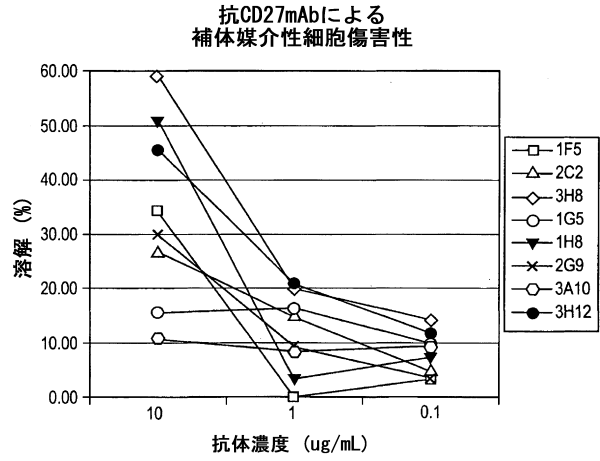
【 図 9 】



【図10】

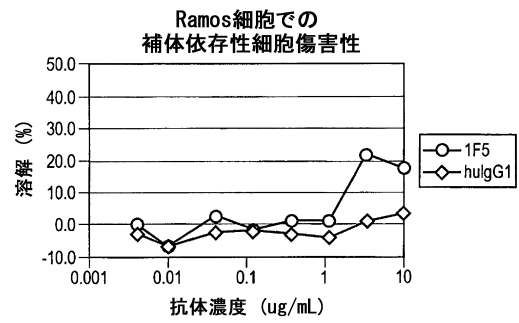


【図11】

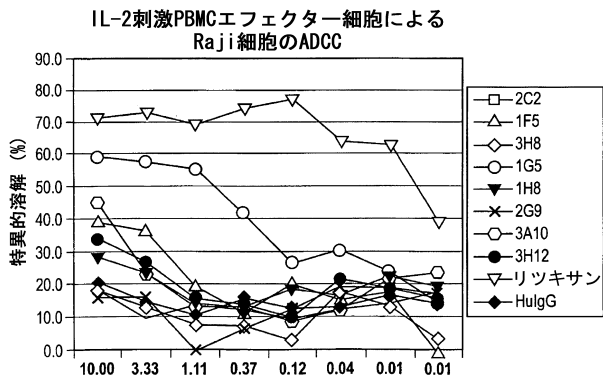


HuIgG = 0% 溶解

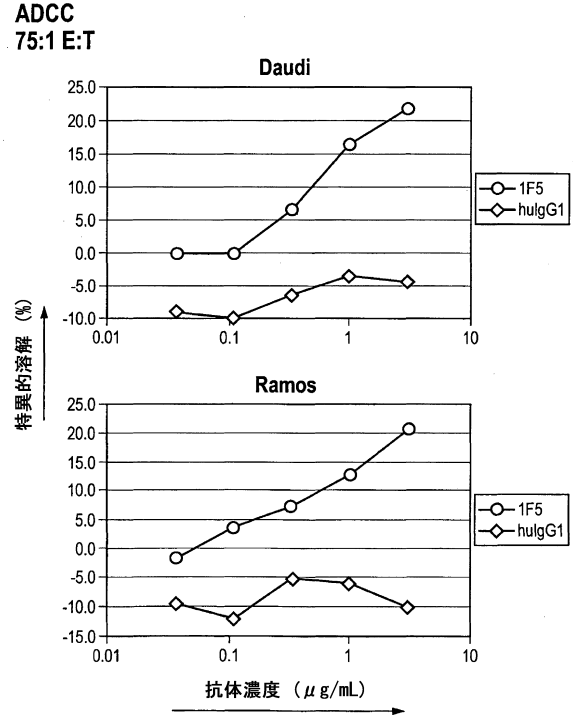
【図12】



【図13】



【図14】



【 図 1 5 】

VHアラインメント

1F5-1H5 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSS	50
1G5-1B9 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSS	
1H8-B4 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFNI	
2C2-1A10 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSS	
2G9-1D11 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSS	
3A10-1G10 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSH	
3H12-1E12 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSS	
3H8-1B11 V-H	(1)	MELGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGFTFSS	
		51	100
1F5-1H5 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLVL	
1G5-1B9 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKHDFADSVKGRFTISRDNKNTLDL	
1H8-B4 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLVL	
2C2-1A10 V-H	(51)	YDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNSTNSLFL	
2G9-1D11 V-H	(51)	YDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNSTNSLFL	
3A10-1G10 V-H	(51)	YGMHWVRQAPGKPEWVAIIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLDL	
3H12-1E12 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLVL	
3H8-1B11 V-H	(51)	YMAHWVRQAPGKGLEWLNITKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLVL	
		101	143
1F5-1H5 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCARGSGN-----WGFFDYWGQGLTVTVSS	
1G5-1B9 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCAREGLAVPG---HWYFDLWGRGTLTVTVSS	
1H8-B4 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCARG-TH-----WGYFDYWGQGLTVTVSS	
2C2-1A10 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCYGG-----TADLEHWQDGLTVTVSS	
2G9-1D11 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCVRC-----TADLEHWQDGLTVTVSS	
3A10-1G10 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCARDGWTVMRGLNVFDIWGQGTMTVTVSS	
3H12-1E12 V-H	(101)	QMNSLGDIEDTAVYVCARGSGN-----WGFFDYWGQGLTVTVSS	
3H8-1B11 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYVCVRELG-----MDWYFDLWGRGTLTVTVSS	

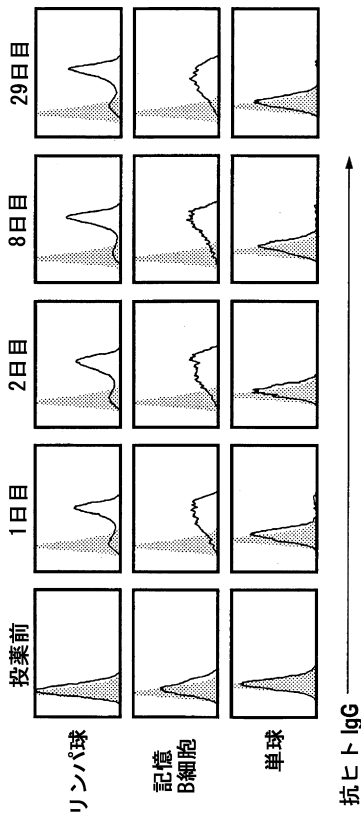
【 図 1 6 】

VKアラインメント

1F5-1H5 V-L #2	(1)	MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	50
1G5-1B9 V-L	(1)	MRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	
1H8-B4 V-L	(1)	MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	
2C2-1A10 V-L	(1)	MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	
2G9-1D11 V-L	(1)	MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	
3A10-1G10 V-L #2	(1)	MRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	
3H12-1E12 V-L #2	(1)	MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQGIS	
3H8-1B11 V-L #2	(1)	MEAPAQLLFLLLWLPDPTTGEIVLQSPATLSPGERATLSCRASQVSD	
		51	100
1F5-1H5 V-L #2	(51)	RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
1G5-1B9 V-L	(51)	SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
1H8-B4 V-L	(51)	SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
2C2-1A10 V-L	(51)	SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
2G9-1D11 V-L	(51)	SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
3A10-1G10 V-L #2	(51)	SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
3H12-1E12 V-L #2	(51)	RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP	
3H8-1B11 V-L #2	(51)	SYLAWYQQKPGKAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSDFTLTISSLQP	
		101	127
1F5-1H5 V-L #2	(101)	EDFATYCCQYNTYPRTFGGGKTKVEIK	
1G5-1B9 V-L	(101)	EDFATYCCQYNTYPRTFGGGKTKVEIK	
1H8-B4 V-L	(101)	EDFATYCCQYNSYPRTFGGGKTKVEIK	
2C2-1A10 V-L	(101)	EDFATYCCQYNSYPLTFGGGKTKVEIK	
2G9-1D11 V-L	(101)	EDFATYCCQYNSYPLTFGGGKTKVEIK	
3A10-1G10 V-L #2	(101)	EDFATYCCQYNSYPTFGGKTKVDIK	
3H12-1E12 V-L #2	(101)	EDFATYCCQYNTYPRTFGGGKTKVEIK	
3H8-1B11 V-L #2	(101)	EDFATYCCQYNSYPTFGGKTKVEIK	

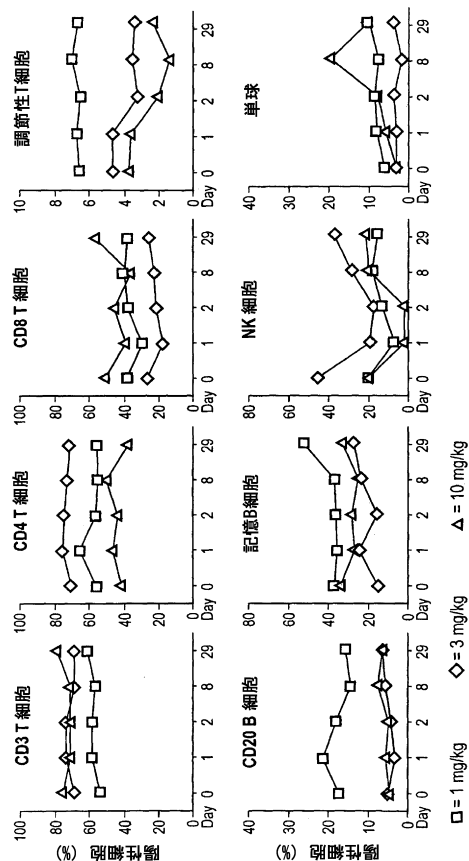
【 図 1 7 】

1mg/kgの単回投薬後の循環リンパ球上のIF5

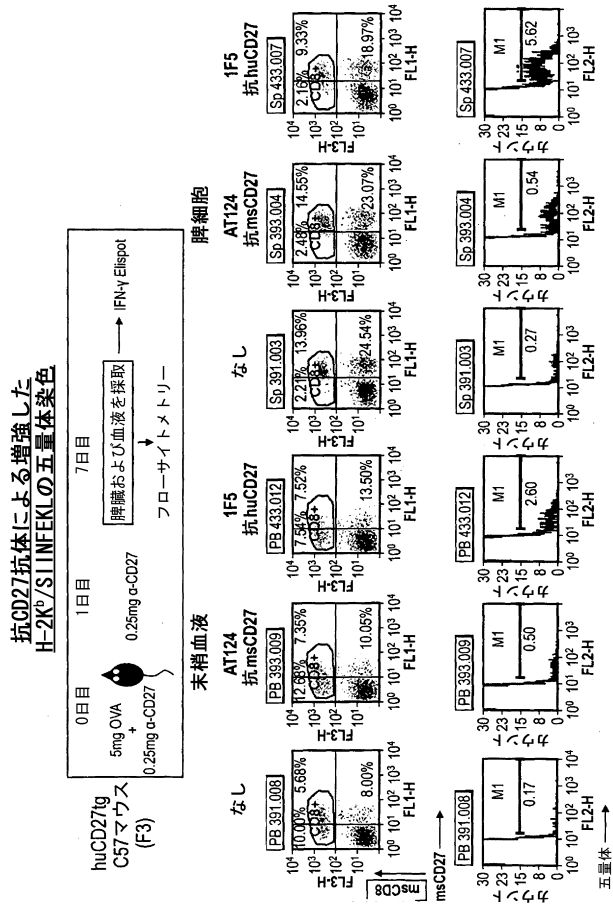


【 図 1 8 】

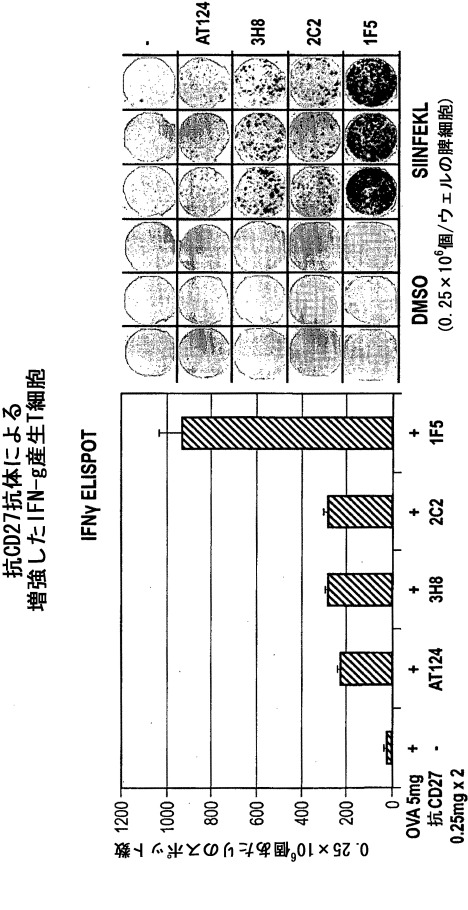
IF5は1~10mg/kgの単回投薬後に循環リンパ球を有意には減少させない



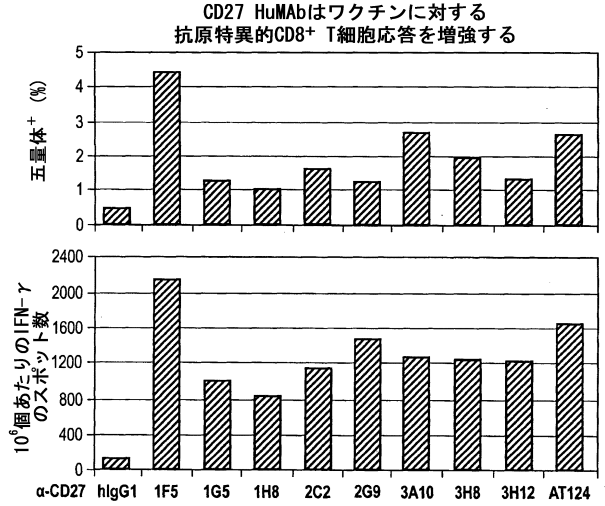
【 図 1 9 】



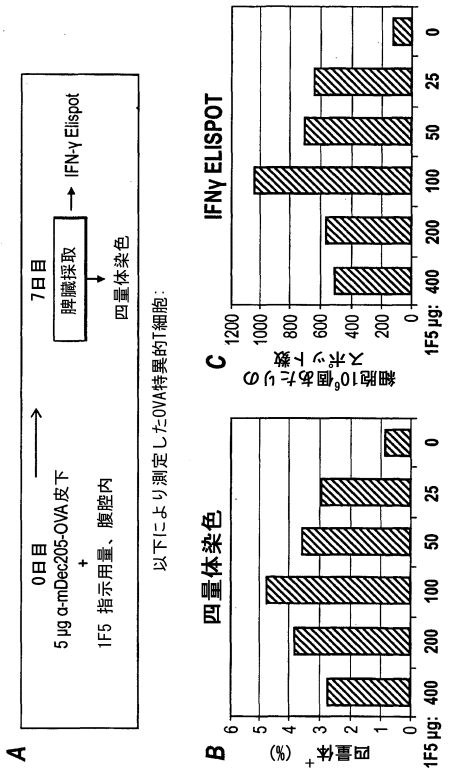
【 図 2 0 】



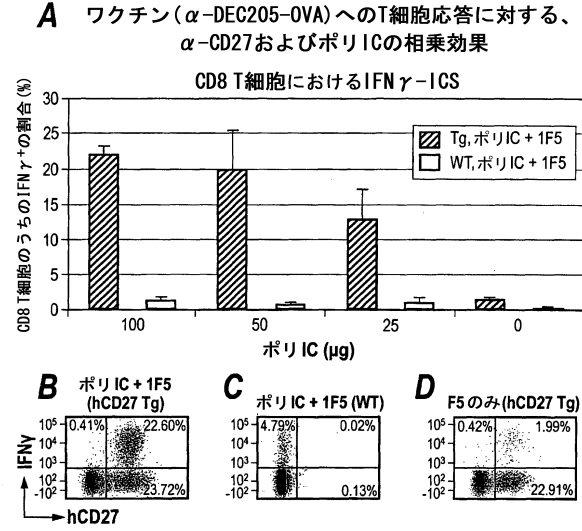
【 図 2 1 】



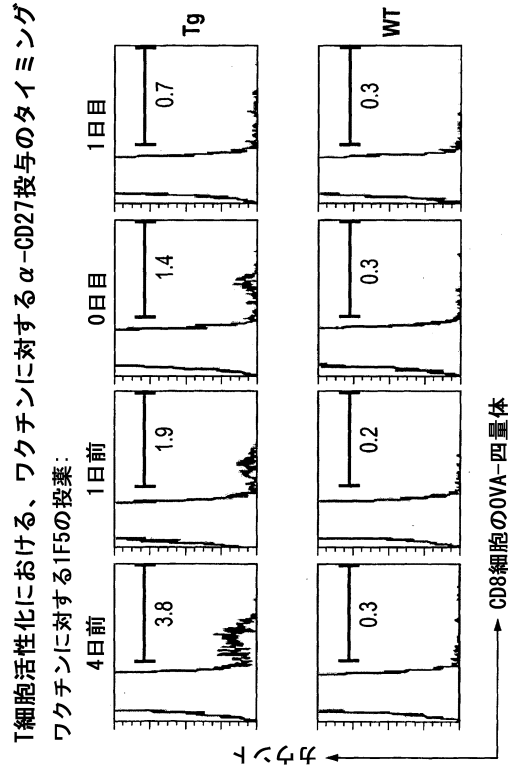
【 図 2 2 】



【図 2 3】

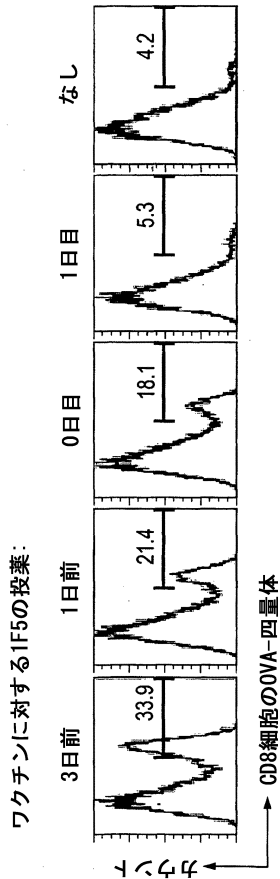


【図 2 4】



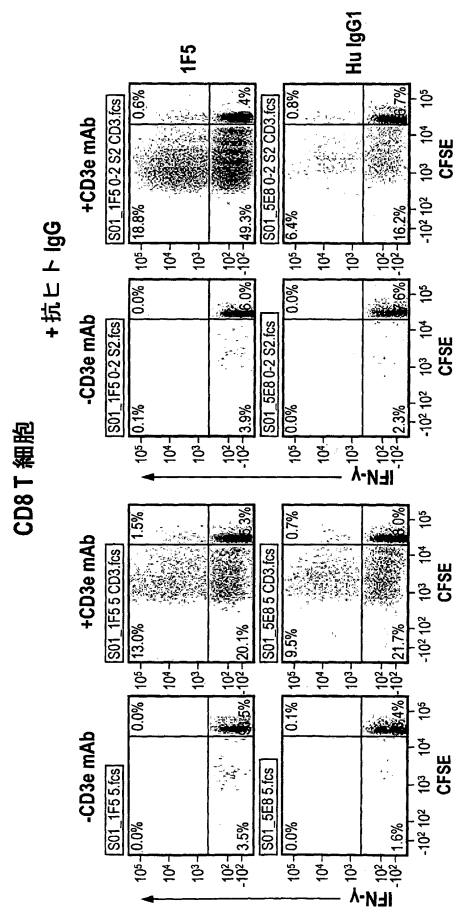
【図 2 5】

T細胞活性化における、ワクチンに対する α -CD27投与のタイミング
(ポリICとの組み合わせ)



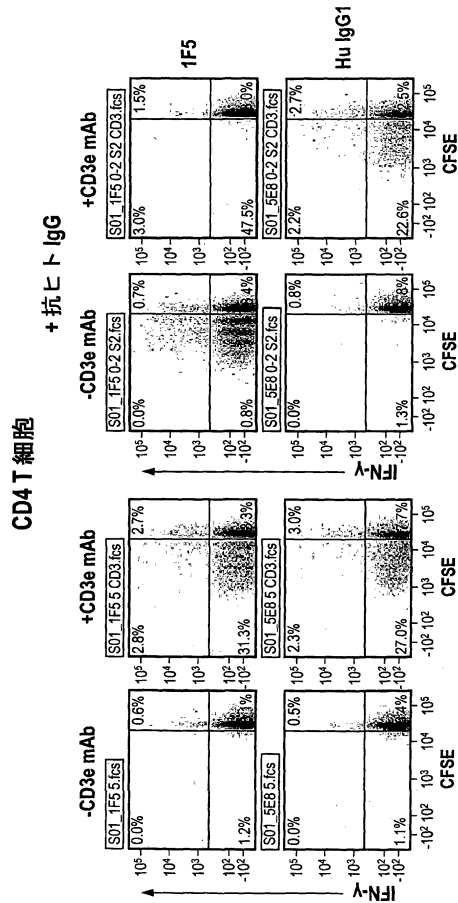
【図 2 6】

TCR活性化と組み合わせたIF5は、インビトロでの増殖およびT細胞からのサイトカイン産生を誘発する



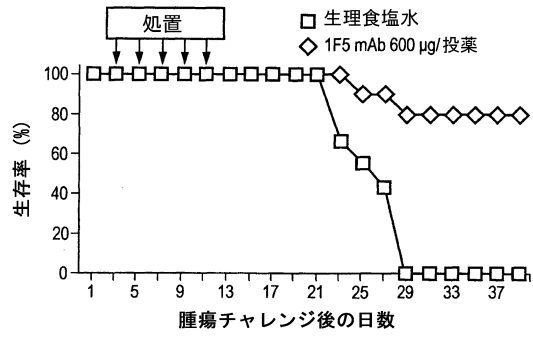
【 図 2 7 】

TCR活性化と組み合わせた1F5は、インビトロでの増殖およびT細胞からのサイトカイン産生を誘発する

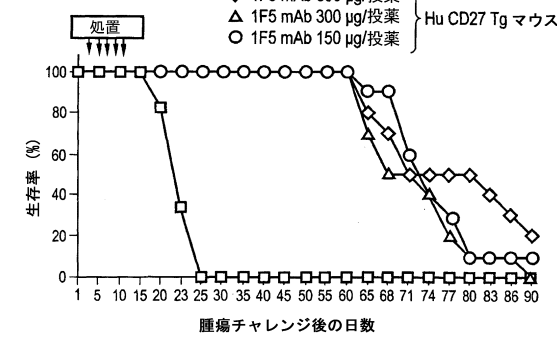


【 図 2 9 】

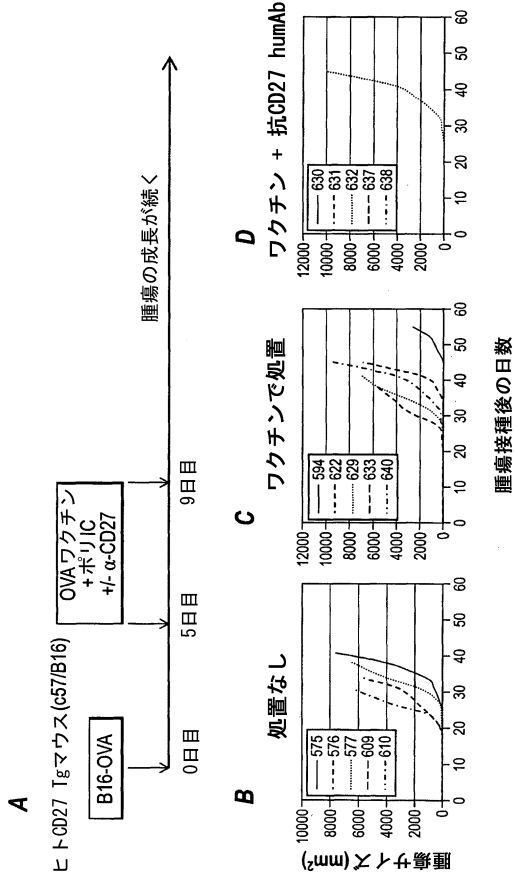
A BCL₁ 同系腫瘍モデルにおける1F5の有効性



B WTマウスにおける1F5 mAb 600 μg/投薬

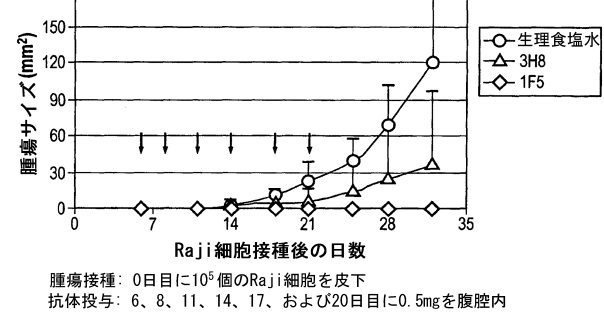


【 図 2 8 】

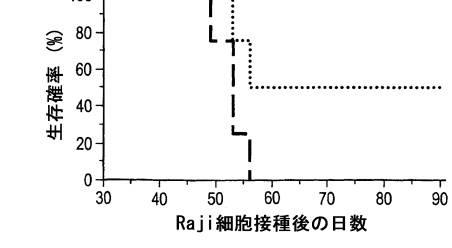


【 図 3 0 】

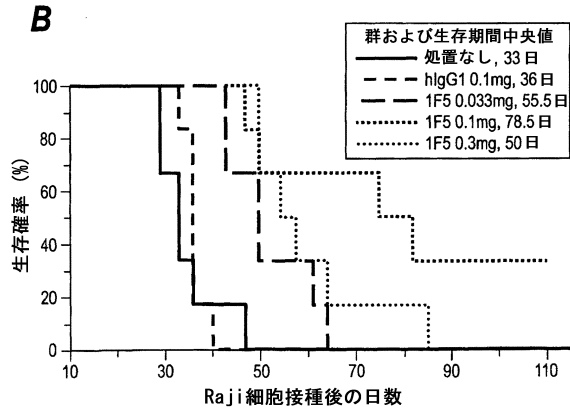
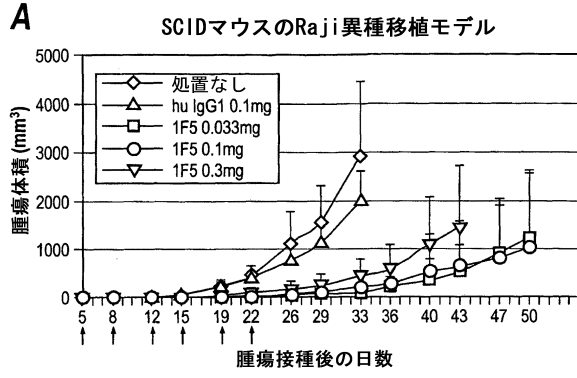
A SCIDマウスのRaji異種移植モデル



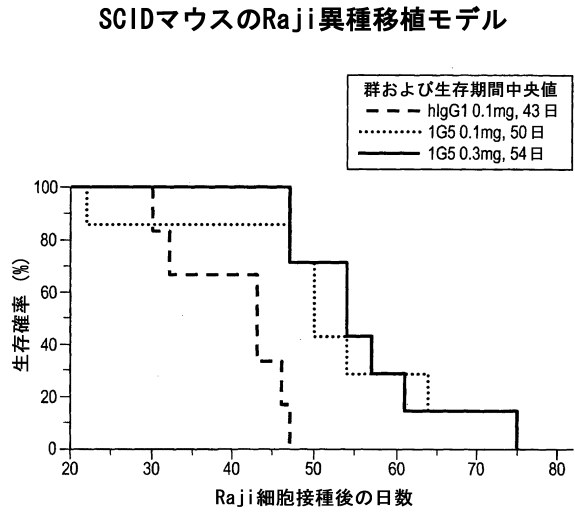
B



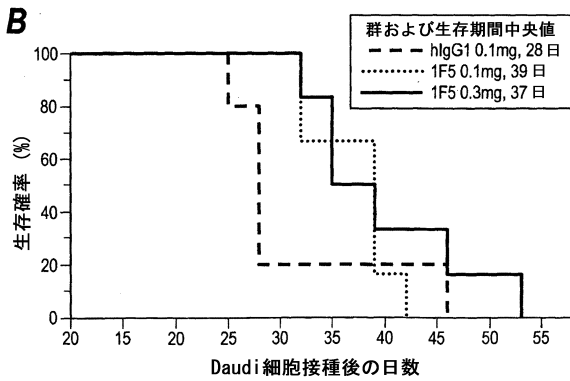
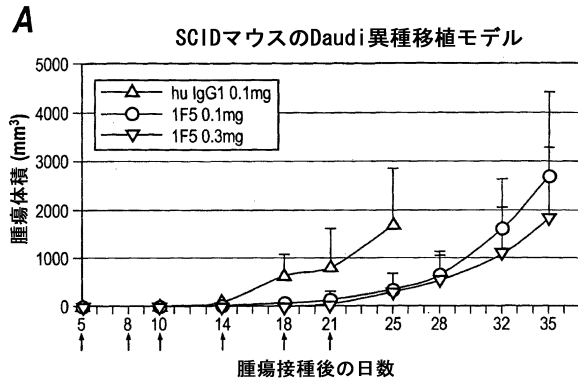
【図 3 1】



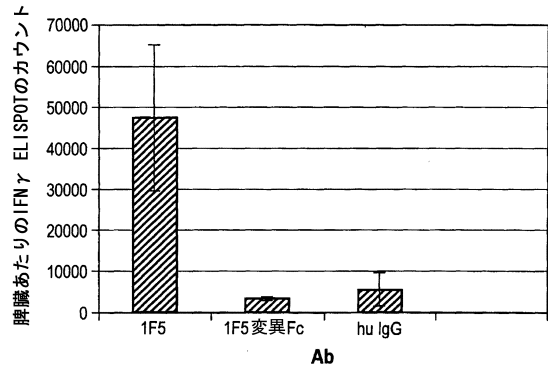
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



【配列表】

0006002659000001.app

0006002659000002.xml

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			
	C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
	C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
	C 1 2 N	5/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	
	A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
	A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
	A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/39	
	A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
	A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
	A 6 1 K	39/35	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	M
	A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
	A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/35	
	A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
	A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
	A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
	A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
	A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/10	
	A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
	A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	33/00	
	A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
	A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
	A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
	A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
	A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
	A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
	A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
	A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
	A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
	A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
	A 6 1 P	19/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
	A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
	A 6 1 P	5/40	(2006.01)	A 6 1 P	19/04	
	A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
	A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	5/40	
	A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	15/08	
	A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
	A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
	A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
	A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
	A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
	A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
	A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	37/24	
	A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	31/7105	
	A 6 1 K	31/429	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
	G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	35/74	A
				A 6 1 K	31/429	
				G 0 1 N	33/53	D

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ケラー チボル
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 オッツビル パーク ロード 30
- (72)発明者 マーシュ ヘンリー シー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レディング サマー アベニュー 297
- (72)発明者 ヘ リーチェン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 アレンタウン リッジビュー ドライブ 1675
- (72)発明者 ビターレ ローラ エイ .
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ドイルズタウン ビター スウィート レーン 5574
- (72)発明者 トーマス ローレンス ジェイ .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 イーストン フォックス リッジ ロード 1

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特表2010-506925(JP,A)
特表2005-507635(JP,A)
国際公開第2007/102230(WO,A1)
国際公開第2009/058564(WO,A1)
The Journal of Immunology, 2010年 4月 1日, Vol.184, No.1, Supp., Meeting Abstracts. Abstract Number:87.23
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010年 3月19日, Vol.393, p.829-835
The Journal of Immunology, 2000年, Vol.164, p.1741-1745

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
C07K
CAplus/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	抗体与人CD27的结合及其用途		
公开(公告)号	JP6002659B2	公开(公告)日	2016-10-05
申请号	JP2013505106	申请日	2011-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	塞尔德克斯医疗公司		
申请(专利权)人(译)	细胞指数Therapeutics公司		
当前申请(专利权)人(译)	细胞指数Therapeutics公司		
[标]发明人	ケラーチボル マーシュヘンリーシー ヘリーチェン ビターレローラエイ トーマスローレンスジェイ		
发明人	ケラー チボル マーシュ ヘンリー シー. ヘ リーチェン ビターレ ローラ エイ. トーマス ローレンス ジェイ.		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/28 C12N15/09 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 A61K39/395 A61K39/39 A61K45/00 A61P37/04 A61K39/00 A61K39/35 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P3/10 A61P17/06 A61P1/04 A61P37/02 A61P21/04 A61P5/14 A61P13/12 A61P17/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P19/04 A61P21/00 A61P5/40 A61P15/08 A61P19/02 A61P1/16 A61P27/02 A61P25/00 A61P9/10 A61P25/28 A61K38/22 A61K31/7105 A61K31/713 A61K35/74 A61K31/429 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2878 C07K2317/92 A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P13/12 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/74 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/395 A61K47/42 A61K48/00 A61K49/16 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/565 C07K2317/75		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C C07K16/28 C12N15/00.A C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/39 A61K45/00 A61P37/04 A61K39/395.M A61K39/00.H A61K39/35 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.105 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P3/10 A61P17/06 A61P1/04 A61P37/02 A61P21/04 A61P5/14 A61P13/12 A61P17/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P19/04 A61P21/00 A61P5/40 A61P15/08 A61P19/02 A61P1/16 A61P27/02 A61P25/00 A61P9/10.101 A61P25/28 A61K37/24 A61K31/7105 A61K31/713 A61K35/74.A A61K31/429 G01N33/53.D		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/471459 2011-04-04 US 61/323720 2010-04-13 US		
其他公开文献	JP2013531970A5 JP2013531970A		

摘要(译)

公开了与人CD27和相关的基于抗体的组合物和分子结合的分离的单克隆抗体。还公开了使用抗体的治疗和诊断方法。

(表1) 選択した抗CD27mAbの特徴付け

mAb	ヒトCD27に 対する 最大半量の 結合(M)**	ヒトCD27に 対する 最大半量の 結合(µg/ml)**	サルCD27に 対する 最大半量の 結合(µg/ml)**	
1G5	4.9E-10	0.074	0.065	
1H8	4.3E-10	0.064	0.105	
3H12	5.7E-10	0.085	0.123	
3H8	4.6E-10	0.069	0.065	
2G9	4.3E-10	0.064	0.069	
1F5	3.9E-10	0.059	0.12	
3A10	6.3E-10	0.094	結合なし	
2C2	3.0E-10	0.045	0.034	