

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-505107

(P2017-505107A)

(43) 公表日 平成29年2月16日(2017.2.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-534136 (P2016-534136)
 (86) (22) 出願日 平成26年11月25日 (2014.11.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月25日 (2016.7.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/075578
 (87) 国際公開番号 W02015/075269
 (87) 国際公開日 平成27年5月28日 (2015.5.28)
 (31) 優先権主張番号 13382469.8
 (32) 優先日 平成25年11月25日 (2013.11.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 508157886
 コンセジョ スペリオール デ インベス
 ティガショネス シエンティフィカス
 スペイン国 マドリッド イー-2800
 6, 117, シー/セラノ
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100103447
 弁理士 井波 実
 (74) 代理人 100111730
 弁理士 伊藤 武泰
 (74) 代理人 100180873
 弁理士 田村 慶政

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CCR9に対する抗体およびその用途

(57) 【要約】

本発明は、CCR9に特異的に結合する、抗体およびその抗原結合断片に関する。それはまた、その使用、および前記抗体を使用する診断方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CCR9 に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片であって、

a) 少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含む重鎖であって、

- 配列番号：1 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - H1] またはその変異体；

- 配列番号：2 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - H2] またはその変異体；および

- 配列番号：3 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - H3] またはその変異体

から選択されるもの、および

b) 少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含む軽鎖であって、

- 配列番号：4 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - L1] またはその変異体；

- 配列番号：5 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - L2] またはその変異体；および

- 配列番号：6 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - L3] またはその変異体

から選択されるもの

を含んでなる、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記重鎖内に、配列番号：1～3 に示されているアミノ酸配列を含む CDR またはそれらの変異体から選択される CDR の 2 つを含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記重鎖内に、配列番号：1 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - H1] またはその変異体、配列番号：2 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - H2] またはその変異体、および配列番号：3 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - H3] またはその変異体を含む、請求項 1 または 2 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記軽鎖内に、配列番号：4～6 に示されているアミノ酸配列を含む CDR またはそれらの変異体から選択される CDR の 2 つを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記軽鎖内に、配列番号：4 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - L1] またはその変異体、配列番号：5 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - L2] またはその変異体、および配列番号：6 に示されているアミノ酸配列を含む CDR [CDR - L3] またはその変異体を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

a) 前記重鎖内に、配列番号：1 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - H1 と、配列番号：2 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - H2、および配列番号：3 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - H3 を含み、前記軽鎖内に、配列番号：4 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - L1、配列番号：5 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - L2、および配列番号：6 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - L3 とを含み、

あるいは、

b) 前記重鎖内に、配列番号：7 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - H1、配列番号：2 に示されているアミノ酸配列を含む CDR - H2、および配列番号：3 に示され

10

20

30

40

50

ているアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、前記軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号：9に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項7】

前記その抗原結合断片が、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc、ミニボディおよびダイアボディからなる群より選択されるものである、請求項1から6のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項8】

a) 請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸、および

b) 前記i)に定義される核酸の相補的核酸からなる群から選択される、核酸。

【請求項9】

請求項8に記載の核酸を含んでなる、ベクター。

【請求項10】

請求項8に記載の核酸または請求項9に記載のベクターを含んでなる、細胞。

【請求項11】

被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状を診断および/または予後予測するための方法であって、

a) 請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を、前記被験体由来の細胞を含むサンプルと接触させること、

b) 前記被験体由来のサンプルにおけるCCR9を検出および/または定量すること、

c) 前記被験体由来のサンプルにおいて検出されたCCR9の存在および/または量および/または分布を、対照サンプルにおいて検出されたものと比較すること、そして

d) 得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の存在と相関させること

を含んでなる、方法。

【請求項12】

治療中の被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応をモニタリングするためのインビトロ方法であって、

a) 請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を、第1の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第1のサンプルと接触させること、

b) 前記第1のサンプルにおけるCCR9を検出および/または定量すること、

c) 前記抗体またはその抗原結合断片を、第2の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第2のサンプルと接触させること、

d) 前記第2のサンプルにおけるCCR9を検出および/または定量すること、

e) 前記第1のサンプルおよび第2のサンプルにおいて検出されたCCR9の存在および/または量および/または分布を比較すること、そして

f) 得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応と相関させること

を含んでなる、インビトロ方法。

【請求項13】

医薬として用いられる、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項14】

CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に用いられる、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項15】

CCR9発現細胞が関与する前記疾患または症状が、T細胞急性リンパ芽球性白血病、

10

20

30

40

50

前立腺癌、乳癌、メラノーマ、固形腫瘍由来の循環細胞、クローン病、炎症性腸疾患、肝線維症および急性肝炎からなる群より選択される、請求項 1 1 に記載の診断および/もしくは予後予測するための方法、または請求項 1 2 に記載のモニタリングするためのインビトロ方法、または請求項 1 4 に記載の用途のための抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

治療有効量の少なくとも 1 つの請求項 1 から 7 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片を、薬学的に許容され得る賦形剤または担体とともに含んでなる、医薬組成物。

【請求項 1 7】

標的 C C R 9 発現細胞を殺傷するため、または標的 C C R 9 発現細胞を殺傷することを含む治療方法に使用するため、またはイメージング技術を用いた腫瘍診断であり、当該腫瘍が C C R 9 発現細胞 (C C R 9 ⁺) を含む腫瘍診断に使用するため、または C C R 9 発現細胞 (C C R 9 ⁺) を含む腫瘍に薬物をターゲティングするために使用するため、または炎症性疾患における C C R 9 発現細胞を除去することによる炎症性疾患の治療に使用するための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 1 8】

サンプル中の C C R - 9 タンパク質を検出、位置決定および/もしくは定量するためのバイオテクノロジー技術におけるツールとしての、またはサンプル中に存在する C C R 9 もしくは C C R 9 発現細胞の検出および/もしくは定量における、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片の使用。

【請求項 1 9】

サンプル中の C C R 9 または C C R 9 発現細胞の存在を検出および/または定量するためのインビトロ方法であって、

20

i) 前記試験サンプルを、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片と接触させること、

i i) 前記抗体またはその抗原結合断片との免疫複合体の形成を検出および/または定量すること

を含んでなる、インビトロ方法。

【請求項 2 0】

少なくとも 1 つの請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含んでなる、キット。

30

【請求項 2 1】

治療剤をさらに含んでなる、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 2】

- C C R 9 発現細胞が関与する疾患もしくは症状を診断および/もしくは予後予測するための、または

- 治療中の被験体における C C R 9 発現細胞が関与する疾患もしくは症状の治療に対する反応をモニタリングするための、または

- C C R 9 発現細胞が関与する疾患もしくは症状を治療するための、または

- C C R 9 ⁺ 細胞を含む腫瘍に薬物をターゲティングするための、または

- サンプルにおける C C R 9 タンパク質を検出、位置決定および/もしくは定量するためのバイオテクノロジー技術におけるツールとしての、または

40

- サンプル中に存在する C C R 9 もしくは C C R 9 発現細胞を検出および/もしくは定量するための、

請求項 2 0 または 2 1 のいずれかに記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、C C R 9 に特異的に結合する抗体、ならびにその使用、および前記抗体を使用する診断方法に関する。

【背景技術】

50

【0002】

ケモカインは、7つの膜貫通Gタンパク質共役型受容体に結合する構造的に関連する低分子タンパク質のファミリーである。ケモカインおよびその受容体は、恒常性状態および炎症状態の両方における器官形成およびリンパ球輸送において重要な役割を有する。ケモカイン受容体（例えば、CXCR4またはCCR7）の異常な腫瘍細胞発現と、癌の進行、器官選択的転移および予後不良との間には強い関連性がある。ヒトケモカイン受容体CCR9（GenBank受託番号U45982）は、Zaballosら（1999, J Immunol 162:5671-5; EMBL データベース受託番号AJ132337）およびYounら（1999, Blood 94:2533-6）によって同定された。CCR9については多くのデータがないが、腫瘍細胞上のその発現は、小腸における転移と相関する（Letsch et al., 2004, J Invest Dermatol 122:685-90; Richmond A, 2008, Clin Cancer Res 14:621-3; Amersi et al., 2008, Clin Cancer Res 14:638-45）。

10

【0003】

CCR9は、胸腺のリンパ系細胞、小腸の浸潤細胞、一部の循環メモリーTリンパ球（CCR9⁺ CD4⁺ CD7^{hi}）、IgA分泌形質細胞および形質細胞様樹状細胞においてのみ専ら発現している。唯一の公知のCCR9リガンドは、胸腺および小腸陰窩上皮由来の上皮細胞および樹状細胞によって分泌されるケモカインTECK（CCL25）である。CCR9-CCL25相互作用は、胸腺における胸腺細胞の遊走および腸管への細胞ホーミングの重要な調節因子である。卵巣癌、前立腺癌、乳癌およびメラノーマにおける異常なCCR9発現は、CCL25に応じたインビトロ侵襲性と相関する。急性T細胞系白血病および慢性T細胞系白血病におけるCCR9過剰発現は、疾患の悪性度に関連する。CCR9は、競争優位性を腫瘍細胞に提供する；CCL25の結合は、乳癌および卵巣癌において、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）/Akt経路を介して、細胞生存およびアポトーシス耐性を増強し、JNK1抗アポトーシス経路を活性化し、白血病細胞におけるNotch1を活性化することによって増殖を増強する。

20

【0004】

異種モデルにおいて成長中のヒトCCR9⁺腫瘍を治療するための特定の治療ツールは、毒素結合性リガンド（CCL25-PE38融合タンパク質）（Hu et al., 2011, Leukemia Res 35:1254-60）を使用すること、またはリガンド特異的抗体を単独でもしくは細胞傷害剤エトポシド（Sharma et al., 2010, Int J Cancer 127:2020-30）と組み合わせて使用することに限定されている。これらの戦略においては、腫瘍細胞を除去するために、CCL25-CR9相互作用をターゲティングしている；結果は限定的であったが、それらは、CCR9が、癌免疫療法の潜在的な標的であるという証拠を提供している。

30

【0005】

CCR9ターゲティング治療の欠如を考えると、CCR9を特異的に認識する薬剤であって、CCR9発現細胞を伴う疾患または症状の診断、予後予測および/または治療に適切な薬剤を提供することが、当技術分野において依然として必要である。

40

【発明の概要】

【0006】

一態様において、本発明は、CCR9に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片であって、

a) 少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む重鎖であって、

- 配列番号：1に示されているアミノ酸配列を含むCDR [CDR-H1] またはその変異体；

- 配列番号：2に示されているアミノ酸配列を含むCDR [CDR-H2] またはその変異体；および

- 配列番号：3に示されているアミノ酸配列を含むCDR [CDR-H3] またはその変

50

異体

から選択されるもの、および

b) 少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む軽鎖であって、

- 配列番号: 4に示されているアミノ酸配列を含むCDR [CDR-L1] またはその変異体;

- 配列番号: 5に示されているアミノ酸配列を含むCDR [CDR-L2] またはその変異体; および

- 配列番号: 6に示されているアミノ酸配列を含むCDR [CDR-L3] またはその変異体

から選択されるもの

を含んでなる抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0007】

別の態様において、本発明は、

i) 前記抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸、DNAまたはRNA、および

ii) 前記i)に定義される核酸の相補的核酸

からなる群から選択される核酸に関する。

【0008】

別の態様において、本発明は、前記核酸を含む遺伝子構築物に関する。

【0009】

別の態様において、本発明は、前記核酸または前記遺伝子構築物を含む発現カセットに関する。

【0010】

別の態様において、本発明は、前記核酸または前記遺伝子構築物または前記発現カセットを含んでなるベクターに関する。特定の実施形態において、前記ベクターは、発現ベクターである。

【0011】

別の態様において、本発明は、前記核酸または前記遺伝子構築物または前記発現カセットまたは前記ベクターを含んでなる細胞に関する。

【0012】

別の態様において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片を生産するための方法であって、前記抗体またはその抗原結合断片の産生を可能にする条件下において、前記細胞を成長させることを含んでなる方法に関する。

【0013】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状のインビトロ診断および/または予後予測のための、本発明の抗体の使用に関する。

【0014】

別の態様において、本発明は、被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状を診断および/または予後予測するための方法であって、

a) 前記抗体またはその抗原結合断片を、前記被験体由来の細胞を含むサンプルと接触させること、

b) 前記被験体由来のサンプル中のCCR9を検出および/または定量すること、

c) 前記被験体由来のサンプルにおいて検出されたCCR9の存在および/または量および/または分布を、対照サンプルにおいて検出されたものと比較すること、そして

d) 得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の存在と相関させること

を含んでなる方法に関する。

【0015】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測のための前記抗体もしくはその抗原結合断片の使用、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後

10

20

30

40

50

予測のための方法における前記抗体もしくはその抗原結合断片の使用に関する；あるいは、この態様は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状のインビボ診断および/または予後予測のための組成物の製造における前記抗体またはその抗原結合断片の使用と表現され得る。別の代替的な表現において、この態様は、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測に使用するための前記抗体もしくはその抗原結合断片、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測のための方法に使用するための前記抗体もしくはその抗原結合断片と表現され得る。

【0016】

別の態様において、本発明は、治療中の被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応をモニタリングするためのインビトロ方法であって、

a) 本発明の抗体を、第1の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第1のサンプルと接触させること、

b) 前記第1のサンプル中のCCR9を検出および/または定量すること、

c) 本発明の抗体を、第2の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第2のサンプルと接触させること、

d) 前記第2のサンプル中のCCR9を検出および/または定量すること、

e) 前記第1のサンプルおよび第2のサンプルにおいて検出されたCCR9の存在および/または量および/または分布を比較すること、そして

f) 得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応と

を関連させること
を含んでなるインビトロ方法に関する。

【0017】

別の態様において、本発明は、医薬として使用するための前記抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0018】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に使用するための前記抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0019】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療のための医薬の調製における前記抗体またはその抗原結合断片の使用に関する。

【0020】

別の態様において、本発明は、疾患の治療方法に使用するための前記抗体またはその抗原結合断片の使用であって、前記治療方法が、標的細胞（すなわち、CCR9発現細胞（CCR9⁺））を殺傷することを含む使用；またはあるいは、疾患の治療のための医薬の製造における抗体またはその抗原結合断片の使用であって、前記治療が、標的細胞を殺傷することを含む使用に関する。

【0021】

別の態様において、本発明は、イメージング技術を用いた腫瘍診断に使用するための前記抗体またはその抗原結合断片であって、前記腫瘍がCCR9発現細胞（CCR9⁺）を含む使用、またはあるいはイメージング技術を用いたインビボ腫瘍診断のための組成物の製造における前記抗体またはその抗原結合断片の使用であって、前記腫瘍がCCR9発現細胞（CCR9⁺）を含む使用に関する。

【0022】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞（CCR9⁺）を含む腫瘍に薬物をターゲットングするために使用するための前記抗体またはその抗原結合断片、またはあるいはCCR9発現細胞（CCR9⁺）を含む腫瘍に薬物をインビボターゲットングするための組成物の製造における前記抗体またはその抗原結合断片の使用に関する。

【0023】

別の態様において、本発明は、炎症性疾患におけるCCR9発現細胞を除去することに

よる炎症性疾患の治療に使用するための前記抗体またはその抗原結合断片、またはあるいはCCR9発現細胞を除去することによって炎症性疾患を治療するための医薬組成物の製造における前記抗体またはその抗原結合断片の使用に関する。

【0024】

別の態様において、本発明は、サンプル中のCCR-9タンパク質を検出、位置決定および/または定量するためのバイオテクノロジー技術におけるツールとしての前記抗体またはその抗原結合断片の使用に関する。

【0025】

別の態様において、本発明は、サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞の検出および/または定量における前記抗体またはその抗原結合断片の使用に関する。

10

【0026】

別の態様において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片を使用することによって、サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞を検出および/または定量するための方法に関する。

【0027】

別の態様において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片の少なくとも1つを含んでなるキットに関する；特定の実施形態において、前記キットは、前記抗体またはその抗原結合断片に加えて、さらなる治療剤を含む。

【0028】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状を診断するための、または治療中の被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状の治療に対する反応をモニタリングするための、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状を治療するための、またはCCR9⁺細胞を含む腫瘍に薬物をターゲティングするための、またはサンプル中のCCR9タンパク質を検出、位置決定および/もしくは定量するためのバイオテクノロジー技術におけるツールとしての、またはサンプル中に存在するCCR9もしくはCCR9発現細胞を検出および/もしくは定量するための、前記キットの使用に関する。

20

【0029】

別の態様において、本発明は、薬学的に許容され得る賦形剤または担体と一緒に、治療有効量の少なくとも前記抗体またはその抗原結合断片を含む医薬組成物に関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1AB】91R mAbは、ヒトケモカイン受容体CCR9に特異的である。(A) hCCR9、mCCR9、hCCR4、hCCR5、hCCR6、hCCR8(白色のヒストグラム)または空のpCIneoベクター(灰色のヒストグラム)によって安定トランスフェクトしたHEK293細胞を91R mAbによって染色し、フローサイトメトリーによって分析した。(B)抗ヒトCCR9 mAb 91Rおよび112509(白色のヒストグラム)またはアイソタイプ適合対照mAb(灰色のヒストグラム)によってヒト白血病MOLT-4およびJurkat細胞を染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

40

【図1CD】(C)様々な用量(0.12~10 μ g/ml)の91R(灰色のヒストグラム)、112509(白色のヒストグラム)またはアイソタイプ適合mAb(灰色の線)によって染色したMOLT-4の代表的なフローサイトメトリー分析(n=5)。(D)抗CD4、-CD8および91R抗体を使用したヒト胸腺細胞のフローサイトメトリー分析。CD4/CD8プロットのゲートにおける陽性細胞の割合が示されている；各亜集団について、hCCR9発現が示されている。

【図1E】(E)91Rおよび抗CD3によって染色したヒト末梢血細胞を示すフローサイトメトリー、リンパ球ゲートにおける全細胞集団およびCD3対91R染色。(F)91Rと共にインキュベートしたhCCR9-またはpCIneoトランスフェクトHEK293細胞、MOLT-4およびJurkat細胞の膜濃縮画分の代表的なウエスタンブ

50

ロット；ローディング対照として抗CD71 Abによって同じ膜をプローブした（ $n = 3$ ）。

【図2】91R mAbは、ヒトCCR9 N末端ドメインを認識する。（A）ヒトおよびマウスCCR9、ならびにN末端ドメイン（Nt）をマウス配列によって置換したヒトCCR9（mNt/hCCR9）の配列を有するキメラCCR9ダイアグラム；91R mAb（抗hCCR9；白色のヒストグラム）、ウサギポリクローナルK629（抗mCCR9；白色のヒストグラム）およびウサギ対照Ab（灰色のヒストグラム）を用いたフローサイトメトリー。（B）pCIneo-、hCCR9-HEKおよびMOLT-4細胞由来の膜濃縮溶解物を、91Rおよび抗CD71 Ab（ローディング対照として）によるウエスタンブロットに使用した。示されている場合、細胞溶解物をPNGase処理して、N-グリコシル化残基を除去した。代表的な実験を示す（ $n = 2$ ）。

10

【図3】ヒトCCL25は、MOLT-4細胞に対する結合について91R mAbと部分的に競合する。単独で、または $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ hCCL25もしくはhCXCL12（40分間、4）と共にプレインキュベートし、91Rまたはアイソタイプ適合mAbによって染色したヒトMOLT-4細胞の代表的なフローサイトメトリー分析（ $n = 3$ ）。

【図4ABCD】91R mAbによって処理したマウスにおいて、白血病異種移植片の成長は阻害される。異種移植片分析において、0日目（d0）に、MOLT-4細胞をRag2^{-/-}マウスに皮下（s.c.）接種した。91Rまたは非関連IgG2b mAb（1回目および2回目 $4 \text{ mg}/\text{kg}$ ；3回目および4回目 $2 \text{ mg}/\text{kg}$ ）を実験群に4回腹腔内（i.p.）投与した。キャリパーによって、腫瘍成長を3日ごとに測定した。マウスを屠殺した後、腫瘍を摘出し、計量した。（A）各脇腹に注射した腫瘍細胞を担持するマウスの、1日目、7日目、14日目および21日目における抗体投与スケジュール。（B）腫瘍成長速度（tumor growth kinetics）。示されている時点において、腫瘍体積を測定し、 $V = [\text{軸直径の長さ、mm}] \times [(\text{回転直径、mm})^2 / 2]$ （マウス6匹/群）として計算した。（C）d56におけるIgG2b処理に対する腫瘍重量（%）。平均 \pm SEM（ $n =$ マウス6匹/群）。（D）屠殺時点（56日目）におけるIgG2b-および91R処理したマウス由来の腫瘍の画像。バー = 1 cm。

20

【図4EFGH】（E）一方の脇腹に注射したマウスの、7日目、14日目、21日目および28日目における抗体投与スケジュール。（F）Cのように、腫瘍体積を計算した（マウス10匹/群）。（G）d72におけるIgG2b処理に対する腫瘍重量の割合。結果は、平均 \pm SEMを示す（ $n =$ マウス10匹/群）。（H）屠殺時点（72日目）におけるIgG2b-および91R処理したマウス由来の腫瘍の画像。バー = 1 cm。スチューデントのt検定、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

30

【図5ABC】白血病異種移植片の成長の91R mAb誘導性減少の短期速度。（A）d0にRag2^{-/-}マウスの各脇腹に皮下接種した発光MOLT-4細胞（MOLT-4-luc）を使用した処理スケジュール。d1（ $4 \text{ mg}/\text{kg}$ ）およびd6（ $2 \text{ mg}/\text{kg}$ ）に、91Rまたは対照IgG2b mAbを実験群に腹腔内接種した。1~28日目に、発光イメージングを分析した；d62にマウスを屠殺し、腫瘍を摘出した。（B）細胞接種後の示されている時点における各群の代表的なマウスの画像。（C）腫瘍移植後の腫瘍成長速度。相対生物発光単位を平均 \pm SEMとして示す。

40

【図5DE】（D）d62におけるIgG2b処理に対する腫瘍負荷の割合。結果は、平均 \pm SEMを示す。（E）マウス1匹当たりの腫瘍重量。データは、平均 \pm SEMを示す。C~E、 $n =$ マウス7匹/群。スチューデントのt検定、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図6AB】91R mAbは、腫瘍異種移植片において、アポトーシスおよび壊死を促進し、細胞増殖および血管新生を減少させる。（A~D）異種移植MOLT-4腫瘍の組織学的分析（ $n =$ マウス5匹/群）。（A）91Rまたは対照IgG2b mAbによって処理した異種移植MOLT-4腫瘍由来のヘマトキシリン/エオシン染色切片；バー = 2 mm。右、高倍率の画像；バー = 25 μm 。（B）グラフは、腫瘍当たりの壊死領域の

50

割合として表した壊死段階による腫瘍分類を示す (< 1%、1 ~ 30%および > 30%)。カイ二乗検定、*** $p < 0.0001$ 。

【図6C】(C) TUNELアッセイによって、腫瘍におけるアポトーシスレベルを分析した。PCNA免疫染色によって、増殖レベルを決定した。CD31染色によって、血管を検出した。組織切片をDAPI対比染色した。バー = 50 μm 。

【図6D】(D) 光学視野当たりのTUNEL - およびPCNA陽性核および血管の定量分析。マンホイットニー検定、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図7AB】91R mAbは、ヒト白血病MOLT-4細胞におけるインビトロ補体依存性細胞傷害を促進する。91Rまたはアイソタイプ適合mAb (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30分間、37) によってMOLT-4細胞をオプソニン化し、洗浄し、25%活性 (37) または不活性 (56) 仔ウサギ補体 (BRC) と共にインキュベート (1時間) した; 7AAD染色によるフローサイトメトリーによって、細胞生存を評価した。(A) 抗体の非存在下における、または91R、112509mAbもしくはアイソタイプ適合mAb (IgG2aまたはIgG2b) による特異的補体溶解。各条件を3回反復で分析した。データは、4回の独立した実験の平均 \pm SEMを示す。(B) 示されている濃度の91Rおよび対照IgG2bを使用した特異的補体溶解の用量反応曲線。データは、4回のうちの1回の代表的な実験の平均 \pm SEMを示す。

【図7CD】(C) BRCへの曝露時間の効果。データは、2回のうちの1回の代表的な実験の平均 \pm SEMを示す (3回反復)。(D) BRCの用量反応曲線における特異的補体溶解。データは、2回のうちの1回の代表的な実験の%平均 \pm SEMを示す (3回反復)。スチューデントのt検定、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図8AB】92R mAbは、内因性ケモカイン受容体CCR9を発現するヒトT細胞を特異的に認識し、CCR9結合について91Rと競合する。(A) 抗ヒトCCR9 mAb 92R (白色のヒストグラム) またはアイソタイプ適合対照mAb (灰色のヒストグラム) によってヒトT細胞白血病MOLT-4およびJurkat細胞を染色し、フローサイトメトリーによって分析した。(B) 91R mAbは、MOLT-4細胞に対する結合について92R mAbと競合する。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mAb (対照IgG2b、92Rまたは91R) と共にプレインキュベートし、ビオチン標識92R mAb (92R - Biot) とそれに続いてFITC結合アビジンによって染色したMOLT-4細胞の代表的なフローサイトメトリー分析。

【図8C】(C) mAb 91Rおよび92Rは、hCCR9アミノ酸2 ~ 22を含む合成ペプチドに対する結合について互いに競合する。hCCR9のアミノ酸2 ~ 22に対応する合成ペプチドによってELISAプレートをコーティングした。PBSと共にインキュベートした後、対照IgG2b、92Rまたは91R、91R - Biotまたは92R - Biot mAbを追加した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合アビジンによってプレートを現像した。データは、1回の代表的な実験の平均 \pm SEMを示す。スチューデントのt検定、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図9】91R、92Rおよび3C3 mAbの6つのCDRの配列アライメント。91R、92Rおよび3C3 mAbの6つのCDR (CDR - H1、CDR - H2、CDR - H3、CDR - L1、CDR - L2、CDR - L3) のアミノ酸配列をアライメントした。キー: 「*」は、同一の残基を表す; 「:」は、保存的置換を表す; 「.」は、半保存的置換を表す。

【図10】91Rおよび3C3 mAbは、内因性ケモカイン受容体CCR9を発現するヒトT細胞、およびhCCR9トランスフェクトHEK-293細胞を特異的に認識する。(A) 91Rおよび3C3 mAbは、MOLT4細胞 (CCR9 + ヒト急性リンパ芽球性白血病T細胞株) に特異的に結合する。アイソタイプ適合対照mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、灰色のヒストグラム) または抗ヒトCCR9 mAb 91Rまたは3C3 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、白色のヒストグラム) によって、ヒト白血病MOLT-4 (hCCR9+) お

10

20

30

40

50

よび Jurkat (hCCR9-) 細胞 (細胞 2×10^5 個/ウェル) を染色した。洗浄した後、PE 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体と共に細胞をインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。1回の代表的な実験を示す ($n = 3$)。 (B) 91R および 3C3 mAb は、hCCR9 トランスフェクト HEK-293 の異なる認識パターンを有する。特に、3C3 mAb は、モックトランスフェクト細胞に対する非特異的結合が 91R mAb よりも多い。hCCR9 または空 pCIneo ベクターによって安定トランスフェクトしたヒト HEK-293 細胞 (細胞 2×10^5 個/ウェル) を、アイソタイプ適合対照 mAb ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、灰色のヒストグラム) または抗ヒト CCR9 mAb 91R もしくは 3C3 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、白色のヒストグラム) によって染色した。洗浄した後、PE 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体と共に細胞をインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。1回の代表的な実験を示す ($n = 2$)。

10

【図 11】ELISA プレートにおける hCCR9 由来ペプチドに対する 91R および 3C3 mAb の結合。hCCR9 のアミノ酸 2~22 (配列番号: 11) および 13~30 (配列番号: 12) に対応する合成ペプチド、ペプチド BOT (無関係な対照合成ペプチド)、ヤギ抗マウス 軽鎖抗体 (GaM LC) またはウシ血清アルブミン (BSA) によって、プレートをコーティングした。BSA によってブロッキングした後、3C3、91R、BOT またはアイソタイプ対照 mAb を追加した。洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンを追加し、インキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、OPD および H_2O_2 によって現像した。490 nm の吸光度を測定することによって、結果を定量した。ブランクを控除しなかった。1回の代表的な実験を示す ($n = 2$)。

20

【図 12】91R、92R および 3C3 mAb ならびに MOLT4 細胞を使用した競合結合アッセイ。50 μl の PBSS (灰色のヒストグラム) または 3C3、91R、92R もしくはアイソタイプ対照 mAb ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、白色のヒストグラム) と共に MOLT4 細胞 (細胞 2×10^5 個/ウェル) をプレインキュベートした。4 において 30 分間経過した後、50 μl のビオチン標識 3C3、91R または 92R mAb ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を追加し、さらに 20 分間インキュベートし続けた。洗浄した後、PE 標識アビジンと共に細胞をインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。1回の代表的な実験を示す ($n = 2$)。

30

【図 13】CCR9 リガンド CCL25 によって、MOLT-4 細胞の遊走の遮断が誘導される。5 μm トランスウェルインサートを使用して、MOLT-4 細胞の遊走に対する抗 CCR9 抗体の効果を調べた。単独で、またはアイソタイプ対照、91R もしくは 3C3 mAb ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共に予めプレインキュベートした 3×10^5 個の MOLT-4 細胞を、200 nM CCL25 を含有する培地にプレーティングし、遊走させた。3 時間後、遊走した細胞の数を、フローサイトメーターを使用して評価した。データは、1回の代表的な実験の平均 \pm SEM を示す (4 回反復) ($n = 2$)。スチューデントの t 検定、*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【発明を実施するための形態】

【0031】

40

本発明の抗体

本発明は、CCR9 に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片 (以下、「本発明の抗体」) であって、

i) 少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含む重鎖であって、

- 配列番号: 1 に示されているアミノ酸配列 (NFWMN) を含む CDR [CDR-H1] またはその変異体;

- 配列番号: 2 に示されているアミノ酸配列 (EIRLKSNNYATHYAESVKG) を含む CDR [CDR-H2] またはその変異体; および

- 配列番号: 3 に示されているアミノ酸配列 (DGWFAY) を含む CDR [CDR-H3] またはその変異体

50

から選択されるもの、および

i i) 少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む軽鎖であって、

- 配列番号: 4に示されているアミノ酸配列(RSSQSLLSNGNTYVQ)を含むCDR[CDR-L1]またはその変異体;

- 配列番号: 5に示されているアミノ酸配列(KVSNRFP)を含むCDR[CDR-L2]またはその変異体;および

- 配列番号: 6に示されているアミノ酸配列(AQSTHVPR T)を含むCDR[CDR-L3]またはその変異体

から選択されるもの

を含んでなる抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

【0032】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号: 1~3に示されているアミノ酸配列を含むCDRまたはそれらの変異体から選択されるCDRの2つを含む。

【0033】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号: 1に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-H1]またはその変異体、配列番号: 2に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-H2]またはその変異体、および配列番号: 3に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-H3]またはその変異体を含む。

【0034】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号: 1に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-H1]、配列番号: 2に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-H2]、および配列番号: 3に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-H3]を含む。

20

【0035】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖内に、配列番号: 4~6に示されているアミノ酸配列を含むCDRまたはそれらの変異体から選択されるCDRの2つを含む。

【0036】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖内に、配列番号: 4に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-L1]またはその変異体、配列番号: 5に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-L2]またはその変異体、および配列番号: 6に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-L3]またはその変異体を含む。

30

【0037】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖内に、配列番号: 4に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-L1]、配列番号: 5に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-L2]、および配列番号: 6に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-L3]を含む。

【0038】

本発明の抗体は、その特徴が前述されているCDR配列の任意の組み合わせを含有し得る;それにもかかわらず、好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号: 1に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号: 2に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号: 3に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、軽鎖内に、配列番号: 4に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号: 5に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号: 6に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

40

【0039】

より好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号: 1に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H1、配列番号: 2に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H2、および配列番号: 3に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H3を含み、軽鎖内に、配列番号: 4に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L1、

50

配列番号：5に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L2、および配列番号：6に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L3を含み、これは、実施例において91RmAbとして同定した抗体に対応する。

【0040】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：7、2および3に示されているアミノ酸配列を含むCDRまたはそれらの変異体から選択されるCDRの2つを含む。

【0041】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：7に示されているアミノ酸配列(KFWMN)を含むCDR[CDR-H1]またはその変異体、配列番号：2に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-H2]またはその変異体、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列を含むCDR[CDR-H3]またはその変異体を含む。

10

【0042】

別の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：7に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-H3]、配列番号：2に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-H2]、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-H3]を含む。

【0043】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖内に、配列番号：8～10に示されているアミノ酸配列を含むCDRまたはそれらの変異体から選択されるCDRの2つを含む。

20

【0044】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列(RSSQSLVHSNGNTYLN)を含むCDR[CDR-L1]またはその変異体、配列番号：9に示されているアミノ酸配列(KVSNRFS)を含むCDR[CDR-L2]またはその変異体、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列(SQSTHFPRRT)を含むCDR[CDR-L3]またはその変異体を含む。

【0045】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-L1]、配列番号：9に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-L2]、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列からなるCDR[CDR-L3]を含む。

30

【0046】

本発明の抗体は、その特徴が前述されているCDR配列の任意の組み合わせを含有し得る；それにもかかわらず、好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：7に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号：2に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号：9に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

40

【0047】

より好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：7に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H1、配列番号：2に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H2、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H3を含み、軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L1、配列番号：9に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L2、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L3を含み、これは、実施例において92RmAbとして同定した抗体に対応する。

【0048】

50

本明細書において使用される用語「抗体」は、「抗原」と称される特定のタンパク質に対して特異的な結合活性を示す糖タンパク質を指す。用語「抗体」は、全モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、またはそれらの断片を含み、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト起源の抗体を含む。「モノクローナル抗体」は、単一の部位または抗原「決定基」に対する均一で高特異的な抗体集団である。「ポリクローナル抗体」は、異なる抗原決定基に対する不均一な抗体集団を含む。

【0049】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、非ヒト起源、好ましくはマウス起源の抗体である。別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、ポリクローナル抗体である。

10

【0050】

本発明の抗体は、任意のアイソタイプのものであり得る。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの所望のエフェクター機能を指針とするであろう。例示的なアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4である。ヒト軽鎖定常領域、またはのいずれかを使用し得る。所望であれば、公知の方法によって、本発明のCCR9抗体のクラスをスイッチし得る。

【0051】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒト起源の抗体またはヒト化抗体である。

【0052】

本発明の抗体は、CCR9に特異的に結合する。本明細書において使用される用語「CCR9」または「CCR9ケモカイン受容体」は、ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体9を指す。CCR9を指定するための他の用語としては、GPR28; CDw199; GPR-9-6; CC-CR-9が挙げられる。特定のCCR9リガンドは、CLL25である。ケモカイン受容体CCR9は、ほとんどの小腸粘膜固有層および上皮内リンパ球、ならびにごく一部の末梢血リンパ球において発現している。この受容体は、胸腺、小腸粘膜固有層および上皮内リンパ球の大部分、ごく一部の末梢血リンパ球、ならびに循環中に存在する一部の記憶T細胞₄において発現している。それはまた、IgA分泌B細胞、マクrophageおよび形質細胞様樹状細胞において発現している。CCR9発現は、T細胞急性リンパ芽球性白血病細胞、前立腺癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞およびメラノーマ細胞において報告されている。CCR9陽性細胞は、急性肝炎、炎症性腸疾患およびクローン病の病因において重要である。CCR9をコードする遺伝子について、CCR9アイソフォームAおよびCCR9アイソフォームBをもたらす2つの選択的スプライシング転写産物変異体が記載されている(それぞれSwiss-Prot受託番号NP_112477.1およびNP_001243298.1、20th September 2013)。

20

30

【0053】

CCR9は、N末端細胞外ドメイン(Nt)、7個の膜貫通ドメイン、3個の細胞内ドメイン、3個の細胞外ドメインおよび細胞内C末端ドメイン(Ct)に対応する15個のドメインから構成される(図2A)。特定の実施形態において、本発明の抗体は、CCR9アイソフォームAのN末端細胞外ドメイン(Nt)のアミノ酸2~22(配列番号:11)を含有するエピトープに特異的に結合する

40

【0054】

本発明の抗体は、様々な哺乳動物種由来のCCR9抗原に対するものであり得る。本発明に適切な哺乳動物の非限定的な例としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ロバまたは非ヒト霊長類、例えばサル(例えば、カニクイザルまたはアカゲザル)または類人猿(例えば、チンパンジー)およびヒトが挙げられる。特定の実施形態において、CCR9は、ヒト起源のものである。

【0055】

抗体の基本構造単位は、四量体を含むことが周知である。各四量体は、ポリペプチド鎖

50

の2つの同一のペアから構成され、これらはそれぞれ、軽鎖(25kDa)および重鎖(50~75kDa)から構成される。各鎖のアミノ末端領域は、抗原認識に關与する約100~110アミノ酸以上の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端領域は、エフェクター機能を媒介する定常領域を含む。軽鎖および重鎖の各ペアの可変領域は、抗体の結合部位を形成する。したがって、インタクトな抗体は、2つの結合部位を有する。軽鎖は、またはとして分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ および α として分類され、それらは、抗体のアイソタイプをそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEと規定する。

【0056】

軽鎖および重鎖の各ペアの可変領域は、抗体の結合部位を形成する。それらは、相補性決定領域(CDR)と称される3つの超可変領域によって連結された比較的保存された領域から構成される同一般構造を特徴とする(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD.; Chothia and Lesk, 1987, J Mol Biol 196:901-17)。本明細書において使用される用語「相補性決定領域」または「CDR」は、このタンパク質が抗原の形状と相補的である抗体内領域を指す。したがって、CDRは、特定の抗原に対するタンパク質の親和性(およびその結合強度)および特異性を決定する。各ペアの2本の鎖のCDRは、フレームワーク領域によってアライメントされて、特定のエピトープに結合する機能を獲得する。その結果、重鎖および軽鎖は両方とも、3つのCDR(それぞれCDRH1、CDRH2、CDRH3およびCDRL1、CDRL2、CDRL3)を特徴とする。

10

20

【0057】

CDR配列は、従来の基準にしたがって、例えばIgBLASTの基準：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>(Ye et al., 2013, Nucleic Acids Res 41(Web Server issue:W34-40))によって、本出願において使用されているようにKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に示されているナンバリングにしたがって、またはChothia et al. (1989, Nature 342:877-83)に示されているナンバリングにしたがって決定され得る。

30

【0058】

本明細書において使用される本発明の抗体は、全長抗体(例えば、IgG)だけではなく、その抗原結合断片、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、非ヒト起源の抗体、組換え抗体、および遺伝子工学技術によって生産される免疫グロブリン由来のポリペプチド、例えば単鎖Fv(scFv)、ダイアボディ、重鎖もしくはその断片、軽鎖もしくはその断片、V_Hもしくはその二量体、V_Lもしくはその二量体、ジスルフィド架橋によって安定化されたFv断片(dsFv)、単鎖可変領域ドメインを有する分子(Abs)、ミニボディ(minibody)、scFv-Fc、および抗体を含む融合タンパク質、または所望の特異性の抗原認識部位を含む任意の他の改変型免疫グロブリン分子を包含する。本発明の抗体はまた、二重特異性抗体であり得る。抗体断片は、抗原結合断片を指し得る。抗体は、任意のクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG(またはそれらのサブクラス)およびIgMの抗体を含み、抗体は、任意の特定のクラスのものでもよい。加えて、本発明の抗体はまた、さらなる化合物、例えば治療剤、毒素などにコンジュゲートされ得る。

40

【0059】

多くのアプローチは、臨床用途または他の用途のために免疫グロブリンの特性を改善することを目的として、免疫グロブリンの遺伝的特徴および構造についての十分な知識など

50

の分子生物学および遺伝子工学を利用して免疫グロブリン分子の様々な改変を構築する。それらのアプローチの中には、使用すべき種において分子の免疫原性を低減する傾向を有するものもあり、得られた分子は、この種とより相同な配列を有する。健常なヒトにおける倫理的に許容できない手順を避けて、ヒト由来の m A b を得るために、様々な方法が使用されている。他のアプローチにおいては、例えば、固形腫瘍内への分子の分散を改善するために、分子量およびサイズが低減される。他の可能性としては、2つ以上の標的分子（二重特異性抗体または三重特異性抗体など）に対する結合ドメインの分子内における結合、または所望の機能を有する他の分子（例えば、毒剤、ホルモン、成長因子、免疫調節剤（免疫抑制剤または免疫刺激剤）、細胞成長阻害剤など）と、抗体または断片との結合である。一般に、得られたすべての分子は、抗体の少なくとも1つの可変ドメインを保持しており、このドメインにより、抗原-抗体結合の特異性および親和特性が高くなる。

10

【0060】

このような抗体は、ハイブリドーマ培養、細菌または哺乳動物細胞培養における組換え発現、およびトランスジェニック動物における組換え発現を含む様々な方法によって生産され得る。特定の生産方法の選択について、文献、例えば Chadd and Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12: 188-194 (2001) において十分なガイダンスがある。製造方法の選択は、所望の抗体構造、抗体上の炭水化物部分の重要性、培養および精製の容易性、ならびに費用を含むいくつかの要因に依存する。標準的な発現技術を使用して、全長抗体、抗体断片（例えば、F a b および F v 断片）、ならびに異なる種由来の成分を含むキメラ抗体を含む多くの異なる抗体構造を作製し得る。エフェクター機能を有さず、限られた薬物動態活性を有する小型抗体断片（例えば、F a b および F v 断片）は、細菌発現系において作製され得る。単鎖 F v 断片は、低い免疫原性を示し、血液から迅速に排除される。

20

【0061】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、CCR9に結合する能力を保持するモノクローナル抗体または前記抗体の断片である。前記抗体は、好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0062】

したがって、特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒト抗体である。別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒト化抗体である。別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、キメラ抗体である。

30

【0063】

ヒト化抗体：

「ヒト化抗体」は、非ヒト抗体、典型的にはマウス抗体由来の抗体を意味し、この抗体は、親抗体の抗原結合特性を保持するが、ヒトにおける免疫原性はより低い。これは、(a) ヒト定常領域上に非ヒト可変ドメイン全体をグラフトし、キメラ抗体を生成すること、(b) 重要なフレームワーク残基を保持して、または保持しないで、非ヒト相補性決定領域(CDR)のみをヒトフレームワーク領域および定常領域内へグラフトすること、および(c) 非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によってそれらをヒト様部分で「覆う(cloaking)」こと、を含む様々な方法によって達成され得る。

40

【0064】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当技術分野において説明されている。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と称され、典型的には「インポート」可変ドメインから採取される。

【0065】

ヒト化は、本質的には、Winterおよび共働者らの方法(Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988))にしたがって

50

、ヒト抗体の対応する配列を超可変領域配列に置換することにより行うことができる。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基と、おそらくはいくつかのフレームワーク領域（FR）残基が、齧歯類抗体における相同部位からの残基で置換されているヒト抗体である。ヒト化抗体を作製する際に使用すべき（重鎖および軽鎖の両方の）ヒト可変ドメインの選択は、抗原に対する特異性および親和性を保持しつつ、免疫原性を低減するために非常に重要である。いわゆる「最適な」方法にしたがって、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してスクリーニングされる。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒトの配列は、ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域（FR）として認められる（Suns et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)）。別の方法においては、軽鎖または重鎖の特定サブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定フレームワーク領域が使用される。同じフレームワークは、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用され得る（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)）。

【0066】

抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持しつつ抗体をヒト化することはさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列および様々な概念上のヒト化生成物の分析プロセスによって調製される。

【0067】

抗体をよりヒトに類似させるといふこのアプローチにおけるさらなる工程は、いわゆる霊長類化抗体、すなわち、サル（または他の霊長類）抗体、特に、カニクイザル抗体の重鎖および軽鎖可変ドメインを含有するように改変され、ヒト定常ドメイン配列、好ましくはヒト免疫グロブリンガンマ1またはガンマ4定常ドメイン（またはPE変異体）を含有する組換え抗体を調製することである。このような抗体の調製は、Newman et al., Biotechnology, 10:1458-1460 (1992); 米国特許第5,658,570号および米国特許第6,113,898号に記載されている。これらの抗体は、ヒト抗体と高い相同性、すなわち85~98%の相同性を呈するものとして報告されており、ヒトエフェクター機能を示し、免疫原性が低下しており、ヒト抗原に対して高い親和性を示し得る。組換え抗体を作製するための別の非常に効率的な手段は、Newman, Biotechnology, 10:1455-1460 (1992)に開示されている。

【0068】

ヒト抗体：

「ヒト抗体」は、公知の標準的な方法のいずれかによって生産される、ヒトの軽鎖および重鎖、ならびに定常領域を完全に含有する抗体を意味する。

【0069】

ヒト化に替わり得るものとして、ヒト抗体を作製することができる。例えば、免疫化により、内因性免疫グロブリンを産生せずにヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生産することが現在可能である。例えば、キメラ型生殖系変異体マウスにおける抗体の重鎖結合領域PH遺伝子のホモ接合体が欠失することにより、内因性抗体の生成が完全に阻害されることが説明されている。ヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子アレイをこのような生殖系変異体マウスに移入することにより、免疫化後にヒト抗体が生成される。例えば、Jakobovits et al., Proc. Mad. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993), Lonberg, 2005, Nature Biotech. 23:1117-25を参照のこと。

【0070】

ヒト抗体はまた、インビトロ活性化B細胞、またはその免疫系をヒト細胞によって再構成したSCIDマウスによって生成され得る。

【0071】

ヒト抗体が得られたら、そのDNAコード配列を単離し、クローニングし、好ましくは哺乳類からの適切な発現系、すなわち細胞系に導入し、その後発現させて、抗体が単離され得る培養培地内にそれを遊離させる。

【0072】

抗体断片：

抗体断片は、例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'およびscFvなどの抗体断片である。抗体断片を生産するために、様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクトな抗体をタンパク分解することにより得られていたが、より近年においては、これらの断片は、組換え宿主細胞によって直接産生され得る。他の実施形態において、最適な抗体は、さらに単一特異性または二重特異性であり得る単鎖Fv(scFv)断片である。

10

【0073】

抗体のパイニン分解により、それぞれが単一の抗原結合部位を有する2つの同じ抗原結合断片(「Fab」断片と称される)と、残りの「Fc」断片(この名称は、容易に結晶化するというこの断片の能力を反映している)とが生成される。ペプシン処理によりF(ab')₂断片が生成され、この断片は2つの抗原結合部位を有し、抗原を依然として架橋することができる。

20

【0074】

「Fv」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含有する最小抗体断片である。この領域は、1つの重鎖可変領域と1つの軽鎖可変領域とが強固に、非共有的に結合した二量体からなる。各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、V_H-V_L二量体の表面上に抗原結合部位を規定するのは、この構成においてである。集約すると、6つの超可変領域は、抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(または、抗原に特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分)は、抗原を認識し、結合する能力を有するが、結合部位全体よりも親和性が低い。

30

【0075】

Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインと、重鎖の第1定常ドメイン(CH1)とを含有する。Fab'断片は、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含むいくつかの残基が付加されている点がFab断片と異なる。Fab'-SHは、本明細書においては、定常ドメインの1つ以上のシステイン残基が少なくとも1つの遊離チオール基を有するFab'についての名称である。F(ab')₂抗体断片は、元来、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片対として生産されていた。抗体断片の他の化学的カップリングも公知である。

【0076】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、さらに、V_HおよびV_Lドメインの間にポリペプチドリッカーを含み、これによりscFvは抗原結合のための望ましい構造を形成することができる。scFvの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994)を参照のこと。

40

【0077】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小型抗体断片であって、同ポリペプチド鎖(V_H-V_L)において軽鎖可変ドメイン(V_L)に接合された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む小型抗体断片を指す。同じ鎖上の2つのドメイン間におけるペアリン

50

グを可能にするには短いリンカーを使用することにより、これらのドメインは別の鎖の相補的ドメインとのペアリングを余儀なくされ、2つの抗原結合部位を形成する。ダイアボディは、例えば、欧州特許出願公開第404,097号；国際公開第93/11161号；およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)においてより詳細に記載されている。

【0078】

本発明内に含まれるCCR9受容体に結合する抗体の機能的断片は、それらが由来する全長抗体の少なくとも1つの結合機能および/または調節機能を保持する。好ましい機能的断片は、対応する全長抗体の抗原結合機能（例えば、哺乳類CCR9受容体に結合する能力）を保持する。

10

【0079】

二重特異性抗体：

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、CCR9の2つの異なるエピトープに結合し得る。他のこのような抗体は、CCR9に結合し、第2の細胞表面マーカーに結合し得る。二重特異性抗体はまた、細胞傷害剤をCCR9発現細胞に局在化するために使用され得る。これらの抗体は、抗CCR9結合アームと、細胞傷害剤（例えば、サボリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体）に結合するアームとを有する。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えば、F(ab)₂二重特異性抗体、ミニボディ、ダイアボディ）として調製され得る。

20

【0080】

別のアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体-抗原結合部位）は、免疫グロブリンの定常ドメイン配列と融合される。この融合は、免疫グロブリン重鎖の定常ドメインと行われるのが好ましく、この定常ドメインは、少なくともヒンジ部、CH2およびCH3領域の一部を含む。前記融合体の少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含有する第1の重鎖定常領域（CH1）を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体、および所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクター内に挿入され、適切な宿主生物にコトランスフェクトされる。構築に使用される3つのポリペプチド鎖の比が同じでないことによって最適な収量が得られる実施形態において、これは、3つのポリペプチド断片の相互比率の調整における高柔軟性を提供する。しかしながら、少なくとも2つのポリペプチド鎖が同じ比で発現することによって収量が高くなる場合、またはそれらの比が特に重要ではない場合には2つまたは3つすべてのポリペプチド鎖についてのコード配列を1つの発現ベクターに挿入することも可能である。

30

【0081】

抗体断片から二重特異性抗体を作製するための技術もまた文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製され得る。

【0082】

CCR9に結合する能力を有する断片は、当技術分野における通常の知識を有する者に公知の従来の方法によって得られ得る。前記方法は、目的のモノクローナル抗体のポリペプチド鎖（またはその断片）をコードするDNAを単離すること、および組換えDNA技術によってDNAを操作することを含み得る。目的の別のDNAを作製するためにDNAを使用してもよいし、または1アミノ酸以上を付加、削除または置換するための（例えば、突然変異誘発による）改変DNA、例えば抗体（例えば、重鎖または軽鎖、可変領域または抗体全体）のポリペプチド鎖をコードするDNAを、CCR9を有する免疫マウス由来のマウスB細胞から単離してもよい。DNAは、従来の方法によって、例えばPCRによって単離および増幅され得る。

40

【0083】

単鎖抗体は、従来の方法によって、アミノ酸架橋を介して重鎖および軽鎖の可変領域（Fv領域）を結合することによって得られ得る。scFvは、可変領域（V_LおよびV_H

50

)のポリペプチドをコードするDNA間において、リンカーペプチドをコードするDNAを融合させることによって調製され得る。scFvの生産は、多くの文献、例えば米国特許第4,946,778号、Bird (Science 242:423, 1988)、Huston et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988)およびWard et al. (Nature 334:544, 1989)に記載されている。

【0084】

当業者であれば、ポリペプチドの一次配列が変化する場合であっても、抗体のCCR9結合能が維持されるように、本発明の抗体のアミノ酸配列は1つ以上のアミノ酸置換を含み得ることを理解するであろう。前記置換は保存的置換であり得、これは一般に、類似の特性を有する別のアミノ酸によるあるアミノ酸の置換(例えば、アスパラギン酸によるグルタミン酸(負に荷電したアミノ酸)の置換は、保存的アミノ酸置換であろう)を示すために適用される。

10

【0085】

本発明はまた、本明細書において同定された重鎖および軽鎖のCDRの配列の変異体を企図し、これらは本発明の範囲内である。本明細書において使用される用語「変異体」または「機能変異体」は、本明細書において使用される場合、その同族抗原に結合する能力(すなわち、その親和性/結合力および/または特異性/選択性)を実質的に維持する実質的に同様の配列を指す。変異体は、一般に、ネイティブな配列として定性的な観点から、同じ生物学的活性を有する。CDRの変異体は、1つ以上のアミノ酸の付加、欠失または置換を含む本明細書において同定されたポリペプチド配列誘導体であり得る。本発明によれば、配列番号:1~10の1つに示されているアミノ酸配列を含むCDRの変異体は、配列番号:1~10の1つに示されている対応するアミノ酸配列と少なくとも約70%の配列同一性、好ましくは、配列番号:1~10の1つに示されている対応するアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDRを含む。変異体は、CDRのN末端、またはC末端、またはN末端およびC末端の両方において、少なくとも1アミノ酸、または少なくとも2アミノ酸、または少なくとも3アミノ酸、または少なくとも4アミノ酸、または少なくとも5アミノ酸、または少なくとも6アミノ酸、または少なくとも7アミノ酸、または少なくとも8アミノ酸、または少なくとも9アミノ酸、または少なくとも10アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸からなる付加を含むことも企図される。同様に、変異体は、CDRのN末端、またはC末端、またはN末端およびC末端の両方において、少なくとも1アミノ酸、または少なくとも2アミノ酸、または少なくとも3アミノ酸、または少なくとも4アミノ酸、または少なくとも5アミノ酸、または少なくとも6アミノ酸、または少なくとも7アミノ酸、または少なくとも8アミノ酸、または少なくとも9アミノ酸、または少なくとも10アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸からなる欠失を含むことも企図される。本発明の抗体の機能変異体は、好ましくは、前記抗体の同族標的結合能の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同族標的結合能を有するであろう。

20

30

40

【0086】

本発明の抗体のCCR9結合能は、当技術分野において利用可能な多くのアッセイによって決定され得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはインビトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、表面プラズモン共鳴によって、または免疫蛍光技術、例えば免疫組織化学(IHC)、蛍光顕微鏡検査もしくはフローサイトメトリーによって決定される。

【0087】

50

本明細書において記載される抗体のアミノ酸配列改変が企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合もある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする核酸に、適切なヌクレオチドの変化を導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。このような改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはそれらへの挿入、および/またはそれらの置換が挙げられる。欠失、挿入および置換のいずれかの組み合わせを行って最終構築物を達成するが、ただし、最終構築物が望ましい特性を有することが条件である。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置を変更するなど、タンパク質の翻訳後プロセスを変化させ得る。

【0088】

アミノ酸配列の挿入としては、1残基から100残基以上を含有するポリペプチドまでの長さを有するアミノおよび/またはカルボキシル末端融合物、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有するペプチド、または細胞傷害性ポリペプチドと融合された抗体ポリペプチド鎖が挙げられる。分子の他の挿入変異体としては、N末端またはC末端と酵素または血清中半減期を増加させるポリペプチドとの融合物が挙げられる。

【0089】

別の種類の変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、分子内に、異なる残基で置換された少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。抗体の置換型突然変異誘発のための最大の関心部位としては超可変領域が挙げられるが、FRの変更もまた企図される。

【0090】

抗体の別の種類のアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変化させる。変化は、分子内に見られる1つ以上の炭水化物部分を欠失する、および/または分子内に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N-結合型またはO-結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖に炭水化物部分が結合していることを指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン(式中、Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖に炭水化物部分を酵素的に結合させるための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作る。O-結合型グリコシル化は、単糖類または単糖類の誘導體、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの1つをヒドロキシアミノ酸、最も一般にはセリンまたはトレオニンへ結合させることを指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも使用され得る。グリコシル化部位の抗体への付加は、アミノ酸配列が(N-結合型グリコシル化部位のための)上述のトリペプチド配列の1つ以上を含有するようにアミノ酸配列を変化させることによって好都合に達成される。この変化はまた、(O-結合型グリコシル化部位のための)1つ以上のセリンまたはトレオニン残基を元の抗体の配列に付加することによって、または元の抗体の配列をそれら残基で置換することによって行われ得る。抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野において公知の様々な方法によって調製される。これらの方法としては、限定されないが、天然供給源からの単離(天然由来のアミノ酸配列変異体の場合)、またはオリゴヌクレオチド媒介型(または部位指向型)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、および予め調製された抗体の変異体もしくは非変異体バージョンのカセット突然変異誘発による調製が挙げられる。

【0091】

本発明において使用される抗体を改変してエフェクター機能を改善するために、例えば、抗体のADCCおよび/またはCDCを改善することが望ましい場合もある。これは、抗体のFc領域に1つ以上のアミノ酸置換を導入することによって達成され得る。

【0092】

抗体などの糖タンパク質のアミノ酸骨格に付加されたグリコシル基は、いくつかの単糖

10

20

30

40

50

類または単糖類誘導体によって形成されるので、異なる哺乳類または組織からの細胞において生成された同じ抗体でも組成が異なる可能性がある。加えて、グリコシル基の異なる組成は、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) および / または補体依存性細胞傷害 (CDC) を媒介する効力に影響を与え得ることが示されている。したがって、異なる供給源からの抗体のグリコシル化パターンを研究することにより、それらの特性を改善することが可能である。このようなアプローチの例は、Niwa et al., Cancer Res. 2004 Mar 15; 64 (6) : 2127 - 33 である。

【0093】

したがって、別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、フコースを減少させて ADCC を増強するように糖操作される (glycoengineered)。フコシル残基を欠く抗体は、米国特許第 8207303 号にしたがって調製され得る。

【0094】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、補体活性化を増強するように操作されている。

【0095】

あるいはまたは加えて、1つ以上のシステイン残基を Fc 領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスフイド結合を形成し得る。このようにして作製されたホモ二量体抗体は、改善したインターナリゼーション能力、ならびに / または増加した補体媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を有し得る。Caron et al., J. Exp. Med. 176 : 1191 - 1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148 : 2918 - 2922 (1992) を参照のこと。増強した抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体もまた、Wolf et al. Cancer Research 53 : 2560 - 2565 (1993) に記載されているように、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、二重 Fc 領域を有する抗体を操作し得、それにより、補体溶解および ADCC 能力を増強し得る。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3 : 219 - 230 (1989) および Davis et al., Protein Eng Des Sel 23 : 195 - 202 (2010) を参照のこと。

【0096】

抗体の血清中半減期を増加させるために、例えば米国特許第 5,739,277 号に記載されるように、サルベージ受容体結合エピトープを抗体に組み込み得る。本明細書において使用される用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG 分子 (例えば、IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4) の Fc 領域のエピトープであって、IgG 分子のインビボ血清中半減期の増加に關与するエピトープを指す。

【0097】

好ましくは、本発明の抗体 (例えば、モノクローナル抗体、scFv 断片、Fab 断片) または本発明のモノクローナル抗体由来の他の結合組成物は、高い CCR9 受容体親和性を有する。モノクローナル抗体および関連分子の CCR9 受容体親和性は、従来技術によって測定され得る。

【0098】

抗原に対する抗体の親和性は、このような抗原に結合するための抗体の効力と定義され得る。抗原 - 抗体結合は可逆的な結合であるので、十分な時間の後、両分子が同じ溶液で希釈されると、この溶液は平衡に達し、抗原 - 抗体複合体 (AgAb)、遊離抗原 (Ag) および遊離抗体 (Ab) の濃度は一定である。したがって、 $[AgAb] / [Ag] * [Ab]$ 比はまた、 K_a と称される結合定数として定義される定数であり、この定数は、そのそれぞれのエピトープに対するいくつかの抗体の親和性を比較するために使用され得る。

【0099】

親和性を測定するための一般的な方法は、結合曲線を実験により決定することである。これは、遊離抗原の濃度の関数として、抗体 - 抗原複合体の量を測定することを含む。こ

10

20

30

40

50

の測定を行う一般的な方法は2つある：(i) Scatchard分析を用いた伝統的な平衡透析、および(ii)抗体または抗原のいずれかが導電性表面に結合され、抗原または抗体それぞれの結合がこの表面の電気的特性に影響を及ぼす表面プラズモン共鳴法。

【0100】

同じエピトープを接合する2つ以上の抗体(例えば、本発明の抗体またはその機能変異体の場合)の相対親和性を測定するだけでよいことも多い。この場合、抗体の一方の系列希釈物を一定量のリガンドと共にインキュベートし、次いで、任意の適切なトレーサーによって標識した第2の抗体を追加する競合アッセイを実施し得る。このmAbを結合させ、未結合の抗体を洗浄した後、第2の抗体の濃度を測定し、第1の抗体の濃度に関してプロットし、Scatchard法によって分析する。一例は、Tamura et al., J. Immunol. 163:1432-1441(2000)である。あるいは、本発明の場合のように、リガンドが膜結合抗原である場合、可溶性リガンドは、前記抗原を発現する細胞の表面上の抗体にディスプレイされ得る。したがって、一定量のリガンドと共に、様々な量の抗体をインキュベートする。

10

【0101】

本発明の抗体のCCR9親和性は、少なくとも 10^{-7} M、少なくとも 10^{-8} M、少なくとも 10^{-9} M、少なくとも 10^{-10} M、少なくとも 10^{-11} Mまたは少なくとも 10^{-12} Mである。

【0102】

本発明の核酸、発現カセット、ベクターおよび細胞

20

別の態様において、本発明は、

- i) 本発明の抗体をコードする核酸、および
 - ii) 前記i)に定義される核酸の相補的核酸
- からなる群から選択される核酸(以下、「本発明の核酸」)に関する。

【0103】

本明細書において使用される用語「核酸」は、ホスホジエステル結合によって連結されたヌクレオチドと称されるモノマーの繰り返しによって形成されたポリマーを指す。この用語は、DNAおよびRNAの両方を含む。

【0104】

本発明の抗体の詳細は前述されており、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0105】

特定の実施形態において、本発明の核酸は、a)重鎖内に、配列番号：1に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号：2に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、b)軽鎖内に、配列番号：4に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号：5に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号：6に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む抗体をコードする。

【0106】

別の特定の実施形態において、本発明の核酸は、a)重鎖内に、配列番号：1に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H1、配列番号：2に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H2、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H3を含み、b)軽鎖内に、配列番号：4に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L1、配列番号：5に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L2、および配列番号：6に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L3を含む抗体(これは、実施例において91R mAbとして同定した抗体に対応する)をコードする。

40

【0107】

別の特定の実施形態において、本発明の核酸は、a)重鎖内に、配列番号：7に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号：2に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、b)軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L1、配

50

列番号：9に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む抗体をコードする。

【0108】

別の特定の実施形態において、本発明の核酸は、a)重鎖内に、配列番号：7に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H1、配列番号：2に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H2、および配列番号：3に示されているアミノ酸配列からなるCDR-H3を含み、b)軽鎖内に、配列番号：8に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L1、配列番号：9に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L2、および配列番号：10に示されているアミノ酸配列からなるCDR-L3を含む抗体（これは、実施例において92R mAbとして同定した抗体に対応する）をコードする。

10

【0109】

本発明の核酸は、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列の発現のために作動可能に連結された調節配列を含有し、それにより、遺伝子構築物（以下、「本発明の遺伝子構築物」）を形成し得る。本明細書において使用される用語「作動可能に連結された」は、本発明の核酸配列によってコードされる抗体が、発現制御配列または発現調節配列の制御下において正しいリーディングフレームによって発現されることを意味する。したがって、別の態様において、本発明は、発現制御配列に作動可能に連結された本発明の遺伝子構築物を含む発現カセット（以下、「本発明の発現カセット」）を提供する。本発明の遺伝子構築物は、従来技術において広く公知の技術を使用することによって得られ得る（Sambrook et al., 2001 "Molecular cloning: to Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3）。

20

【0110】

制御配列は、前記抗体の転写および適切な場合には翻訳を制御および調節する配列であり、プロモーター配列、転写調節因子をコードする配列、リボソーム結合配列（RBS）、および/または転写終結配列を含む。本発明の発現カセットは、エンハンサー（これは、プロモーター配列に隣接していてもよいし、またはプロモーター配列から離れていてもよく、これからの転写を増加させるように機能し得る）をさらに含み得る。特定の実施形態において、前記発現制御配列は、原核細胞および生物、例えば細菌などにおいて機能的である。一方、別の特定の実施形態において、前記発現制御配列は、真核細胞および生物、例えば昆虫細胞、植物細胞、哺乳類細胞などにおいて機能的である。

30

【0111】

任意の利用可能なプロモーターをこの方法において使用し得る。本発明の好ましい実施形態において、本発明の核酸構築物において使用されるプロモーターは、トランスフェクトすべき特定の細胞集団において活性である。本発明の発現カセット中に存在し得るユビキタスプロモーターの例示的で非限定的な例としては、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター（hCMV）、SV40プロモーター、EF1-アルファプロモーターおよびユビキチンプロモーターCが挙げられる。細胞型特異的プロモーターおよび/または組織特異的プロモーター（例えば、アルブミン）の例示的で非限定的な例としては、肝臓に対して特異的であるもの [Pinkert et al. (1987) Genes Dev 1 : 268 - 277]、リンパ系特異的プロモーター [Calame et al.; (1988) Adv. Immunol. 43 : 235 - 275]、特にT細胞受容体 [Wintoto et al. (1989) EMBO J. 8 : 729 - 733] および免疫グロブリン [Banerji et al. (1983) Cell 33 : 729 - 740] のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター、例えばニューロフィラメントプロモーター [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5473 - 5477]、膵臓特異的プロモーター [Edlunch et al. (1985) Science 230 : 912 - 916] または乳腺特異的プロモーター、例えば乳清プロモーター（米国特許第4,873,316号および欧州特許第264,166号）が挙げられる。発現カセットCAG-GSは、CMVエンハンサーエレ

40

50

メント、ニワトリ - アクチンのプロモーターおよび転写後調節エレメント (WPRE) ウイルスウッドチャック肝炎 (ウッドチャック肝炎ウイルス、WHP) から構成される [Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-9]。プロモーターおよびこの要素の組み合わせは、インビボにおける導入遺伝子の高い発現レベルを促す。

【0112】

有利なことに、本発明の発現カセットは、前記発現カセットを有する形質転換宿主細胞を選択することを可能にするモチーフまたは表現型をコードするマーカーまたは遺伝子をさらに含む。本発明の発現カセット中に存在し得る前記マーカーの例示的な例としては、抗生物質耐性遺伝子、毒性化合物耐性遺伝子、および一般に遺伝子形質転換細胞を選択することを可能にするすべてのものが挙げられる。

10

【0113】

本発明の遺伝子構築物または本発明の発現カセットは、適切なベクターに挿入され得る。したがって、別の態様において、本発明は、本発明の遺伝子構築物または本発明の発現カセットを含んでなるベクター (例えば、発現ベクター) (以下、「本発明のベクター」) に関する。ベクターの選択は、それがその後導入される宿主細胞に依存する。一例として、前記核酸配列が挿入されるベクターは、宿主細胞に導入されると前記細胞のゲノムに組み込まれるかまたは組み込まれないプラスミドまたはベクターであり得る。このベクターの取得は、当業者に公知の従来の方法によって実施され得る (Sambrook et al. 2001、前掲)。特定の実施形態において、前記組換えベクターは、動物細胞をトランスフェクトするために有用なベクターである。

20

【0114】

前記ベクターは、前記ベクターによって形質転換、トランスフェクトまたは感染しやすい細胞を形質転換、トランスフェクトまたは感染するために使用され得る。このような細胞は、原核生物または真核生物のものであり得る。したがって、別の態様において、本発明は、本発明のベクターによって形質転換、トランスフェクトまたは感染された細胞 (以下、「本発明の細胞」) に関する。したがって、前記形質転換、トランスフェクトまたは感染された細胞は、本発明の核酸、本発明の遺伝子構築物または本発明の発現カセットもしくはベクターを含む。

【0115】

形質転換、トランスフェクトまたは感染された細胞は、当業者に公知の従来の方法によって得られ得る (Sambrook et al. 2001、前掲)。本発明を実施するために適切な細胞としては、限定されないが、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞および細菌細胞が挙げられる。細菌細胞としては、限定されないが、グラム陽性細菌、例えば桿菌、ストレプトマイセスおよび *Staphylococcus* 属の種に由来する細胞、ならびにグラム陰性細菌細胞、例えば *Escherichia* およびシュードモナス属の細胞が挙げられる。真菌細胞としては、好ましくは、酵母細胞、例えば酵母類、ピキア パストリスおよび *Hansenula polymorpha* が挙げられる。昆虫細胞としては、限定されないが、ショウジョウバエ細胞および Sf9 細胞が挙げられる。植物細胞としては、とりわけ、作物植物、例えば穀物、薬用作物、観賞植物または球根の細胞が挙げられる。本発明に適切な哺乳動物細胞としては、上皮細胞株、骨肉腫細胞株、神経芽腫細胞株、上皮癌、神経膠細胞、肝細胞株、CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞、COS細胞、BHK細胞、HeLa細胞、911細胞、AT1080細胞、A549細胞、293および293T細胞、PER.C6細胞、NTERA-2ヒトECC細胞、mESC系統のD3細胞、ヒト胚性幹細胞、例えばHS293、hMSCおよびBGV01、SHEF1、SHEF2およびHS181、NIH3T3細胞、REHおよびMCF-7細胞が挙げられる。

30

40

【0116】

特定の実施形態において、前記細胞は、適切なベクターによって形質転換、トランスフェクトまたは感染された動物細胞、本発明の抗体を発現することができる前記トランスフェクト、形質導入または感染された動物細胞であるので、前記ベクターは、動物細胞にお

50

いて本発明の抗体を発現させるために使用され得る。用語「抗体」およびその詳細は、本発明の抗体との関連において詳細に記載されており、本発明の核酸、発現カセット、ベクターおよび細胞との関連において同じ意味で使用される。

【0117】

本発明の核酸、遺伝子構築物、発現カセット、ベクターまたは細胞は、本発明の抗体を生産するために使用され得る。特定の実施形態において、本発明の核酸、遺伝子構築物、発現カセット、ベクターまたは細胞によって発現または産生される本発明の抗体は、実施例において91R mAbとして同定した抗体である。別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、実施例において92R mAbとして同定した抗体である。

【0118】

このように、用語「本発明の細胞」はまた、拡大によって、本発明の抗体を生産するハイブリドーマ細胞を含む。本明細書において使用される用語「ハイブリドーマ」は、特定の抗体産生B細胞を骨髄腫(B細胞癌)細胞(これは、組織培養液中におけるその成長能および抗体鎖合成の欠如により選択される)と融合することによって形成されたハイブリッド細胞株を指す。ハイブリドーマによって産生される抗体は、通常、単一特異性であるので、(ポリクローナル抗体とは対照的に)モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体の生産は、1975年にCesar MilsteinおよびGeorges J. F. Kohlerによって発明された(Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495-7)。

【0119】

したがって、別の態様において、本発明は、本発明の抗体を生産するための方法であって、前記抗体の産生を可能にする条件下において、本発明の細胞を成長させることを含んでなる方法に関する。前記細胞の培養を最適化するための条件は、使用される細胞に依存するであろう。所望であれば、本発明の抗体を生産するための方法は、前記抗体を単離および精製することをさらに含む。

【0120】

本発明による診断/予後予測方法

本発明の抗体は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状のインビトロ診断および/または予後予測に使用され得る。したがって、別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状のインビトロ診断および/または予後予測のための、本発明の抗体の使用に関する。

【0121】

さらに、別の態様において、本発明は、被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状を診断および/または予後予測するためのインビトロ方法(以下、「本発明の第1の方法」)であって、

- a) 本発明の抗体を、前記被験体由来の細胞を含むサンプルと接触させること、
- b) 前記被験体由来のサンプル中のCCR9を検出および/または定量すること、
- c) 前記被験体由来のサンプルにおいて検出されたCCR9の存在および/または量および/または分布を、対照サンプルにおいて検出されたものと比較すること、そして
- d) 得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の存在と相関させること

を含んでなるインビトロ方法に関する。

【0122】

本発明の第1の方法は、高感度かつ特異的な方法であり、例えば、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状を有する被験体または個体は、所定の細胞集団または細胞亜集団におけるCCR9陽性細胞の数が、絶対的に増加しているか、またはCCR9発現細胞が関与するこれらの疾患もしくは症状の病歴を有していない被験体由来の、もしくはCCR9を発現しない細胞の培養物由来の対照サンプル(陰性対照)における対応するレベルと比較して増加しているという事実に基づくものである。

【0123】

10

20

30

40

50

用語「抗体」および「CCR9」は、本発明の抗体との関連において詳細に記載されており、それらの詳細は、本発明の抗体との関連において詳細に記載されており、本発明の第1の方法との関連における同じ意味で使用される。

【0124】

用語「被験体」または「個体」は、哺乳動物種のメンバーを指し、限定されないが、家畜、霊長類およびヒトが挙げられる；被験体は、好ましくは、任意の年齢または人種の男性または女性のヒトである。

【0125】

本発明の第1の方法を実施するために、細胞を含むサンプル、例えば生物学的サンプルは、研究すべき被験体から得られる。本明細書において使用される用語「サンプル」または「生物学的サンプル」は、様々な種類の生体液、罹患器官の組織切片などを含む。特定の実施形態において、サンプルは、研究中の被験体由来の細胞を含む。前記サンプルの例示的で非限定的な例としては、様々な種類の生体液、例えば腹水、胸膜液、滑液、尿、唾液、血液、精液、血清などが挙げられる。これらの生体液サンプルは、当業者に公知の任意の従来の方法によって得られ得る。あるいは、前記サンプルはまた、例えば、リンパ腺、乳房、前立腺、皮膚、小腸、大腸、膵臓、卵巣、肺、膀胱、腎臓などに由来する罹患器官組織サンプルの切片（これらは、任意の従来の方法によって、例えば生検、膀胱鏡検査、外科的切除などによって得られ得る）および組織学的目的により採取された凍結切片であり得る。

【0126】

分析すべきサンプルは、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状と以前に診断されたかもしくは診断されていない被験体から、または治療を受けている被験体から、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状について以前に治療された被験体から得られ得る。

【0127】

本発明の第1の方法の工程(a)によれば、当業者に公知の適切な条件下において、本発明の抗体を、研究中の被験体由来のサンプルと接触させる。

【0128】

当業者であれば、サンプル中のCCR9を検出および/または定量するための多くの従来の方法であって、本発明の第1の方法の工程(b)を行うために適切な従来の方法を使用し得る。特に有用なものは、免疫学的方法である。したがって、特定の実施形態において、本発明の第1の方法は、前記サンプル中のCCR9を検出および/または定量するために、本発明の抗体を、前記個体由来の腫瘍細胞を含むサンプルと接触させることを含む。

【0129】

これらのアッセイにおいて使用すべき本発明の抗体は、標識されていてもよいし、または標識されていなくてもよい。本明細書において使用される用語「検出可能な標識」または「標識剤」は、適切な検出手順および検出装置を使用して、例えば、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段または化学的手段によって、それが結合している分子の検出、位置決定および/または同定を可能にする分子標識を指す。抗体を標識するために適切な標識剤としては、放射性核種、酵素、フルオロフォア、化学発光試薬、酵素基質または補因子、酵素阻害剤、粒子、色素および誘導体などが挙げられる。当業者であれば理解するように、さらなる試薬、例えば標識された（標識されるであろう）二次抗体を用いて、標識されていない抗体を検出する必要がある。これは、シグナルの増幅を可能にするので、検出方法の感度を増加させるために特に有用である。

【0130】

本発明において使用され得る幅広い従来のアッセイであって、標識されていない本発明の抗体（一次抗体）および標識された本発明の抗体（二次抗体）を使用する従来のアッセイがある；これらの技術としては、ウエスタンブロットまたはイムノブロット、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合EIA（競合

10

20

30

40

50

酵素免疫アッセイ)、DAS-ELISA(二重抗体サンドイッチELISA)、免疫細胞化学技術および免疫組織化学技術、タンパク質マイクロスフェアの使用に基づくフローサイトメトリーまたはマルチプレックス検出技術、本発明の抗体を含むバイオチップまたはマイクロアレイが挙げられる。本発明の抗体を使用してCCR9を検出および定量する他の方法としては、アフィニティークロマトグラフィー技術、リガンド結合アッセイまたはレクチン結合アッセイが挙げられる。

【0131】

本発明の第1の方法はまた、工程c)において、研究の被験対象由来のサンプルにおいて検出および決定されたCCR9の存在および/または量および/または分布を、対照サンプル中のCCR9のもの(基準値)と比較する工程を含む。

10

【0132】

本明細書において使用される用語「対照サンプル」または「参照サンプル」は、通常の生理学的条件下において、CCR9発現細胞を含まないかまたはCCR9発現細胞を含むサンプルを指すので、基準値を確立するために使用され得る。特定の実施形態において、参照サンプルは、健常被験体から採取されるが、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の病歴を有していない被験体(組織またはその一部が通常の生理学的条件下にあるかまたは健常である以外は同じ被験体)を含む他の被験体からも採取され得る。特定の実施形態において、対照サンプルは、健常被験体由来のサンプルである。別の特定の実施形態において、対照サンプルは、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の病歴を有していない個体由来のサンプルであり、この場合、得られた結果は、被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状の悪性度、侵襲性、病期および/または重症度の診断価値または予測価値を有し得る。別の特定の実施形態において、対照サンプルは、組織またはその一部が健常である以外は同じ被験体由来のサンプルである。所望であれば、陽性対照としては、例えば、CCR9を発現する細胞株、および/または陰性対照としては、例えば、CCR9を発現しない細胞株をさらに使用し得る。

20

【0133】

本明細書において使用される用語「分布」は、サンプル中のCCR9が発現している細胞集団または細胞型を指す。したがって、CCR9は、1つまたは複数の特定の細胞集団または細胞型において発現され得る。細胞集団または細胞型は、形態および表現型が異なる細胞、例えばT細胞、B細胞、マクロファージ、上皮細胞、筋細胞、破骨細胞、骨芽細胞、神経細胞などと理解される。したがって、分析すべきサンプルと参照サンプルとの間のCCR9の分布を比較することによって、前記サンプル中に存在する異なる細胞集団におけるCCR9の存在を比較している。

30

【0134】

本発明の第1の方法は、工程(d)として、工程(c)の比較から得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の存在、前記被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状の悪性度、侵襲性、病期および/または重症度の決定または予後予測と関連させる工程をさらに含む。

【0135】

特定の実施形態において、分析されるサンプル中のCCR9の存在は、CCR9が参照サンプル中に存在しない場合には、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状を有する被験体を示す。

40

【0136】

別の特定の実施形態において、分析されるサンプル中のCCR9の分布の、参照サンプル中のCCR9の分布に対する変化は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状を有する被験体を示す。CCR9が、参照サンプルと異なる細胞集団において発現している場合、またはCCR9が、参照サンプルと異なる少なくとも1つのさらなる細胞集団において発現している場合、CCR9の分布は「変化している」とみなされる。

【0137】

別の特定の実施形態において、前記被験体由来のサンプル中のCCR9の量の、前記参

50

照サンプル中のCCR9の量に対する増加は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状を示す。分析されるサンプル中のCCR9の量は、それが参照サンプルに対して少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも150%、少なくとも200%またはそれ以上増加している場合、参照サンプル中のCCR9の量に対して「増加している」とみなされる。

【0138】

前記情報はまた、前記被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状の悪性度、侵襲性、病期および/または重症度を決定または評価または予測するために使用され得る；この意味において、当業者であれば、彼/彼女が得た経験を考慮して、研究中の被験体由来のサンプルにおいて決定されたCCR9の量を、前記被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患または症状の悪性度、侵襲性、病期および/または重症度と相関させることができるであろう。同様に、対照サンプルが、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状と診断され、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状を治療するための治療の投与前または投与中に分析された被験体彼自身/彼女自身由来のサンプルである場合、前記治療の投与後の所定時点の前記被験体由来のサンプル中のCCR9の分布および/または量の検出または変動に関する情報は、下記のように、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状を患っている被験体に投与される治療の効果または有効性をモニタリングまたは評価するために、および前記治療が有効ではない場合には、それを変化させる可能性を評価するために役立つ。

10

20

【0139】

当業者であれば理解するように、予測は、診断または評価すべき被験体の100%に対して正しいことが好ましいが、その必要はない。しかしながら、この用語は、統計的に有意な一部の被験体が、所定の転帰を有する可能性が高いと判定され得ることを必要とする。当業者であれば、被験体から得られたデータが統計的に有意であるかを、様々な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値の決定、交差検定分類率などを使用して、さらなる負担を伴わずに決定し得る。詳細は、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983に見られる。好ましい信頼区間は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%である。p値は、好ましくは、0.01、0.005またはそれ以下である。

30

【0140】

本明細書において使用される用語「CCR9発現細胞が関与する疾患または症状」は、CCR9が前記疾患または症状の原因であるか否かに関係なく、CCR9発現細胞が直接的または間接的に関与する疾患または症状（例えば、異なる様式、場所もしくは分布において、または通常もしくは参照の生理学的条件または基準値と異なる量、例えばより高い値において、CCR9が発現している疾患または症状を含む）を指す。このように、用語「CCR9発現細胞が関与する疾患または症状」は、「CCR9発現細胞を伴う疾患または症状」または「CCR9発現細胞が直接的または間接的に暗示される疾患または症状」などと実質的に同等である。

40

【0141】

特定の実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、腫瘍性疾患および非腫瘍性疾患からなる群より選択される。

【0142】

好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、腫瘍性疾患である。より好ましい実施形態において、前記腫瘍性疾患は、T細胞急性リンパ芽球性白血病、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、および固形腫瘍由来の循環細胞からなる群より選択される。

50

【0143】

本明細書において使用される用語「T細胞急性リンパ芽球性白血病」または「T-ALL」は、血液および骨髄中のT細胞リンパ芽球の悪性増殖性障害の一種を指し、リンパ性白血病の一形態である。

【0144】

本明細書において使用される用語「前立腺癌」は、前立腺細胞の任意の悪性増殖性障害を指す。

【0145】

本明細書において使用される用語「乳癌」は、最も一般的には乳管の内壁、または乳を乳管に供給する小葉由来の乳腺細胞の任意の悪性増殖性障害を指す。管に由来する癌は乳管癌として公知であり、小葉に由来するものは小葉癌として公知である。

10

【0146】

本明細書において使用される用語「メラノーマ」は、メラニン細胞の悪性皮膚腫瘍を指す。

【0147】

本明細書において使用される用語「卵巣癌」は、卵巣から生じる癌性成長を指す。

【0148】

本明細書において使用される用語「結腸直腸癌」（「結腸癌」、「直腸癌」または「大腸癌」としても公知である）は、結腸もしくは直腸またはそれらの付属物における制御されていない細胞成長からの癌を指す。

20

【0149】

本明細書において使用される用語「肺癌」は、肺組織における悪性増殖性障害の一種を指す。

【0150】

本明細書において使用される用語「固形腫瘍由来の循環細胞」またはCTC（循環腫瘍細胞）は、原発腫瘍から血管系に流れて、血流中を循環する細胞を指す。CTCは、さらなる腫瘍（転移）が遠隔器官において成長する原因であり得る。

【0151】

別の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、非腫瘍性疾患である。特定の実施形態において、前記非腫瘍性疾患は、自己免疫疾患である。別の特定の実施形態において、前記非腫瘍性疾患または症状は、炎症性障害を含むか、または炎症反応もしくは炎症要素が存在する疾患である。特定の実施形態において、前記非腫瘍性疾患は、クローン病、炎症性腸疾患、肝線維症、急性肝炎からなる群より選択される。

30

【0152】

本明細書において使用される用語「クローン病」は、口から肛門までの胃腸管の任意の部分に影響を及ぼし得る炎症性腸疾患の一種であって、多種多様な症候を引き起こすものを指す。それは、主に、腹部の痛み、下痢（これは、炎症が最悪である場合には血性であり得る）、嘔吐（これは、持続的であり得る）または体重減少を引き起こすが、胃腸管外の合併症、例えば貧血、皮膚発疹、関節炎、眼の炎症、疲労感および集中力の欠如も引き起こし得る。クローン病は、遺伝的に感受性の個体において、環境的因子と免疫学的因子と細菌因子との間の相互作用によって引き起こされる。これは、身体の免疫系が胃腸管を攻撃する慢性炎症性疾患をもたらす。クローン病は免疫関連疾患であるが、（免疫系が体それ自体によってトリガーされないという点で）自己免疫疾患ではないと思われる。

40

【0153】

本明細書において使用される用語「炎症性腸疾患」は、結腸および小腸の炎症症状の一群を指し、潰瘍性大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、転換大腸炎、ベーチェット病、および不確定大腸炎が挙げられる。

【0154】

本明細書において使用される用語「肝線維症」は、「肝臓線維症」としても公知であり

50

、肝臓が過剰な細胞外マトリックスタンパク質（コラーゲンを含む）を蓄積する症状を指し、ほとんどの種類の慢性肝疾患において生じる；それは、先天的条件に起因するものであり得るか、または繰り返される肝損傷によるものであり得る。進行性肝線維症は、肝硬変、肝不全および門脈圧亢進症をもたらし、多くの場合には肝移植を必要とする。

【0155】

本明細書において使用される用語「急性肝炎」は、肝細胞の破壊および肝組織における炎症細胞の存在を特徴とする症状を指す。

【0156】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、T細胞急性リンパ芽球性白血病である。

10

【0157】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞を伴う疾患または症状は、前立腺癌である。

【0158】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、乳癌である。

【0159】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、メラノーマである。

【0160】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、卵巣癌である。

20

【0161】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、結腸直腸癌である。

【0162】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、肺癌である。

【0163】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、固形腫瘍由来の循環細胞である。

30

【0164】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、クローン病である。

【0165】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、炎症性腸疾患である。

【0166】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、肝線維症である。

40

【0167】

本発明の好ましい実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、急性肝炎である。

【0168】

別の特定の実施形態において、CCR9の発現が変化している細胞は、リンパ系細胞、骨髄細胞、樹状細胞、形質細胞の亜集団を含み、これらは、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD25、CD51、CD81、CD146、CD228、CD231、TCRおよびそれらの組み合わせを含むマーカーのさらに少なくとも1つによって定義される。

【0169】

50

好ましい実施形態は、蛍光標識された本発明の抗体によって組織学的組織サンプルを染色する手順において、組織の迅速な試験を含む。さらに好ましい方法において、本発明の抗体、好ましくはIgGアイソタイプ抗体は、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD25、CD51、CD81、CD146、CD228、CD231、TCRを特異的に認識するさらなる抗体と組み合わせられる。さらに好ましい実施形態において、抗体は、様々な蛍光色素、例えばCy3およびCy5またはCy3およびFITCによって直接的に標識される。

【0170】

シグナル増強が有利である実施形態において、抗体および/または認識分子は、標識二次抗体またはビオチン-ストレプトアビジン検出システムによって増加される。したがって、抗体の定常領域において、異なる種のアイソタイプおよび/または配列を使用することが有利である。本文書において使用される技術および方法、例えば免疫組織学、ならびに認識分子の適切なフォーマットの選択は、当業者に公知である。

10

【0171】

加えて、標的細胞（すなわち、CCR9発現細胞またはCCR9⁺細胞）に特異的に結合する能力の観点から、本発明の抗体は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状のインビボ診断および/または予後予測に使用され得る；例として、前記抗体は、医療イメージング（すなわち、臨床目的のために（例えば、疾患を明らかにし、診断し、または調べようとする医療処置）、または医療科学のために（通常の解剖学および生理学の研究を含む）、体（またはその一部および機能）、例えば人体の画像を作成するために使用される一連の技術および方法）に使用され得る。

20

【0172】

したがって、別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測のための本発明の抗体の使用、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測のための方法における本発明の抗体の使用に関する；あるいは、この態様は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状のインビボ診断および/または予後予測のための組成物の製造における本発明の抗体の使用と表現され得る。別の代替的な表現において、この態様は、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測に用いられる本発明の抗体、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状のインビボ診断および/もしくは予後予測のための方法に用いられる本発明の抗体と表現され得る。

30

【0173】

この目的のために、本発明の抗体は、当技術分野において公知の適切な方法によって標識され、例えば、適切な分子、例えば放射性同位体または蛍光色素を用いてカップリングおよび/またはロードすることによって、診断イメージング方法、例えば放射免疫診断法、陽電子放出断層撮影（PET）、内視鏡検査免疫蛍光法などのための薬剤として提供される。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、ガンマ線放射同位体、例えば^{99m}Tc、¹²³Iおよび¹¹¹Inにカップリングされ、ガンマカメラを使用した放射免疫シンチグラフィまたは単一光子放射型コンピュータ断層撮影法に使用される。別の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、陽電子放射体、例えば¹⁸F、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Yおよび¹²⁴Iにカップリングされ、PETに使用される。別の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、蛍光色素、例えばCy3、Cy2、Cy5またはFITCにカップリングされ、内視鏡検査免疫蛍光法に使用される。記載されるように改変された抗体は、個体のための適切な用量において、例えば静脈内的に、任意の適切な経路によって投与され、CCR9の場所は、当技術分野において周知の方法によって検出、決定または測定される。診断イメージングを含む本明細書において使用される方法および技術は適切な投薬製剤も提供し得る当業者に公知である。

40

【0174】

さらに好ましい実施形態において、本発明の抗体は、例えば、¹¹¹Inによって放射

50

性標識され、腫瘍もしくは腫瘍の血管において局所的に、求心的に、または遠心的に、または全身的に投与され得る診断剤として提供される。これは、腫瘍サイズの決定の一実施形態、およびリンパ節の決定のさらなる実施形態において役立つ。診断イメージングを含む本明細書において使用される方法および技術は、適切な投薬製剤も提供し得る当業者に公知である。

【 0 1 7 5 】

診断アッセイにおいて、または診断剤として使用される本発明の放射性標識認識分子はまた、他の適用経路によって投与され得る。このため、好ましい経路は、腹腔内経路、結節内経路、腫瘍内経路および静脈内経路である。

【 0 1 7 6 】

さらに、本発明の抗体は、被験体への投与に適切な組成物中に製剤化される。このために、組成物は、必要な薬学的に許容され得る賦形剤または担体を含むであろう。前記組成物の例示的で非限定の例は、以下に記載され、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 7 7 】

CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応をモニタリングするための方法

別の態様において、本発明は、治療中の被験体における CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応をモニタリングするためのインビトロ方法（以下、「本発明の第 2 の方法」と称される）であって、

- a) 本発明の抗体を、第 1 の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第 1 のサンプルと接触させること、
- b) 前記第 1 のサンプル中の CCR9 を検出および / または定量すること、
- c) 本発明の抗体を、第 2 の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第 2 のサンプルと接触させること、
- d) 前記第 2 のサンプル中の CCR9 を検出および / または定量すること、
- e) 前記第 1 のサンプルおよび第 2 のサンプルにおいて検出された CCR9 の存在および / または量および / または分布を比較すること、そして
- f) 得られた結果を、CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応と

を含んでなるインビトロ方法に関する。

【 0 1 7 8 】

用語「抗体」、「CCR9」、「サンプル」、「被験体」、「CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状」、「分布」およびそれらの詳細は、本発明の抗体および第 1 の方法との関連において詳細に記載されており、本発明の第 2 の方法との関連において同じ意味で使用される。

【 0 1 7 9 】

本明細書において使用される用語「治療」は、CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状の改善に適切な治療を指す。CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状に適切な治療は、従来型で当業者に周知のものである。

【 0 1 8 0 】

本発明の第 2 の方法は、本発明の抗体を、第 1 の時点において採取された前記被験体由来の細胞を含む第 1 のサンプルと接触させる第 1 の工程を含む。当業者であれば理解するように、本発明の第 2 の方法の工程 (a) は、上記に詳細に記載されている本発明の第 1 の方法の工程 (a) と同一である。したがって、本発明の第 1 の方法の工程 (a) の詳細は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 8 1 】

本発明の第 2 の方法の工程 (b) は、前記第 1 のサンプル中の CCR9 を検出および / または定量することを含む。本発明の第 2 の方法の工程 (b) は、上記に詳細に記載されている本発明の第 1 の方法の工程 (b) と同一である。したがって、本発明の第 1 の方法の工程 (b) の詳細は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0182】

本発明の第2の方法は、本発明の抗体を第2のサンプルと接触させること、ならびに第2の時点において採取された前記第2のサンプル中のCCR9を検出および/または定量することを含む工程(c)および(d)をさらに含む。

【0183】

本明細書において使用される用語「時点」は、サンプルが、モニタリングされる被験体から採取される時点の瞬間を指す。本発明の第2の方法との関連において、第1のサンプルが採取される第1または最初の時点と、第2のサンプルが採取される第2または後の時点とがある。第1および第2の時点は、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも10日、少なくとも20日、少なくとも30日、少なくとも40日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも70日、少なくとも80日、少なくとも90日、少なくとも100日、少なくとも6カ月、少なくとも1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年またはそれ以上の時間的な隔たりがある。特定の実施形態において、第1のサンプルが第2のサンプルの前に採取されるように、第1の時点は、第2の時点の前に発生する。

10

【0184】

当業者であれば理解するように、特定の実施形態において、前記治療に対する反応を完全にモニタリングするためには、第1のサンプルは、被験体が、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始する前に採取されることが特に有用である。したがって、特定の実施形態において、第1の時点は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始する前に発生する。別の特定の実施形態において、第1の時点は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始する際に発生する。同様に、特定の実施形態において、第1のサンプルは、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始する前に採取されるのに対して、別の特定の実施形態において、第1のサンプルは、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始する際に採取される。

20

【0185】

前記治療に対する前記被験体の反応をモニタリングするために、第2のサンプルは、被験体が前記治療を開始した後に採取されることが必要であろう。したがって、別の特定の実施形態において、第2の時点は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始した後に発生する。特定の実施形態において、第2の時点は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始した少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも10日、少なくとも20日、少なくとも30日、少なくとも40日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも70日、少なくとも80日、少なくとも90日、少なくとも100日、少なくとも6カ月、少なくとも1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年またはそれ以上後に発生する。同様に、第2のサンプルは、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始した後に採取される。特定の実施形態において、第2のサンプルは、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療を開始した少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも10日、少なくとも20日、少なくとも30日、少なくとも40日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも70日、少なくとも80日、少なくとも90日、少なくとも100日、少なくとも6カ月、少なくとも1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年またはそれ以上後に採取される。

30

40

【0186】

本発明の第2の方法はまた、工程(e)の比較から得られた結果を、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応と関連させる関連工程[工程(f)]の前に、前記第1および第2のサンプルにおいて検出されたCCR9の存在および/または量および/または分布を比較する工程[工程(e)]を含む。

【0187】

特定の実施形態において、第1のサンプルに対する第2のサンプル中のCCR9の存在

50

の欠如は、前記治療に対する好ましい反応を示す。あるいは、第1のサンプルに対する第2のサンプル中のCCR9の存在は、前記治療に対する好ましくない反応を示すかまたは示し得る。

【0188】

別の特定の実施形態において、第2のサンプル中のCCR9の分布の、第1のサンプルのものに対する変化（第1のサンプルよりも少数のまたは少ない第2のサンプルの細胞集団において、CCR9が発現している）は、前記治療に対する好ましい反応を示す。一方、第2のサンプル中のCCR9の分布の、第1のサンプルのものに対する不変化、または第2のサンプル中のCCR9の分布の、第1のサンプルのものに対する変化（第1のサンプルよりも多くの第2のサンプルの細胞集団において、CCR9が発現している）は、前記治療に対する好ましくない反応を示す。

10

【0189】

別の特定の実施形態において、第2のサンプル中のCCR9の量の、第1のサンプル中のCCR9の量に対する減少は、前記治療に対する好ましい反応を示す。第2のサンプル中のCCR9の量は、それが第1のサンプルに対して少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも150%、少なくとも200%またはそれ以上減少している場合、第1のサンプル中のCCR9の量に対して減少しているとみなされる。同様に、第2のサンプル中のCCR9の量の、第1のサンプル中のCCR9の量に対する増加は、前記治療に対する好ましくない反応を示す。分析されるサンプル中のCCR9の量は、それが参照サンプルに対して少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも150%、少なくとも200%またはそれ以上増加している場合、参照サンプル中のCCR9の量に対して増加しているとみなされる。

20

【0190】

本明細書において使用される用語「治療に対する反応」は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状であって、治療されている疾患または症状の進化を指し、好ましい反応または好ましくない反応であり得る。一般に、治療に対する好ましい反応は、前記疾患または症状によって引き起こされる症候および/または病変の部分的または完全な改善または消失を伴うのに対して、治療に対する好ましくない反応は、前記疾患または症状によって引き起こされる症候および/または病変の悪化または増悪を伴う。CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に対する反応を評価する様々な方法であって、従来型で当業者に周知の様々な方法がある。例示的で非限定的な例として、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状が癌の一種、特に固形腫瘍である場合、治療に対する反応は、

30

- 完全奏効（CR）：すべての標的病変の消失；
- 部分奏効（PR）：LDのベースラインの合計を基準として、標的病変の最長径（LD）の合計の少なくとも30%の減少；
- 疾患（SD）：治療開始以来の最小LDの合計を基準として、PRとするには不十分な減少であり、PDとするには不十分な増加である；または
- 進行（PD）：治療開始以来に記録された最小LDの合計を基準として、標的病変のLDの合計の少なくとも20%の増加、または1つ以上の新たな病変の出現と評価され得、

40

CRおよびPRは、治療に対する好ましい反応であり、PDは、治療に対する好ましくない反応である。

【0191】

50

本発明の使用

CCR9のエピトープに特異的に結合する本発明の抗体は、治療的に使用され得るだけでなく、免疫化学アッセイ、例えば免疫蛍光アッセイ、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫組織化学アッセイ、免疫沈降、または当技術分野において公知の他の免疫化学アッセイにおいて使用され得る。

【0192】

したがって、本発明の別の態様は、医薬として使用（以下、「本発明の第1の使用」）するための本発明の抗体である。

【0193】

本発明はまた、医薬の製造における本発明の抗体の使用に関する。あるいは、この態様は、本発明の抗体を投与することを含む治療方法として再構築され得る。

10

【0194】

本発明者らは、この抗体が、ヒト急性リンパ芽球性白血病のCCR9発現異種移植片モデルのインビボ成長を阻害することができ、壊死およびアポトーシスだけではなく血管新生および細胞増殖の減少を促進することができ、補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介するので、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に特に有用であることを示した。

【0195】

したがって、本発明の別の態様は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療に使用（以下、「本発明の第2の使用」）するための本発明の抗体である。

20

【0196】

本発明はまた、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療のための医薬の製造における本発明の抗体の使用に関する。あるいは、この態様は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の治療方法であって、本発明の抗体を投与することを含む治療方法として再構築され得る。

【0197】

用語「抗体」、「CCR9」、「CCR9発現細胞が関与する疾患または症状」およびそれらの詳細は、本発明の抗体との関連において詳細に記載されており、本発明の第1の使用との関連において同じ意味で使用される。

【0198】

本発明の第1の使用の特定の実施形態において、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状は、T細胞急性リンパ芽球性白血病、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、クローン病、炎症性腸疾患、肝線維症、急性肝炎、固形腫瘍由来の循環細胞からなる群より選択される。

30

【0199】

用語「治療」または「治療法」は区別なく使用され、疾患もしくは障害または再発性疾患もしくは障害の1つ以上の症候の重症度を予防、治療、遅延、軽減し、または前記1つ以上の症候を改善し、またはこのような治療の非存在下において予想される生存を超えて患者の生存を延長しようとする臨床的介入を指す。

【0200】

当業者であれば認識するように、本発明の抗体は、様々な形態（限定されないが、インタクトな抗体の形態、別の治療剤にコンジュゲートされたもの、および別の治療剤との融合タンパク質の形態を含む）において、治療用途において有用であり得る。これらの治療用途は、治療有効量の本発明の抗体を投与することを含むであろう。

40

【0201】

本明細書において使用される用語「治療有効量」は、CCR9発現細胞が関与する疾患または症状の1つ以上の症候の重症度の認識可能な予防、治療、遅延、軽減、または前記1つ以上の症候の改善を達成するために必要な本発明の抗体の量を指す。

【0202】

本発明の第1および第2の使用の特定の実施形態において、本発明の抗体は、インタク

50

トな抗体の形態（すなわち、免疫グロブリンの形態）である。本発明の抗体は、免疫グロブリンの形態である場合、典型的には、CCR9発現細胞に対する直接的な細胞傷害効果を使用する：(i)それは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を介して、または(ii)補体依存性細胞傷害(CDC)を介して免疫系の成分と相互作用する。

【0203】

抗体が細胞上の抗原に結合し、抗体Fcドメインが免疫エフェクター細胞の表面上のFc受容体(FcR)に係合すると、抗体依存性細胞傷害(ADCC)が起こる。Fc受容体のいくつかのファミリーが同定されており、特定の細胞集団は、規定のFc受容体を特徴的に発現する。例えば、好中球は、一般的に、ヒトFcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16)のB(脂質アンカー)アイソフォームを発現する。対照的に、ヒトナチュラルキラー(NK)細胞は、CD16のA(膜貫通)アイソフォームのみを発現する。この構造は、抗体とCD16との係合によって、アダプタータンパク質の動員およびNK細胞の活性化を促進する。

10

【0204】

補体依存性細胞傷害(CDC)は、抗体によって指令され得る別の細胞殺傷方法である。ADCCのように、異なるサブクラスの抗体は、CDC反応を誘発する様々な能力を有する。IgMは、補体活性化の最も有効なアイソタイプであり、IgG1およびIgG3は両方とも、古典的な補体活性化経路を介してCDCを指令するために非常に有効である。このカスケードにおいて、抗原-抗体複合体が形成されると、複数のC1q結合部位が、参加したIgG分子のC_H2ドメインのごく近くに露出される(C1qは、補体C1の3つのサブコンポーネントの1つである)。露出されたこれらのC1q結合部位が、以前の低親和性C1q-IgG相互作用を高結合力の相互作用に変換すると、一連の他の補体タンパク質が関与するカスケード事象がトリガーされて、エフェクター細胞走化性物質/活性化物質であるC3aおよびC5aがタンパク質分解放出される。補体カスケードは、膜傷害複合体(これは、細胞膜において、水および溶質の細胞内外への自由な通過を促進する100の細孔を作る)の形成により終了する。

20

【0205】

本発明の第1および第2の使用の別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、別の治療剤にコンジュゲートされるか、または別の治療剤との融合タンパク質の形態である。

【0206】

本発明のイムノコンジュゲートを形成するために適切な治療剤としては、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シンジオン、メイタンシンまたはその類似体もしくは誘導體、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-エ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；カリケアマイシンまたはその類似体もしくは誘導體；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、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、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、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導體、例えばカルボプラチン；およびデュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、CC-1065(a.k.a.レイチエルマイシン)またはCC-1065の類似体もしくは誘導體)、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、ダウノルピシン(以前はダウノマイシン)、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン(AMC))、抗有糸分裂剤(例えば、チューブリン阻害剤)、例えばモノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンFまたはドラスタチン1

30

40

50

0の他の類似体もしくは誘導体；ジフテリア毒素および関連分子（例えば、ジフテリアA鎖およびその活性断片およびハイブリッド分子）；リシン毒素（例えば、リシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素）、コレラ毒素、志賀様毒素（SLT-I、SLT-II、SLT-III）、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆ポーマン-パークプロテアーゼ阻害剤、シュードモナス外毒素、アロリン、サボリン、モデシン、ゲラニン、アプリンA鎖、モデシンA鎖、*Salsin*、*Aleurites fordii*タンパク質、*Jianxintan*タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、*Momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*Saponaire officinalis*阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシンおよびエノマイシン毒素が挙げられる。他の適切なコンジュゲート分子としては、抗菌性/溶解性ペプチド、例えばCLIP、マガニン2、メリチン、セクロピンおよびP18；リボヌクレアーゼ（RNase）、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ジフテリア毒素およびシュードモナスエンテロトキシンが挙げられる。例えば、Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) および Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994) を参照のこと。

10

【0207】

本発明の第1および第2の使用の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、細胞毒素、放射性核種、免疫抑制剤、化学療法薬またはサイトカインからなる群より選択される別の治療剤にコンジュゲートされるか、または前記別の治療剤との融合タンパク質の形態である。

20

【0208】

癌の細胞傷害性化学療法または放射線療法は、悪性細胞に対して選択的ではないので、前記治療法は、深刻で時には生命を脅かす副作用であって、感受性の正常細胞に対する毒性から生じる副作用によって制限される。これらの問題を回避する1つの戦略は、腫瘍関連抗原を認識する抗体または他のリガンドに治療剤をカップリングすることである。これは、リガンドターゲティング治療薬への悪性細胞の曝露を増加させ、正常細胞の曝露を減少させる。

【0209】

治療剤は、細胞傷害性放射線をCCR9発現細胞に放出するように作用する放射性核種であり得る。本発明の抗体にコンジュゲートすると、得られる分子は、放射免疫療法剤として有用である。

30

【0210】

本発明の第1および第2の使用の好ましい一実施形態において、本発明の抗体は、放射性核種にコンジュゲートされる。本発明との関連において有用な例示的な例としては、限定されないが、放射体、例えば ^{131}I 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu および ^{67}Cu ならびに放射体、例えば ^{213}Bi および ^{211}At が挙げられる。

【0211】

治療剤は、免疫抑制剤（すなわち、本明細書において治療される哺乳動物の免疫系を抑制またはマスクするように作用する物質）であり得る。これは、サイトカイン産生を抑制し、自己抗原発現をダウンレギュレートもしくは抑制し、またはMHC抗原をマスクする物質を含む。

40

【0212】

治療剤はまた、細胞傷害剤（すなわち、細胞の機能を阻害もしくは阻止し、および/または細胞の破壊を引き起こす物質）であり得る。この用語は、放射性同位体（上記）、化学療法剤、すなわち癌の治療に有用な化合物、および毒素、例えば小分子毒素または細菌起源、真菌起源、植物起源もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素またはそれらの断片を含むことを意図する。

【0213】

50

治療剤はまた、サイトカイン、ホルモン、成長因子、壊死因子、すなわち、細胞間メディエーターとして、または同じ細胞集団においてさえ別の細胞に対して作用するある細胞集団によって放出されたタンパク質またはペプチドであり得る。本明細書において使用される用語サイトカインは、天然源由来の、または組換え細胞培養物由来のタンパク質およびペプチド、ならびにネイティブ配列のサイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0214】

本発明の第1および第2の使用の好ましい一実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の毒素分子にコンジュゲートされる。使用され得る酵素的に活性な毒素およびその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(*Pseudomonas aeruginosa*由来の)エクソトクシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンシタンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質(PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、*momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaonarria officinalis*阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンが挙げられる。

10

【0215】

本発明は、核酸分解活性を有する化合物(例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNase)、または細胞構造もしくは細胞小器官を損傷して細胞を殺傷するかもしくは細胞の生命力を減退することができる他の化合物に本発明の抗体がコンジュゲートされることをさらに企図する。

20

【0216】

抗体と細胞傷害剤とのコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤またはリンカーを使用して行われ得る。リンカーは、細胞内における細胞傷害剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカーを使用し得る。

【0217】

あるいは、抗体および細胞傷害剤を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製され得る。

【0218】

治療剤はまた、プロドラッグ(これは、薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態であって、腫瘍細胞に対する細胞傷害性が親薬物と比較して低く、酵素的に活性化されることができるか、またはより活性な親形態に変換されることができるものを指す)であり得る。

30

【0219】

本発明の第1および第2の使用の好ましい一実施形態において、本発明の抗体はまた、プロドラッグを活性抗癌薬に変換するプロドラッグ活性化剤とコンジュゲートされ得る。このようなコンジュゲートの薬剤成分としては、プロドラッグをより活性な細胞傷害形態に変換するようにプロドラッグに対して作用することができる任意の薬剤が挙げられる。これは、抗体指向性酵素プロドラッグ治療法(ADEPT)に特に有用である。

40

【0220】

本発明において有用な酵素としては、プロドラッグを活性治療剤(薬物)に変換し得る任意の酵素が挙げられる。特定の実施形態において、酵素は、哺乳動物由来の酵素、例えばヒトの酵素である。別の特定の実施形態において、酵素は、哺乳動物以外の生物由来の酵素である;この最後の実施形態において、酵素の免疫原性は、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)などへのコンジュゲーションによって場合により減少していてもよい。特定の実施形態によれば、前記酵素、および類似の基質特異性を有する酵素はいずれも、投与の経路またはプロドラッグの生体内分布によって、被験体にとって内因性のものではない。

【0221】

50

プロテアーゼ、グリコシダーゼ、エステラーゼなどは、本発明にしたがって使用される一般的な種類の酵素である。適切な酵素の具体例としては、限定されないが、グリコシダーゼ（ α -グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ）、 β -ラクタマーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、フルクターゼ、アミノペプチダーゼ、リゾチーム、シトシンデアミナーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ペニシリンアミダーゼ、メチオニンリアーゼおよびカルボキシエステラーゼが挙げられる。酵素は、選択されたプロドラッグをその活性薬物形態に変換するその能力について選択される。例えば、プロドラッグがデキストランと治療剤とのコンジュゲートを含む場合、適切な酵素は、デキストラナーゼであろう。同様に、セルラーゼは、セルロース基質を含むプロドラッグと共に使用され得、グルクロニダーゼは、グルクロニドを含むプロドラッグと共に使用され得る。

10

【0222】

好ましい実施形態において、酵素は、グリコシダーゼ（グルクロニダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ）、 β -ラクタマーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、フルクターゼ、アミノペプチダーゼ、リゾチーム、シトシンデアミナーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ペニシリンアミダーゼ、メチオニンリアーゼおよびカルボキシエステラーゼ、または触媒活性を有するそれらの機能変異体もしくは断片からなる群より選択される。より好ましくは、酵素は、グリコシダーゼ（例えば、 β -ガラクトシダーゼ）またはシトシンデアミナーゼである。

【0223】

本発明との関連において有用な薬物としては、毒素、抗生物質または化学療法薬、放射性同位体、常磁性イオン、ホウ素付加物、サイトカイン、光増感剤、放射線増感剤、血管拡張剤、免疫調節剤、免疫抑制剤、（グルコ）コルチコイドなどが挙げられる。

20

【0224】

特定の実施形態において、薬物は、化学療法薬、例えば細胞傷害活性を有する薬物である。薬物またはプロドラッグの細胞傷害活性は、当技術分野において周知のアッセイによって実施され得る。例えば、細胞傷害効果を有する化合物は、細胞膜完全性を損なうことが多いので、細胞膜完全性の評価は、細胞生存および細胞傷害効果を測定するための最も一般的な方法の1つである。トリパンブルーまたはヨウ化プロピジウムなどのバイタル色素は、通常、正常細胞の内部から排除される；細胞膜が損なわれている場合、それらは膜を自由に通過し、細胞内成分を染色する。あるいは、膜完全性は、細胞内に通常隔離されている物質の外部への通過をモニタリングすることによって評価され得る。一般に測定される分子の1つは、乳酸脱水素酵素（LDH）である。

30

【0225】

細胞傷害性はまた、MTTアッセイを使用してモニタリングされ得る。このアッセイは、比色反応を使用して細胞の還元電位を測定する。生存細胞は、ジメチルチアゾリルジフェニルテトラゾリウム塩（MTT）試薬を着色ホルマザン生成物に還元する。酸化還元に基づく類似のアッセイもまた、蛍光色素レサズリンを使用して開発されている。細胞の酸化還元電位を示すための色素を使用してそれらの生存をモニタリングすることに加えて、生存マーカーとしてATP含有量を使用するアッセイも使用され得る。このようなATPに基づくアッセイとしては、ATPがルシフェラーゼ反応の制限試薬である生物発光アッセイが挙げられる。細胞傷害性はまた、スルホローダミンB（SRB）アッセイ、水溶性テトラゾリウム塩（WST）アッセイおよびクロン原性アッセイによって測定され得る。接着動物細胞の細胞傷害反応をリアルタイム追跡する無標識アプローチは、金膜電極上において細胞を成長させた際の電気インピーダンス測定に基づくものである。この技術は、電気細胞-基質インピーダンスセンシング（ECIS）と称される。

40

【0226】

別の特定の実施形態において、薬物は、薬物が放出されるその対応するプロドラッグよりも細胞傷害性である。化合物の細胞傷害性は、典型的には、その IC_{50} 値として表される。本明細書において使用される IC_{50} 値は、半最大阻害濃度を指し、インビボにおける最大効果の50%を達成するために必要な化合物濃度を表す。特定の好ましい実施形

50

態において、活性薬物は、その対応するプロドラッグよりも細胞傷害性である。これは、プロドラッグの IC_{50} / 薬物の IC_{50} の比である QIC_{50} 値を用いて推定され得る。 QIC_{50} 値は、5 もしくは 5 超、例えば 10 もしくは 10 超、 10^2 もしくは 10^2 超、 10^3 もしくは 10^3 超、 10^4 もしくは 10^4 超、またはさらにそれ以上であり得る。好ましくは、 QIC_{50} は、 10^2 超、より好ましくは 10^3 超である。

【0227】

本発明との関連において使用され得るプロドラッグの例示的で非限定的な例としては、グリコシドプロドラッグ、例えばデュオカルマイシン由来のガラクトシルプロドラッグ、 N -(-D-ガラクトピラノシルオキシカルボニル)-ドキソルピシンおよび N -[4-(D-ガラクトピラノシル)-3-ニトロベンジルオキシカルボニル]ダウノマイシン；5-フルオロシトシン；セファロスポリンプロドラッグ、例えば PROTAX (タキソールのセファロスポリン誘導体)、C-DOX (ドキソルピシンのセファロスポリン誘導体)、CCM (セファロスポリンマスタードプロドラッグ) など；パリトキシンプロドラッグ NHPAP、ドキソルピシンプロドラッグ DPO、コンプレタスタチンプロドラッグ、例えばコンプレタスタチン A-4 プロドラッグ (CA-4PD)、ビスホスホネートプロドラッグ、例えば Bisphosphonamidate clodronate などが挙げられる。プロドラッグは、通常、周知の方法、例えば Burger "Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6th ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) および "Design and Applications of Prodrugs" (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers) に記載されているものを使用して調製され得る。

10

20

【0228】

あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結された少なくとも本発明の抗体を含む融合タンパク質は、当技術分野において周知の組換え DNA 技術を使用して構築され得る。

【0229】

ヒト抗体、部分的ヒト抗体またはヒト化抗体は、多くの用途（特に、ヒト被験体における治療のための医薬の調製における抗体の使用を含むもの）に適切であるが、他の種類の抗体（すなわち、異なる起源のもの）は、特定の用途に適切である。本発明の非ヒト抗体は、例えば、任意の抗体産生動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ロバまたは非ヒト霊長類、例えばサル（例えば、カニクイザルまたはアカゲザル）もしくは類人猿（例えば、チンパンジー）に由来し得る。本発明の非ヒト抗体は、例えば、インビトロおよび細胞培養ベースの用途において使用され得るか、または本発明の抗体に対する免疫反応が起こらず、重要ではなく、防止され得、懸案事項ではなく、もしくは望まれる任意の他の用途において使用され得る。

30

【0230】

別の態様において、本発明は、疾患の治療方法に用いられる本発明の抗体であって、前記治療方法が、標的細胞（すなわち、CCR9 発現細胞 (CCR9⁺)）を殺傷することを含む本発明の抗体に関する；または、別様に表現すると、この態様によれば、本発明は、疾患の治療のための医薬の製造における本発明の抗体の使用であって、前記治療が、標的細胞（すなわち、CCR9 発現細胞 (CCR9⁺)）を殺傷することを含む使用に関する。この用途において、本発明の抗体は、好ましくは、医薬組成物（その詳細は以下に記載され、参照により本明細書に組み込まれる）によって投与されるであろう。特定の実施形態において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体、例えば実施例において 91R および 92R mAb として同定した抗体などである。別の特定の実施形態において、標的細胞は、前記細胞における CCR9 の発現および / または量および / または分布が変化している疾患または症状に含まれる腫瘍 CCR9 発現細胞または非腫瘍 CCR9 発現細胞である。別の特定の実施形態において、前記疾患または症状は、T 細胞急性リンパ芽球性白血病、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、固形腫瘍由来の循環細胞

40

50

、クローン病、炎症性腸疾患、肝線維症および急性肝炎からなる群より選択される。

【0231】

別の態様において、本発明は、イメージング技術を用いた腫瘍診断に用いられる本発明の抗体であって、前記腫瘍がCCR9発現細胞(CCR9⁺)を含む本発明の抗体に関する；または、別様に表現すると、この態様によれば、本発明は、イメージング技術を用いたインビボ腫瘍診断のための組成物の製造における本発明の抗体の使用であって、前記腫瘍がCCR9発現細胞(CCR9⁺)を含む使用に関する。この用途において、本発明の抗体は、好ましくは、医薬組成物によって投与されるであろう。特定の実施形態において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体、例えば実施例において91Rおよび92R mAbとして同定した抗体などである。別の特定の実施形態において、イメージング技術は、核医学において使用される技術である。これらの技術としては、限定されないが、シンチグラフィ、SPECTおよびPETが挙げられる。当業者であれば、これらの技術を実施するためには、適切な放射性核種によって本発明の抗体を標識することが必要であることを理解するであろう。この態様において使用され得る適切な放射性核種は、本明細書の他の箇所に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。別の特定の実施形態において、前記腫瘍は、T細胞急性リンパ芽球性白血病、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌および固形腫瘍由来の循環細胞からなる群より選択される。

10

【0232】

別の態様において、本発明は、CCR9発現細胞(CCR9⁺)を含む腫瘍に薬物をターゲティングするために用いられる本発明の抗体に関する；または、別様に表現すると、この態様によれば、本発明は、CCR9発現細胞(CCR9⁺)を含む腫瘍に薬物をインビボターゲティングするための組成物の製造における本発明の抗体の使用に関する。したがって、本発明の抗体は、腫瘍に対するビヒクル、例えばナノビヒクルとみなされ得る。この用途において、本発明の抗体は、好ましくは、医薬組成物(その詳細は以下に記載され、参照により本明細書に組み込まれる)によって投与されるであろう。特定の実施形態において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体、例えば実施例において91Rおよび92R mAbとして同定した抗体などである。別の特定の実施形態において、薬物は、毒素、抗生物質または化学療法薬、放射性同位体、常磁性イオン、ホウ素付加物、サイトカイン、光増感剤、放射線増感剤、血管拡張剤、免疫調節剤、免疫抑制剤および(グルコ)コルチコイド(それらの詳細は以下に記載され、参照により本明細書に組み込まれる)からなる群より選択される。別の特定の実施形態において、前記腫瘍は、T細胞急性リンパ芽球性白血病、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌および固形腫瘍由来の循環細胞からなる群より選択される。

20

30

【0233】

別の態様において、本発明は、炎症性疾患におけるCCR9発現細胞を除去することによる炎症性疾患の治療に用いられる本発明の抗体に関する；または、別様に表現すると、この態様によれば、本発明は、CCR9発現細胞を除去することによって炎症性疾患を治療するための医薬組成物の製造における本発明の抗体の使用に関する。したがって、本発明の抗体は、炎症性疾患に対するビヒクル、例えばナノビヒクルとみなされ得る。一実施形態において、炎症性疾患は、CCR9発現細胞が関与する炎症性疾患であり、本発明の抗体は、前記炎症性疾患に関与するCCR9発現細胞を除去する。この用途において、本発明の抗体は、好ましくは、医薬組成物(その詳細は以下に記載され、参照により本明細書に組み込まれる)によって投与されるであろう。特定の実施形態において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体、例えば実施例において91Rおよび92R mAbとして同定した抗体などである。別の特定の実施形態において、薬物は、毒素、抗生物質または化学療法薬、放射性同位体、常磁性イオン、ホウ素付加物、サイトカイン、光増感剤、放射線増感剤、血管拡張剤、免疫調節剤、免疫抑制剤および(グルコ)コルチコイド(それらの詳細は以下に記載され、参照により本明細書に組み込まれる)からなる群より選択される。別の特定の実施形態において、前記炎症性疾患は、クローン病、炎症性腸疾患、肝線維症および急性肝炎からなる群より選択される。

40

50

【0234】

本発明の別の態様は、サンプル中のCCR9タンパク質を検出、位置決定および/または定量するためのバイオテクノロジー技術におけるツールとしての本発明の抗体の使用(以下、「本発明の第3の使用」)に関する。

【0235】

したがって、本発明の抗体は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段または化学的手段によって、その位置決定および/または同定を可能にする検出可能な標識または標識剤によって標識され得る。したがって、特定の実施形態において、本発明の抗体は、標識剤を含む。

【0236】

本明細書において使用される用語「検出可能な標識」または「標識剤」は、適切な検出手順および検出装置を使用して、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段または化学的手段のいずれかによって、それが結合している分子の検出、位置決定および/または同定を可能にする分子標識を指す。

【0237】

したがって、特定の実施形態において、本発明の抗体は、その後の検出が可能ないように改変される。したがって、本発明は、抗体の検出を可能にする検出可能な薬剤によって本発明の抗体を改変する可能性を企図する。検出可能な薬剤の非限定的な例としては、放射性同位体および蛍光基が挙げられる。

【0238】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、放射性同位体によって改変される。本発明に適切な放射性同位体の非限定的な例としては、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At および ^{213}B が挙げられる。放射性同位体標識は、典型的には、金属イオンを錯化することができるキレートリガンド、例えばDOTA、DOTP、DOTMA、DTPAおよびTETAを使用することによって実施される。放射性同位体をタンパク質にコンジュゲートするための方法は、従来技術において周知である。

【0239】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、蛍光基によって標識される。蛍光基は、アミノ酸の側鎖に直接的に、または連結基を介して結合され得る。ポリペプチド蛍光試薬をコンジュゲートするための方法は、従来技術において周知である。

【0240】

蛍光基によってポリペプチド(例えば、抗体)を標識するために適切な試薬としては、アミノ基およびチオール基を含む、タンパク質の側鎖に記載されている様々な基と反応する能力を示す化学基が挙げられる。したがって、本発明の抗体を改変するために使用され得る化学基としては、限定されないが、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル(例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネート、塩化スルホニル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、ホスホラミダイトなどが挙げられる。適切な反応性官能基の例は、カルボキシル基によって改変された検出可能な基のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)である。典型的には、蛍光化合物を改変するカルボキシル基は、前記化合物をカルボジイミド試薬(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、ウロニウム、またはTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート)、HBTU(O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)またはHATU(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)などの試薬、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)およびN-ヒドロキシスクシンイミドのタイプの活性化剤と接触させることによって活性化されて、標識のNHSエステルが得られる。

10

20

30

40

50

【0241】

本発明の第3の使用に使用するために適切な蛍光化合物としては、限定されないが、臭化エチジウム、SYBRグリーン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、テトラメチルイソチオール(TRIT)、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン、HEX(6-カルボキシ-2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン)、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、Joe(6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン)、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、ローダミン、テトラメチルローダミン(Tamra)、Rox(カルボキシ-X-ローダミン)、R6G(ローダミン6G)、フタロシアニン、アゾメタジナス、シアニン(Cy2, Cy3およびCy5)、テキサスレッド、プリンストンレッド、BODIPY FL-Br2、BODIPY 530/550、BODIPY TMR、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、DABCYL、エオシン、エリスロシン、臭化エチジウム、緑色蛍光タンパク質(GFP)およびその類似体、無機系蛍光半導体ナノ結晶(量子ドット)、蛍光標識系ランタニド、例えばEu³⁺およびSm³⁺などが挙げられる。

10

【0242】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、結合ペアの第1のメンバーにコンジュゲートすることによって標識される。好ましい実施形態において、この改変は、共有結合ビオチン化である。本明細書において使用される用語「ビオチン化」は、分子(典型的には、タンパク質)へのビオチンの共有結合を指す。ビオチン化は、タンパク質の側鎖にコンジュゲートすることができるビオチン試薬を使用して実施され、前記コンジュゲーションは、タンパク質の側鎖に含まれる第1級アミノ基およびチオール基に対して主に起こる。アミノ基のビオチン化に適切な試薬としては、ビオチンと、アミノ基と反応することができる基(例えば、スクシンイミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステルまたはハロゲン化アルキル)とを含有する分子であって、ビオチン部分および反応性基が、任意の長さ(例えば、8~40Åの長さ)のスペーサーによって分離されている分子が挙げられる。これらの薬剤のいくつかの例としては、ビオチン化NHS-ビオチン(ビオチンとNHS基との間に5個の炭素原子のエステル結合を含有する)、スルホ-NHS-ビオチン、NHS-LC-ビオチン、スルホ-NHS-LC-ビオチン、NHS-LC-LC-ビオチン、スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン、スルホ-NHS-SS-ビオチン、NHS-PEO₄-ビオチン、PFPP-ビオチン、TFPP-PEO-ビオチンなどの薬剤が挙げられ、「NHS」は、N-ヒドロキシスクシンイミドを指し、「LC」は、NHSとビオチン基との間に位置する6個の炭素原子のアミド結合を指し、「PEO」は、エチレンオキシド基(下付き文字は、PEO単位の数を示す)を指し、「PFPP」は、ペンタフルオロフェニル基を指し、「TFPP」は、テトラフルオロフェニル基を指し、「スルホ」は、スルホン酸基(SO₃)を指し、「SS」は、ジスルフィド基を指す。チオール基を有するビオチン化試薬の例としては、任意の長さのスペーサーによって分離されている、ビオチンの基と、マレイミドまたはハロゲン化アルキル型とを含む分子が挙げられる。ビオチン化試薬の例としては、マレイミド-PEG-ビオチン、ビオチン-BMCC(マレイミド基N末端およびシクロヘキシル基、2個のアミドおよび9個の炭素原子リンカーを含有する)、PEO-ヨードアセチルビオチン、ヨードアセチル-LC-ビオチン、ビオチン-HPDP(ピリジルジスルフィドを含有する)などが挙げられる。

20

30

40

【0243】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、金属イオン、例えば金(Au)(コロイド状金ナノ粒子を含む)によって標識され、これらは、静電相互作用を介して抗体に直接結合され得る。別の特定の実施形態において、コロイド状金ナノ粒子は、ビオチンにプレカップリングされており、抗体に共有結合され得る。

50

【0244】

本発明の別の態様は、サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞の検出および/または定量における本発明の抗体の使用である。本発明の抗体による、サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞の検出および/または定量は、インビトロにおいて行われ得る。本発明の抗体の使用は、サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞の存在を検出、同定および/または定量するための任意の免疫化学アッセイまたは免疫蛍光アッセイによって行われ得る。免疫化学アッセイまたは免疫蛍光アッセイの例としては、限定されないが、免疫センサー、免疫沈降、ウエスタンブロット、ドットブロット、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、免疫細胞化学、免疫組織化学およびフローサイトメトリーが挙げられる。

10

【0245】

サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞の存在を検出、同定および/または定量するための本発明の抗体の使用は、サンプル中に存在するCCR9またはCCR9発現細胞の存在を検出および/または定量するためのインビトロ方法であって、
i) 試験サンプルを本発明の抗体と接触させること、
ii) 前記抗体との免疫複合体の形成を検出および/または定量すること
を含んでなるインビトロ方法の実施を必要とする。

【0246】

前記方法は、本発明のさらなる態様を構成する。

【0247】

本発明の方法を使用して、多種多様なフォーマットの免疫化学分析のいずれかを使用し得る。分析のこのような免疫化学技術としては、限定されないが、ELISA、イムノアッセイストリップまたはLFA、免疫センサー、免疫親和性抽出システム、免疫沈降、ウエスタンブロット、ドットブロット、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫細胞化学および免疫組織化学が挙げられる。

20

【0248】

当業者であれば理解するように、サンプル中のCCR9の存在の検出、同定および/または定量は、多くの用途(CCR9+循環腫瘍細胞の検出、CCR9+細胞亜集団、特にCCR9+幹細胞の表現型分析を含む)における本発明の抗体の使用を可能にする。

【0249】

CCR9+循環腫瘍細胞の検出は、通常、周囲の正常血液細胞と区別される循環腫瘍細胞の異なる特性(物理的特性(サイズ、密度、電荷、変形能)および生物学的特性(表面タンパク質発現、主にEpCAM発現およびCCR9発現)を含む)に基づく技術の大型パネルを含む、循環腫瘍細胞の濃縮工程を含む。濃縮後、循環腫瘍細胞画分は、通常、相当数の白血球を依然として含有するので、単一細胞レベルにおいて腫瘍細胞と正常血液細胞とを区別し得る方法によって、循環腫瘍細胞を同定しなければならない。タンパク質ベースの戦略においては、サイトケラチン(CK;陽性マーカー)、共通の白血球抗原CD45(陰性マーカー)および核色素(DAPI)について、細胞を蛍光染色する;循環腫瘍細胞は、CK+/CD45-/DAPI+細胞と同定されている。次いで、多くの異なるアッセイによって、例えば本発明の抗CCR9抗体による直接的な検出によって、または本発明の抗CCR9抗体によってコーティングされたマイクロポストのアレイからなる循環腫瘍細胞チップによって、循環腫瘍細胞が豊富なサンプルを、CCR9+細胞の存在について試験し得る。

30

40

【0250】

本発明の抗体はまた、CCR9+細胞亜集団、特にCCR9+幹細胞の表現型分析において、例えば哺乳動物細胞を表現型決定するためのマイクロアレイの一部として使用され得る。

【0251】

本発明の抗体はまた、CCR9発現細胞、例えば間葉系幹細胞の単離または精製において使用され得る。したがって、本発明の別の態様は、CCR9発現細胞、例えば間葉系幹

50

細胞の単離および/または精製における本発明の抗体の使用である。当業者であれば、この用途を使用して単離された間葉系幹細胞は、再生細胞治療において有用であることを理解するであろう。

【0252】

CCR9発現細胞の単離および/または精製のために、固相または可溶性相のいずれかにおいて、多種多様なフォーマットを使用し得る。

【0253】

本発明の抗体の特定の用途は、白血球フェレーシスなどの技術である。本明細書において使用される用語「白血球フェレーシス」は、血液から白血球を分離し、残りの成分を血液循環に戻す手順を指す。したがって、それは、体外治療（体外において実施される医療処置）である。白血球フェレーシスを行うための方法の1つは、本発明の抗体とカップリングされた選択的白血球フェレーシスカラムを使用することによるものである。当業者であれば、この用途は、例えば、炎症性腸疾患の治療において有用であることを理解するであろう（Eberhardson et al., 2013, Clin Immunol. 149: 73 - 82）。

10

【0254】

本発明によるキット

本発明はまた、上記方法および使用を行うためのキットを提供する。

【0255】

したがって、別の態様において、本発明は、少なくとも本発明の抗体を含んでなるキット（以下、「本発明のキット」）に関する。

20

【0256】

特定の実施形態において、本発明のキットは、本発明の抗体に加えて、さらなる治療剤を含む。前記治療剤の詳細は、本発明の抗体の治療用途に関連して既に記載されており（例えば、本発明の第1および第2の使用を参照のこと）、参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態において、前記治療剤は、本発明の抗体にコンジュゲートされ得るか、または本発明の抗体と融合タンパク質を形成し得る。

【0257】

本発明との関連において、「キット」は、本発明の方法を行うために必要な様々な試薬であって、それらの輸送および保存を可能にするようにパッキングされた様々な試薬を含む製品と理解される。キットの構成要素をパッキングするために適切な材料としては、クリスタル、プラスチック（ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネートなど）、ボトル、バイアル、紙、封筒などが挙げられる。加えて、本発明のキットは、キット内の様々な構成要素の同時使用、連続使用または別個使用のための説明書を含むし得る。前記説明書は、印刷物の形態、またはサブジェクトによって読み取り可能な説明書を保存することができる電子支持体の形態、例えば電子記憶媒体（磁気ディスク、テープなど）、光媒体（CD-ROM、DVD）などであり得る。加えてまたはあるいは、媒体は、前記説明書を提供するインターネットアドレスを含むし得る。

30

【0258】

本発明のキットは、CCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状を診断および/もしくは予後予測するために（とりわけ、イメージング技術を用いたCCR9+腫瘍の診断を含む）、または治療中の被験体におけるCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状の治療に対する反応をモニタリングするために、またはCCR9発現細胞が関与する疾患もしくは症状を治療するために（とりわけ、標的細胞（CCR9⁺）を殺傷することを含む治療方法、およびCCR9発現細胞を除去することによる炎症性疾患の治療方法を含む）、またはCCR9⁺細胞を含む腫瘍に薬物をターゲティングするために、またはバイオテクノロジー技術（例えば、サンプル中のCCR9タンパク質を検出、位置決定および/もしくは定量するためのバイオテクノロジー技術など）におけるツールとして、またはサンプル中に存在するCCR9もしくはCCR9発現細胞を検出および/もしくは定量するために使用され得る。

40

50

【0259】

したがって、別の態様において、本発明は、

- CCR9 発現細胞が関与する疾患もしくは症状を診断および/もしくは予後予測するための、
 - 治療中の被験体における CCR9 発現細胞が関与する疾患もしくは症状の治療に対する反応をモニタリングするための、
 - CCR9 発現細胞が関与する疾患もしくは症状を治療するための、
 - CCR9⁺ 細胞を含む腫瘍に薬物をターゲティングするための、
 - サンプル中の CCR9 タンパク質を検出、位置決定および/もしくは定量するためのバイオテクノロジー技術におけるツールとしての、または
 - サンプル中に存在する CCR9 もしくは CCR9 発現細胞を検出および/もしくは定量するための、
- 本発明のキットの使用に関する。

10

【0260】

用語「抗体」および「CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状」は、本発明の抗体および本発明の診断/予後予測方法との関連において詳細に記載されており、これらの用語およびそれらの詳細は、本発明の第1のキットに同様に適用される。

【0261】

本発明のキットの好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：1 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-H1、配列番号：2 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-H2、および配列番号：3 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-H3 を含み、軽鎖内に、配列番号：4 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-L1、配列番号：5 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-L2、および配列番号：6 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-L3 を含む。

20

【0262】

本発明のキットの別の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、重鎖内に、配列番号：7 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-H1、配列番号：2 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-H2、および配列番号：3 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-H3 を含み、軽鎖内に、配列番号：8 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-L1、配列番号：9 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-L2、および配列番号：10 に示されているアミノ酸配列からなる CDR-L3 を含む。

30

【0263】

医薬組成物

別の態様において、本発明は、治療有効量の本発明の抗体またはその薬学的誘導体もしくはそのプロドラッグを、被験体に投与するための薬学的に許容され得る賦形剤、担体、アジュバントまたはビヒクルとともに含んでなる医薬組成物（以下、「本発明の医薬組成物」）に関する。前記医薬組成物は、CCR9 発現細胞が関与する疾患または症状を有する被験体に投与して、CCR9 発現細胞を殺傷するために、または CCR9 発現細胞のアポトーシスを誘導するために使用され得る。

【0264】

本明細書において使用される用語「薬学的に許容され得る担体」は、医薬投与に適合する任意のすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含むことを意図する。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤を使用することは当技術分野において周知である。いかなる従来の媒体および薬剤も活性化合物に不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が企図される。許容され得る担体、賦形剤または安定剤は、用いられる用量および濃度においてレシピエントに無毒であり、緩衝剤（例えば、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸類）；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンなど）；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン（例えば、

40

50

メチルパラベンまたはプロピルパラベン) ; カテコール ; レゾルシノール ; シクロヘキサノール ; 3 - ペンタノールおよび m - クレゾール) ; 低分子量 (約 10 残基未満) ポリペプチド ; タンパク質 (例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン) ; 親水性ポリマー (例えば、ポリビニルピロリドン) ; アミノ酸 (例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシン) ; 単糖類、二糖類および他の炭水化物類 (グルコース、マンノースまたはデキストリンなど) ; キレート化剤 (例えば、EDTA) ; 糖類 (例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール) ; 塩形成対イオン類 (例えば、ナトリウム) ; 金属錯体 (例えば、Zn - タンパク質複合体) および / または非イオン性界面活性剤 (例えば、TWEEN (登録商標)、PLURONICS (登録商標) またはポリエチレングリコール (PEG)) が挙げられる。

【0265】

本発明の抗体は、同じ製剤であり得るか、または異なる製剤によって投与され得る。投与は、同時または連続であり得、いずれかの順序において有効であり得る。

【0266】

補助的な活性化化合物もまた、本発明の医薬組成物に組み込まれ得る。したがって、特定の実施形態において、本発明の医薬組成物はまた、治療される特定の適応症に必要なような2つ以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する化合物を含有し得る。例えば、化学療法薬、サイトカイン、鎮痛剤または免疫抑制剤をさらに提供することが望ましい場合がある。このような他の活性薬剤の有効量は、とりわけ、医薬組成物中に存在する本発明の抗体の量、疾患もしくは障害または治療の種類などに依存する。

【0267】

一実施形態において、本発明の抗体は、体内からの迅速な排出から前記化合物を保護する担体と共に調製される (例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤) 。エチレンビニルアセテート、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などの生分解性生体適合性ポリマーが使用され得る。このような製剤の調製方法は、当業者に明らかであろう。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されている当業者に公知の方法にしたがって調製され得る。

【0268】

本発明の抗体 (またはその断片) の投与経路は、腫瘍内または非経口であり得る。

【0269】

本明細書において使用される用語「非経口」は、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与または腔内投与を含む。非経口投与の静脈内形態が一般に好ましい。当然のことながら、治療効果または予防効果に必要な抗体の量は、選択される抗体、治療される症状の性質および重症度、ならびに患者によって変化するであろう。

【0270】

加えて、抗体は、例えば、漸減用量の抗体を用いてパルス注入によって適切に投与され得る。好ましくは、投薬は、投与が短期的または長期的であるかに部分的に応じて、注射、最も好ましくは静脈内注射または皮下注射によって行われる。

【0271】

別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、適切な単位剤形において、非経口投与に適合され得る (例えば、滅菌溶液、懸濁液または凍結乾燥製品) 。注射用途に適切な医薬組成物としては、滅菌水溶液 (水溶性である場合) または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調製用滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、適切な担体としては、生理的食塩水、静菌水、Cremophor EM (BASF、Parsippany, N. J.) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。すべての場合において、組成物は滅菌性でなければならず、注射容易性が存在する程度に流動的であるべきである。それは、製造および保存の条件下において安定でなければならず、細菌および真菌

などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、薬学的に許容され得るポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）およびこれらの適切な混合物を含有する溶剤または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には所要の粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合において、等張剤、例えば糖類、多価アルコール類（例えば、マンニトール）、ソルビトールおよび塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいであろう。注射組成物の長期間吸収は、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/またはゼラチンなどを組成物に含めることによってもたらされ得る。

10

【0272】

滅菌注射溶液は、先に列挙した成分の1つまたはその組み合わせを必要に応じて含む適切な溶剤に活性化化合物（例えば、ポリペプチドまたは抗体）を所要量配合し、次いでろ過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散液は、塩基性分散媒と、先に列挙したものからの他の所要成分とを含有する滅菌賦形剤に活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、活性成分と、予め滅菌ろ過したその溶液からのさらなる所望成分との粉末が得られる。

20

【0273】

特定の実施形態において、前記医薬組成物は、静脈内または腫瘍内を介して投与される。増量剤、緩衝剤または界面活性剤などの適切な賦形剤が使用され得る。前記製剤は、標準的な方法、例えばスペインおよび米国の薬局方ならびに類似参考文献において記載または言及されているものを使用して調製される。

【0274】

容易な投与および投与量の均一性のための単位剤形において、医薬組成物（すなわち、経口または非経口組成物）を製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される単位剤形は、治療すべき被験体のための単位投与量として適切な物理的に別個の単位を指す；各単位は、所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化化合物（本発明の抗体）を、必要な医薬担体と共に含有する。本発明の単位剤形の仕様は、活性化化合物の固有の特徴、および達成すべき特定の治療効果、および個体の治療のためにこのような化合物を配合する分野に特有の制限によって決定され、これらに直接依存する。

30

【0275】

一般に、本発明の抗体の有効投与量は、選択された化合物の相対的効果、治療される障害の重症度および患者の体重に依存するであろう。しかしながら、活性化化合物は、典型的には、1日1回以上、例えば1日1回、2回、3回または4回投与され、典型的な総1日用量は、0.001~1,000 mg/kg体重/日、好ましくは約0.01~約100 mg/kg体重/日、最も好ましくは約0.05~10 mg/kg体重/日の範囲内である。

40

【0276】

患者への抗体の投与とは別に、本出願は、遺伝子治療による抗体投与を企図する。国際公開第96/07321号は、細胞内抗体を作製するための遺伝子治療の使用に関する。

【0277】

医薬組成物は、投与説明書と共に、容器、パックまたはディスペンサーに含められ得る。

【0278】

本発明の抗体および医薬組成物は、併用療法を提供するために他の薬物と共に使用され得る。他の薬物は、同じ組成物の一部を形成し得るか、または同じ時点もしくは異なる時点において投与するための別個の組成物として提供され得る。併用療法において適切な薬物の非限定的な例は、CCR9アンタゴニスト、例えば米国特許出願公開第2005/0

50

049286号に記載されているもの、CCCL25-PE38融合タンパク質(Huetal., 2011、前掲)である。

【0279】

本発明の抗体および医薬組成物は、医学的症候、例えばCCR9発現細胞が関与する疾患および症候の治療において、特にT細胞急性リンパ芽球性白血病、前立腺癌、乳癌、メラノーマ、クローン病、炎症性腸疾患を治療するために有用であろう。

【0280】

別の特定の実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも1つの治療剤がロードされたナノ容器にカップリングされる。したがって、本発明の抗体にカップリングされたナノ容器は、投与されると、標的細胞(すなわち、CCR9発現細胞)に向かう。リポソームおよびナノ粒子は、一般に使用されるナノ容器の例示的な形態である。リポソームは、好ましくは、200ナノメートル未満の直径を有する。50~150ナノメートルの直径を有するリポソームが好ましい。約80ナノメートルの外径を有するリポソームまたは他のナノ容器が特に好ましい。適切な種類のリポソームは、リポソーム内のDNAを安定化するための少量(1%)のカチオン性脂質、例えばジドデシルジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)と共に、中性リン脂質、例えば1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(POPC)、ジホスファチジルホスホコリン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)またはコレステロールから作られる。

10

【0281】

本発明の抗体を使用するための他の適切な容器としては、 dendritic が挙げられる。用語「 dendritic 」は、コアを有する高分子であって、コアから生じる分岐構造の複数のシェルを有する高分子を指す。樹状担体の形状およびサイズは、変化し得る。いくつかの場合において、樹状担体は、形状がほぼ球状または球形であり得る。さらに、樹状担体は、約150Å(A)~約250Å(A)の範囲内の直径を有し得、対応する分子量の範囲は、例えば、約500ダルトン~約200万ダルトン~である。 dendritic は、様々な供給元(例えば、Dendritech、Midland、Michigan)から商業的に入手され得るか、または当業者に公知の方法によって合成され得る。樹状分子は、大まかに低分子量種および高分子量種に分けられ得る。第1のカテゴリーは、 dendritic および dendritic を含むのに対して、第2は、樹状ポリマー、超分岐ポリマーおよびブラシポリマー(ボトルブラシとも称される)を包含する。 dendritic および dendritic は、通常は繰り返し分岐した高対称性の単分散化合物である。 dendritic および dendritic の定義に明確な違いはない。 dendritic は、通常、焦点と称される化学的にアドレス可能な単一基を含有する。モル質量分布の欠如により、高モル質量の dendritic および dendritic は高分子であるが、ポリマーではない。 dendritic の特性は、分子表面上の官能基によって決定される。樹状足場は、内部機能および外部機能を分離するので、官能性分子の樹状カプセル化は、活性部位(これは、生体材料内の活性部位の構造を模倣する構造である)の単離を可能にする。例えば、その末端基がカルボキシル基のような親水性基である場合、 dendritic は水溶性であり得る。

20

30

【0282】

dendritic は、一般に、以下の特徴を特徴とし得る：(i)1つ以上の反応性部位を有し得るイニシエーターコア(I)であって、 dendritic の最終的なトポロジーをもたらすように点状または有意なサイズであり得るイニシエーターコア(I)；(ii)イニシエーターコアに結合している分岐状の反復単位の1つ以上の層；(iii) dendritic の表面に(場合により連結基を介して)結合している官能性末端基、例えばアニオン性基またはカチオン性基。

40

【0283】

本明細書において企図される dendritic は、リジンまたはリジン類似体構成単位を含み得る。用語「リジン類似体」は、構成単位の前の層に結合するための単一の先端カルボキシル基と、さらなる構成単位に結合可能な2つまたは3つの第1級アミン基とを有する

50

分子を指す。本明細書において企図される「リジン類似体」の例は、国際特許出願第PCT/AU2007/000352号に記載されており、例えばグリシル-Lysである。いくつかの特定の例において、デンドリマーは、構成単位としてリジンまたは一種のリジン類似体のみを含む。

【0284】

本明細書において企図される他のデンドリマーとしては、ポリアミドアミン(PAMAM)、ポリ(エーテルヒドロキシルアミン)(PEHAM)またはポリプロピレンイミン構成単位を含むものが挙げられる。その特定の例において、デンドリマーは、構成単位としてポリアミドアミン(PAMAM)、ポリ(エーテルヒドロキシルアミン)(PEHAM)またはポリプロピレンイミンのみを有する。コア部分は、構成単位のための1つの結合点のみを含有し得るか、または2つ、3つまたはそれ以上の点(これらは、構成単位の結合のためにさらに利用されてもよいし、または利用されなくてもよい)を含有し得る。典型的には、結合点は、遊離アミノ基である。コア部分は、構成単位からなり得るか、構成単位を含み得るか、もしくは構成単位に由来し得るか、または構成単位と異なる分子であり得る。典型的なコア部分は、本明細書において例示されており、国際特許出願第PCT/AU2007/000352号に記載されている。

10

【0285】

リポソームおよびデンドリマーは、静脈内投与のための任意の適切な医薬担体と組み合わせられ得る。組成物の静脈内投与は、最も低侵襲的であるので、好ましい経路である。所望であれば、他の投与経路が可能である。適切な薬学的に許容され得る担体としては、生理食塩水、Tris緩衝液、リン酸緩衝液または任意の他の水溶液が挙げられる。適切な投与量は、当業者に周知の手順によって確立され得る。

20

【0286】

本発明の抗体にカップリングされたリポソームおよびデンドリマーは、標的細胞を殺傷することができる上記治療剤のいずれかを封入し得る。

【0287】

以下の実施例は本発明を例証するものであり、その限定的な意味において考慮してはならない。

【実施例】

【0288】

材料および方法

細胞および試薬

ヒト胚性腎臓293(HEK293)細胞、ならびにケモカイン受容体hCCR6およびhCCR8によって安定トランスフェクトしたHEK293細胞を、記載されているように培養した(Zaballos et al., 1999, J Immunol 162:5671-5; Carramolino et al., 1999, J Leukocyte Biol 66:837-44; Goya et al., 1998, 160:1975-81)。hCCR4、hCCR5およびhCCR9トランスフェクタントは、A. Zaballos (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain)の寄贈であった。MOLT-4(CRL-182)およびJurkat(TIB-152)ヒトT細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株は、ATCC(Manassas, VA)から入手した。EGFPおよび赤色ルシフェラーゼ(Promega, Palo Alto, CA)をコードする組換えレンチウイルスを感染させることによって、生物発光MOLT-4細胞(MOLT-4-luc)を作製した。高レベルのEGFPを発現する感染細胞を、FACSによって単離し、クローニングし、増殖させ、インビボ生物発光アッセイに使用した。MOLT-4-luc細胞の成長は、親MOLT-4細胞に類似しており、それらは表面CCR9発現を維持していた。10%ウシ胎児血清(FBS, Lonza, Switzerland)、2mM L-グルタミン、50U/mlペニシリンおよび50μg/mlストレプトマイシンを補充したDMEM(完全培地)において、細胞を培養した。ヘルシンキ宣言にしたがって患者からインフォー

30

40

50

ムドコンセントを得た後、矯正心臓手術中に摘出された胸腺から、ヒト末梢血リンパ球および胸腺細胞を得た。

【0289】

組換えヒトCCL25およびCXCL12は、Peprrotech (London, UK) から入手した。以下の抗体を使用した：抗hCCR9 (112509、マウスmAb IgG2a; R&D, Abingdon, UK)、mCCR9 (K629; ウサギAb; Carramolino et al., 2001, Blood 97: 850-7)、hCD3-FITC (UCHT1)、hCD4-Pcy5 (13B8.2)、hCD8-PE (B9.11) (3つすべてをBeckman Coulter, Miami, FLから入手)、hCD31 (MEC 13.3; ラットmAb; BD Biosciences, San Jose, CA)、hCD71トランスフェリン受容体 (H300; ウサギAb)、PCNA (PC10; マウスmAb) (両方ともSanta Cruz Biotechから入手) および対照抗体P-020 (マウスmAb IgG2b; 本発明者らの研究室) およびMPC-11 (マウスmAb IgG2a; BD Biosciences)。LS123-3C3-E3-1ハイブリドーマ (ATCC 寄託番号HB12653) から、3C3抗hCCR9 mAbを生産した。

10

【0290】

ヒトCCR9特異的mAbの作製

遺伝子銃 (Bio-Rad, Hercules, CA) 粒子を介して、ヒトCCR9配列を有するpCIneoプラスミドをBALB/cマウスにDNA投与することによって、ヒトCCR9に対するマウスmAbを惹起した。DNAを1.6nm金粒子にコーティングし、DNA/金錯体 (2μg/日) を各マウスに送達した; 30日目および60日目に、同量のプラスミドによって、マウスを追加免疫した。最後の追加免疫の7~10日後に血清を収集し、陰性対照として安定トランスフェクトhCCR9-HEK293およびpCIneo-HEK293細胞を使用してフローサイトメトリーによって、特異的抗体について試験した。-3日目および-2日目に、 10^7 個のhCCR9-HEK293細胞を、選択したマウスに静脈内的に追加免疫し、続いて、脾細胞をP3X63Ag8.653骨髄腫 (Kremer et al., 2004, Methods Mol Biol 239: 243: 60) と融合した。融合の2週間後、hCCR9-HEK293細胞を使用してフローサイトメトリーによって、CCR9特異的抗体について、培養上清をスクリーニングした。陽性ハイブリドーマをクローニングし、組織培養上清からmAbを精製し、ELISA (Kremer et al., 2004、前掲) によって抗体アイソタイプを決定した。

20

30

【0291】

キメラCCR9の作製

NheI-EcoRI部位に挿入したヒトまたはマウスCCR9 cDNAを有するpCIneo発現ベクターを使用して、キメラCCR9を作製した。NheIおよびBspLIによって両方のベクターを消化し、マウスCCR9配列のN末端の62アミノ酸を含有する断片を、消化したヒトCCR9プラスミドにクローニングして、mNt/hCCR9発現ベクターを作製し、これをHEK293細胞に一過性トランスフェクトした。フローサイトメトリーによって、キメラCCR9の発現を評価した。

40

【0292】

フローサイトメトリー

染色のために、V底96ウェルプレートにおいて、1ウェル当たり 2×10^5 個の細胞を遠心分離し、0.5%ウシ血清アルブミン (BSA)、1%FBSおよび0.1%アジ化ナトリウム (PBSt) を含有するPBSによって洗浄した。40μg/mlラットIgG (Sigma, St Louis, MO; 20分間、4) と共に細胞をブレインキュベートすることによって、非特異的結合をブロックした。一次Ab (30分間、4) と共に細胞をインキュベートし、洗浄し、FITC-またはPE-ヤギF(ab')₂抗マウスIgG (H+L) (Beckman Coulter; 30分間、4) と

50

共にインキュベートした。Epics XLまたはCytomics cytometer (Beckman Coulter)を用いて、サンプルを分析した。

【0293】

特定のケモカインを使用した競合研究において、50 μ lのhCCL25またはhCXCL12 (10 μ g/ml、40分間、4)と共に細胞をインキュベートし、続いて、50 μ lの91Rまたはアイソタイプ適合mAb (0.5 μ g/ml、30分間、4)を追加した。洗浄後、FITC-ヤギ抗マウスIgG抗体を追加した(30分間、4)。フローサイトメトリーによって、CCR9の発現を評価した。

【0294】

91R、92R mAbおよび3C3抗hCCR9 mAbを用いた競合研究において、50 μ lのPBSt (灰色のヒストグラム)と共に、または3C3、91R、92Rまたはアイソタイプ対照mAb (20 μ g/ml、白色のヒストグラム)と共に、MOLT4細胞(細胞 2×10^5 個/ウェル)をプレインキュベートした。4)において30分間経過した後、別の50 μ lのビオチン標識3C3、91Rまたは92R mAb (5 μ g/ml)を追加し、インキュベーションをさらに20分間継続した。洗浄工程の後、フローサイトメトリーによって、MOLT4細胞に結合している抗体を評価した。

10

【0295】

ウエスタンブロットアッセイ

膜画分を抽出するために、細胞ペレット(5 $\times 10^6$ 個の細胞)を低張緩衝液(5 mM Tris/HCl pH7.4、50 mM NaCl、1 mM MgCl₂、2 mM EGTA)に再懸濁し、4回の凍結融解サイクルに供し、遠心分離(750 \times g、2分間、4)した。上清を遠心分離(18,000 \times g、30分間、4)した。 Haltプロテアーゼ阻害剤カクテル(Thermo Scientific, Rockford, IL)を含むPBSに膜ペレットを再懸濁し、20% SDS、100 mMジチオスレイトール(30分間、室温(RT))によって可溶化し、SDS-PAGEによって分離した。タンパク質をImmobilon PVDF膜(Millipore, Billerica, MA)に転写し、ブロッキング(5% BSA、5% 脱脂粉乳および0.05% Tween 20のPBS溶液)し、次いで、91R mAb (1 μ g/ml、2時間、室温)によってイムノプロットイングし、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG抗体と共にインキュベートした。ローディング対照として抗hCD71 Ab (0.4 μ g/ml、2時間、室温)によって、膜を再プローブした。ECL (GE, Pittsburg, PA)を使用して、プロットを現像した。示されている場合、ペプチド-N-グリコシダーゼF (PNGase F, New England Biolabs, Ipswich, MA; 1時間、37)を使用して、サンプルをN脱グリコシル化した。

20

30

【0296】

ELISA

合成ペプチド[hCCR9アミノ酸2~22(配列番号:11)もしくは13~30(配列番号:12)またはBOT、無関係な対照ペプチド]、ヤギ抗マウス 軽鎖抗体(Gam kappa LC; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)またはBSAによって、マイクロタイタープレートをコーティングした。BSAによってプレートをブロッキングし、3C3、91R、BOTまたはアイソタイプ対照mAbを追加した。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Dako, Denmark)を使用した。インキュベーション後、プレートを洗浄し、OPDおよびH₂O₂によって現像した。490 nmの吸光度を測定することによって、結果を定量した。

40

【0297】

3C3 mAbのCDRの配列決定

TRIZOL (登録商標)試薬(Ambion)によって、ハイブリドーマ3C3(LS129-3C3-E3-1; ATCC寄託番号HB12653)の全RNAを、凍結ハイブリドーマ細胞溶解物から抽出した。PrimeScript (商標)1st Str

50

and cDNA Synthesis Kit (Takara) の技術マニュアルにしたがって、アイソタイプ特異的アンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを使用して、全RNAをcDNAに逆転写した。GenScriptのRACEの標準操作手順にしたがって、VHおよびVLの抗体断片を増幅し、次いで、これを標準的なクローニングベクターに別個にクローニングし、配列決定 (GenScript) した。Kabata ナンバリングにしたがって、CDRをマッチングした。

【0298】

遊走アッセイ

5 μmの孔径を有するトランスウェルプレート (Corning - Costar) を使用した。200 nM組換えhCCL25 (Peprotech) を補充した500 μlの遊走培地 (DMEM、0, 1% BSA、10 mM HEPES) を下部チャンバーに充填した。100 μlの遊走培地において、対応するmAb (100 μg/ml) と共に、 3×10^5 個のMOLT-4細胞を室温において15分間プレインキュベートし、上部チャンバーに入れ、37 °Cにおいて3時間遊走させた。下部チャンバー中の遊走した細胞を、フローサイトメーターを使用してカウントした。

10

【0299】

異種移植アッセイ

CNB動物施設において、BALB/c Rag2^{-/-}マウス (Taconic Farms, Hudson, NY) を飼育し、8~22週齢の時に使用した。管理および治療プロトコールは、動物実験に関するEUおよび国内のガイドラインに従っており、CNB/CSIC倫理委員会によって承認された。

20

【0300】

インビボ実験においては、0日目に、MOLT-4細胞 (2×10^6 個) をRag2^{-/-}マウスの各脇腹に皮下 (s.c.) 接種した；次いで、1日目、7日目、14日目および21日目に、抗hCCR9 91RまたはIgG_{2b}対照mAbを、6匹のマウスからなる2つの各群に腹腔内 (i.p.) 接種した (d1および6に4 mg/kg；d13および21に2 mg/kg)。第2の実験において、MOLT-4細胞 (2×10^6 個) を雌性Rag2^{-/-}マウスの脇腹に皮下接種した；7日目、14日目、21日目および28日目に、抗hCCR9 91RまたはIgG_{2b}対照mAbを、10匹のマウスからなる2つの各群に腹腔内接種した (d7および14に4 mg/kg；d28および35に2 mg/kg)。ノギス (Mitutoyo, Kanawaga, Japan) を用いて、腫瘍サイズを測定し、 $V = [軸直径の長さ、mm] \times [(回転直径、mm)^2 / 2]$ として腫瘍体積 (mm³) を計算した。腫瘍負荷は、IgG_{2b}処理マウスのものに対する%腫瘍体積として表す。実験に応じて、56日目または69日目に、マウスを屠殺した；マウスおよび腫瘍を計量し、組織学のために加工した。

30

【0301】

生物発光異種移植アッセイにおいては、d0に、 2×10^6 個のMOLT-4-luc細胞を雌性Rag2^{-/-}マウスの各脇腹に皮下接種した。24時間後、マウスを麻酔し、イメージングを可能にするためにD-ルシフェリン (150 mg/kg) を投与し、実験群へのバランスの取れた割り当てのために発光を定量した。d1 (4 mg/kg) およびd6 (2 mg/kg) に、91Rまたはアイソタイプ対照P-020 mAbをマウス (7匹/群) に腹腔内接種した。d62にマウスを屠殺するまで、6つの時点において、発光イメージングを繰り返した。分析前に、Imalgene 500 (2 ml/Kg；Merial Laboratories, France) およびXilagesic 2% (0.6 ml/Kg；Calier Laboratories, Spain) によって、マウスを10分間麻酔した。遮光チャンバー内において、1394 ORCA I I ERGカメラ (Hamamatsu, Japan) を用いて、イメージングを100秒間行った；Wasabiソフトウェア (Hamamatsu) を使用して、データを定量し、擬似カラー画像を生成した。

40

【0302】

50

壊死領域の組織学および定量

解剖した腫瘍を半分に分割した；半分を4%パラホルムアルデヒド(pH7.4)によって一晩固定し、PBSによって洗浄し、パラフィン包埋し、切片化(5 μ m)した。残りの半分をOCT(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)に包埋し、ドライアイス冷却イソペンタンによって急速凍結し、-80で保存し、その後切片化(8 μ m)した。

【0303】

標準的な手順によって、パラフィン包埋切片をヘマトキシリン/エオシン染色し、Micro mount media(Leica Microsystems)にマウントした。Digital Sightカメラ(Nikon, Japan)を備えるZeiss Axio phot顕微鏡(Carl Zeiss, Germany)によって、画像をキャプチャした。NIH Image Jソフトウェアを用いて、全腫瘍切片および壊死領域を定量した。

10

【0304】

デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介性のdNTPビオチンニック末端標識(TUNEL)

TUNELによって細胞死を測定するために、パラフィン包埋切片を脱ろうおよび再水和し、次いで、透過処理(PBS、0.5% Triton X-100；室温、10分間)した。TdT緩衝液pH6.6(Sigma)および1mM CoCl₂と共に、スライドをプレインキュベート(室温、15分間、暗所、加湿チャンバー)した。反応ミックス(組換えターミナルトランスフェラーゼおよびビオチン-16-dUTP；Roche, UK)と共に切片をインキュベートし、プレインキュベーション緩衝液によって洗浄した(室温、10分間)。PBSおよび0.01% Tween 20によって反応を終了させ、ストレプトアビジン-Cy5(Jackson Immunoresearch；Zymed, USA；1時間、室温)と共にスライドをインキュベートした。

20

【0305】

免疫組織化学(IHC)

脱ろうおよび再水和したパラフィン包埋切片における増殖細胞核抗原(PCNA)を標識することによって、細胞増殖を定量した。クエン酸ナトリウム緩衝液において蒸気処理することによって(15分間)抗原を曝露させ、抗PCNA(2 μ g/ml、PC10マウスmAb、Santa Cruz Biotechnology)を使用し、続いてAlexa Fluor 488標識ヤギ抗マウスIgGを使用して、Mouse Fluorescence Detection Kit(Max Vision Biosciences, USA)のMax Fluor Mouseによって染色した。抗hCD31 mAbによって、腫瘍血管を染色した。OCT包埋切片を100%アセトン(-20、10分間)によって固定し、空気乾燥し、TBSによって洗浄した。2.5%ヤギ血清および0.5% BSAのTBS溶液(2時間、室温)によってサンプルをブロッキングし、抗CD31(一晩、4、80ng/ml)によって染色した。インキュベーションおよび洗浄の後、Alexa Fluor 647標識ヤギ抗マウスIgGを追加した。4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI；Sigma)によって核を染色し、すべての顕微鏡調製物に関して、Fluoromount-G(Southern Biotech, Birmingham, Al)によってスライドをマウントした。

30

40

【0306】

組織のイメージングおよび分析

Leicaレーザー走査マルチスペクトル共焦点顕微鏡(TCS SP5, Leica Microsystems)によって、デジタル画像を取得した。画像スタックは、20倍レンズを介して取得された5つの画像平面から構成されていた(計算された最適ズーム比2、z-ステップ1.39 μ m)。各腫瘍について、少なくとも3個の切片および切片1個当たり12~30個のランダムな非連続非重複領域を取得および調査した。TUNEL-およびPCNA陽性核ならびにCD31陽性血管断片の光学視野当たりの密度を定

50

量し、すべての光学視野からのデータを使用して、陽性構造の推定平均数を計算した。Adobe Photoshop Count Toolを使用して拡大画像を用いて、定量を実施した。

【0307】

補体依存性細胞傷害 (CDC)

MOLT-4細胞(標的細胞 10^5 個/ $100\mu\text{l}$)を96ウェルV底プレートにプレATINGし、示されている濃度の抗hCCR9またはアイソタイプ適合対照mAb(30分間、 37°C)と共にインキュベートし、遠心分離し、洗浄した。1%BSAを含む無血清DMEMにおいて、活性な仔ウサギ補体、または56において熱不活性化した仔ウサギ補体(25%; AbD Serotec, UK)を細胞に追加した(1時間、 37°C)。生存排除マーカー7-AAD(BD Biosciences; 10分間、 4°C)によって細胞を染色し、フローサイトメトリーによって非生存細胞の数を評価した; 各条件を3回反復で分析した。特異的溶解を $100 \times$ (活性補体による死細胞の% - 不活性補体による死細胞の%) / (100% - 不活性補体による死細胞の%)として計算した。

10

【0308】

統計分析

GraphPad Prism 4ソフトウェア(San Diego, CA)を使用して、統計分析を実施した。特に指示がない限り、スチューデントのt検定によって評価した場合の統計的有意性は、 $p < 0.05$ において確立した。結果を平均 \pm SEMとして示す。

20

【0309】

実施例 1

91R mAbは、ヒトケモカイン受容体CCR9を特異的に認識する

真核生物発現ベクターに挿入された全長hCCR9コード配列によって免疫した後に、マウス抗hCCR9 mAbを作製した。最初に、hCCR9または空ベクターを安定発現するHEK293細胞に対するフローサイトメトリーによって、特異性を評価した。ヒトおよびマウスCCR9は86%の配列同一性を共有するが、91R mAbは、ヒトCCR9を発現する細胞のみを認識した(図1A)。91Rは、hCCR9と30~36%の同一性を示すhCCR4、hCCR5、hCCR6またはhCCR8ケモカイン受容体を発現する安定HEK293トランスフェクタントと交差反応せず(図1A)、これは、91Rの特異性を実証している。

30

【0310】

91Rは、T細胞急性リンパ芽球性白血病MOLT-4細胞株上の内因性ヒトCCR9を認識したが、陰性対照のJurkat細胞を染色しなかった(図1B)(Zabel et al., 1999, J Exp Med 190: 1241-56)。市販の抗hCCR9(112509 mAb)を並行して比較した(図1B); 同じmAb濃度($10\mu\text{g}/\text{ml}$)において、91Rは、MOLT-4細胞に対して、112509 mAbよりも13倍高い平均蛍光強度を示した(MFI; 49.7対3.8)。最適以下濃度($0.12/\text{ml}$)において、91Rは、MOLT-4細胞の100%を依然として染色し、MFIは10.9であり、112509の飽和濃度におけるシグナルよりも高かった(図1C); これにより、91R mAbのより高いCCR9親和性および/またはよりアクセス可能なエピトープの認識が示された。91Rはまた、正常細胞上の内因性ヒトCCR9を認識した。91Rは、T細胞の成熟のすべての段階における胸腺細胞を染色し、 $\text{CD}4^+ \text{CD}8^+ \text{DP}$ 細胞に対する結合が最大であった(図1D)。加えて、91Rによって、末梢血リンパ球の2~3%(主に $\text{CD}3^+$ 集団)が染色された(図1E)。

40

【0311】

hCCR9-およびpCIneo-HEK293トランスフェクタント(モックトランスフェクト-およびhCCR9-HEK293; 図1G)の膜抽出物を使用してウエスタンブロットにおいて、91Rの特異性をさらに評価した。hCCR9トランスフェクタント由来のサンプルにおいて、91Rは、hCCR9の推定分子量(369アミノ酸; 推定

50

MW 42, 016 Da) に一致する 43 kDa のバンドを特異的に認識した。同様に、MOLT-4 細胞サンプルにおいて、47 kDa のバンドが検出されたが、Jurkat 細胞サンプルにおいては検出されなかった。HEK293 細胞および MOLT-4 細胞における hCCR9 バンドの見掛けの分子量の違いは、グリコシル化の違いに起因し得る (図 1G)。

【0312】

実施例 2

hCCR9 N 末端ドメインは、91R mAb のエピトープ認識に必要である

CCR9 は、7 個の膜貫通ドメイン、細胞外 N 末端ドメイン (Nt)、3 個の細胞内ドメイン、3 個の細胞外ドメインおよび細胞内 C 末端ドメインから構成される (図 2A)。ヒト CCR9 および マウス CCR9 は、86% のアミノ酸配列同一性を示し、31 個の残基が異なる。91R によって認識される hCCR9 ドメインをマッピングするために、hCCR9 Nt をマウス配列 (mNt/hCCR9) によって置換した発現ベクター (図 2A) を作製し、HEK293 細胞において発現させた。フローサイトメトリー分析により、K629 抗マウス CCR9 Ab はこのキメラ受容体を認識したのに対して、91R は認識しなかったことが示されたが (図 2A)、これは、hCCR9 Nt ドメインが 91R のエピトープ認識に必要であったことを示している。

【0313】

hCCR9 Nt ドメインは、Asn32 において推定 N-グリコシル化部位を有するので、それがグリコシドエピトープまたはペプチド骨格を認識したかを確認するために、91R の認識部位を試験した。MOLT-4 細胞溶解物および hCCR9-KEK293 細胞溶解物を PNGase によって処理し、続いて、電気泳動を行い、91R を用いてウエスタンブロットを行った。未処理の MOLT-4 細胞抽出物は、47 kDa の主要なタンパク質バンドおよび 43 kDa の副次的なバンドを示したのに対して、PNGase 処理した溶解物においては、39 kDa の単一バンドが出現した (図 2C)。CCR9 トランスフェクト HEK293 細胞抽出物において、91R は、未処理の溶解物および PNGase 処理した溶解物において、それぞれ 43 および 39 kDa のバンドを検出した。この結果は、hCCR9 が N-グリコシル化タンパク質であること、およびグリコシル部分が、91R によって認識されるエピトープの一部ではなく、91R によって認識されるエピトープをマスクするものでもないことを裏付けており、これは、この mAb が hCCR9 ペプチド主鎖を特異的に認識することを示唆している。

【0314】

実施例 3

CCR9 リガンド CCL25 は、MOLT-4 細胞に対する 91R の結合を部分的に遮断する

CCL25 が、91R による CCR9 認識に対して影響を与えるかを研究するために、受容体のインターナリゼーションを阻害するためのアジ化ナトリウムの存在下において、MOLT-4 細胞を単独で、または hCCL25 と共にプレインキュベートし (40 分間、4)、続いて、91R と共にインキュベートし、フローサイトメトリー分析を行った。CCL25 は、91R の結合を部分的に阻害した (図 3A)。対照のケモカイン CXCL12 は、mAb の結合に対して影響を与えなかった (図 3B)、この効果は特異的であったが、これは、CCR9 に対する CCL25 および 91R の結合部位が部分的に重複しているか、またはごく接近していることを示唆している。

【0315】

実施例 4

91R mAb は、異種移植片におけるヒト腫瘍のインビボ成長を阻害する

免疫不全マウスに移植した MOLT-4 細胞は、腫瘍として成長する。2 つのアプローチを使用して、このモデルにおける 91R の抗腫瘍能を評価した。第 1 の実験デザインにおいて、MOLT-4 細胞を 2 つのマウス群両方の背側脇腹に皮下接種した (0 日目) ; 次いで、MOLT-4 細胞を移植した翌日から開始して、91R またはアイソタイプ適合

m A b (P - 0 2 0、I g G 2 b) をそれらに週 4 回腹腔内注射した (図 4 A)。腫瘍が発達し、そのサイズを、マウスを屠殺した 5 6 日目まで定期的に測定した。9 1 R 処理したマウスにおいては、有意に小さい腫瘍が 3 9 日目に既に出現していた ($p =$; 図 4 B)。5 6 日目に、各マウス群の腫瘍を摘出し、計量した ; 9 1 R 処理したマウスにおいては、対照と比較して、各群の腫瘍重量の合計として測定した全腫瘍量の計算が $8 4 \pm 1 8 \%$ 減少していた (マウス 1 匹当たりの腫瘍量 $6 3 . 3 \pm 3 0 . 3 \text{ mg}$ 対 $3 9 7 \pm 6 5 \text{ mg}$; $p = 0 . 0 0 0 9$; 図 4 C)。9 1 R 処理したマウス由来の個々の最大腫瘍は、対照マウス由来のいずれの腫瘍よりも小さかった (図 4 D) ; すべての対照マウスは腫瘍を発達させたのに対して、9 1 R 処理した 2 匹のマウスは腫瘍がなかった ($n =$ マウス 6 匹 / 群)。

10

【 0 3 1 6 】

より限定的な条件下における 9 1 R m A b の腫瘍成長阻害能を試験するために、M O L T - 4 細胞を移植した 7 日後に、処理を開始した。4 つの m A b 用量を上記のように 1 週間間隔で投与し (図 4 E)、腫瘍サイズを、マウスを屠殺した 6 9 日目まで測定した。4 8 日目までに、2 つのマウス群間の腫瘍サイズの差は明らかであり ($p = 0 . 0 1 2$; 図 4 F)、腫瘍量のデータにより、9 1 R 処理したマウスにおいては、対照処理したマウスと比較して、 $6 4 \pm 2 9 \%$ 減少していたことが示された ($1 6 3 \pm 5 6 \text{ mg}$ 対 $4 5 1 \pm 1 1 7 \text{ mg}$; $p = 0 . 0 3 9$; 図 4 G)。これらの実験においては、M O L T - 4 細胞を一方の脇腹にのみ注射した ; 2 匹の対照マウスおよび 9 1 R 処理した 4 匹のマウスは腫瘍がなく、9 1 R 処理したマウス由来の最大腫瘍のサイズは、対照マウス由来の最小腫瘍と同様であった (図 4 H)。

20

【 0 3 1 7 】

直接的なキャリパー測定が不可能である場合、初期段階において腫瘍成長を評価するために、ルシフェラーゼを発現する M O L T - 4 細胞 (M O L T - 4 - l u c) を R a g 2 / - マウスの背側脇腹に注射した。抗体の投与回数を減少させる効果を決定するために、1 日目 ($1 0 0 \mu \text{g} /$ マウス) および 6 日目 ($5 0 \mu \text{g} /$ マウス) に、9 1 R および対照抗体も投与した (図 5 A)。発光イメージングによって移植腫瘍をモニタリングし (図 5 B)、d 6 2 にマウスを屠殺した。発光分析により、2 日目から腫瘍成長が示され、これは、9 1 R 処理したマウスにおいて 1 2 日目から阻害されたことが示された ($p = 0 . 0 3 2$; 図 5 B、C)。9 1 R 処理は、対照と比べて $8 5 \pm 1 1 \%$ の総腫瘍量減少をもたらした (図 5 D)。重量および相対発光によって決定したところ、9 1 R 処理した 7 匹のマウスのうちの 3 匹は腫瘍がなく、残りの 4 匹のマウス由来の腫瘍は対照よりも小さかった ($2 2 3 \pm 1 0 3 \text{ mg}$ 対 $1 , 4 7 8 \pm 2 6 2 \text{ mg}$; $p < 0 . 0 0 0 1$; 図 5 E)。

30

【 0 3 1 8 】

これらの結果は、M O L T - 4 マウスモデルにおける 9 1 R の抗腫瘍効果を示している。

【 0 3 1 9 】

実施例 5

9 1 R 処理した腫瘍は、壊死およびアポトーシスの増加、ならびに血管新生および細胞増殖の減少を示す

40

M O L T - 4 腫瘍に対する 9 1 R 処理の効果を組織化学分析によって調べた。剖検で採取した腫瘍異種移植片由来の切片をヘマトキシリン / エオシン染色し、各腫瘍切片について、総面積に対する壊死領域の割合を計算した ; 壊死領域は、細胞がない領域であって、紫色の核が高密度に蓄積した領域によって囲まれる領域と定義した (図 6 A)。壊死領域の程度に基づいて、腫瘍を 3 つのカテゴリーに分類した : 低 ($< 1 \%$)、中 ($1 - 3 0 \%$) および高 ($> 3 0 \%$) (図 6 B)。9 1 R 処理したマウスにおいてのみ、高い壊死レベルが検出された (腫瘍の $4 0 \%$) ; 中級レベルは、9 1 R 処理したマウスの場合には $2 0 \%$ であり、対照マウスの場合には $5 0 \%$ であった。各抗体処理の頻度分布の差は、統計的に有意であった ($p < 0 . 0 0 0 1$; 図 6 B)。

50

【 0 3 2 0 】

TUNELアッセイを使用して、アポトーシス（これは、細胞クリアランスに先立って、壊死無細胞領域につながり得る）の程度を決定した。対照と比較して、91R処理した腫瘍は、アポトーシス細胞密度の有意な増加を示した（1.93倍； $p < 0.0001$ ；図6C、D左）。

【0321】

パラフィン包埋腫瘍切片における増殖細胞核抗原（PCNA）を標識することによって、細胞増殖を定量した；91R処理した腫瘍は、対照腫瘍と比較して、増殖細胞の割合の有意な減少を示した（40%； $p < 0.0001$ ；図6C、D中央）。

【0322】

腫瘍成長はまた、腫瘍内血管新生の程度に関連している。内皮マーカーCD31の免疫組織化学的検出による腫瘍血管新生の評価により、91R処理した腫瘍においては、対照腫瘍と比較して、微小血管密度が減少していることが示された（50.7%； $p < 0.0001$ ；図6C、D右）。

【0323】

これらのデータは、91Rが、アポトーシス細胞死および壊死レベルを増加させ、細胞増殖および腫瘍内微小血管密度を減少させることによって、腫瘍成長を妨げることを示している。

【0324】

実施例6

91R mAbは、補体依存性細胞傷害を媒介する

補体依存性細胞傷害（CDC）は、治療抗体による腫瘍細胞排除の主なインビボ機構の1つであり、これにより、補体成分C1qが抗体オプソニン化細胞（古典経路）に動員され、その特異的溶解を促進する。MOLT-4白血病細胞の溶解を誘導する91Rのインビト能力を、補体結合によって試験した。91R、112509または適切なアイソタイプ適合mAbと共にMOLT-4細胞をプレインキュベートし、その後、仔ウサギ補体を追加した（1時間、37）。7-AADの取り込みのフローサイトメトリー分析によって、特異的細胞死を評価した。

【0325】

91Rは、112509 mAb（ $18 \pm 2\%$ ； $p = 0.03$ ；図7A）よりも高いレベルにおいて、MOLT-4細胞の補体特異的溶解を促進した（ $49 \pm 2\%$ ； $p < 0.0001$ ；図7A）。

【0326】

91Rの使用条件を最適化するために、mAb濃度、補体濃度および曝露時間を評価した。用量反応実験により、S字状の反応が示され、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度において検出可能であり（ $18.4 \pm 3.2\%$ ）、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ mAbにおいて30分間にわたって40%の細胞溶解を超えていた（図7B）。25%補体において、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 91Rと共に1時間インキュベートすることにより、約50%のMOLT-4細胞溶解がもたらされた；より長いインキュベーション（5時間）は、溶解を 71.7 ± 4.4 に増加させた（図7C）。より高い補体濃度は、溶解を 77.3 ± 2.3 の最大値に高めた（1時間、75%補体）（図7D）。これらの結果は、CDCが、マウスにおけるMOLT-4腫瘍異種移植片を減少させるために91Rが使用する機構の1つであることを示唆している。

【0327】

実施例7

92R mAbは、ヒトケモカイン受容体CCR9を認識し、この受容体に対する91R mAbの結合と競合する

真核生物発現ベクターに挿入された全長hCCR9コード配列によって免疫した後に、マウス抗hCCR9 mAb 92Rを作製した。最初に、hCCR9または空ベクターを安定発現するHEK293細胞に対するフローサイトメトリーによって、特異性を評価した。ヒトおよびマウスCCR9は86%の配列同一性を共有するが、92R mAbは

10

20

30

40

50

、ヒトCCR9を発現する細胞のみを認識した。92Rは、hCCR9と30～36%の同一性を示すhCCR4、hCCR5、hCCR6またはhCCR8ケモカイン受容体を発現する安定HEK293トランスフェクタントと交差反応せず、これは、92Rの特異性を実証している。さらに、92Rは、T細胞急性リンパ芽球性白血病MOLT-4細胞株上の内因性ヒトCCR9を認識したが、陰性対照のJurkat細胞を染色しなかった(図8A)(Zabel et al., 1999, J Exp Med 190:1241-56)。加えて、前記mAb 91Rと共にプレインキュベートしたMOLT-4細胞のフローサイトメトリー分析により、この抗体は、MOLT-4細胞に対する結合についてmAb 92Rと競合することが示された(図8A)。

【0328】

CCR9は、7個の膜貫通ドメイン、細胞外N末端ドメイン(Nt)、3個の細胞内ドメイン、3個の細胞外ドメインおよび細胞内C末端ドメインから構成される(図2A)。ヒトCCR9およびマウスCCR9は、86%のアミノ酸配列同一性を示し、31個の残基が異なる。抗原としてhCCR9のアミノ酸2～22に対応する合成ペプチドを使用したELISA分析の結果により、92R mAbによって認識されるCCR9エピトープは、Ntドメインに位置することが示された。これらのアッセイを使用して、mAb 91Rおよび92Rは両方とも、hCCR9アミノ酸2～22を含むこの合成ペプチドに対する結合について互いに競合することも示された(図8C)。

【0329】

実施例 8

91R mAb、92R mAbは、3C3 mAbと構造的に異なる

91R mAbおよび92R mAbが、現状技術(国際公開第00/53635号)において説明されている3C3抗hCCR9 mAbと構造的に異なっていたかを評価するために、それらのCDRを配列決定した。3C3 mAbの6つのCDRの配列は、配列番号:13(CDR-H1)、配列番号:14(CDR-H2)、配列番号:15(CDR-H3)、配列番号:16(CDR-L1)、配列番号:9(CDR-L2)、配列番号:17(CDR-L3)として同定されている。図9に示されているアライメントは、91R mAbおよび92R mAbの重鎖CDRならびにCDR-L1およびCDR-L3がいずれも3C3 mAbの対応するCDRと同一ではなかったことを実証している。実際、92R mAbおよび3C3 mAbのCDR-L2のみが同じ配列(配列番号:9)を共有していた。加えて、91R mAbまたは92R mAbおよび3C3 mAbのそれぞれのCDR間の配列同一性の割合を計算した(表1)。

【表1】

表1:抗体91Rまたは92Rと抗体3C3との間の配列同一性の割合。

抗体	%同一性 CDR-H1	%同一性 CDR-H2	%同一性 CDR-H3	%同一性 CDR-L1	%同一性 CDR-L2	%同一性 CDR-L3
91R/ 3C3	0%	26.3%	12.5%	75%	85.7%	44.4%
92R/ 3C3	0%	26.3%	12.5%	87.5%	100%	33.3%

【0330】

実施例 9

91R mAbおよび92R mAbは、3C3 mAbによって認識されるものと異なるhCCR9のエピトープを認識する

91R mAbによるhCCR9認識のパターンを、3C3 mAbのものと比較した。抗体は両方とも、T細胞急性リンパ芽球性白血病MOLT-4細胞株上の内因性ヒトCCR9を認識し、陰性対照Jurkat細胞を染色しなかった一方(図10A)、91R mAbおよび3C3 mAbは、hCCR9トランスフェクトHEK-293の異なる認識パターンを有する(図10B)。特に、3C3 mAbは、モックトランスフェクト細胞に対する非特異的結合が91R mAbよりも高い。hCCR9由来の合成ペプチド

10

20

30

40

50

を使用してELISAによって、この差をさらに分析した。図11に示されている結果により、91R mAbは、hCCR9のアミノ酸2~22(配列番号:11)に対応するペプチドを認識し、hCCR9のアミノ酸13~30(配列番号:12)に対応するペプチドに対する無視可能な結合を示したのに対して、3C3 mAbは、これらのペプチドのいずれにも結合しないことが明らかになった。

【0331】

MOLT4細胞における91R mAb、92R mAbおよび3C3 mAbを使用した競合結合アッセイにより、91R mAbおよび92R mAbは、MOLT4細胞に対する結合について互いに競合するのに対して、3C3 mAbはそれ自体としか競合しないことが示された。

【0332】

実施例10

91R mAbおよび3C3 mAbは、MOLT4細胞に対して異なる機能を示す

国際公開第00/53635号の文書には、3C3 mAbは、CCR9リガンドCCL25によって誘導されるMOLT4細胞の遊走を遮断することが記載されている。91R mAbと3C3 mAbとの間の機能的差異を調査するために、このアッセイを再現した。図13に示されている結果により、3C3 mAbは、CCL25によって誘導されるMOLT4細胞の遊走を遮断するのに対して、91R mAbは遮断しないことが明らかになった。

【図1AB】

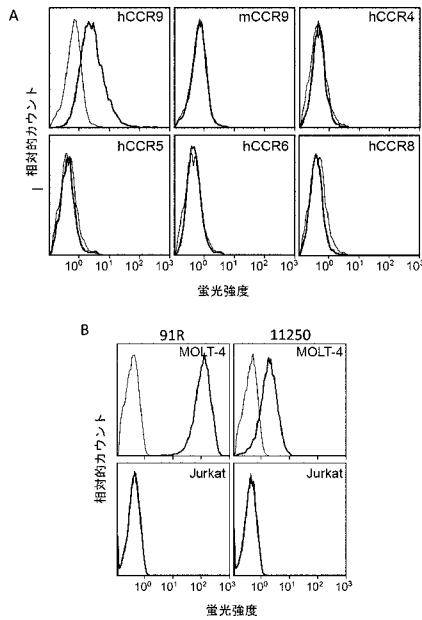


Figure 1

【図1CD】

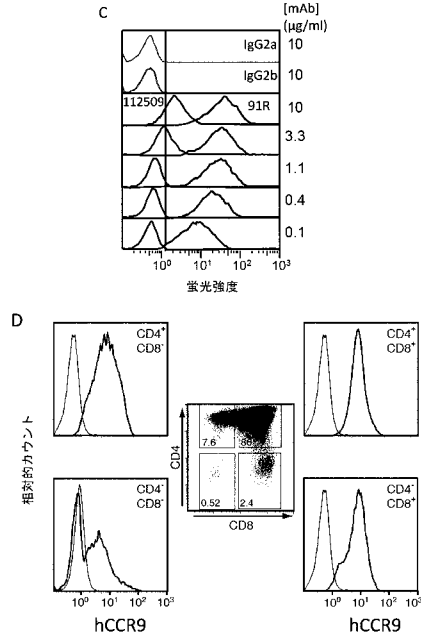
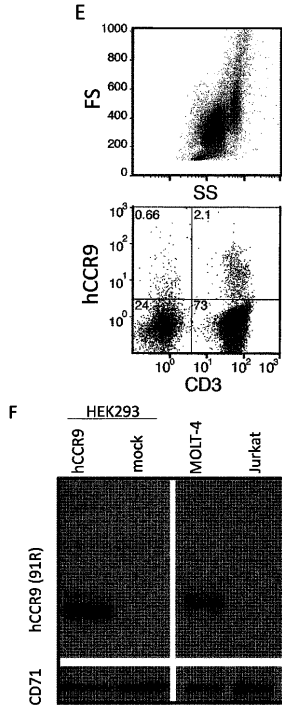
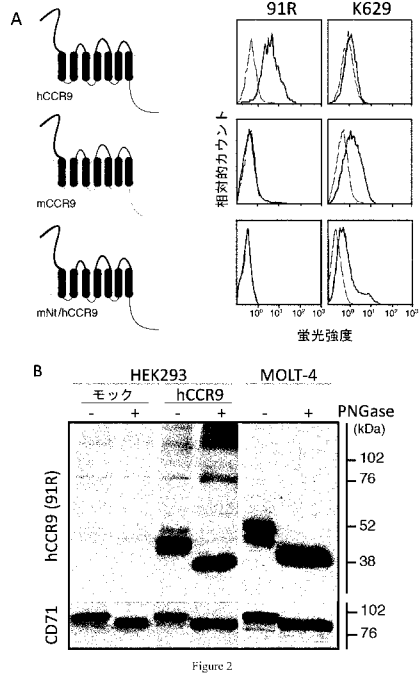


Figure 1 (cont.)

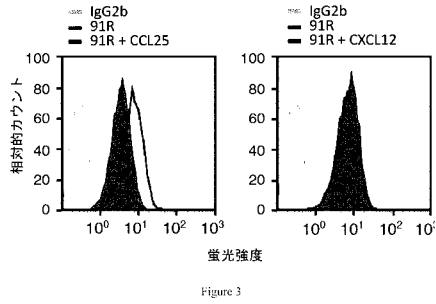
【 図 1 E F 】



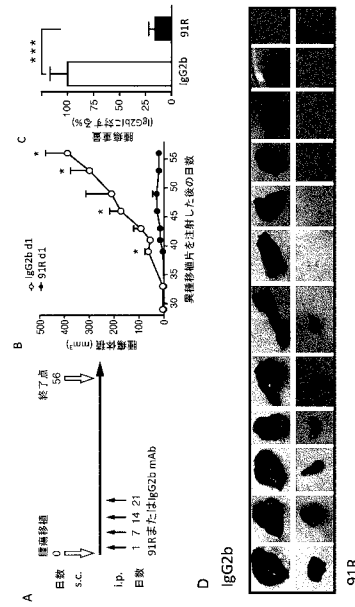
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 A B C D 】



【 図 4 E F G H 】

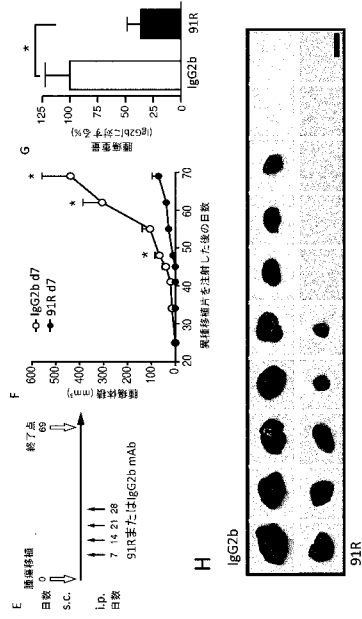


Figure 4 (cont.)

【 図 5 A B C 】

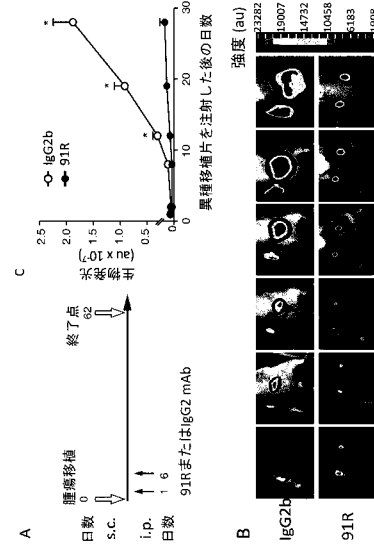


Figure 5

【 図 5 D E 】

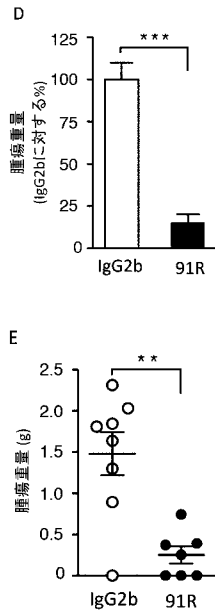


Figure 5 (cont.)

【 図 6 A B 】

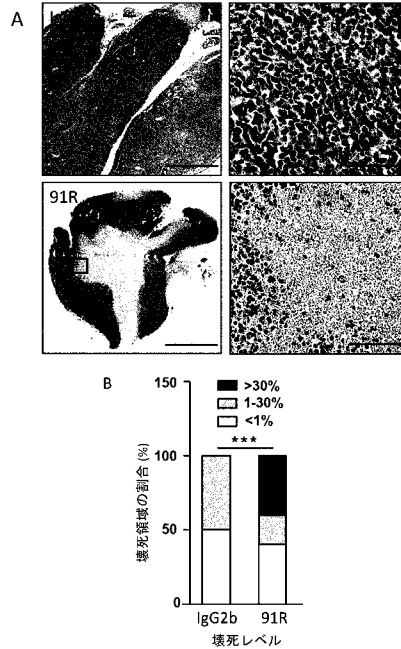


Figure 6

【 図 6 C 】

C

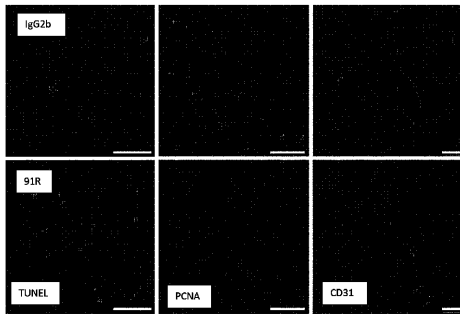


Figure 6 (cont.)

【 図 6 D 】

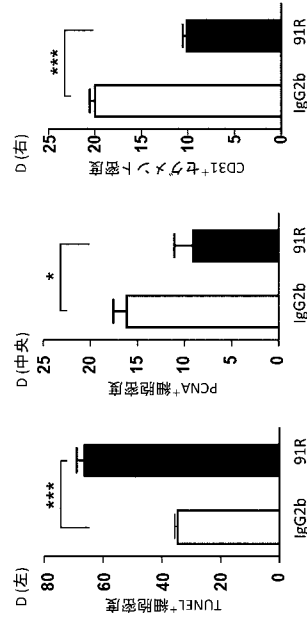


Figure 6 (cont.)

【 図 7 A B 】

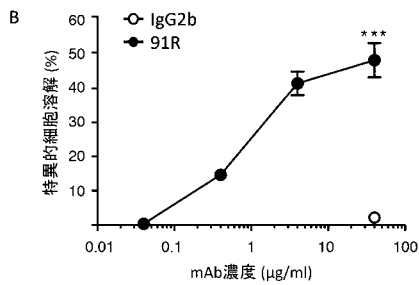
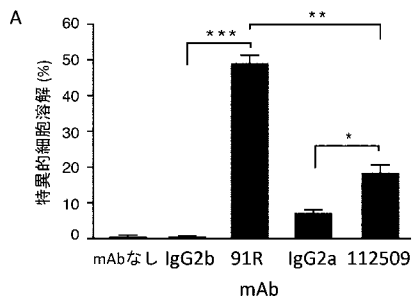


Figure 7

【 図 7 C D 】

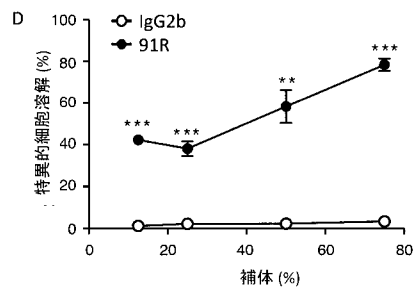
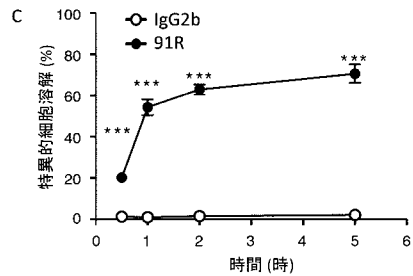


Figure 7 (cont.)

【 図 8 A B 】

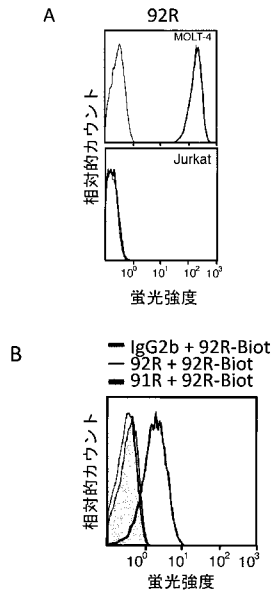


Figure 8

【 図 8 C 】

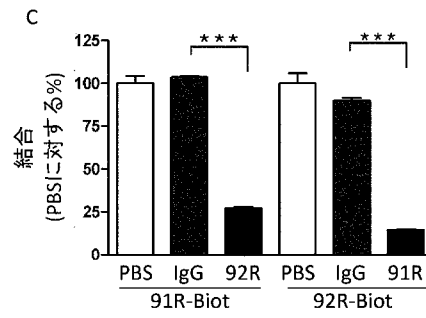


Figure 8 (cont.)

【 図 9 】

3C3, 91R および 92R の重鎖 CDR のアライメント

```

CDR-H1
91R  -RFSNN (SEQ ID NO: 1)
92R  -RFSNN (SEQ ID NO: 7)
3C3  SAYSRR (SEQ ID NO: 13)
      *  *
      :  :

CDR-H2
91R  RTRLRKSNVATGAVASVRS (SEQ ID NO: 2)
92R  RTRLRKSNVATGAVASVRS (SEQ ID NO: 8)
3C3  VTRLRK--RQVNSVRS (SEQ ID NO: 14)
      *  *  *  *  *  *
      :  :  :  :  :  :

CDR-H3
91R  DG--RFAY (SEQ ID NO: 3)
92R  DG--RFAY (SEQ ID NO: 9)
3C3  DRFFVFDV (SEQ ID NO: 15)
      *  *
      :  :

```

3C3, 91R および 92R の軽鎖 CDR のアライメント

```

CDR-L1
91R  RSQQMLRNGRTVYD (SEQ ID NO: 4)
92R  RSQQMLRNGRTVYD (SEQ ID NO: 10)
3C3  RSQQMLRNGRTVYF (SEQ ID NO: 16)
      *  *  *  *  *  *
      :  :  :  :  :  :

CDR-L2
91R  RYNSRPT (SEQ ID NO: 5)
92R  RYNSRPS (SEQ ID NO: 11)
3C3  RYNSRPS (SEQ ID NO: 17)
      *  *  *
      :  :  :

CDR-L3
91R  AQGSRVPT (SEQ ID NO: 6)
92R  AQGSRVPT (SEQ ID NO: 12)
3C3  PQGSRVPT (SEQ ID NO: 18)
      *  *  *
      :  :  :

```

Figure 9

【 図 10 】

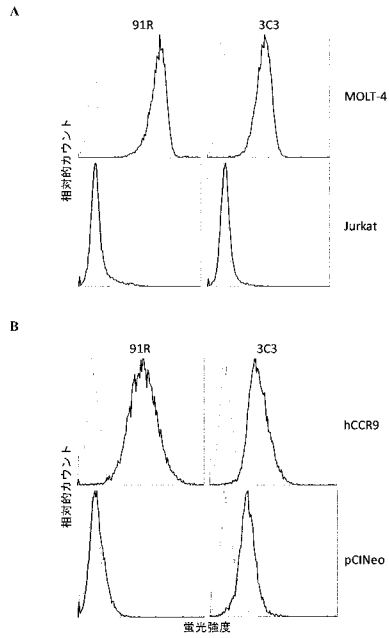


Figure 10

【 図 1 1 】

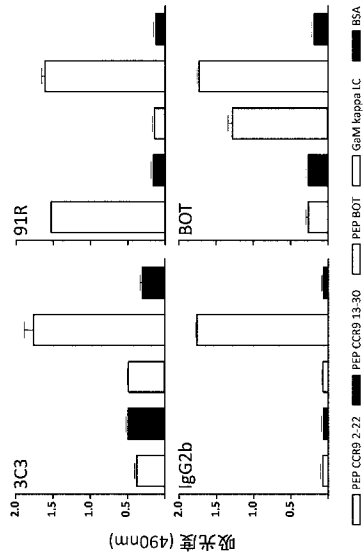


Figure 11

【 図 1 2 】

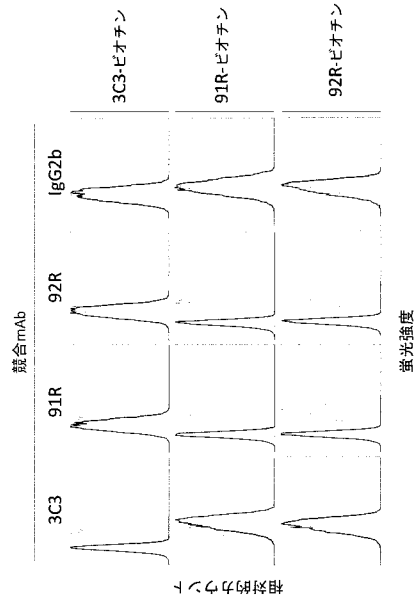


Figure 12

【 図 1 3 】

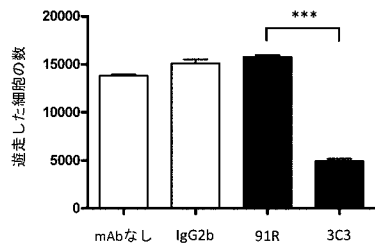


Figure 13

【配列表】

2017505107000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/075578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/53635 A1 (LEUKOSITE INC [US]) 14 September 2000 (2000-09-14) page 5 - page 7 page 4, paragraph 3 ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 11 May 2015		Date of mailing of the international search report 18/05/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fellows, Edward

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/075578

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ZABEL B A ET AL: "HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR-9-6/CC CHEMOKINE RECEPTOR 9 ISSELECTIVELY EXPRESSED ON INTESTINAL HOMING T LYMPHOCYTES, MUCOSAL LYMPHOCYTES, AND THYMOCYTES AND IS REQUIRED FOR THYMUS-EXPRESSED CHEMOKINE-MEDIATED CHEMOTAXIS", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 190, no. 9, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 1241-1255, XP000914973, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.190.9.1241 figures 1-13</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/075578

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0053635	A1	14-09-2000	
		AT 517123 T	15-08-2011
		AU 771603 B2	01-04-2004
		AU 3522600 A	28-09-2000
		CA 2365230 A1	14-09-2000
		EP 1157043 A1	28-11-2001
		JP 5112578 B2	09-01-2013
		JP 2002542157 A	10-12-2002
		JP 2012012402 A	19-01-2012
		US 6329159 B1	11-12-2001
		US 6936248 B1	30-08-2005
		US 2002119504 A1	29-08-2002
		US 2002141991 A1	03-10-2002
		US 2003022238 A1	30-01-2003
		US 2005181501 A1	18-08-2005
		WO 0053635 A1	14-09-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	N
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (72)発明者 チャモロ ペレス、ソニア
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス
- (72)発明者 フランコ ビジャヌエバ、アナ
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス
- (72)発明者 ガルシア サンス、ホセ アルベルト
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス
- (72)発明者 クレメル バロン、レオノル
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス
- (72)発明者 マルティネス アロンソ、カルロス
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス
- (72)発明者 ベラ クエンカ、マリア
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス
- (72)発明者 カラモリノ フィテラ、ラウラ
 スペイン国 マドリッド エ - 2 8 0 0 6、1 4 2、セラーノ、コンセジョ スペリオール デ
 インベスティガシヨネス シエンティフィカス

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS36 QX01
 QX02
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 CA46
 4C084 AA19 NA05 ZA681 ZA682 ZA751 ZA752 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
 4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 AA33 BB36 CC22 CC23

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	针对CCR9的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2017505107A	公开(公告)日	2017-02-16
申请号	JP2016534136	申请日	2014-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	科学研究高等机关		
申请(专利权)人(译)	Konsejo高级DE库存Sutiga甘蔗内斯表实体榕		
[标]发明人	チャモロペレスソニア フランコビジャヌエバアナ ガルシアサンスホセアルベルト クレメルバロンレオノル マルティネスアロンソカルロス ベラクエンカマリア カラモリノフィテララウラ		
发明人	チャモロ ペレス、ソニア フランコ ビジャヌエバ、アナ ガルシア サンス、ホセ アルベルト クレメル バロン、レオノル マルティネス アロンソ、カルロス ベラ クエンカ、マリア カラモリノ フィテラ、ラウラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 G01N33/531 G01N33/574 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/02 A61P35/00 A61P1/04 A61P1/16		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/2866 C07K2317/33 C07K2317/73 C07K2317/734 C07K2317/76 A61K39/395 C07K2317/565 G01N33/6893 G01N2333/7158 G01N2800/52 A61K39/39558 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/92 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 G01N33/531.A G01N33/574.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P35/02 A61P35/00 A61P1/04 A61P1/16		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/AA33 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	伊奈美稔 田村 庆政		
优先权	2013382469 2013-11-25 EP		
其他公开文献	JP6550385B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与CCR9特异性结合的抗体及其抗原结合片段。它还涉及使用所述抗体的用途和诊断方法。

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-534136 (P2016-534136)	(71) 出願人	508157886
(86) (22) 出願日	平成26年11月25日 (2014.11.25)	コンセジョ	スベリオール デ インベス
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月25日 (2016.7.25)	ティガシヨネス	シエンティフィカス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/075578	スペイン国	マドリッド イー-2800
(87) 国際公開番号	W02015/075269	6, 1 1 7, シー/セラノ	
(87) 国際公開日	平成27年5月28日 (2015.5.28)	(74) 代理人	100094640
(31) 優先権主張番号	13382469.8	弁理士	紺野 昭男
(32) 優先日	平成25年11月25日 (2013.11.25)	(74) 代理人	100103447
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	弁理士	井波 実
		(74) 代理人	100111730
		弁理士	伊藤 武泰
		(74) 代理人	100180873
		弁理士	田村 慶政
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C C R 9 に対する抗体およびその用途