

(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2019-511220

(P2019-511220A)

(43) 公表日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-546850 (P2018-546850)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月7日 (2017.3.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月6日 (2018.9.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/055364
 (87) 国際公開番号 WO2017/153433
 (87) 国際公開日 平成29年9月14日 (2017.9.14)
 (31) 優先権主張番号 62/304, 957
 (32) 優先日 平成28年3月8日 (2016.3.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506000184
 イナート・ファルマ・ソシエテ・アノニム
 INNATE PHARMA PHARM
 A S. A.
 フランス、エフー13009マルセイユ、
 アブニュ・ドゥ・リュミニエール117番
 (74) 代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74) 代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美

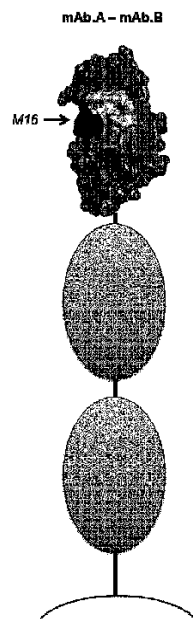
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Siglec 中和抗体

(57) 【要約】

本発明は、免疫細胞において阻害活性を有するヒト Siglec に結合し、かつそのような Siglec の阻害活性を中和する薬剤に関する。このような薬剤は、癌または感染性疾患の処置のために使用され得る。

Figure 13



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト Siglec - 9 ポリペプチドに結合し、かつヒト NK 細胞によって発現される Siglec - 9 ポリペプチドの阻害活性を中和することができる単離抗体。

【請求項 2】

ヒト Siglec - 7 ポリペプチドおよびヒト Siglec - 9 ポリペプチドに同等の結合親和性で特異的に結合する単離抗体。

【請求項 3】

ヒト Siglec - 7 ポリペプチドおよびヒト Siglec - 9 ポリペプチドへの結合について、細胞であって、その表面において Siglec - 7 または Siglec - 9 を発現する細胞への結合についてフローサイトメトリーによって決定されるときに $1 - \log$ 以下だけ異なる EC_{50} を有する、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

(a) リンパ球によって発現される Siglec - 7 ポリペプチドの阻害活性を中和することができる、かつ (b) リンパ球によって発現される Siglec - 9 ポリペプチドの阻害活性を中和することができる、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

Siglec - 9 を発現する NK 細胞がヒトドナーから精製され、かつ Siglec - 9 のシアル酸リガンドを発現する標的細胞と温置される標準的な 4 時間のインビトロ⁵¹ Cr 放出細胞傷害性アッセイにおいて、NK 細胞の細胞傷害性を増強および / または回復させる、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の抗体。

20

【請求項 6】

ヒト mODC であって、シアル酸とのシス相互作用に關与する Siglec - 9 ポリペプチドをその表面に保有するヒト mODC によって発現される Siglec - 9 ポリペプチドの阻害活性を中和することができる、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

CD16 ヒト Fc 受容体に結合する能力を欠く、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

ヒト CD16A、CD16B、CD32A、CD32B および CD64 に結合する能力を欠く、請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の抗体。

30

【請求項 9】

ヒト Siglec - 9 ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止しない、請求項 1 ~ 8 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記シアル酸リガンドは、Neu5Aca2 - 3Galb1 - 4GlcNAcb を含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

ヒト Siglec - 9 ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止する、請求項 1 ~ 8 の何れか一項に記載の抗体。

40

【請求項 12】

(a) ヒト Siglec - 9 ポリペプチドと Neu5Aca2 - 3Galb1 - 4GlcNAcb との間の相互作用を実質的に阻止し、かつ (b) ヒト Siglec - 9 ポリペプチドと 6' - シアリルラクトースとの間の相互作用を実質的に阻止する、請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 13】

ヒト Siglec - 7 ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止しない、請求項 1 ~ 12 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

ヒト Siglec - 7 ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的

50

に阻止する、請求項 1 ~ 12 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記シアル酸リガンドは、6'-シアリルラクトースを含む、請求項 13 または 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む S i g l e c - 9 ポリペプチドおよび配列番号 160 のアミノ酸配列を含む S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する、請求項 1 ~ 15 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 17】

さらなるヒト CD33 関連 S i g l e c ポリペプチドに実質的に結合せず、任意選択により、第 3 のヒト CD33 関連 S i g l e c ポリペプチドよりも少なくとも 100 倍低い KD で前記 S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 に結合し、任意選択により、前記第 3 のヒト CD33 関連 S i g l e c は、S i g l e c - 3、- 5、- 6、- 8、- 10、- 11 および - 12 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 16 の何れか一項に記載の抗体。

10

【請求項 18】

前記第 3 のヒト CD33 関連 S i g l e c ポリペプチドは、S i g l e c - 12 である、請求項 1 ~ 17 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 19】

S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 ポリペプチドの I g 様 C2 型ドメイン上に存在する決定基に結合する抗体であって、前記 S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 ポリペプチドの阻害活性を、前記ポリペプチドを発現する細胞において中和することができる抗体。

20

【請求項 20】

前記細胞は、好中球、マクロファージ、樹状細胞または NK 細胞である、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

ヒトドナーから精製された S i g l e c 発現 NK 細胞において、前記 NK 細胞が、標的ヒト細胞であって、標的細胞表面上に前記 S i g l e c のリガンドを保有する標的ヒト細胞と接触されると、細胞傷害性および / または細胞傷害性に関連するマーカーの上昇を引き起こす、請求項 1 ~ 20 の何れか一項に記載の抗体。

30

【請求項 22】

配列番号 2 の野生型 S i g l e c - 9 ポリペプチドへの結合と比較して、

- 残基 N78、P79、A80、R81、A82 および / もしくは V83 における突然変異；残基 N77、D96、H98 および / もしくは T99 における突然変異、ならびに / または残基 W84、E85、E86 および / もしくは R88 における突然変異を有する S i g l e c - 9 ポリペプチド、
- 残基 S47、H48、G49、W50、I51、Y52、P53 および / または G54 における突然変異を有する S i g l e c - 9 ポリペプチド、
- 残基 P55、H58、E122、G124、S125 および / または K127 における突然変異を有する S i g l e c - 9 ポリペプチド、
- 残基 K131 および / または H132 における突然変異を有する S i g l e c - 9 ポリペプチド、および / または
- 残基 R63、A66、N67、T68、D69、Q70 および / または D71 における突然変異を有する S i g l e c - 9 ポリペプチド

への減少した結合によって特徴付けられ、アミノ酸残基は、配列番号 2 の前記 S i g l e c - 9 ポリペプチドに関して示される、請求項 1 ~ 21 の何れか一項に記載の抗体。

40

【請求項 23】

S i g l e c - 9 への結合について、

(a) (i) 配列番号 15 の重鎖可変領域の CDR1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i

50

) 配列番号 16 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(b) (i) 配列番号 17 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 18 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(c) (i) 配列番号 19 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 20 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(d) (i) 配列番号 21 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 22 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(e) (i) 配列番号 23 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 24 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、および

(f) (i) 配列番号 25 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 26 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体

からなる群から選択される抗体と競合する、請求項 1 ~ 22 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 24】

S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 への結合について、

(a) (i) 配列番号 3 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 4 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(b) (i) 配列番号 5 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 6 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(c) (i) 配列番号 7 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 8 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(d) (i) 配列番号 9 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 10 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(e) (i) 配列番号 11 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 12 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、および

(f) (i) 配列番号 13 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 14 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体

からなる群から選択される抗体と競合する、請求項 1 ~ 23 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 25】

ヒト S i g l e c - 9 に結合する抗体であって、

(a) (i) 配列番号 15 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 16 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(b) (i) 配列番号 17 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 18 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(c) (i) 配列番号 19 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 20 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

10

20

30

40

50

(d) (i) 配列番号 21 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 22 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(e) (i) 配列番号 23 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 24 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、および

(f) (i) 配列番号 25 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 26 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体

からなる群から選択される抗体。

10

【請求項 26】

ヒト Siglec - 7 および Siglec - 9 に結合する抗体であって、

(a) (i) 配列番号 3 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 4 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(b) (i) 配列番号 5 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 6 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(c) (i) 配列番号 7 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 8 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

20

(d) (i) 配列番号 9 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 10 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(e) (i) 配列番号 11 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 12 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、および

(f) (i) 配列番号 13 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(ii) 配列番号 14 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体

30

からなる群から選択される抗体。

【請求項 27】

キメラ、ヒトまたはヒト化抗体である、請求項 1 ~ 26 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 28】

Fc ドメインであって、前記 Fc ドメインと Fc 受容体との間の結合を減少させるために修飾されている Fc ドメインを有する抗体である、請求項 1 ~ 27 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 29】

抗体断片、任意選択により、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、ダイアボディ、1本鎖抗体断片から選択される断片、または複数の異なる抗体断片を含む多特異性抗体である、請求項 1 ~ 26 の何れか一項に記載の抗体。

40

【請求項 30】

請求項 29 に記載の抗体断片を含む単離された Siglec 結合タンパク質。

【請求項 31】

検出可能部分と複合化されているかまたは共有結合されている、請求項 1 ~ 30 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 27 の何れか一項に記載の抗体をキメラ化またはヒト化することによって得られる抗体。

【請求項 33】

50

請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体を含み、任意選択により、請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体を特異的に認識する標識化二次抗体をさらに含むキット。

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体の重鎖および / または軽鎖をコードする核酸。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体を産生するハイブリドーマまたは組み換え宿主細胞。

10

【請求項 3 7】

疾患の処置または予防を、それを必要とする患者において行うための方法であって、有効量の請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体または請求項 3 3 に記載の組成物を前記患者に投与することを含む方法。

【請求項 3 8】

前記疾患は、癌であり、任意選択により、S T 3 G A L 1 および / または S T 3 G A L 6 酵素の発現によって特徴付けられる癌である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

対象において、C D 5 6 ^{d i m} N K 細胞、および / または C D 5 6 ^{b r i g h t} N K 細胞、および / または C D 8 + T 細胞を調整するための方法であって、有効量の請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体または請求項 3 3 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む方法。

20

【請求項 4 0】

単球由来細胞および / またはリンパ球、任意選択により、C D 5 6 ^{d i m} N K 細胞、C D 5 6 ^{b r i g h t} N K 細胞および / または C D 8 + T 細胞の活性を調整するためのインビトロ方法であって、S i g l e c 7 および / または S i g l e c - 9 を発現する単球由来細胞および / またはリンパ球を、請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体または請求項 3 3 に記載の組成物と接触させることを含むインビトロ方法。

【請求項 4 1】

疾患を有する対象からの N K 細胞の活性を評価するためのインビトロ方法であって、N K 細胞を含む対象からの生体試料を得ることと、前記細胞を請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体と接触させることと、前記抗体が前記 N K 細胞の前記活性を調整するか否かを評価することを含むインビトロ方法。

30

【請求項 4 2】

リンパ球、任意選択により、C D 5 6 ^{d i m} N K 細胞、C D 5 6 ^{b r i g h t} N K 細胞および / または C D 8 + T 細胞を同定するための方法であって、細胞を含む対象からの生体試料を得ることと、前記細胞を請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体と接触させることと、前記抗体が前記細胞に結合するか否かを評価することを含む方法。

【請求項 4 3】

前記細胞は、疾患、任意選択により、癌を有している対象から得られた生体試料中に存在する、請求項 4 0 ~ 4 2 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 4 4】

請求項 1 ~ 3 2 の何れか一項に記載の抗体または請求項 3 3 に記載の組成物での処置に反応する癌を有している対象を選択するための方法であって、前記対象中の癌細胞が S i g l e c - 7 または S i g l e c - 9 のリガンドを発現するか否か、任意選択により、癌細胞が、上昇したレベルの S i g l e c - 7 または S i g l e c - 9 のリガンドを発現するか否かを判定することを含み、S i g l e c - 7 もしくは S i g l e c - 9 のシアル酸リガンドの発現または S i g l e c - 7 もしくは S i g l e c - 9 のシアル酸リガンドの上昇したレベルは、反応者対象を示す、方法。

50

【請求項 45】

請求項 1 ~ 32 の何れか一項に記載の抗体または請求項 33 に記載の組成物での処置に反応する癌を有している対象を選択するための方法であって、前記対象中の癌細胞は、S T 3 G A L 1 および / もしくは S T 3 G A L 6 酵素 (または S T 3 G A L 1 および / もしくは S T 3 G A L 6 酵素活性) を発現するか否かを判定することを含み、S T 3 G A L 1 および / もしくは S T 3 G A L 6 酵素の発現あるいは S T 3 G A L 1 および / もしくは S T 3 G A L 6 酵素 (または S T 3 G A L 1 および / もしくは S T 3 G A L 6 酵素活性) の上昇したレベルは、反応者対象を示す、方法。

【請求項 46】

請求項 1 ~ 32 の何れか一項に記載の抗体または請求項 33 に記載の組成物を反応者対象に投与することをさらに含む、請求項 43 ~ 45 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 47】

複数の S i g l e c 遺伝子産物と交差反応し、かつ前記 S i g l e c の阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

(a) S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 (b) ヒトドナーから精製された N K 細胞における S i g l e c - 9 ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体を選択するステップと
 を含む方法。

【請求項 48】

S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

(a) S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 (b) S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体 (例えば、ステップ (a) のもの) を選択するステップと、
 (c) S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止しない抗体 (例えば、ステップ (b) のもの) を選択するステップと
 を含む方法。

20

【請求項 49】

S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

(a) S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 (b) S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体 (例えば、ステップ (a) のもの) を選択するステップと、
 (c) S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止する抗体 (例えば、ステップ (b) のもの) を選択するステップと
 を含む方法。

30

【請求項 50】

S i g l e c ポリペプチドの阻害活性を中和する能力を評価することは、S i g l e c - 9 を発現するヒトドナーから精製された N K 細胞において、前記 N K 細胞が、標的ヒト細胞であって、標的細胞表面上に前記 S i g l e c のリガンドを保有する標的ヒト細胞と接触されると、細胞傷害性、任意選択により、細胞傷害性のマーカーの上昇を引き起こすことができる抗体を選択することを含む、請求項 47 ~ 49 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 51】

前記シアル酸リガンドは、N e u 5 A c a 2 - 3 G a l b 1 - 4 G l c N A c b 構造を含む、請求項 48 ~ 50 の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本願は、任意の図面および配列表を含む、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる2016年3月8日提出の米国仮特許出願第62/304,957号明細書の利益を主張する。

【 0 0 0 2 】

配列表の参照

本願は、電子方式の配列リストと共に提出されている。本配列リストは、2017年2月22日作成の「S i g 7 9 2 P C T _ S T 2 5 t x t」という名称で提供されており、サイズは124kBである。本配列リストの電子方式の情報は、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

10

【 0 0 0 3 】

本発明は、NKおよび/または他の免疫細胞において阻害活性を有するヒトS i g l e cタンパク質に結合し、かつそのようなS i g l e cの阻害活性を中和する薬剤に関する。このような薬剤は、癌または感染性疾患の処置のために使用され得る。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

NK細胞は、リンパ球前駆細胞から骨髄で発生する単核細胞であり、形態学的特徴および生物学的特性としては、一般的に、クラスター決定基(CD)CD16、CD56および/またはCD57の発現；細胞表面上にアルファ/ベータまたはガンマ/デルタTCR複合体がないこと；「自己」主要組織適合抗原複合体(MHC)/ヒト白血球抗原(HLA)タンパク質を発現できない標的細胞に結合し、これを死滅させる能力；およびNK受容体を活性化するためにリガンドを発現する腫瘍細胞または他の病的細胞を死滅させる能力が挙げられる。NK細胞は、予め免疫付与または活性化する必要なく、一部のタイプの腫瘍細胞株に結合し、これを死滅させる能力によって特徴付けられる。NK細胞は、免疫系において制御効果を発揮する可溶性タンパク質およびサイトカインも放出し得、複数回の細胞分裂が起こり、親細胞と同様の生物学的特性を有する娘細胞を生成させ得る。正常で健康な細胞は、NK細胞による溶解から保護される。

20

【 0 0 0 5 】

それらの生物学的特性に基づいて、NK細胞の調整に依存する様々な治療およびワクチンストラテジーが当技術分野において提案されてきた。しかし、NK細胞活性は、刺激性および阻害シグナルの両方を含む複雑な機序により制御される。簡潔に述べると、NK細胞の溶解活性は、標的細胞上でのリガンドとの相互作用時に正または負の何れかの細胞内シグナルを伝達する様々な細胞表面受容体により制御される。これらの受容体を介して伝達される正および負のシグナル間のバランスは、NK細胞によって標的細胞が溶解(死滅)されるか否かを決定する。NK細胞刺激性シグナルには、NKp30、NKp44およびNKp46などの天然細胞傷害誘発受容体(NCR)；ならびにNKG2C受容体、NKG2D受容体、ある種の活性化キラーIg様受容体(KIR)および他の活性化NK受容体が介在し得る(非特許文献1)。NK細胞阻害シグナルには、CD94/NKG2-Aのような受容体ならびに主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスI分子を認識するある種の阻害性KIRが介在し得る(非特許文献2)。これらの阻害受容体は、他の細胞上に存在するMHCクラスI分子の多型決定基(HLAクラスIを含む)に結合し、NK細胞介在性の溶解を阻害する。

30

40

【 0 0 0 6 】

NK細胞の溶解活性は、s i g l e cポリペプチドによっても制御され得る。S i g l e c(シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン)は、シアログリカンに結合し、細胞型および分化依存性に造血系の細胞で主に発現される、I型レクチンのサブセットである。シアル酸が一般的には糖タンパク質および脂質の末端の位置でユビキタスに発現される一方で、非常に特異的な個別のシアログリカン構造のみが、末端近くの炭水化物部分に対する同一性および連結に依存して、個々のS i g l e c受容体により認識される。N-アセチ

50

ルノイラミン酸 (Neu5Ac) 2-6 および 2-3 結合を含有する一般的な哺乳動物シアロシド構造に対する Siglec の一般的な親和性は低いものにすぎない。

【0007】

Siglec は、一般に、Siglec-1、-2、-4 および -15 から構成される第1のサブセットと、Siglec-3、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-14 および -16 を含む Siglec の CD33 関連群との2つの群に分けられる。CD33 関連 Siglec は、とりわけ、進化的保存性が低いことおよび複数の機序による配列の急速な進化によって特徴付けられる。

【0008】

イタリア、ジェノバの Moretta グループにより 1999 年に最初にクローニングされ、特徴が調べられ、ヒト CD33 関連 Siglec 受容体に属する、1型膜貫通タンパク質である Siglec-7 (CD328) は、シアル酸結合 N 末端 V-セット Ig ドメイン、2つの C2-セット Ig ドメインおよび1つの免疫受容体チロシン阻害モチーフ (ITIM) および1つの ITIM 様モチーフを含有する細胞質内領域によって特徴付けられる。Siglec-7 は、NK 細胞、樹状細胞、単球および好中球上で構成的に発現される。この受容体の細胞外ドメインは、(2, 8)-結合ジシアル酸および分岐状 2, 6-シアルル残基、例えばガングリオシド GD3 により提示されるものなどに選択的に結合する。

10

【0009】

Siglec-9 (CD329) は、2000年に Varaki グループにより特徴が調べられ (例えば、(非特許文献3))、単球、好中球、樹状細胞、CD34+細胞およびNK細胞上で発現される。Siglec-9 (ならびに Siglec-8) は、シアル酸および硫酸の両方を含有するシアロシドリガンドに対して示差的な特異性を有し、硫酸の位置が特異性の重要な決定基であることが分かっている。Siglec-9 は、癌細胞上で過剰発現される MUC16 に結合することが分かっている。Siglec-7 のように、Siglec-9 もシアル酸結合 N 末端 V-セット Ig ドメイン、2つの C2-セット Ig ドメイン、および1つの免疫受容体チロシン阻害モチーフ (ITIM) および1つの ITIM 様モチーフを含有する細胞質内領域を含有する。ヒト Siglec-9 の N 末端 V-セット Ig ドメインは、ヒト Siglec-7 の N 末端 V-セット Ig ドメインと約 77% の全体的なアミノ酸配列同一性を共有し、これらの2種類の siglec は、異なるシアル酸結合特異性を示す。

20

30

【0010】

結合アッセイは、Siglec-7 と同様に、Siglec-9 がガラクトースへの 2, 3-または 2, 6-グリコシド結合の何れかにおいてシアル酸を認識することが報告されてきた。(非特許文献4) は、Siglec-9 特異的 mAb を用いて、Siglec-9 が、単球、好中球および CD16+、CD56-細胞の少数集団によって高レベルまたは中レベルで発現することが見出されたことを報告した。しかし、B細胞およびNK細胞の約50%ならびに CD8+T細胞および CD4+T細胞の少数サブセットでは、より弱い発現が観察された。著者らは、高度の配列類似性にもかかわらず、Siglec-7 および Siglec-9 が別個の発現プロファイルを有すると結論付けた。

40

【0011】

NK および他の免疫細胞上の Siglec-9 の興味深い発現プロファイル、および Siglec-9 を中和することへの潜在的な治療上の関心にもかかわらず、治療的使用について、Siglec-9 を特異的に中和する治療剤の候補は、今日まで進歩していないかまたは提案されていない。腫瘍関連シアル酸リガンドによる骨髄単球系統の細胞への Siglec-9 の関与は、NK細胞ならびに好中球、微生物を認識し直接死滅させる特殊な顆粒球による免疫監視および腫瘍細胞の死滅を阻害することが報告されている (非特許文献5)。(非特許文献6) は、宿主シアル酸付加グリカンの模倣が、細菌病原体が好中球 Siglec-9 に関与し、自然免疫応答を弱めることを可能にすると報告した。(非特許文献6) は、抗 Siglec-9 抗体 191240 (R&D Systems, in

50

c.)をSiglec-9上のシアル酸結合部位に結合し、シアル酸との相互作用を阻害するものとして記載した。(非特許文献6)は、非ブロッキング抗体(クローンE10~286、BD Biosciences inc.)と異なり、クローン191240が好中球の細菌細胞への活性化を増強することをさらに報告した。同様に、前出の(非特許文献5)は、抗Siglec-9抗体クローン191240が、好中球による腫瘍細胞の死滅を増強しなかったクローンE10-286と比較して、好中球による腫瘍細胞の死滅を増強できることを報告した。

【0012】

抗Siglec-7抗体は、(特許文献1)(Moretta et al)および(非特許文献7)に記載され、マウス抗Siglec-7抗体QA79に言及しており、(非特許文献8)も抗Siglec-7抗体Z176を報告している。

10

【0013】

(非特許文献9)は、ブロッキング抗Siglec-7抗体が腫瘍標的細胞のNK細胞による溶解からのSiglec-7媒介性防御を阻害することを報告した。しかし、Siglec-9に関して、抗Siglec-9抗体(クローン191240が使用された)は、好中球による腫瘍細胞の死滅を増強する能力を有するにもかかわらず((非特許文献5)を参照されたい、ヒトドナーから精製されたNK細胞による溶解からの腫瘍標的細胞のSiglec-9媒介性防御を阻害することができなかった((非特許文献9)を参照されたい)。非ブロッキングおよび好中球による腫瘍細胞の死滅を促進しないとして(非特許文献5)に報告されている二価結合抗体クローンE10-286も、初代NK細胞による溶解からの腫瘍標的細胞のSiglec-9媒介性防御を阻害しなかった(非特許文献10)。

20

【0014】

Siglec-7および-9への関心にもかかわらず、これらの受容体を標的とする治療剤は開発されていない。したがって、癌などの疾患を処置することにおける使用のための、これらの受容体を標的とする薬剤が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】欧州特許第1238282B1号明細書

30

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Lanier, Annual Review of Immunology 2005; 23: 225-74

【非特許文献2】Wagtmann et al. (1995) Immunity 5: 439-449

【非特許文献3】Angata et al. J Biol Chem 2000; 275: 22127-22135

【非特許文献4】Zhang et al. ((2000) J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 29: 22121-22126)

40

【非特許文献5】Laubli et al. (2014) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 111(39): 14211-14216

【非特許文献6】Carlin et al. ((2009) Blood 113: 3333-3336)

【非特許文献7】Vitale et al. ((1999) Proc. Nat. Acad. Sci. 96(26): 15091-96)

【非特許文献8】Falco et al. (1999) J. Exp. Med. 190: 793-801

【非特許文献9】Hudak et al. (2014) Nat. Chem. Biol. 10: 69-77

50

【非特許文献10】Jandus et al. (2014) J. Clin. Invest. 124(4):1810-1820

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

ある態様において、本開示は、好中球および/または他の細胞と比較してより低いレベルの細胞表面Siglecを発現するヒト個体における、とりわけNK細胞上のヒトSiglecの強力な中和剤として作用し、かつエフェクターリンパ球(Siglec-7、Siglec-9)における阻害性細胞表面受容体として作用する高親和性結合抗体を提供する。

10

【0018】

ある実施形態において、本開示は、Siglec-9の競合および非競合阻害剤を含むSiglec阻害剤(例えば、細胞の表面で発現されるSiglec-9)を提供する。それぞれの阻害剤は、Siglecとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止するか否かにかかわらず、Siglecの阻害活性の中和において特に高い効力を有する。

【0019】

ある実施形態において、Siglec阻害剤は、ヒトSiglec-9タンパク質、例えば抗体もしくは抗体フラグメント、またはそれを含むタンパク質に特異的に結合する免疫グロブリン抗原結合ドメインを含むタンパク質である。ある実施形態において、Siglec阻害剤は、表1のヒトSiglec-7および/または他のヒトSiglec(mAbA、-B、-C、-D、-Eおよび-Fによって例示される)に結合することなく、ヒトSiglec-9タンパク質に特異的に結合する。ある実施形態において、Siglec阻害剤は、ヒトSiglec-9タンパク質およびヒトSiglec-7タンパク質に特異的に結合し、任意選択により、さらに表1の他のヒトSiglec(mAb4、-5、-6によって例示される)に結合しない。ある実施形態において、Siglec阻害剤は、ヒトSiglec-9タンパク質、ヒトSiglec-7タンパク質およびヒトSiglec-12タンパク質に特異的に結合し、任意選択により、さらに表1の他のヒトSiglec(mAb1、-2および-3によって例示される)に結合しない抗体または抗体断片である。ある実施形態において、Siglec阻害剤は、ヒトSiglec-9タンパク質に二価結合することができる抗体または抗体フラグメントである(阻害剤は、それぞれヒトSiglec-9タンパク質に結合することができる2つの抗原結合ドメインを含む)。

20

30

【0020】

ある実施形態において、本発明は、ヒトSiglec-9ポリペプチドに特異的に結合し、かつSiglec-9ポリペプチドの阻害活性を中和する単離抗体を提供し、任意選択により、抗体は、Siglec-9ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止せず(mAb1、2および3によって例示される、実施例10を参照されたい)、任意選択により、抗体は、Siglec-9ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を阻止する(mAbA、BおよびCによって例示される、実施例10を参照されたい)。任意選択により、Siglec-9ポリペプチドは、細胞の表面、例えばエフェクターリンパ球、NK細胞、例えば初代NK細胞、ヒト個体由来のCD56^{dim}NK細胞において発現される。ある実施形態において、抗体は、さらに、ヒトSiglec-7ポリペプチドに結合し、かつSiglec-7ポリペプチドの阻害活性を中和し、任意選択により、抗体は、さらに、Siglec-7ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止しない。別の実施形態において、抗体は、ヒトSiglec-7ポリペプチドに結合しない。

40

【0021】

ある態様において、本発明は、とりわけヒトSiglec-9に特異的に結合し、かつNK細胞(例えば、初代NK細胞)のシアル酸リガンド保有標的細胞に対する活性(例え

50

ば、細胞傷害性)を増強する抗体の発見から生じる。好中球、S i g l e c 遺伝子移入体、および/または細胞表面で高レベルのS i g l e c - 9を発現するかもしくは発現するように作成された他の細胞においてのみ細胞傷害性を増強することができる従来の抗体と異なり、本明細書に記載の抗体は、ヒトにおけるNK細胞(例えば、C D 5 6 ^{d i m} NK細胞)などの低レベルのS i g l e c - 9を発現する細胞でも機能する。このようなS i g l e c - 9低発現NK細胞の細胞傷害性を増強する能力は、疾病標的細胞(例えば、腫瘍細胞および/または細菌細胞)に対するこの細胞集団をさらに動員できるという利点を有する。

【0022】

ある実施形態において、ヒトS i g l e c - 9に特異的に結合し、かつS i g l e c - 9を発現するNK細胞が、S i g l e c - 9のシアル酸リガンドを発現する標的細胞と共に温置される標準的な4時間のインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて、NK細胞(初代NK細胞)の細胞傷害性を増強および/または回復させる抗体または抗体フラグメント(またはそのようなフラグメントを含むタンパク質)が提供される。ある実施形態において、標的細胞は、NK細胞の添加前に⁵¹Crで標識され、次いで、死滅(細胞傷害性)は、細胞から培地への⁵¹Crの放出に比例するものとして推定される。任意選択により、本明細書の実施例の方法に従ってアッセイを実施することができる。例えば、実施例8を参照されたい。ある実施形態において、抗体または抗体フラグメントは、S i g l e c - 9を発現するNK細胞の細胞傷害性を、少なくともS i g l e c - 9を発現しないNK細胞で観察されるレベル(例えば、本明細書の実施例の方法に従って決定されるレベル)まで回復させることができる。

10

20

【0023】

本明細書中の何れかの態様において、NK細胞(例えば、初代NK細胞)は、ドナーから精製された新鮮なNK細胞として特定され得、任意選択により、使用前に37℃で一晩温置される。本明細書中の何れかの態様において、NK細胞または初代NK細胞は、例えば、フローサイトメトリーによってS i g l e c - 9上で細胞をゲートすることができるアッセイでの使用のために、S i g l e c - 9を発現するものとして特定され得る。例えば、本明細書の実施例8に記載されるNK細胞を参照されたい。

【0024】

別の実施形態において、ヒトS i g l e c - 9に特異的に結合し、かつ単球由来樹状細胞(m o D C)におけるS i g l e c - 9ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体または抗体フラグメント(またはそのようなフラグメントを含むタンパク質)が提供される。ある実施形態において、m o D Cは、その表面にS i g l e c - 9のシアル酸リガンドを保有する。ある実施形態において、m o D Cは、その表面において、シアル酸とのシス相互作用に關与するS i g l e c - 9ポリペプチドを保有する。ある実施形態において、抗体は、m o D Cにおける活性化またはシグナル伝達を増加させる。ある実施形態において、抗体は、S i g l e c - 9のシアル酸リガンドを保有するm o D CにおいてS i g l e c - 9ポリペプチドの阻害活性を中和し、ここで、m o D Cは、シアル酸リガンドを除去するノイラミダーゼでm o D Cを処理すると、m o D Cに結合する抗体のE C ₅₀がより低くなる細胞である。

30

40

【0025】

別の態様において、本発明は、とりわけ同等の親和性でS i g l e c - 7およびS i g l e c - 9ポリペプチドの両方に結合する抗S i g l e c 抗体の発見から生じる。そのような抗体は、有利な薬理学的特徴を有する。本明細書中に示されるように、NK細胞は、阻害S i g l e c - 7および阻害S i g l e c - 9タンパク質の両方を発現し得るが、S i g l e c - 7およびS i g l e c - 9は、異なる細胞集団にわたって異なる発現プロファイルを有し得る。さらに、腫瘍細胞がS i g l e c - 7およびS i g l e c - 9に対する天然リガンド(グリカン)を発現し得ることが示されている。結果的に、一方のS i g l e c を阻害するが他方を阻害しない治療剤は、S i g l e c が介在するNKおよび/または他の免疫細胞集団の活性の制限を中和するのに最大限に有効でない可能性がある。し

50

たがって、Siglec7および9の両方の阻害は有利であり得る。しかし、Siglec-9がヒトSiglec-7のN末端V-セットIgドメインと共有する全体的なアミノ酸配列同一性は、約77%のみである。さらに、これらの2種類のSiglecは、異なるシアル酸結合特異性を示し、シアル酸リガンドが結合した領域における構造的差異を示唆する。

【0026】

ある態様において、本開示は、Siglec-7および/またはSiglec-9の阻害活性を中和し、かつ阻害性ヒトSiglec-7ポリペプチドおよびヒトSiglec-9ポリペプチドに同等の親和性で特異的に結合することができる高親和性結合抗体を提供する。Siglec-7およびSiglec-9に同等の親和性で結合する抗体は、例えば、特定の実施形態において、各Siglecとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を阻止する向上した能力を有し得る(mAb4、5および6によって例示される、実施例6を参照されたい)。Siglec-9に結合する抗体は、他の実施形態において、Siglec-9とそのシアル酸リガンド、特にNeu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb構造を含むシアル酸との間の相互作用を実質的に阻止することなく、Siglec-9の阻害活性を中和するものとして特徴付けられ得る(mAb1、2および3によって例示される、実施例9を参照されたい)。

10

【0027】

本明細書に示すように、ヒトSiglec-9は、Sia1(Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb)およびSia2(6'-シアリルラクトース)の両方に結合するが、Siglec-7はSia2にのみ結合する。ある態様において、Siglec-9およびSiglec-7の両方のシアル酸リガンド、例えばSia2シアル酸などのSiglecポリペプチドの相互作用を阻止することができる抗体が提供される。ある実施形態において、シアル酸は、シアル酸付加三糖である。ある実施形態において、シアル酸は、6'-シアリルラクトース構造を含む。

20

【0028】

別の態様において、ヒトSiglec-9ポリペプチドに結合し、かつその阻害活性を中和する抗体であって、Sia1(Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb)およびSia2(6'-シアリルラクトース)の両方のSiglec-9ポリペプチドとの相互作用を阻止することができる抗体が提供される(mAb1、2および3によって例示される、実施例9を参照されたい)。

30

【0029】

ある実施形態において、Siglec-7およびSiglec-9を結合することができる抗体は、ヒトSiglec-7ポリペプチドへの結合について、細胞であって、その表面においてSiglec-7またはSiglec-9を発現する細胞(例えば、それぞれのSiglecの1つで遺伝子移入されたが、他のSiglecを発現しないCHO細胞)への結合についてフローサイトメトリーによって決定されるときに、ヒトSiglec-9ポリペプチドへの結合についてのそのEC₅₀と1-log未満だけ異なるEC₅₀を有する。ある実施形態において、抗体は、ヒトSiglec-7ポリペプチドおよびヒトSiglec-9ポリペプチドへの結合について、細胞であって、その表面においてSiglec-7またはSiglec-9を発現する細胞への結合についてフローサイトメトリーによって決定されるときに0.5log、0.3log、0.2logまたは0.1log以下だけ異なるEC₅₀を有する。細胞であって、その表面においてSiglec-7またはSiglec-9を発現する細胞は、それぞれのSiglecを同等の発現レベルで発現するものとして特徴付けられ得る。

40

【0030】

ある実施形態において、抗体は、ヒトSiglec-7および/または-9と同等の親和性で非ヒト霊長類Siglecにさらに結合する。ある実施形態において、抗体は、ヒトSiglec-7ポリペプチド、ヒトSiglec-9ポリペプチドおよび非ヒト霊長類Siglecへの結合について、細胞であって、その表面においてSiglec-7ま

50

たはS i g l e c - 9を発現する細胞（例えば、それぞれのS i g l e cで遺伝子移入されたC H O細胞）への結合についてフローサイトメトリーによって決定されるときに1 - 1 l o g、0 . 5 l o g、0 . 3 l o g、0 . 2 l o gまたは0 . 1 l o g以下だけ異なるE C₅₀を有する。

【0031】

ある実施形態において、ヒトS i g l e c - 9の活性を中和し、かつヒトS i g l e c - 9ポリペプチドおよび非ヒト霊長類S i g l e cへの結合について、細胞であって、その表面においてS i g l e c - 9を発現する細胞（例えば、S i g l e cで遺伝子移入されたC H O細胞）への結合についてフローサイトメトリーによって決定されるときに1 - 1 l o g、0 . 5 l o g、0 . 3 l o g、0 . 2 l o gまたは0 . 1 l o g以下だけ異なるE C₅₀を有する抗体が提供される。

10

【0032】

ある実施形態において、抗体は、ヒトS i g l e c - 7ポリペプチドおよびヒトS i g l e c - 9ポリペプチド（および任意選択により、さらに非ヒト霊長類S i g l e c）への結合について、例えば表面プラズモン共鳴（S P R）スクリーニング（B I A c o r e（商標）S P R分析装置による分析によるものなど）によって決定されるときに10倍、5倍、3倍または2倍以下だけ異なる結合親和性のK Dを有する。

【0033】

ある実施形態において、抗体は、ヒトS i g l e c - 9ポリペプチド（および任意選択により、さらにヒトS i g l e c - 7ポリペプチドおよび/または非ヒト霊長類S i g l e c）への結合について、約 1×10^{-8} M ~ 約 1×10^{-10} Mまたは約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのK Dを有する。ある実施形態において、抗S i g l e c - 9抗体は、ヒトS i g l e c - 9ポリペプチドへの結合（例えば、一価親和性）について、約 1×10^{-8} M ~ 約 1×10^{-10} Mまたは約 1×10^{-9} M ~ 約 1×10^{-11} MのK Dを有し、抗体は、ヒトS i g l e c - 7ポリペプチドに対する実質的な結合を有しない。

20

【0034】

ある実施形態において、本抗体は、さらに、ヒトS i g l e c - 3、- 5、- 6、- 8、- 10、- 11および- 12の何れにも実質的に結合しない。ある実施形態において、本抗体は、さらに、S i g l e c - 14および- 16の何れにも実質的に結合しない。ある実施形態において、本抗体は、さらに、S i g l e c - 6に実質的に結合しない。ある実施形態において、本抗体は、さらに、S i g l e c - 12に実質的に結合しない。

30

【0035】

本明細書中の実施形態の何れかにおいて、抗S i g l e c抗体は、細胞（例えば、NK細胞、S i g l e c - 7および/またはS i g l e c - 9を発現するように作製された細胞、例えば実施例に示すようにS i g l e c - 7および/またはS i g l e c - 9をその表面に発現するように作製された組み換えC H O宿主細胞）の表面上に発現されるポリペプチドに結合することによって特徴付けられ得、および任意選択により、さらに、抗体は、フローサイトメトリーによって決定される高親和性で結合する。例えば、抗体は、初代NK細胞（例えば、ヒト個体またはドナー由来の生物学的試料から精製されたNK細胞）、任意選択により、C D 5 6^{d i m} NK細胞への結合について、5 μg / ml以下、任意選択により、1 μg / ml以下、0 . 5 μg / ml以下、0 . 2 μg / ml以下、または0 . 1 μg / ml以下の、フローサイトメトリーによって決定されるE C₅₀によって特徴付けられ得る。E C₅₀は、例えば、実施例9の方法に従い、例えば4人以上の健常ヒトドナーで試験し、染色をB D F A C S C a n t o I Iによって得てF l o w J o ソフトウェアを用いて分析し、4パラメーターロジスティックフィットを用いてE C₅₀を計算する方法で決定され得る。

40

【0036】

別の態様において、本開示は、ヒトS i g l e c - 7および/または- 9ポリペプチドに特異的に結合し、かつ免疫細胞におけるそのようなS i g l e cの阻害活性を中和する

50

ことができ、そのようなS i g l e cポリペプチドのそのシアル酸リガンドとの相互作用を阻止することができる抗体または抗体フラグメント（例えば、抗原結合ドメインまたはそれを含むタンパク質）を提供する。ある実施形態において、シアル酸は、シアル酸付加三糖である。ある実施形態において、シアル酸は、Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb構造を含む。ある実施形態において、シアル酸は、6'-シアリルラクトース構造を含む。ある実施形態において、抗体または抗体断片は、ヒトS i g l e c - 7および/または-9ポリペプチドに特異的に結合し、かつヒトNK細胞細胞（例えば、ヒト初代NK細胞；CD56^{d i m}NK細胞）、ヒト単球、ヒト樹状細胞、ヒトマクロファージ（特に免疫抑制またはM2マクロファージ）、CD8⁺T細胞および/またはヒト好中球において、そのようなS i g l e cの阻害活性を中和することができる。ある実施形態において、抗体または抗体断片は、ヒトS i g l e c - 7および/または-9ポリペプチドに特異的に結合し、かつヒトドナーからの免疫抑制マクロファージ（例えば、M2マクロファージ）において、そのようなS i g l e cの阻害活性を中和ことができ、ここで、抗体または抗体断片は、マクロファージの免疫抑制活性または能力を低下させる。

10

【0037】

考察したように、ヒトS i g l e c - 9は、S i a 1（Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb）およびS i a 2（6'-シアリルラクトース）の両方に結合するが、S i g l e c - 7は、S i a 2にのみ結合する。特定の態様において、S i g l e c - 9ポリペプチドと、S i g l e c - 9のリガンドであるがS i g l e c - 7のリガンドではないシアル酸、例えばS i a 1シアル酸との間の相互作用を阻止する抗体が提供される。ある実施形態において、シアル酸は、シアル酸付加三糖である。ある実施形態において、シアル酸は、Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb構造を含む。ある実施形態において、抗体は、S i g l e c - 7のリガンドであるがS i g l e c - 9のリガンドではないシアル酸、例えば6'-シアリルラクトース含有シアル酸とのS i g l e c - 7ポリペプチドの相互作用を実質的に阻止しない。

20

【0038】

このような抗体の断片および誘導体も提供される。ある実施形態において、本抗体は、ヒトS i g l e c - 7ポリペプチドおよび/またはヒトS i g l e c - 9ポリペプチドに結合可能である抗原結合ドメイン（例えば、単一抗原結合ドメイン、重鎖および軽鎖可変ドメインから構成されるドメインなど）を含む。ある実施形態において、抗原結合ドメインは、ヒトS i g l e c - 9ポリペプチドに結合し、かつヒトS i g l e c - 7ポリペプチドに結合しない（mAbA、-B、-C、-D、-Eおよび-Fによって例示される）。ある実施形態において、抗原結合ドメインは、ヒトS i g l e c - 9ポリペプチドおよびヒトS i g l e c - 7ポリペプチド（mAb1、-2、-3、-4、-5および-6によって例示される）の両方に結合する。ある実施形態において、そのような抗原結合ドメインをコードするタンパク質（例えば、抗体、多量体および/または多重特異性タンパク質）または核酸が提供される。

30

【0039】

ある実施形態において、本開示の中和抗S i g l e c抗体は、免疫細胞においてS i g l e c - 7および/または-9によって発揮される阻害活性を緩和し、S i g l e c - 7のシアル酸リガンドおよび/またはS i g l e c - 9のシアル酸リガンドを発現する癌細胞を効果的に認識しかつ/または排除するリンパ球の能力を促進する。中和抗体（または抗体断片）は、一方または他方のタイプのリガンドの発現のために、癌細胞が溶解から逃れる能力を低下させ、したがって、これらにより免疫系による腫瘍監視が促進される。NK区画において、S i g l e c - 9は、CD56^{d i m}NK細胞で主に発現される一方、s i g l e c - 7は、CD56^{d i m}およびCD56^{b r i g h t}NK細胞上で発現される。CD56^{d i m}NK細胞（CD56^{d i m}CD16⁺KIR⁺）は、末梢血液および脾臓NK細胞の約90%に相当し、パーフォリンおよびグランザイムを発現し、主要な細胞傷害性サブセットである一方、CD56^{b r i g h t}NK細胞（CD56^{b r i g h t}CD16^{d i m}/-KIR⁻）は、リンパ節および扁桃腺でNK細胞の大多数を構成し、

40

50

活性化時に主としてサイトカイン産生に反応する。ある実施形態において、ヒト Siglec-9 に特異的に結合し、かつヒトNK細胞（例えば、ヒト初代NK細胞；CD56^d i^m NK細胞）における Siglec-9 によって発揮される阻害活性を緩和し、Siglec-9 のシアル酸リガンドを発現する癌細胞を効果的に認識しかつ/または排除するNK細胞の能力を増強する抗体または抗体フラグメントが提供される。ある実施形態において、ヒト Siglec-7 および Siglec-9 に特異的に結合し、かつヒトNK細胞（例えば、ヒト初代NK細胞；CD56^d i^m NK細胞）における Siglec-7 および Siglec-9 によって発揮される阻害活性を緩和し、Siglec-7 および Siglec-9 のシアル酸リガンドを発現する癌細胞を効果的に認識しかつ/または排除するNK細胞の能力を増強する抗体または抗体フラグメントが提供される。

10

【0040】

ある実施形態において、本開示の抗体は、Siglec-7 および Siglec-9 の両方に結合し得、かつリンパ球（例えば、NK細胞、CD8+T細胞）細胞傷害性の Siglec-7 および Siglec-9 介在性阻害の両方を中和し得る。ある態様において、本抗体は、標的細胞（例えば、Siglec-7 のリガンドおよび/または Siglec-9 のリガンドを発現する細胞、腫瘍細胞）の存在下でリンパ球活性化を向上させる。ある実施形態において、抗体は、Siglec-9 を発現するNK細胞がヒトドナーから精製され、かつ Siglec-9 のシアル酸リガンドを発現する標的細胞と温置される標準的なインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて評価されるNK細胞の細胞傷害性を向上させる。ある実施形態において、細胞傷害性の阻害の活性化または中和の向上は、細胞傷害性/細胞傷害性の可能性のマーカー、例えばCD107 および/またはCD137 発現（動員）の上昇によって評価される。ある実施形態において、細胞傷害性の阻害の活性化または中和の向上は、⁵¹Cr 放出アッセイにおける⁵¹Cr 放出の増加によって評価される。Siglec-7 は、配列番号1のアミノ酸配列を含み得る。Siglec-9 は、配列番号2のアミノ酸配列を含み得る。別の実施形態において、Siglec-9 は、配列番号160のアミノ酸配列を含む。

20

【0041】

ある実施形態において、本開示の抗体は、配列番号2のアミノ酸配列（100位にリジン有し、集団の約49%を表す）を含む Siglec-9 ポリペプチド、および配列番号160のアミノ酸配列（配列番号2の残基100に対応する位置にグルタミン酸を有する）、集団の約36%を表す）を含む Siglec-9 ポリペプチドの両方に結合することができる。何れかの実施形態において、本開示の抗体または抗体フラグメントは、配列番号2のアミノ酸配列を含む Siglec-9 ポリペプチドを発現する（またはその細胞が発現する）個体において、および配列番号160のアミノ酸配列を含む Siglec-9 ポリペプチドを発現する（またはその細胞が発現する）個体において、Siglec-9 の阻害活性を中和することができるものとして特定され得る。

30

【0042】

ある実施形態において、ヒト Siglec-9 ポリペプチドに結合し、かつ配列番号2のアミノ酸配列を含む Siglec-9 ポリペプチドおよび配列番号160のアミノ酸配列を含む Siglec-9 ポリペプチドの両方の阻害活性を中和することができる抗体または抗体断片（またはそのような断片を含むタンパク質）が提供される。ある実施形態において、ヒト Siglec-9 ポリペプチドに結合し、かつ配列番号2のアミノ酸配列を含む Siglec-9 ポリペプチドを発現するNK細胞および配列番号160のアミノ酸配列を含む Siglec-9 ポリペプチドを発現するNK細胞において、Siglec-9 ポリペプチドの阻害活性を中和することができる抗体または抗体フラグメント（またはそのようなフラグメントを含むタンパク質）が提供される。ある実施形態において、抗体は、特定の Siglec-9 を発現するNK細胞がヒトドナーから精製され、かつその Siglec-9 のシアル酸リガンドを発現する標的細胞と温置される標準的なインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて評価されるNK細胞の細胞傷害性を向上させる。

40

【0043】

50

本明細書中の実施形態の何れかのある態様において、本抗体は、S i g l e cの細胞外ドメイン上に存在するエピトープに2価方式で結合する四量体（例えば、全長、F (a b) ' 2断片）抗体または抗体断片である。例えば、2価の様式でS i g l e cに結合する抗体または抗体断片は、それぞれがS i g l e c - 9ポリペプチドに結合することができるか、またはそれぞれがS i g l e c - 7およびS i g l e c - 9ポリペプチドの両方に存在するエピトープに結合することができる2つの抗原結合ドメインを含み得る。本明細書中の実施形態の何れかの別の態様において、本抗体は、1価方式でS i g l e cに結合し、各S i g l e c、例えばS i g l e c - 7および/またはS i g l e c - 9でアゴニスト活性を欠く。ある実施形態において、1価方式でS i g l e cに結合する抗体は、F a b断片である。本明細書中の実施形態の何れかにおいて、本抗体は、S i g l e cに1価または2価方式で結合し、S i g l e c - 9でアゴニスト活性がない。治療用途の場合、抗体は、好ましくは非枯渇抗体である。任意選択により、本抗体は、ヒト新生児F c受容体（F c R n）によって結合可能であるが、実質的にヒトF c RへのそのF cドメインを介した結合を欠くF cドメインを含む（例えば、C D 1 6 '、任意選択により、ヒトC D 1 6 A、C D 1 6 B、C D 3 2 A、C D 3 2 Bおよび/またはC D 6 4ポリペプチドの1つ以上またはそれぞれ）。任意選択により、抗体は、ヒトC D 1 6 A、C D 1 6 B、C D 3 2 A、C D 3 2 Bおよび/またはC D 6 4ポリペプチドの1つ以上、またはそれぞれに対する、抗体の結合親和性を減少させるアミノ酸修飾（例えば、1つ以上の置換）を含むヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4アイソタイプのF cドメインを含む。

10

20

【0044】

ある実施形態において、本抗体は、S i g l e c - 9、任意選択により、さらにS i g l e c - 7に結合する1つ以上の（例えば、2つの）抗原結合ドメインを含む。ある具体的な実施形態において、本抗体は、四量体の、任意選択により、2つの同一の抗原結合ドメイン（任意選択により、2つの重鎖および軽鎖可変領域対）を含み、S i g l e c - 9、任意選択により、さらにS i g l e c - 7に結合し、その阻害活性を中和し、ヒト新生児F c受容体（F c R n）によって結合可能なF cドメインを含み、実質的にヒトF c R（例えば、C D 1 6；任意選択により、ヒトC D 1 6 A、C D 1 6 B、C D 3 2 A、C D 3 2 Bおよび/またはC D 6 4ポリペプチドの1つ以上またはそのそれぞれ）への結合を欠く全長抗体である。

30

【0045】

本明細書中の実施形態の何れかにおいて、ヒトリンパ球上でのS i g l e cへの結合時、モノクローナル抗体は、標的細胞表面上のS i g l e cのシアル酸リガンドを保有する標的ヒト細胞の溶解を促進または再構成する能力を有し、および/またはこの標的細胞が前記リンパ球、例えばエフェクターリンパ球、ヒト個体からのNKまたはC D 8 + T細胞（例えば、C D 5 6 ^{d i m} NK細胞）と接触すると、（例えば、リンパ球上のC D 1 0 7および/またはC D 1 3 7発現の上昇によって決定した場合に）リンパ球活性化を向上させる能力を有する。ある実施形態において、リンパ球の第1のサブセットによって発現される第1のS i g l e c（例えば、C D 5 6 ^{d i m} NK細胞上に発現されるS i g l e c - 9）を中和する、およびリンパ球の第2のサブセットによって発現される第2のS i g l e c（例えば、C D 5 6 ^{b r i g h t} NK細胞上に発現されるS i g l e c - 7）を中和する抗体が提供される。ヒトリンパ球の第1および第2のサブセット（例えば、NK細胞、C D 8 + T細胞、単球、樹状細胞、マクロファージ、免疫抑制またはM 2マクロファージ）は、例えば、異なる細胞表面マーカー、または異なる機能的特性、または異なる標的細胞を溶解または認識する（例えば、これにより活性化される）能力によって特徴付けられ得る。ある実施形態において、本抗体は、そのシアロシドリガンド（例えば、腫瘍細胞上に存在するリガンド）へのS i g l e cの結合を減少させる（阻止する）。

40

【0046】

本明細書中の実施形態の何れかにおいて、S i g l e cのシアロシドまたはシアル酸リガンドは、天然リガンド、例えばシアル酸リガンド（シアル酸を含むリガンド）であり、

50

抗体が結合する S i g l e c ポリペプチドに結合することが知られている。9つの炭素の酸性単糖のファミリーであるシアル酸は、一般的にはN-グリカン、O-グリカンおよび糖脂質の終端分岐であることが分かっている。S i g l e c は、2位からの酸性シアル酸結合のようなシアル酸分子の多くの態様、シアル酸の配置およびそれらの提示法を認識すると考えられる。本明細書中の実施形態の何れかにおいて、S i g l e c のリガンドは、主に5-N-アセチルノイラミン酸 (N e u 5 A c) 誘導体を含み、5-N-グリコリルノイラミン酸 (N e u 5 G c) 誘導体のような他のシアル酸誘導体を含み得る。ある実施形態において、S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 のリガンドは、糖タンパク質 (例えば、ムチン) または糖脂質上に存在するシアル酸である。ある実施形態において、S i g l e c - 7 のリガンドは、b-シリーズガングリオシド、例えば G D 2、G D 3 および G T 1 b 上で提示される 2, 8-結合ジシアル酸を含む。ある実施形態において、S i g l e c - 7 のリガンドは、内部で分岐状である 2, 6-結合ジシアルガングリオシド、例えば D S G b 5 を含む。ある実施形態において、S i g l e c - 9 のリガンドは、ムチン、例えば M U C 1 上に存在するリガンドであるか、またはムチン、例えば M U C 1 を含む。ある実施形態において、S i g l e c - 9 のリガンドは、シアル酸および硫酸の両方を含有するシアログリカンリガンドである。

10

【0047】

ある態様において、抗体は、第1および第2のヒト C D 3 3 関連 S i g l e c の細胞外ドメイン上に存在する共通の決定基に結合する。本明細書中の何れかの実施形態のある態様において、抗体は、S i g l e c - 9 上に存在するが S i g l e c - 7 上に存在しない決定基に結合する。本明細書中の何れかの実施形態のある態様において、抗体は、S i g l e c - 7 上および S i g l e c - 9 上に存在する共通の決定基に結合する。任意選択により、抗体が結合する決定基は、1つ以上の他の S i g l e c、例えば S i g l e c - 3、- 5、- 6、- 8、- 10、- 11 および - 12 の1つ以上 (またはこれらの全て) 上に存在しない。

20

【0048】

本明細書中の実施形態の何れかにおいて、本抗体は、S i g l e c の細胞外ドメインに結合する。本明細書中の特定の実施形態において、特に抗体が S i g l e c とそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を阻止する場合、抗体は、少なくとも部分的に S i g l e c のシアル酸結合ドメイン内またはその近くに結合し得る。本明細書中の他の実施形態において、特に抗体が S i g l e c とそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を阻止しない場合、抗体は、S i g l e c のシアル酸結合ドメインの外側に結合し得る。

30

【0049】

本明細書中の実施形態の何れかにおいて、ヒトリンパ球 (例えば、初代 N K 細胞) 上の S i g l e c に結合すると、標的細胞がリンパ球と接触すると、モノクローナル抗体は、標的細胞表面上に S i g l e c のシアル酸リガンドを保有する標的ヒト細胞の溶解を再構成する能力を有する。

【0050】

本明細書中の実施形態の何れかにおいて、本抗体は、S i g l e c ポリペプチド (例えば、ヒト S i g l e c - 7 および / またはヒト S i g l e c - 9) のそれぞれへの結合に対して、 10^{-8} M 未満、好ましくは 10^{-9} M 未満の (例えば、一価結合について、本明細書中の実施例に開示される方法に従って判定される) K D を有する。大量に発現される低親和性シアル酸とのシス相互作用のために細胞表面で S i g l e c - 7 および - 9 結合部位が一般的に遮蔽されると考えられる限り、トランス相互作用は、シスと競合するリガンドよりも高い親和性を発現する抗体で起こり得る。ある実施形態において、中和抗 S i g l e c 抗体は、S i g l e c (例えば、S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9) へのシアロシドリガンドの結合に取って代わることが可能である。

40

【0051】

本発明は、ヒトもしくはヒト化抗体またはその抗体断片もしくは誘導体も提供し、これは、単独でまたは何らかの適切な組み合わせで先述の特性の何れかを有する。

50

【0052】

ある態様において、mAb A、- B、- C、- D、- E および / または - F が結合する S i g l e c - 9 上のエピトープへの結合について競合する（例えば、mAb A、- B、- C、- D、- E および / または - F の何れかの重鎖および軽鎖 C D R または可変領域を有する抗体との、S i g l e c - 9 ポリペプチド上のエピトープへの結合について競合する）モノクローナル抗体が提供される。

【0053】

ある態様において、mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5 および / または - 6 が結合する S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 上のエピトープへの結合について競合する（例えば、mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 の何れかの重鎖および軽鎖 C D R または可変領域を有する抗体との、S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 ポリペプチド上のエピトープへの結合について競合する）モノクローナル抗体が提供される。

10

【0054】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 N 8 2、P 8 3、A 8 4、R 8 5、A 8 6 および / または V 8 7 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 7 ポリペプチドへの減少した結合を有する。ある態様において、抗 S i g l e c - 7 抗体は、残基 N 8 1、D 1 0 0、H 1 0 2 および / または T 1 0 3 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 7 ポリペプチドへの減少した結合を有する。ある態様において、抗 S i g l e c - 7 抗体は、残基 W 8 8、E 8 9、E 9 0、R 9 2 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 7 ポリペプチドへの減少した結合を有する。突然変異のための残基位置は、配列番号 1 の S i g l e c - 7 ポリペプチドを参照する。任意選択により、抗体は、表 3 の 1 つ以上の他の突然変異 S i g l e c - 7 ポリペプチド、例えば 1 つ以上の（または全ての）突然変異体 M 6、M 8、M 1 5 または M 1 6 に対する結合を失わない。

20

【0055】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 N 7 8、P 7 9、A 8 0、R 8 1、A 8 2 および / または V 8 3 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。ある態様において、抗 S i g l e c - 9 抗体は、残基 N 7 7、D 9 6、H 9 8 および / または T 9 9 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。ある態様において、抗 S i g l e c - 9 抗体は、残基 W 8 4、E 8 5、E 8 6 および / または R 8 8 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。突然変異のための残基位置は、配列番号 2 の S i g l e c - 9 ポリペプチドを参照する。任意選択により、抗体は、表 3 の 1 つ以上の他の突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチド、例えば 1 つ以上の（または全ての）突然変異体 M 6、M 8、M 1 5 または M 1 6 に対する結合を失わない。

30

【0056】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 S 4 7、H 4 8、G 4 9、W 5 0、I 5 1、Y 5 2、P 5 3 および / または G 5 4 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。突然変異のための残基位置は、配列番号 2 の S i g l e c - 9 ポリペプチドを参照する。任意選択により、抗体は、表 3 の 1 つ以上の他の突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチド、例えば突然変異体 9、1 0 および / もしくは 1 1、または 1 つ以上の（もしくは全ての）突然変異体 M 7 もしくは M 8 に対する結合を失わない。

40

【0057】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 P 5 5、H 5 8、E 1 2 2、G 1 2 4、S 1 2 5 および / または K 1 2 7 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。突然変異のための残基位置は、配列番号 2 の S i g l e c - 9 ポリペプチドを参照する。任意選択により、抗体

50

は、表 3 の 1 つ以上の他の突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチド、例えば突然変異体 9、10 および / または 11 に対する結合を失わない。

【 0 0 5 8 】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 K 1 3 1 および / または H 1 3 2 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。突然変異のための残基位置は、配列番号 2 の S i g l e c - 9 ポリペプチドを参照する。任意選択により、抗体は、表 3 の 1 つ以上の他の突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチド、例えば突然変異体 9、10 および / もしくは 11、または 1 つ以上の（もしくは全ての）突然変異体 M 8 もしくは M 1 5 に対する結合を失わない。

【 0 0 5 9 】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 R 6 3、A 6 6、N 6 7、T 6 8、D 6 9、Q 7 0 および / または D 7 1 における突然変異（例えば、表 3 に示す突然変異）を有する S i g l e c - 9 ポリペプチドへの減少した結合を有する。突然変異のための残基位置は、配列番号 2 の S i g l e c - 9 ポリペプチドを参照する。任意選択により、抗体は、表 3 の 1 つ以上の他の突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチド、例えば突然変異体 9、10 および / もしくは 11、または 1 つ以上の（もしくは全ての）突然変異体 M 6、M 1 5 または M 1 6 に対する結合を失わない。

【 0 0 6 0 】

ある実施形態において、

(a) (i) 配列番号 3 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 4 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(b) (i) 配列番号 5 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 6 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(c) (i) 配列番号 7 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 8 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(d) (i) 配列番号 9 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 10 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(e) (i) 配列番号 11 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 12 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、および

(f) (i) 配列番号 13 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 14 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(g) (i) 配列番号 15 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 16 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(h) (i) 配列番号 17 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 18 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(i) (i) 配列番号 19 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 20 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(j) (i) 配列番号 21 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 22 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、

(k) (i) 配列番号 23 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i)

10

20

30

40

50

) 配列番号 24 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体、および

(l) (i) 配列番号 25 の重鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 26 の軽鎖可変領域の CDR 1、2 および 3 を含む軽鎖とを含むモノクローナル抗体

からなる群から選択される抗体の重鎖および軽鎖 CDR 1、2 および 3 を含むか、あるいはその抗体と同じエピトープに結合し、かつ/または S i g l e c - 7 および/もしくは S i g l e c - 9 ポリペプチドへの結合についてその抗体と競合する抗原結合化合物が提供される。

【0061】

本発明の実施形態の何れかのある態様において、S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する抗体は、抗体 m A b A、- B、- C、- D、- E、および - F からなる群から選択される抗体の重鎖の CDR を 1 つ、2 つまたは 3 つ有する重鎖；および抗体 m A b A、- B、- C、- D、- E および - F からなる群から選択されるそれぞれの抗体の軽鎖の CDR を 1 つ、2 つまたは 3 つ有する軽鎖を含み得る。

【0062】

ある態様において、アミノ酸配列 S Y W M H (配列番号 75) を含む重鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 E I N P S N G H T N Y N E K F E S (配列番号 78) を含む重鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 G V E S Y D F D D A L D Y (配列番号 80) を含む重鎖 C D R 3 ; アミノ酸配列 R A S Q D I N N Y L N (配列番号 83) を含む軽鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 Y T S R L H S (配列番号 57) を含む軽鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 Q Q G N T L P F T (配列番号 86) を含む軽鎖 C D R 3 ; およびヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列を含む、ヒト S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

【0063】

ある態様において、アミノ酸配列 S Y W M H (配列番号 75) を含む重鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 E I N P S N G H T N Y N E K F K T (配列番号 90) を含む重鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 G V E T Y D F D D A M D Y (配列番号 92) を含む重鎖 C D R 3 ; アミノ酸配列 R A S Q D I N N Y L N (配列番号 83) を含む軽鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 F T S R L H S (配列番号 95) を含む軽鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 Q Q G D T F P F T (配列番号 96) を含む軽鎖 C D R 3 ; およびヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列を含む、ヒト S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

【0064】

ある態様において、アミノ酸配列 N Y E M N (配列番号 98) を含む重鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 W I N T Y T G E S T Y A D D F K (配列番号 101) を含む重鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 D D Y G R S Y G F A Y (配列番号 103) を含む重鎖 C D R 3 ; アミノ酸配列 R A S E S V D S Y G N S F M H (配列番号 106) を含む軽鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 L A S K L E S (配列番号 109) を含む軽鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 H Q N N E D P P W T (配列番号 110) を含む軽鎖 C D R 3 ; およびヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列を含む、ヒト S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

【0065】

ある態様において、アミノ酸配列 D Y S M H (配列番号 112) を含む重鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 W I I T E T G E P T Y A D D F R G (配列番号 115) を含む重鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 D F D G Y (配列番号 117) を含む重鎖 C D R 3 ; アミノ酸配列 R A S E N I Y S Y L A (配列番号 119) を含む軽鎖 C D R 1 ; アミノ酸配列 N A K T L T E (配列番号 122) を含む軽鎖 C D R 2 ; アミノ酸配列 Q H H Y G F P W T (配列番号 123) を含む軽鎖 C D R 3 ; およびヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列を含む、ヒト S i g l e c - 9 ポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

10

20

30

40

50

【0066】

ある態様において、アミノ酸配列TFGMH（配列番号125）を含む重鎖CDR1；アミノ酸配列YISSGSNAIYYADTVKG（配列番号128）を含む重鎖CDR2；アミノ酸配列PGYGAWFAY（配列番号130）を含む重鎖CDR3；アミノ酸配列RASSSVSSAYLH（配列番号133）を含む軽鎖CDR1；アミノ酸配列STSNLAS（配列番号136を含む軽鎖CDR2；アミノ酸配列QQYSAYPYT（配列番号137）を含む軽鎖CDR3；およびヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列を含む、ヒトSiglec-9ポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

【0067】

ある態様において、アミノ酸配列DYSMH（配列番号112）を含む重鎖CDR1；アミノ酸配列VISTYNGNTNYNQKFKG（配列番号139）を含む重鎖CDR2；アミノ酸配列RGYYGSSSWFGY（配列番号141）を含む重鎖CDR3；アミノ酸配列KASQNVGTDVA（配列番号144）を含む軽鎖CDR1；アミノ酸配列SASYRYS（配列番号147を含む軽鎖CDR2；アミノ酸配列QQYNSFPYT（配列番号148を含む軽鎖CDR3およびヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列を含む、ヒトSiglec-9ポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

【0068】

本発明の実施形態の何れかのある態様において、Siglec-7およびSiglec-9ポリペプチドに結合する抗体は、抗体mAb1、-2、-3、-4、-5および-6からなる群から選択される抗体の個々の重および/または軽鎖の1、2または3つのCDRを有する重および/または軽鎖を有し得る。

【0069】

本発明の実施形態の何れかのある態様において、Siglecへの結合は、細胞性Siglecであるものとして特定され得、このSiglecは、細胞の表面で発現され、例えばナイティブまたは修飾型細胞性Siglec、組み換え宿主細胞によって発現されるSiglec、NK細胞、CD8T細胞などによって発現されるSiglecである。

【0070】

本発明は、先述の特性の何れかを有する、ヒトまたはヒト化抗体または抗体断片をコードする核酸、このような核酸を含むベクター、このようなベクターを含む細胞、抗Siglec抗体の発現に適切な条件下でこのような細胞を培養することを含むヒト抗Siglec抗体を産生させる方法も提供する。本発明は、このようなタンパク質、核酸、ベクターおよび/または細胞および一般的には活性成分または本組成物の処方、送達、安定性もしくは他の特徴を促進する不活性成分であり得る1つ以上のさらなる成分（例えば、様々な担体）を含む、組成物、例えば薬学的に許容可能な組成物およびキットにも関する。本発明は、Siglec介在性生物学的活性の調整などにおいて、例えばそれに関連する疾患、特に癌および感染性疾患の処置において、このような抗体、核酸、ベクター、細胞、生物および/または組成物を作製しかつ使用する、様々な新規のおよび有用な方法にさら

【0071】

別の態様において、Siglec-9の阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

- (a) Siglec-9ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 - (b) (任意選択により、初代ヒトNK細胞、例えばCD56^{dim}NK細胞における) Siglec-9ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体（例えば、ステップ(a)のもの）を選択するステップと、
 - (c) Siglec-9ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止しない抗体（例えば、ステップ(b)のもの）を選択するステップと
- を含む方法が提供される。ある実施形態において、Siglec-9ポリペプチドは、細

10

20

30

40

50

胞、例えばCHO細胞、リンパ球、NK細胞の表面で発現される。

【0072】

別の態様において、Siglec-9の阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

(a) Siglec-9ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 (b) (任意選択により、初代ヒトNK細胞、例えばCD56^{dim}NK細胞における) Siglec-9ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体(例えば、ステップ(a)のもの)を選択するステップと、
 (c) Siglec-9ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止する抗体(例えば、ステップ(b)のもの)を選択し、任意選択により、Neu5Ac2-3Galb1-4GlcNAcbおよびSiglec-9の6'-シアリルラクトースシアル酸リガンドの両方を阻止する抗体を選択するステップとを含む方法が提供される。

10

【0073】

別の態様において、Siglec-7の阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

(a) Siglec-7ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 (b) Siglec-7ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体(例えば、ステップ(a)のもの)を選択するステップと、
 (c) Siglec-7ポリペプチドとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を実質的に阻止しない抗体(例えば、ステップ(b)のもの)を選択するステップとを含む方法が提供される。ある実施形態において、Siglec-7ポリペプチドは、細胞、例えばCHO細胞、リンパ球、NK細胞の表面で発現される。

20

【0074】

当然のことながら、上記方法の何れかにおけるステップ(b)および(c)は、あらゆる所望の順序で行われ得る。

【0075】

別の態様において、Siglec-9およびSiglec-7の阻害活性を中和する抗体を作製する方法であって、

(a) Siglec-9およびSiglec-7ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供するステップと、
 (b) (任意選択により、初代ヒトNK細胞、例えばCD56^{bright}およびCD56^{dim}NK細胞における) Siglec-9ポリペプチドおよびSiglec-7ポリペプチドの阻害活性を中和する抗体(例えば、ステップ(a)のもの)を選択するステップとを含む方法が提供される。

30

【0076】

ある実施形態において、Siglecの阻害活性を中和する抗体を選択することは、初代NK細胞を増強する抗体を選択すること(例えば、ヒトドナーから得られた精製NK細胞として、例えば実施例10の方法に従って)を含み得る。

40

【0077】

ある実施形態において、抗体が2種類の異なるSiglec遺伝子産物のうちの任意のもの阻害活性を中和するか否かを決定することは、その抗体が、Siglecを発現するリンパ球が(例えば、Siglecのリガンドを発現する)標的細胞と接触されると、細胞傷害性のマーカーの上昇(例えば、CD107および/またはCD137の発現の上昇)を引き起こすか否かを評価することを含む。細胞傷害性のマーカー上昇(例えば、CD107および/またはCD137の発現の上昇)は、その抗体がSiglec遺伝子産物の阻害活性を中和可能であることを示す。

【0078】

本発明は、Siglec-7および/またはSiglec-9発現リンパ球、任意選択

50

により、NK細胞および/またはCD8+T細胞の活性を調整するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、表面にSiglec-7および/またはSiglec-9を発現するリンパ球（例えば、初代NK細胞）を、Siglec-7およびSiglec-9の阻害活性を中和する抗体と接触させることを含む。

【0079】

本発明は、リンパ球の活性（例えば、NK細胞、CD8+T細胞）活性の増強および/または調整を、それを必要とする対象において行う方法、例えばCD56^{dim}NK細胞（主要な細胞傷害性サブセット）と、任意選択により、さらなるCD56^{bright}NK細胞（リンパ節および扁桃腺のNK細胞の大部分、活性化時に主にサイトカイン産生に反応する）とを調整することによってNK細胞活性を増強する方法も提供し、この方法は、有効量の先述の組成物の何れかを対象に投与することを含む。ある実施形態において、対象は、癌に罹患している患者である。例えば、患者は、造血系の癌、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫または非ホジキンリンパ腫の罹患患者であり得る。代替的に、患者は、固形腫瘍、例えば結直腸癌、腎臓癌、卵巣癌、肺癌、乳癌または悪性メラノーマの罹患患者であり得る。別の実施形態において、対象は、感染性疾患に罹患している患者である。

10

【0080】

これらの態様をより詳細に記載し、本明細書中で提供される本発明の説明から、さらなる態様、特性および長所が明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0081】

【図1】NK細胞への抗Siglec抗体の結合を示す。Siglec MFI：蛍光強度の平均。NK細胞のかなりの割合（約44%）がSiglec-7およびSiglec-9の両方を発現し、このことから、例えば腫瘍細胞上に存在するグリカンリガンドの機能として、これらの受容体のそれぞれ（またはその両方）によってNK細胞の大部分が阻害されることが示唆される。

【図2】Siglec-7に結合するがSiglec-9またはカニクイザルSiglecに結合しない抗体（右パネル）、Siglec-7、Siglec-9およびカニクイザルSiglecのそれぞれに結合する抗体（中間パネル）、Siglec-9に結合するがSiglec-7またはカニクイザルSiglecに結合しない抗体（左パネル）の例について、フローサイトメトリーによる代表的な結果を示す。

30

【図3】抗体mAbA、mAbCおよびmAbDの、moDC（左側パネル）およびノイラミダーゼ処理moDC（右側パネル）への結合のフローサイトメトリーによる滴定を、それぞれのEC₅₀値を伴って示す。EC₅₀は、ノイラミダーゼ処理後に高度に増強され（10倍）、これは、moDC上に発現したSiglec-9がノイラミダーゼ処理前のシアル酸リガンドとのシス相互作用に参与していることを示唆する。しかし、プラトー相レベルは改変されておらず、抗体は、細胞表面上の全てのSiglec-9（結合および非結合）立体構造に結合することができ、monoDCならびに他の細胞型（例えば、単球ならびにマクロファージM1およびM2）におけるシス相互作用およびシグナル伝達を阻害することを示唆する。

40

【図4】Siglec-7および-9交差反応性抗体（図4B）およびSiglec-9単一特異性（非Siglec-7結合）抗体（図4A）中でのYTS Siglec-9*細胞傷害性の増加の用量依存的誘導を示す。

【図5】初代NK細胞（ドナーから精製された新鮮なNK細胞として）およびHT29結腸直腸癌細胞を用いた古典的な⁵¹Cr放出アッセイにおける、2人の異なるヒトドナー（ドナーD1（左側パネル）およびD2（右側パネル））における抗体mAbA、mAbC、mAbD、mAbE、およびmAbFによって媒介される初代NK細胞の細胞傷害性の増加を示す。

【図6】HT29腫瘍細胞の存在下において、1人のヒトドナーにおけるいくつかの抗Siglec-9および抗Siglec-7/9抗体mAbA、mAbB、mAbF、mAb

50

b 6 および m A b 4 によって媒介される C D 1 3 7 を発現する S i g l e c - 9 陽性 N K 細胞の % の増加を示す。抗 S i g l e c - 9 抗体は、S i g l e c - 9 発現初代ヒト N K 細胞の細胞傷害性を、同一ドナー由来の S i g l e c - 9 陰性初代ヒト N K 細胞で観察されたレベルまで完全に回復させた。

【図 7】抗体 m A b A および m A b 1 が S i g l e c - 9 陽性 C D 1 3 7 + N K 細胞 (%) (中央パネル) の増加を誘導するが、S i g l e c - 9 陰性 C D 1 3 7 + N K 細胞 (%) (右側パネル) を誘導しないことを示す。抗体の非存在下での N K 発現 C D 1 3 7 の % を左側のパネルに示す。

【図 8】S i g l e c - 9 - F c タンパク質のラモス細胞への抗体存在下での結合を示す (上のパネル) 。抗 S i g l e c / 9 m A b m A b A 、 m A b B 、 m A b C および m A b D は、それぞれ S i g l e c - 9 - F c タンパク質の R a m o s 細胞への結合を阻害し、m A b E は部分的阻害を示し、m A b F は結合を阻害しなかった。抗体の存在下での S i g l e c - 9 - F c タンパク質の K 5 6 2 細胞への結合を下のパネルに示す。抗 S i g l e c / 9 m A b m A b A 、 m A b B 、 m A b C および m A b D は、それぞれ S i g l e c - 9 - F c タンパク質の R a m o s 細胞への結合を阻害し、m A b E および m A b F の両方が部分的阻害を示した。

【図 9】E L I S A アッセイを用いた、抗 S i g l e c - 7 / 9 抗体による S i g l e c - 7 および - 9 とシアル酸付加リガンドとの間の相互作用の阻止の試験を示す。m A b 1 、 2 、 4 、 5 および 6 が S i a 2 との S i g l e c - 7 相互作用を阻止したが、m A b 3 が阻止しなかったことを示す。

【図 10】E L I S A アッセイを用いた、抗 S i g l e c - 7 / 9 抗体による S i g l e c - 7 および - 9 とシアル酸付加リガンドとの間の相互作用の阻止の試験を示す。全ての m A b が S i a 2 との S i g l e c - 9 相互作用を阻止するが、m A b 1 、 m A b 2 および m A b 3 は、S i a 1 との S i g l e c - 9 相互作用を阻害する能力が低く、したがって S i a 1 相互作用を実質的に阻止しなかったことを示す。

【図 11】ヒト S i g l e c - 9 タンパク質を示す。S i g l e c - 9 N 末端 V - セット I g 様ドメインの構造を示し、S i g l e c - 9 突然変異体 M 9 、 M 1 0 および M 1 1 において置換された残基は陰影で示される。シアル酸リガンド結合部位は、薄い陰影で示されている。

【図 12】ヒト S i g l e c - 9 タンパク質を示す。S i g l e c - 9 N 末端 V - セット I g 様ドメインの構造を示し、S i g l e c - 9 突然変異体 M 6 および M 7 において置換された残基は陰影で示される。シアル酸リガンド結合部位は、薄い陰影で示されている。

【図 13】ヒト S i g l e c - 9 タンパク質を示す。S i g l e c - 9 N 末端 V - セット I g 様ドメインの構造を示し、S i g l e c - 9 突然変異体 M 1 6 において置換された残基は陰影で示される。シアル酸リガンド結合部位は、薄い陰影で示されている。

【図 14】ヒト S i g l e c - 9 タンパク質を示す。S i g l e c - 9 N 末端 V - セット I g 様ドメインの構造を示し、S i g l e c - 9 突然変異体 M 8 において置換された残基は陰影で示される。シアル酸リガンド結合部位は、薄い陰影で示されている。

【発明を実施するための形態】

【0082】

定義

本明細書で使用される場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」は1つ以上を意味し得る。請求項で使用される場合、「含む」という語と組み合わせて使用されるとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」という語は、1つまたは2つ以上を意味し得る。本明細書中で使用される場合、「別の」は、少なくとも第2またはそれを超えるものを意味し得る。

【0083】

「含む」が使用される場合、これは、任意選択により、「から基本的になる」または「からなる」により置き換えられ得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

ヒト S i g l e c - 7 (G e n b a n k 受入番号 N P _ 0 5 5 2 0 0 . 1 で示され、この開示全体が参照により本明細書中に組み込まれる)は、C D 3 3 関連 S i g l e c ファミリーのメンバーである (A n g a t a a n d V a r k i , G l y c o b i o l o g y 1 0 (4) , 4 3 1 - 4 3 8 (2 0 0 0)) 。 ヒト S i g l e c - 7 は、次のアミノ酸配列を有する 4 6 7 個のアミノ酸を含む。

【 化 1 】

mllllllplll wcrervegqk snrkdysltm qssvtvqeqm cvhvrcsfy pvdsqtdsdp
vngywfraqn diswkapvat nnpawavqee trdrfhllgd pqtknctlsi rdarmsdagr
yffrnekgnl kwnykydqls vnvlatlthrp nilipgtles gcfqnlctsv pwaceqgtp
miswngtsvs plhpsttrss vltlipqpqh hgtsltcqv lpgagvttnr tiqlnvsypp
qnlvtvtfqg egtastalgn ssslsvlegq slrlvcavds npparlswtw rsltlypsqp
snplvlelqv hlgdegeftc raqnsllsqh vslnslsqe ytgkarpvsg vllgavggag
atalvflsfc vifivvrscr kksarpaadv gdigmkdant irgsasqgnl teswaddnpr
hnglaahssg eereicyapl sfhkgepqdl sgqeatney seikipk (配列番号1)

10

【 0 0 8 5 】

ヒト S i g l e c - 9 (G e n b a n k 受入番号 N P 0 5 5 2 5 6 . 1 で示され、この開示全体が参照により本明細書中に組み込まれる)は、C D 3 3 関連 S i g l e c ファミリーのメンバーである (A n g a t a a n d V a r k i , J . B i o l . C h e m . 2 7 5 (2 9) , 2 2 1 2 7 - 2 2 1 3 5 (2 0 0 0)) 。 ヒト S i g l e c - 9 は、次のアミノ酸配列を有する 4 6 3 個のアミノ酸を含む。

20

【 化 2 】

mllllllplllw greraegqts klitmqssvt vqeglcvhvp csfsypshgw iypgpvvhgy
wfregantdq dapvatnnpa ravweetrdr fhllgdphkt notlsirdar rsdagryffr
mekgsikwny khhrslsvnt althrpnilil pgtlesgcpq nltcswpwac eqgtppmisw
igtvspldp sttrssvltl ipqqdqhgts ltcqvtfpga svttnkthvl nvsyppqnl
ntvfgqgdgtv stvlngssl slpegqslrl vcavdavdsn pparlslswr gtlcpcsqps
npgvlelpwv hlrdaaeftc raqnpqlsqg vylnvlqsk atsgvtqgvv ggagatalvf
lsfcvifvfv rscrkksarp aagvgdtgie danavrgsas qgpltepwa dsppdqpppa
sarssvgege lqyaslsfqm vkpwsrgqe atdteyseik ihr (配列番号2)

30

【 0 0 8 6 】

本発明に関連して、「NK細胞の細胞傷害性の S i g l e c 介在性阻害を中和する」、「T細胞の細胞傷害性の S i g l e c 介在性阻害を中和する」または「 S i g l e c の阻害活性を中和する」は、 S i g l e c (例えば、 S i g l e c - 7、 S i g l e c - 9) が、サイトカイン放出および細胞傷害性反応などのリンパ球反応につながる細胞内過程に負の影響を与えるその能力において阻害される過程を指す。これは、例えば標準的なNKまたはT細胞に基づく細胞傷害性アッセイにおいて測定され得、この場合、 S i g l e c 陽性リンパ球によるシアル酸リガンド陽性細胞の死滅を刺激する治療用化合物の能力を測定する。ある実施形態において、抗体標品により、 S i g l e c 限定リンパ球の細胞傷害性の少なくとも 1 0 % の増強、任意選択により、リンパ球細胞傷害性の少なくとも 4 0 % もしくは 5 0 % の増強、または任意選択により、NK細胞傷害性の少なくとも 7 0 % の増強が引き起こされ、これは記載される細胞傷害性アッセイに関するものである。ある実施形態において、抗体標品により、 S i g l e c 限定リンパ球によるサイトカイン放出の少なくとも 1 0 % の増強、任意選択により、サイトカイン放出の少なくとも 4 0 % もしくは 5 0 % の増強、または任意選択により、サイトカイン放出の少なくとも 7 0 % の増強が引き起こされ、これは記載される細胞傷害性アッセイに関するものである。ある実施形態において、抗体標品により、 S i g l e c 限定リンパ球による細胞傷害性のマーカー(例えば、 C D 1 0 7 および / または C D 1 3 7) の細胞表面発現の少なくとも 1 0 % の増強、任意選択により、少なくとも 4 0 % もしくは 5 0 % の増強、または任意選択により、細胞傷害性のマーカー(例えば、 C D 1 0 7 および / または C D 1 3 7) の細胞表面発現の少

40

50

なくとも70%の増強が引き起こされる。

【0087】

シアル酸リガンドへのS i g l e c分子の結合を阻止する抗S i g l e c抗体の能力は、可溶性または細胞表面連結S i g l e cおよびシアル酸分子を用いたアッセイにおいて、本抗体が、シアル酸分子に対するS i g l e c分子の結合を用量依存的に検出可能に減少させ得、このS i g l e c分子が本抗体の非存在下でシアル酸分子に検出可能に結合することを意味する。

【0088】

本明細書全体において、「癌の処置」などが抗S i g l e c結合物質（例えば、抗体）に関して言及される場合には常に、（a）癌の処置の方法であって、このような治療を必要とする個体、哺乳動物、特にヒトに、癌の処置を可能にする用量で（治療的有効量）、好ましくは本明細書中で指定されるような用量（量）で（好ましくは薬学的に許容可能な担体物質中で）抗S i g l e c結合物質を投与する（少なくとも1回の処置）ステップを含む方法；（b）（特にヒトにおける）癌の処置のための抗S i g l e c結合物質の使用またはその処置における使用のための抗S i g l e c結合物質；（c）癌の処置用の医薬品の製造のための抗S i g l e c結合物質の使用、抗S i g l e c結合物質を薬学的に許容可能な担体と混合することを含む、癌の処置用の医薬品または有効用量の癌の処置に適切な抗S i g l e c結合物質を含む医薬品の製造のために抗S i g l e c結合物質を使用する方法；または（d）本願が提出される国で特許を得ることを可能とする主題に従う、a）、b）およびc）の何れかの組み合わせを意味する。

10

20

【0089】

本明細書中で使用される場合、「抗原結合ドメイン」という用語は、エピトープに免疫特異的に結合可能な三次元構造を含むドメインを指す。したがって、ある実施形態において、このドメインは、超可変領域、任意選択により、抗体鎖のV Hおよび/またはV Lドメイン、任意選択により、少なくともV Hドメインを含み得る。別の実施形態において、結合ドメインは、抗体鎖の少なくとも1つの相補性決定領域（C D R）を含み得る。別の実施形態において、結合ドメインは、非免疫グロブリン骨格からのポリペプチドドメインを含み得る。

【0090】

「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される場合、全抗体およびその任意の抗原結合断片またはその単鎖を含む。典型的な抗体は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（V_H）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C H 1、C H 2およびC H 3で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（V_L）および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C Lで構成される。代表的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、各対は1本の「軽」鎖（約25 k D a）および1本の「重」鎖（約50～70 k D a）を有する。各鎖のN末端は、抗原認識に主に関与する約100～110またはそれを超えるアミノ酸の可変領域を定める。可変軽鎖（V_L）および可変重鎖（V_H）という用語は、これらの軽鎖および重鎖をそれぞれ指す。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、「アルファ」、「デルタ」、「イプシロン」、「ガンマ」および「ミュー」とそれぞれ呼ばれる。これらの一部は、サブクラスまたはアイソタイプ、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4などにさらに分類される。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三元立体配置は周知である。I g Gは、生理学的状況において最も共通する抗体であるため、および実験室で最も容易に作製されるため、本明細書中で使用される抗体の代表的なクラスである。任意選択により、本抗体はモノクローナル抗体である。抗体の特定の例は、ヒト化、キメラ、ヒトまたはそうでなければヒトに適切な抗体である。「抗体」は、本明細書中に記載の抗体の何れかの何らかの断片または誘導体も含む。

30

40

【0091】

50

「交差反応性」抗 S i g l e c 抗体は、特異性および/または親和性で、複数の S i g l e c 分子に結合する抗体である。例えば、モノクローナル抗体は、S i g l e c - 7 および S i g l e c - 9 と交差反応性であり得る。

【0092】

「特異的に結合する」という語は、単離標的細胞の表面上に存在するタンパク質、その中のエピトープまたはネイティブタンパク質の何れかの組み換え形態を用いて評価した場合、抗体が好ましくは競合的結合アッセイにおいて結合パートナー、例えば S i g l e c - 7、S i g l e c - 9 に結合し得ることを意味する。競合的結合アッセイおよび特異的な結合を決定するための他の方法を以下でさらに記載し、これらは当技術分野で周知である。

【0093】

抗体が特定のモノクローナル抗体と「競合する」と言われる場合、これは、本抗体が、組み換え S i g l e c 分子または表面発現 S i g l e c 分子の何れかを用いた結合アッセイにおいて、モノクローナル抗体と競合することを意味する。例えば、試験抗体が結合アッセイにおいて参照抗体の S i g l e c ポリペプチドまたは S i g l e c 発現細胞への結合を減少させる場合、本抗体は、参照抗体とそれぞれ「競合する」と言われる。

【0094】

「親和性」という用語は、本明細書中で使用される場合、エピトープへの抗体の結合の強度を意味する。抗体の親和性は、 $[Ab] \times [Ag] / [Ab - Ag]$ (式中、 $[Ab - Ag]$ は、抗体-抗原複合体のモル濃度であり、 $[Ab]$ は未結合抗体のモル濃度であり、 $[Ag]$ は未結合抗原のモル濃度である) として定められる解離定数 K_d により与えられる。親和性定数 K_a は、 $1 / K_d$ により定義される。mAb の親和性を決定するための方法は、Harlow, et al., *Antibody: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993) および Muller, Meth. Enzymol. 92: 589 - 601 (1983) で見出すことができ、この参考文献は、全体的に参照により本明細書中に組み込まれる。mAb の親和性を決定するための当技術分野で周知のある標準的な方法は、表面プラズモン共鳴 (SPR) スクリーニング (BIAcore (商標) SPR 分析装置による分析など) の使用である。

【0095】

本明細書に関連して、「決定基」はポリペプチド上の相互作用または結合の部位を指す。

【0096】

「エピトープ」という用語は、抗原性決定基を指し、抗体が結合する抗原上のエリアまたは領域である。タンパク質エピトープは、直接結合に関与するアミノ酸残基ならびに特異的な抗原結合抗体またはペプチドにより効果的に阻止されるアミノ酸残基、すなわち抗体の「フットプリント」内のアミノ酸残基を含み得る。これは、例えば抗体または受容体と組み合わせ得る複合抗原分子上の最も単純な形態または最小構造領域である。エピトープは、直鎖状または立体構造/構造であり得る。「直鎖状エピトープ」という用語は、アミノ酸の直鎖状配列 (一次構造) 上で隣接するアミノ酸残基から構成されるエピトープとして定義される。「立体構造または構造エピトープ」という用語は、全てが隣接しておらず、したがって分子の折り畳みにより互いに対して近接するようになるアミノ酸の直鎖状配列の分離部分を表す (二次、三次および/または四次構造) アミノ酸残基から構成されるエピトープとして定義される。立体構造エピトープは三次元構造に依存する。したがって、「立体構造」という用語は、「構造」と交換可能に使用されることが多い。

【0097】

「枯渇させる」または「枯渇させること」という用語は、S i g l e c 発現細胞 (例え

10

20

30

40

50

ば、S i g - l e c - 7またはS i g l e c - 9発現リンパ球)に関して、結果として、試料または対象中に存在するこのようなS i g l e c発現細胞の数に負の影響を与えるように、死滅させる、排除する、溶解する、またはこのような死滅、排除もしくは溶解の誘導を引き起こす過程、方法または化合物を意味する。過程、方法または化合物に関して、「非枯渇」という用語は、この過程、方法または化合物が枯渇させていないことを意味する。

【0098】

「薬剤」という用語は、本明細書中で、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生体高分子または生体物質から作製される抽出物を指すために使用される。「治療剤」という用語は、生物学的活性を有する薬剤を指す。

10

【0099】

本明細書中での目的のために、「ヒト化」または「ヒト」抗体は、1つ以上のヒト免疫グロブリンの定常および可変フレームワーク領域が動物免疫グロブリンの結合領域、例えばCDRと融合される抗体を指す。このような抗体は、結合領域が由来する非ヒト抗体の結合特異性を維持するが、非ヒト抗体に対する免疫反応を回避するために設計される。このような抗体は、抗原負荷に反応して特異的なヒト抗体を作製させるために「操作」されている、トランスジェニックマウスまたは他の動物から入手し得る(例えば、全体的な教示が参照により本明細書中に組み込まれる、Green et al. (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994) Int Immun 6:579を参照されたい)。全て当技術分野で公知である、遺伝学的または染色体導入法ならびにファージディスプレイ技術によって完全ヒト抗体も構築し得る(例えば、McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553を参照されたい)。ヒト抗体は、インビトロ活性化B細胞によっても作製し得る(例えば、参照によりそれらの全体において組み込まれる米国特許第5,567,610号明細書および同第5,229,275号明細書を参照されたい)。

20

【0100】

「キメラ抗体」は、(a)抗原結合部位(可変領域)が、異なるかまたは改変されているクラス、エフェクター機能および/または種の定常領域、またはキメラ抗体に新しい特性を付与する完全に異なる分子、例えば酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などに連結されるように、定常領域またはそれらの一部が改変され、置き換えられ、または交換されているか、または(b)可変領域またはそれらの一部が、改変され、置き換えられ、または異なるかもしくは改変されている抗原特異性を有する可変領域と交換されている、抗体分子である。

30

【0101】

「超可変領域」という用語は、本明細書中で使用される場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」または「CDR」(例えば、軽鎖可変ドメイン中の、残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)および重鎖可変ドメイン中の、31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3); Kabat et al. 1991)および/または「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメイン中の、残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)および重鎖可変ドメイン中の、26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917)または抗原結合に関与する必須アミノ酸を決定するための同様の系からのアミノ酸残基を含む。一般的には、この領域中のアミノ酸残基の付番は、Kabat et al.、前出に記載の方法により行われる。「Kabat位置」、「Kabatにおけるような可変ドメイン残基付番」および「Kabatによる」などの句は、本明細書中で、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに対するこの付番系を指す。Kabat付番系を用いて、ペプチドの実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮またはそれへの挿入に

40

50

対応する少数のまたはさらなるアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、CDRH2の残基52の後に1つのアミノ酸挿入(Kabatによる残基52a)および重鎖FR残基82の後に残基の挿入(例えば、Kabatによる残基82a、82bおよび82cなど)を含み得る。残基のKabat付番は、「標準的な」Kabat付番配列での抗体の配列の相動性の領域でのアライメントにより、特定の抗体に対して決定される。

【0102】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書中で使用される場合、CDRとして定められる領域を除く、抗体可変ドメインの領域を意味する。各抗体可変ドメインフレームワークは、CDRによって分離される近接領域(FR1、FR2、FR3およびFR4)にさらに分けられ得る。

10

【0103】

「Fcドメイン」、「Fc部分」および「Fc領域」という用語は、例えば、ヒト(ガンマ)重鎖の約アミノ酸(aa)230~約aa450からの、抗体重鎖のC末端断片、または他のタイプの抗体重鎖(例えば、ヒト抗体の場合、 γ 、 δ 、 ϵ および μ)におけるその対応配列またはその天然のアロタイプを指す。別段の指定がない限り、免疫グロブリンに対する一般的に受容されるKabatアミノ酸付番は、この開示を通じて使用される(Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MDを参照されたい)。

20

【0104】

「単離」、「精製」または「生物学的に純粋」という用語は、実質的にまたは基本的に、そのネイティブ状態で見られるような通常それに付随する成分を含まない物質を指す。純度および均一性は、一般的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析学的化学技術を用いて決定される。標品中に存在する主要な種であるタンパク質は実質的に精製されている。

【0105】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書中で交換可能に使用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の人工的な化学模倣物であるアミノ酸ポリマーならびに天然のアミノポリマーおよび非天然のアミノポリマーに適用される。

30

【0106】

「組み換え」という用語は、例えば細胞または核酸、タンパク質またはベクターに関して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入またはネイティブ核酸もしくはタンパク質の改変により修飾されているか、または細胞が、そのように修飾された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組み換え細胞は、細胞のネイティブ(非組み換え)形態内では見出されない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ異常に発現されるか、発現が少ないかまたは全く発現されないネイティブ遺伝子を発現する。

40

【0107】

本明細書に関連して、ポリペプチドまたはエピトープに「結合」する抗体という用語は、特異性および/または親和性をもって前記決定基に結合する抗体を指す。

【0108】

「同一性」または「同一である」という用語は、2つ以上のポリペプチドの配列間の関係において使用される場合、2つ以上の一連のアミノ酸残基間の一致数により決定される場合の、ポリペプチド間の配列関連性の度合いを指す。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータープログラム(すなわち「アルゴリズム」)により扱われるギャップアライメント(もしあれば)を用いた2つ以上の配列のより小さいものの間の完全な一

50

致のパーセントを評価する。関連ポリペプチドの同一性は、公知の方法により容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; および Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) に記載のものが挙げられるが限定されない。

10

【0109】

同一性を決定するための方法は、試験される配列間の一致が最大となるように設計される。同一性を決定する方法は、公開されているコンピュータプログラムに記載されている。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム法としては、GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP、BLASTN and FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) を含む、GCGプログラムパッケージが挙げられる。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他のソース (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., 前出) から公開されている。周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性を決定するために使用し得る。

20

30

【0110】

抗体の産生

疾患 (例えば、癌、感染性疾患) の治療に有用な抗 Siglec 剤は、ヒト Siglec-9 タンパク質の細胞外部分に結合し (および任意選択により、さらなる Siglec-12 結合を伴うまたは伴わないヒト Siglec-7 タンパク質にさらに結合する)、Siglec 陽性免疫細胞の表面上に発現されたヒト Siglec の阻害活性を低下させる。ある実施形態において、本剤は、好中球、樹状細胞、マクロファージ、M2 マクロファージ、NK細胞および/または CD8+ T細胞において、シアル酸分子が Siglec による阻害シグナル伝達を引き起こす能力を阻害する。

40

【0111】

ある実施形態において、本明細書中に記載される抗 Siglec 剤は、Siglec のリガンドを有する標的細胞 (例えば、癌細胞) への、ヒトまたはヒトドナーにおける NK細胞および/または好中球の細胞傷害性を増加させるために使用され得る。NK細胞および好中球は、微生物および癌細胞を認識し、直接死滅させる特殊化された顆粒球である。腫瘍細胞の表面で発現するシアル酸は、腫瘍細胞に対するNK細胞の細胞傷害性を低下させることが示されている。抗体は、例えば細胞傷害性のレベルを、特定の Siglec をその表面に発現しないNK細胞または好中球において観察されるレベルに実質的に回復させるため、NK細胞の細胞傷害性を増強するために使用され得る。

【0112】

シアル酸はまた、樹状細胞上で高度に発現され、TLR刺激に対する応答性を含むいく

50

つかのDC機能を調整すると記載されてきた。シアル酸合成の阻止は、TLR刺激のためのmODCの活性化閾値を低下させ、およびSiglec-E欠失増強樹状細胞は、いくつかの微生物TLRリガンドに対し応答する。Siglec-9はマウスにおけるSiglec-Eの最も近いヒトのオルソログスなメンバーであり、ブロッキング抗Siglec-9抗体は樹状細胞の活性化を促進し、DC-T相互作用を調整することができる。シアル酸による抗原の改変は、抗原特異的調節性T(Treg)細胞の生成を調節し、樹状細胞によるエフェクターCD4+およびCD8+T細胞の形成を防止する。樹状細胞の貪食能力は、a2,6-シアル酸欠乏症によっても改善することができる。

【0113】

Siglec-7および-9の両方は、タイプM1およびM2マクロファージ上に発現され、Siglec-9のノックダウンはSiglec-9によるマクロファージ機能の調節を示唆する様々な表面発現マーカー(例えば、CCR7およびCD200R)を調整すると記載されてきた。実際、様々なSiglec-9突然変異体(ITIMドメインにおける突然変異)をマクロファージ細胞株に遺伝子移入し、Siglec-9が抗炎症性サイトカインIL-10の産生を増強することを実証した。Siglec-9の可溶性リガンドとの結合はまた、マクロファージが腫瘍関連マクロファージ様表現型を示すように誘導することができ、チェックポイントリガンドPD-L1の発現の増加を伴う。

10

【0114】

ある実施形態において、本剤は、Siglecへの結合においてシアル酸分子と競合し、すなわち、本剤は、Siglecとそのシアル酸リガンドとの間の相互作用を阻止する。

20

【0115】

本発明のある態様において、本剤は、全長抗体、抗体断片および合成または半合成抗体由来分子から選択される抗体である。

【0116】

本発明のある態様において、本剤は、完全ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体から選択される抗体である。

【0117】

本発明のある態様において、本剤は、IgA、IgD、IgG、IgEおよびIgM抗体から選択される抗体の断片である。

30

【0118】

本発明のある態様において、本剤は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から選択される定常ドメインを含む抗体の断片である。

【0119】

本発明のある態様において、本剤は、Fab断片、Fab'断片、Fab'-SH断片、F(ab)2断片、F(ab')2断片、Fv断片、重鎖Ig(ラムまたはラクダIg)、V_HH断片、シングルドメインFvおよび1本鎖抗体断片から選択される抗体断片である。

【0120】

本発明のある態様において、本剤は、scFv、dsFv、ミニボディー、ダイアボディ、トリアボディー、カップボディー、IgNARから選択される合成または半合成抗体由来分子および多特異性抗体である。

40

【0121】

したがって、本発明は、Siglecに結合する抗体および抗原結合ドメイン(および前述のものを含むポリペプチド)に関する。ある態様において、本抗体または抗原結合ドメインは、さらなるヒトSiglec、例えばSiglec-3、-5、-6、-8、-10、-11および/または-12よりも少なくとも100倍低い結合親和性(例えば、KD)でSiglec-7および/または-9に結合する。ある態様において、抗体または抗原結合ドメインは、Siglec-9に結合するが、Siglec-7に結合せず、ある実施形態において、抗体は、ヒトSiglec-9ポリペプチドに対し、ヒトSig

50

IgE - 7ポリペプチドに対するよりも少なくとも100倍低い結合親和性(例えば、KD)で結合する。別の態様において、抗体は、互いに1-logを超えて異なる結合親和性(例えば、KD)を有するヒトSiglec-9ポリペプチドおよびヒトSiglec-7ポリペプチドの両方に結合し、前記Siglec-7およびSiglec-9の結合親和性は、さらなるヒトSiglec、例えばSiglec-3、-5、-6、-8、-10、-11および/または-12に対するよりも少なくとも100倍低い。親和性は、例えば、表面プラズモン共鳴により、組み換えSiglecポリペプチドへの結合について決定することができる。

【0122】

本発明のある態様において、本抗体は、精製されたまたは少なくとも部分的に精製された形態である。本発明のある態様において、本抗体は、基本的に単離形態である。

10

【0123】

本抗体は、当技術分野で公知の様々な技術により作製し得る。一般的には、これらは、Siglecポリペプチド、好ましくはヒトSiglecポリペプチドを含む免疫原での非ヒト動物、好ましくはマウスの免疫付与によって作製される。Siglecポリペプチドは、ヒトSiglec-9および/またはSiglec-7ポリペプチドの全長配列またはその断片もしくは誘導体、一般的には免疫原性断片、すなわち、Siglecポリペプチドを発現する細胞の表面に露出したエピトープを含むポリペプチドの部分を含み得る。このような断片は、一般的には、成熟ポリペプチド配列の少なくとも約7連続アミノ酸、さらにより好ましくはその少なくとも約10連続アミノ酸を含有する。断片は、一般的には、基本的に受容体の細胞外ドメイン由来である。ある実施形態において、免疫原は、脂質膜中、一般的には細胞の表面の、野生型ヒトSiglecポリペプチドを含む。具体的な実施形態において、免疫原は、任意選択により処理されるかまたは溶解されるインタクトな細胞、特にインタクトなヒト細胞を含む。他の実施形態において、本ポリペプチドは組み換えSiglecポリペプチドである。

20

【0124】

非ヒト哺乳動物に抗原で免疫付与するステップは、マウスにおいて抗体の産生を刺激するための当技術分野で周知の何らかの方式で行われ得る(例えば、その開示全体が参照により本明細書中に組み込まれる、E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)を参照されたい)。任意選択により、完全または不完全フロイドアジュバントなどのアジュバントと共に免疫原を緩衝液中で懸濁するかまたは溶解させる。免疫原の量、緩衝液のタイプおよびアジュバントの量を決定するための方法は、当業者にとって周知であり、何ら限定していない。これらのパラメーターは、異なる免疫原に対して異なり得るが、容易に明らかとなり得る。

30

【0125】

同様に、抗体の産生を刺激するのに十分な免疫付与の位置および頻度も当技術分野で周知である。典型的な免疫付与プロトコールにおいて、第1日に非ヒト動物に抗原を腹腔内注射し、約1週間後に再び注射する。この後、第20日前後に、任意選択により、不完全フロイドアジュバントなどのアジュバントと共に抗原のリコール注射を行う。リコール注射は、静脈内で行い、数日連続して反復し得る。この後、第40日に、静脈内または腹腔内の何れかで、一般的にはアジュバントなしで、ブースター注射を行う。このプロトコールの結果、約40日後、抗原特異的な抗体産生B細胞が生成する。結果として免疫付与で使用した抗原に対する抗体を発現するB細胞の生成が起こる限り、他のプロトコールも使用し得る。

40

【0126】

代替的な実施形態において、非免疫付与非ヒト哺乳動物からのリンパ球を単離し、インビトロで増殖させ、次いで細胞培養中で免疫原に曝露する。次いで、リンパ球を回収し、下記の融合ステップを行う。

50

【0127】

モノクローナル抗体の場合、次のステップは、免疫付与した非ヒト哺乳動物から脾臓細胞を分離し、続いて、抗体産生ハイブリドーマを形成させるために、不死化細胞とこれらの脾臓細胞を融合させることである。非ヒト哺乳動物からの脾臓細胞の分離は当技術分野で周知であり、一般的には、麻酔下の非ヒト哺乳動物から脾臓を摘出し、それを切って小片にし、単一の細胞懸濁液を生成させるために、細胞ストレイナーのナイロンメッシュを通じて脾臓から脾臓細胞を適切な緩衝液中に圧搾することを含む。この細胞を洗浄し、遠心し、あらゆる赤血球細胞を溶解する緩衝液中で再懸濁する。溶液を再び遠心し、ペレット中の残留リンパ球を新鮮な緩衝液中で最終的に再懸濁する。

【0128】

分離し、単一細胞懸濁液の中に入れたら、リンパ球を不死細胞株に融合させ得る。これは、一般的にはマウス骨髄腫細胞株であるが、ハイブリドーマを作製するのに有用な多くの他の不死細胞株が当技術分野で公知である。マウス骨髄腫株としては、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, U.S.A. から入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍由来のもの、American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U.S.A. から入手可能なX63 Ag8653およびSP-2細胞が挙げられるが限定されない。融合はポリエチレングリコールなどを使用して達成される。次いで、未融合の親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する選択培地中で、得られたハイブリドーマを増殖させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPR T)を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、一般的にはヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT培地)を含み、これらの物質はHGPRT欠損細胞の増殖を妨害する。

【0129】

ハイブリドーマは、一般的にはマクロファージのフィーダー層上で増殖させる。マクロファージは、脾臓細胞を分離するために使用される、好ましくは非ヒト哺乳動物の同腹仔からのものであり、一般的にはハイブリドーマを播種する数日前に不完全フロインドアジュバントなどで刺激する。融合方法は、その開示が参照により本明細書中に組み込まれる、Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986)に記載されている。

【0130】

コロニー形成および抗体産生のために十分な時間にわたり選択培地中で細胞を増殖させる。これは、通常、約7~約14日間である。

【0131】

次いで、Siglecポリペプチド遺伝子産物に特異的に結合する抗体産生についてハイブリドーマコロニーをアッセイする。このアッセイは、一般的には、比色分析ELISA型アッセイであるが、ハイブリドーマを増殖させるウェルに適合させ得るあらゆるアッセイを使用し得る。他のアッセイとしては、ラジオイムノアッセイまたは蛍光励起細胞分取が挙げられる。1つ以上の別個のコロニーが存在するか否かを決定するために、所望の抗体産生について陽性であるウェルを調べる。複数のコロニーが存在する場合、単一細胞のみが所望の抗体を産生するコロニーを生じさせていることを確実にするために、細胞を再クローニングし、増殖させ得る。一般的には、抗体は、Siglecポリペプチド、例えばSiglec発現細胞に結合する能力についても試験され得る。

【0132】

モノクローナル抗体を産生することが確認されるハイブリドーマをDMEMまたはRPMI-1640などの適切な培地中でより大量に増殖させ得る。代替的に、ハイブリドーマ細胞を動物における腹水癌としてインビボで増殖させ得る。

【0133】

10

20

30

40

50

所望のモノクローナル抗体を産生させるのに十分な増殖後、モノクローナル抗体を含有する増殖培地（または腹水）を細胞から分離して除き、その中に存在するモノクローナル抗体を精製する。精製は、一般に、ゲル電気泳動、透析、プロテインAもしくはプロテインG-セファロースを使用したクロマトグラフィーまたはアガロースもしくはセファロースビーズなどの固体支持体に連結される抗マウスIgによって達成される（例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、Antibody Purification Handbook, Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition ACに全て記載されている）。結合される抗体は、一般的には、抗体含有分画の即時の中和と共に低pH緩衝液（pH3.0以下のグリシンまたは酢酸緩衝液）を使用することによってプロテインA/プロテインGカラムから溶出される。これらの分画をプールし、透析し、必要に応じて濃縮する。

【0134】

単一の明らかなコロニーがある陽性ウェルを一般的には再クローニングし、再アッセイして、1つのモノクローナル抗体のみが検出され、産生されていることを保証する。

【0135】

抗体は、例えば（その開示全体が参照により本明細書中に組み込まれる、Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544）に開示されるような免疫グロブリンのコンビナトリアルライブラリの選択によっても作製され得る。

【0136】

抗体は、Siglecポリペプチドへの最大限の結合を達成するために必要な濃度についてSiglecで滴定することができる。Siglecポリペプチド（またはそれを発現する細胞）への結合に関する「EC50」は、Siglecポリペプチド（またはそれを発現する細胞）への結合に関して最大応答または効果の50%を生じる抗Siglec抗体の効果的な濃度を指す。

【0137】

Siglecに結合可能であり、かつ/または他の所望の特性を有することが可能な抗体が同定されたら、一般的には、他のSiglecポリペプチドおよび/または無関係なポリペプチドを含む他のポリペプチドへのこれらの結合能について、本明細書中に記載のものを含む標準的な方法を使用してこれらも評価する。理想的には、抗体はかなりの親和性でSiglec、例えばヒトSiglec-7および/またはヒトSiglec-9にのみ結合し、無関係のポリペプチド、とりわけCD33関連Siglec以外のポリペプチドまたは所望のSiglec（例えば、Siglec-7および/またはSiglec-9）以外のSiglecに対して顕著なレベルで結合しない。しかし、当然のことながら、Siglecに対する親和性が実質的に他のSiglecおよび/または他の無関係なポリペプチドに対する親和性よりも大きい限り（例えば、5x、10x、50x、100x、500x、1000x、10,000xまたはそれを超える）、抗体は、本方法での使用に適切である。

【0138】

抗Siglec抗体は、これらがヒトFc受容体への特異的な結合を減少させるかまたは実質的に欠くように、非枯渇抗体として調製され得る。このような抗体は、Fc受容体に対して結合しないことまたはこれに対する結合親和性が低いことが知られている様々な重鎖の定常領域を含み得る。あるこのような例は、ヒトIgG4定常領域である。代替的に、Fc受容体結合を回避するために、FabまたはF(ab')₂断片など、定常領域を含まない抗体断片を使用し得る。Fc受容体結合は、例えばBIACOREアッセイにおけるFc受容体タンパク質への抗体の結合を試験することを含め、当技術分野で公知の方法に従い評価し得る。また、Fc受容体への結合を最小化するかまたは除外するためにFc部分が修飾される何らかの抗体アイソタイプを使用し得る（例えば、その開示が参照により本明細書中に組み込まれる国際公開第03101485号パンフレットを参照されたい）。例えばFc受容体結合を評価するための細胞に基づくアッセイなどのアッセイは当技術分野で周知であり、例えば国際公開第03101485号パンフレットに記載

10

20

30

40

50

されている。

【0139】

Siglecポリペプチド上に存在するエピトープに結合する抗体をコードするDNAをハイブリドーマから単離し、適切な宿主への遺伝子移入のために適切な発現ベクターに入れる。次いで、抗体またはそれらの変異体、例えばそのモノクローナル抗体のヒト化バージョン、抗体の活性断片、抗体の抗原認識部分を含むキメラ抗体または検出可能部分を含むバージョンの組み換え産生のために宿主を使用する。

【0140】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して、容易に単離し、配列決定し得る（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることによる）。単離したら、DNAを発現ベクターに入れ得、次いで組み換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得るために、これを、そのままでは免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌（*E. coli*）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞または骨髄腫細胞などの宿主細胞に遺伝子移入する。本明細書中の他の箇所に記載されるように、多数の目的の何れかのために、例えば抗体をヒト化する断片もしくは誘導体を作製するために、または例えば抗体の結合特異性を最適化するために抗原結合部位において抗体の配列を修飾するために、このようなDNA配列を修飾し得る。抗体をコードするDNAの細菌中の組み換え発現は、当技術分野で周知である（例えば、Skerra et al., *Current Opinion in Immunol.*, 5, pp. 256 (1993); および Pluckthun, *Immunol.* 130, p. 151 (1992)を参照されたい）。

10

20

【0141】

本発明に関連して、「共通の決定基」は、ヒト阻害Siglec、特にCD33関連Siglecの受容体のいくつかの遺伝子産物によって共有される決定基またはエピトープを指す。抗体は、少なくともSiglec-7およびSiglec-9によって共有される共通の決定基に結合し得る。ある実施形態において、この共通決定基は、任意選択により、CD33関連Siglec、特にSiglec-3、-5、-6、-8、-10、-11および-12の1つ以上またはその全てにおいて存在し得ない。ある実施形態において、この共通決定基は、Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11および-12上に存在しない。

30

【0142】

siglecポリペプチド（例えば、Siglec-7および/またはSiglec-9、特に実質的にまたは基本的にモノクローナル抗体mAbA、-B、-C、-D、-Eもしくは-F（Siglec-9特異的）またはmAb1、-2、-3、-4、-5もしくは-6（Siglec-7特異的）と同じエピトープに結合する1つ以上の抗体の同定は、抗体競合が評価され得る様々な免疫学的スクリーニングアッセイの何れか1つを用いて容易に決定し得る。多くのこのようなアッセイは、日常的に実施され、当技術分野で周知である（例えば、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第5,660,827号明細書を参照されたい）。本明細書中に記載の抗体が結合するエピトープを実際に決定することは、本明細書中に記載のモノクローナル抗体と同じまたは実質的に同じエピトープに結合する抗体を同定するのに何ら必要とされないことを理解されたい。

40

【0143】

例えば、調べようとする試験抗体は、異なるソースの動物から得られるか、または異なるIgアイソタイプのものであり、対照（例えば、mAbA、-B、-C、-D、-Eもしくは-FまたはmAb1、-2、-3、-4、-5もしくは-6）および試験抗体を混合し（または予め吸着させ）、Siglecポリペプチドを含有する試料に適用する、単純な競合アッセイを使用し得る。ウエスタンブロッティングおよびBIACORE分析の使用に基づくプロトコールは、このような競合実験での使用に適切である。

【0144】

50

特定の実施形態において、S i g l e c 抗原試料に適用する前のある時間、対照抗体（例えば、m A b A、- B、- C、- D、- E もしくは - F または m A b 1、- 2、- 3、- 4、- 5 もしくは - 6）を様々な量の試験抗体（例えば、約 1 : 10 または約 1 : 100）と予め混合する。他の実施形態において、対照および様々な量の試験抗体を S i g l e c 抗原試料への曝露中に単純に混合し得る。（例えば、未結合抗体を排除するための分離または洗浄技術を使用することによって）遊離抗体から結合抗体を、（例えば、種特異的なまたはアイソタイプ特異的な二次抗体を使用することにより、または検出可能標識で m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5、または - 6 を特異的に標識することにより）試験抗体から m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5、または - 6 を区別し得る限り、試験抗体が m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5、または - 6 の抗原への結合を減少させるか否かを判定し得、これは、試験抗体が m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5、または - 6 と結合について競合し、かつ/または共通の S i g l e c 上の結合部位を認識することを示す。完全に無関係な抗体の非存在下での（標識化）対照抗体の結合は、対照高値となり得る。対照低値は、標識化（m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6）抗体を完全に同じタイプの（m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6）非標識抗体と温置することによって得られ得、ここで、競合が起こり、標識抗体の結合を減少させる。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での標識化抗体の反応性の顕著な減少は、S i g l e c 上の実質的に同じ領域を認識し、標識化（m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6）抗体と「交差反応」または競合するエピトープを認識する試験抗体を示す。約 1 : 10 ~ 約 1 : 100 の m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 : 試験抗体の何れかの比率で S i g l e c 抗原への m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 の結合を少なくとも約 50 %、例えば少なくとも約 60 %、またはより好ましくは少なくとも約 80 % もしくは 90 %（例えば、約 65 ~ 100 %）だけ減少させる何らかの試験抗体は、それぞれ m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 と競合する抗体であるとみなされる。好ましくは、このような試験抗体は、少なくとも約 90 %（例えば、約 95 %）だけ S i g l e c 抗原へのそれぞれ m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 の結合を減少させる。

【0145】

例えば、フローサイトメトリー試験により競合を評価することもできる。このような試験において、1種類以上のある種の S i g l e c ポリペプチドを保有する細胞を最初に例えば m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 と温置し、次いで蛍光色素またはビオチンで標識される試験抗体と温置し得る。本抗体は、飽和量の m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 との予備温置時に得られる結合が、それぞれ m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 との予備温置を行わずに抗体により得られる結合の約 80 %、好ましくは約 50 %、約 40 % 以下（例えば、約 30 %、20 % または 10 %）（蛍光手段により測定される場合）である場合、m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 と競合すると言われる。代替的に、抗体は、飽和量の試験抗体と予備温置される細胞上で（蛍光色素またはビオチンにより）それぞれ標識化 m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 抗体と共に得られる結合が、試験抗体との予備温置を行わずに得られる結合の約 80 %、好ましくは約 50 %、約 40 % またはそれ未満（例えば、約 30 %、20 % または 10 %）である場合、m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5 または - 6 と競合すると言われる。

【0146】

試験抗体が予め吸着され、S i g l e c 抗原が固定化される表面に飽和濃度で適用され

る単純な競合アッセイも使用し得る。単純競合アッセイにおける表面は、好ましくはB I A C O R Eチップ（または表面プラズモン共鳴分析に適切な他の媒体）である。次いで、対照抗体（例えば、m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5または- 6）をS i g l e c飽和濃度で表面と接触させ、S i g l e cおよび対照抗体の表面結合を測定する。対照抗体のこの結合を試験抗体の非存在下でのS i g l e c含有面への対照抗体の結合と比較する。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での対照抗体によるS i g l e c含有面の結合の顕著な減少は、試験抗体が結合について競合し、したがって対照抗体と同じS i g l e c上の領域を認識し得、試験抗体が対照抗体と「交差反応」するようになることを示す。少なくとも約30%またはそれを超えて、好ましくは約40%だけS i g l e c抗原への対照（m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5または- 6など）抗体の結合を減少させる何らかの試験抗体は、対照（例えば、m A b A、- B、- C、- D、- E、- F、- 1、- 2、- 3、- 4、- 5または- 6）としてS i g l e cへの結合について競合する抗体であるとみなされ得る。好ましくは、このような試験抗体は、少なくとも約50%（例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%またはそれを超える）だけS i g l e c抗原への対照抗体（例えば、3 A 1 1、1 H 9または2 B 4）の結合を減少させる。当然のことながら、対照および試験抗体の順序は逆転し得、すなわち、対照抗体を最初に表面に結合させ得、試験抗体をその後競合アッセイにおいて表面と接触させる。好ましくは、S i g l e c抗原に対してより高い親和性を有する抗体は、（抗体が交差反応することが推測される）第2の抗体に対して見られる結合の減少がより大きい規模であると予想されるため、最初に表面に結合させる。このようなアッセイのさらなる例は、例えば、その開示が参照により本明細書中に組み込まれるS a u n a l (1 9 9 5) J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 3 : 3 3 - 4 1で提供される。

10

20

【0147】

抗体がエピトープ領域内で結合するか否かの判定は、当業者にとって公知のように行い得る。このようなマッピング/特徴評価方法の一例として、抗S i g l e c抗体に対するエピトープ領域は、S i g l e cタンパク質における露出アミン/カルボキシルの化学修飾を用いて、エピトープ「フットプリンティング」により決定され得る。このようなフットプリンティング技術のある具体例は、H X M S（質量分析により検出される水素-重水素交換）の使用であり、ここで受容体およびリガンドタンパク質アミドプロトンの水素/重水素交換、結合および逆交換が起こり、タンパク質結合に加わる骨格アミド基は、逆交換から保護され、したがって重水素化されたままとなる。関連領域は、この点でペプシンのタンパク質分解、ファストマイクロボア高速液体クロマトグラフィー分離および/またはエレクトロスプレーイオン化質量分析により同定され得る。例えば、E h r i n g H , A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y , V o l . 2 6 7 (2) p p . 2 5 2 - 2 5 9 (1 9 9 9) E n g e n , J . R . a n d S m i t h , D . L . (2 0 0 1) A n a l . C h e m . 7 3 , 2 5 6 A - 2 6 5 Aを参照されたい。適切なエピトープ同定技術の別の例は核磁気共鳴エピトープマッピング（NMR）であり、一般的には遊離抗原および抗体などの抗原結合ペプチドと複合体形成する抗原の二次元NMRスペクトルにおけるシグナルの位置を比較する。抗原は、一般的には、15Nで選択的に同位体標識され、抗原に対応するシグナルのみがNMR-スペクトルで見られ、抗原結合ペプチドからのシグナルが見られないようになる。抗原結合ペプチドとの相互作用に参与するアミノ酸由来の抗原シグナルは、一般に、遊離抗原のスペクトルと比較して、複合体のスペクトルにおいて位置をシフトさせ、結合に参与するアミノ酸はそのように同定され得る。例えばE r n s t S c h e r i n g R e s F o u n d W o r k s h o p . 2 0 0 4 ; (4 4) : 1 4 9 - 6 7 ; H u a n g e t a l . , J o u r n a l o f M o l e c u l a r B i o l o g y , V o l . 2 8 1 (1) p p . 6 1 - 6 7 (1 9 9 8) ; およびS a i t o a n d P a t t e r s o n , M e t h o d s . 1 9 9 6 J u n ; 9 (3) : 5 1 6 - 2 4を参照されたい。

30

40

【0148】

50

エピトープマッピング/特徴評価は質量分析方法を用いて行うこともできる。例えば、Downard, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35(4): 493-503 および Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71(9): 1792-1801 を参照されたい。プロテアーゼ消化技術もエピトープマッピングおよび同定との関連で有用であり得る。抗原性決定基関連領域/配列は、プロテアーゼ消化によって、例えば Siglec に対して約 1:50 の比率でトリプシンを使用することによって pH 7~8 で o/n 消化を使用することにより、続いてペプチド同定のために質量分析(MS)を行うことにより決定し得る。続いて、抗 Siglec 結合物によりトリプシン切断から保護されるペプチドは、トリプシン消化に供した試料および抗体と温置し、続いて例えばトリプシン(それにより結合物に対するフットプリントが明らかになる)による消化に供した試料の比較により同定し得る。キモトリプシン、ペプシンなどの他の酵素もまたは代替的に同様のエピトープ特徴評価方法で使用し得る。さらに、酵索性消化により、可能性のある抗原性決定基配列が表面に露出していない、したがっておそらく免疫原性/抗原性について関連がないと思われる Siglec ポリペプチドの領域内にあるか否かを分析するための迅速な方法が提供され得る。

10

20

30

40

50

【0149】

部位特異的突然変異誘発は、結合エピトープを明らかにするのに有用な別の技術である。例えば、「アラニンスキャニング」において、タンパク質セグメント内の各残基をアラニン残基で置き換え、結合親和性に対する結果を測定する。突然変異が結合親和性の顕著な低下につながる場合、結合に関与する可能性が高い。構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体(すなわち折り畳まれていないタンパク質に結合しない抗体)を使用して、アラニン置換がタンパク質の全体的な折り畳みに影響しないことを確認し得る。例えば、Clackson and Wells, Science 1995; 267: 383-386; および Wells, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 1-6 を参照されたい。

【0150】

エピトープ「フットプリンティング」のために電子顕微鏡も使用し得る。例えば、Wang et al., Nature 1992; 355: 275-278 は、低温電子顕微鏡、三次元画像再構成および X 結晶学の同時適用を使用して、ネイティブササゲモザイクウイルスのキャプシド表面上の Fab 断片の物理学的フットプリントを決定した。

【0151】

エピトープ評価のための「標識不含」アッセイの他の形態としては、表面プラズモン共鳴(SPR、BIACORE)および反射型干渉分光法(RifS)が挙げられる。例えば、Faegerstam et al., Journal Of Molecular Recognition 1990; 3: 208-14; Nice et al., J. Chromatogr. 1993; 646: 159-168; Leipert et al., Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37: 3308-3311; Kroeger et al., Biosensors and Bioelectronics 2002; 17: 937-944 を参照されたい。

【0152】

本発明の抗体と同じであるかまたは実質的に同じであるエピトープへの抗体結合が本明細書中に記載の代表的な競合アッセイの1つ以上で同定され得ることも注意すべきである。

【0153】

試験抗体がヒト Siglec (例えば、Siglec-7 および/または Siglec-9) に対する天然または非天然シアル酸リガンドの結合に影響を及ぼすか否かを評価するために交差ブロッキングアッセイも使用し得る。例えば、ヒト化抗 Siglec 抗体標品がシアル酸との Siglec-7 相互作用を減少させるかまたは阻止するか否かを判定するために次の試験を行い得る。用量範囲の抗ヒト Siglec-9 Fab を固定用量においてヒト Siglec-Fc (例えば、Siglec-7 Fc および/または Sig

l e c - 9 F c) と室温で 30 分間共温置し、次いでシアル酸リガンド発現細胞株を 1 時間にわたり添加した。染色緩衝液で細胞を 2 回洗浄した後、染色緩衝液で希釈した P E 結合ヤギ抗マウス I g G F c フラグメント二次抗体を細胞に添加し、プレートを 4 でさらに 30 分間温置する。細胞を 2 回洗浄し、H T F C プレートリーダーを備えた A c c u r y C 6 フローサイトメーターで分析する。試験抗体の非存在下において、S i g l e c - F c は細胞に結合する。シアル酸への S i g l e c 結合を阻止する S i g l e c - F c (例えば、S i g l e c - 7 F c および / または S i g l e c - 9 F c) と予め温置した抗体標品の存在下において、細胞への S i g l e c - F c の結合が減少する。しかし、当然のことながら、シアル酸リガンド発現標的細胞に対する N K 細胞溶解活性の再構成は、S i g l e c - シアル酸リガンド相互作用の阻止を評価する必要なく直接評価し得る。

10

【 0 1 5 4 】

任意選択により、本開示の抗体は、E 1 0 - 2 8 6 (B D B i o s c i e n c e s C o r p .)、欧州特許第 1 2 3 8 2 8 2 B 1 号 (M o r e t t a e t a l . , U n i v e r s i t a d e g l i S t u d i d i G e n o v a) に開示された抗体 Q A 7 9、もしくは F a l c o e t a l . (1 9 9 9) J . E x p . M e d . 1 9 0 : 7 9 3 - 8 0 1 に記載の Z 1 7 6 の何れか 1 つ以上の抗体以外の抗体、または上記の誘導体、例えば抗原結合領域または重鎖および / もしくは軽鎖 C D R の全体もしくは一部を含むものに特定され得る。任意選択により、本開示の抗体は、2015 年 9 月 9 日に出願された P C T 出願第 P C T / 欧州特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 7 0 5 5 0 号明細書 (I n n a t e P h a r m a) に開示されている抗体 3 A 1 1、1 H 9 および 2 B 4 の何れか 1 つ以上以外の抗体であるものに特定され得る。他の実施形態において、上記の抗体は、抗体の性質に応じて、本開示の抗体の特徴を有するように改変され得る。

20

【 0 1 5 5 】

本明細書において、細胞外ドメイン、例えばヒト S i g l e c - 9 の N 末端 V - セットドメインまたは I g 様 C 2 型ドメイン 1 または 2 に結合する抗体、例えば本明細書の実施例に示されるエピトープに結合する抗体が提供される。

【 0 1 5 6 】

ある態様において、抗体は、抗体 m A b 1、2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F と実質的に同じエピトープに結合する。ある実施形態において、抗体は、抗体 m A b 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F が結合するエピトープと少なくとも部分的に重複するか、または少なくとも 1 つの残基を含む S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 のエピトープに結合する。抗体が結合する残基は、S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチドの表面、例えば細胞の表面上に発現した S i g l e c - 9 または S i g l e c - 7 ポリペプチド中に存在するものとして特定され得る。抗体が結合した S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 上のアミノ酸残基は、例えば、表 3 に列挙される残基からなる群から選択され得る。

30

【 0 1 5 7 】

S i g l e c - 9 突然変異体で遺伝子移入された細胞への抗 S i g l e c 抗体の結合を測定し、抗 S i g l e c 抗体が野生型 S i g l e c - 9 ポリペプチド (例えば、配列番号 2) に結合する能力と比較することができる。S i g l e c - 7 にさらに結合する抗体について、抗 S i g l e c 抗体の結合は、追加的または代替的に、S i g l e c - 7 突然変異体 (例えば、表 3 の) で遺伝子移入した細胞を用いて行い、抗 S i g l e c 抗体が野生型 S i g l e c - 7 ポリペプチド (例えば、配列番号 1) に結合する能力と比較することができる。抗 S i g l e c 抗体と突然変異 S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - 7 ポリペプチド (例えば、表 3 の突然変異 S i g l e c - 9 または S i g l e c - 7) との間の結合の減少は、結合親和性の低下 (例えば、特定の突然変異体を発現する細胞の F A C S 試験などの公知の方法により、または突然変異体ポリペプチドへの結合の B i a c o r e (商標) (S P R) 試験により測定される) および / または抗 S i g l e c 抗体の全結合能力の低下 (例えば、抗 S i g l e c 抗体濃度対ポリペプチド濃度のプロットに

40

50

おける B m a x の減少により証明される)があることを意味する。結合の有意な減少は、抗 S i g l e c 抗体が S i g l e c - 9 に結合している場合、突然変異した残基が抗 S i g l e c 抗体への結合に直接関与するか、または結合タンパク質に近接していることを示す。

【0158】

いくつかの実施形態では、結合の有意な減少は、抗 S i g l e c 抗体と突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチドとの間の結合親和性および/または能力が、抗体と野生型 S i g l e c - 9 ポリペプチドとの間の結合と比較して、40%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超または95%超だけ減少することを意味する。特定の実施形態では、結合は検出可能限界以下に減少される。いくつかの実施形態において、抗 S i g l e c 抗体の突然変異 S i g l e c - 9 ポリペプチドへの結合が、抗 S i g l e c 抗体と野生型 S i g l e c - 9 ポリペプチドとの間に観察される結合の50%未満(例えば、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%または10%未満)である場合、結合の有意な減少が証明される。

10

【0159】

いくつかの実施形態において、突然変異体 S i g l e c - 9 および/または S i g l e c - 7 ポリペプチドに対して有意に低い結合を示し、抗体 m A b 1、- 2、- 3、- A、- B、- C、- D、- E または - F が結合したアミノ酸残基を含むセグメント中の残基が異なるアミノ酸で置換された抗 S i g l e c 抗体が提供される。ある実施形態において、突然変異体は、野生型 S i g l e c ポリペプチド(例えば、配列番号2の S i g l e c - 9 ポリペプチド)への結合と比較して、表3の突然変異体 M 6、M 8、M 9、M 10、M 11、M 15 および M 16 から選択される突然変異体である。ある実施形態において、突然変異体は、野生型 S i g l e c - 7 ポリペプチド(例えば、配列番号1のポリペプチド)への結合と比較して、表3の突然変異体 M 6、M 8、M 9、M 10、M 11、M 15 および M 16 から選択される突然変異体である。

20

【0160】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、N 7 8、P 7 9、A 8 0、R 8 1、A 8 2 および/または V 8 3 (配列番号2を参照されたい)からなる群から選択される1、2、3、4、5 または 6 つの残基を含むヒト S i g l e c - 9 上のエピトープに結合する。

【0161】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、N 7 7、D 9 6、H 9 8 および/または T 9 9 (配列番号2を参照されたい)からなる群から選択される1、2、3 または 4 つの残基を含むヒト S i g l e c - 9 上のエピトープに結合する。

30

【0162】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、W 8 4、E 8 5、E 8 6 および/または R 8 8 (配列番号2を参照されたい)からなる群から選択される1、2、3 または 4 つの残基を含むヒト S i g l e c - 9 上のエピトープに結合する。

【0163】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、S 4 7、H 4 8、G 4 9、W 5 0、I 5 1、Y 5 2、P 5 3 および/または G 5 4 (配列番号2を参照されたい)からなる群から選択される1、2、3、4、5、6、7 または 8 つの残基を含むヒト S i g l e c - 9 上のエピトープに結合する。

40

【0164】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、残基 K 1 3 1 および/または H 1 3 2 (配列番号2を参照されたい)の一方または両方を含むヒト S i g l e c - 9 上のエピトープに結合する。

【0165】

ある態様において、抗 S i g l e c 抗体は、R 6 3、A 6 6、N 6 7、T 6 8、D 6 9、Q 7 0 および/または D 7 1 (配列番号2を参照されたい)からなる群から選択される1、2、3、4、5、6 または 7 つの残基を含むヒト S i g l e c - 9 上のエピトープに

50

結合する。

【0166】

ある態様において、抗Siglec抗体は、P55、H58、E122、G124、S125および/またはK127（配列番号2を参照されたい）からなる群から選択される1、2、3、4、5または6つの残基を含むヒトSiglec-9上のエピトープに結合する。

【0167】

ある態様において、抗Siglec抗体は、N82、P83、A84、R85、A86および/またはV87（配列番号1を参照されたい）からなる群から選択される1、2、3、4、5または6つの残基を含むヒトSiglec-7上のエピトープに結合する。

10

【0168】

ある態様において、抗Siglec抗体は、N81、D100、H102および/またはT103（配列番号1を参照されたい）からなる群から選択される1、2、3または4つの残基を含むヒトSiglec-7上のエピトープに結合する。

【0169】

ある態様において、抗Siglec抗体は、W88、E89、E90、R92（配列番号1を参照されたい）からなる群から選択される1、2、3または4つの残基を含むヒトSiglec-7上のエピトープに結合する。

【0170】

Siglecに対する所望の結合を有する抗原結合化合物が得られたら、そのSiglec（例えば、Siglec-7および/またはSiglec-9）阻害能についてこれを評価し得る。例えば、抗Siglec抗体が（例えば、細胞上に存在するような）シアル酸リガンドにより誘導されるSiglec活性化を低下させるかまたは阻止する場合、Siglec限定リンパ球の細胞傷害性を向上させ得る。これは、典型的な細胞傷害性アッセイにより評価し得、その例を以下に記載する。

20

【0171】

抗体がSiglec介在性シグナル伝達を低下させる能力は、例えばSiglec-7またはSiglec-9を発現するNK細胞および個々のSiglecのシアル酸リガンドを発現する標的細胞を使用して、標準的な4時間インビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験し得る。Siglec-7または-9がシアル酸リガンドを認識するため、このようなNK細胞は、シアル酸リガンドを発現する標的を効果的に死滅させず、リンパ球介在性の細胞溶解を妨害する阻害シグナル伝達の開始および拡大につながる。任意選択により、本明細書の実施例の方法に従ってアッセイを実施することができる。例えば、ドナーから精製され、使用前に37℃で一晩温置された新鮮なNK細胞として初代NK細胞を用いた実施例8を参照されたい。このようなインビトロ細胞傷害性アッセイは、例えばColligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc.およびWiley Inter-science, N.Y., (1992, 1993)に記載のように、当技術分野で周知である標準的方法により行われ得る。標的細胞をNK細胞の添加前に⁵¹Crで標識し、次いで死滅は、死滅の結果としての細胞から培地への⁵¹Crの放出に比例するものとして推定する。Siglec-7および/または-9がシアル酸リガンドに結合するのを妨害する抗体の添加の結果、Siglecを介した阻害シグナル伝達の開始および拡大が妨げられる。したがって、このような薬剤の添加の結果、標的細胞のリンパ球介在性の死滅が増加する。それにより、このステップは、例えばリガンド結合を阻止することによりSiglec-7または-9誘導性の負のシグナル伝達を妨げる薬剤を同定する。特定の⁵¹Cr放出細胞傷害性アッセイにおいて、Siglec-7または-9を発現NKエフェクター細胞は、シアル酸リガンド陰性標的細胞（例えば、シアリダーゼで処理した細胞）を死滅させ得るが、シアル酸リガンド発現対照細胞はあまり死滅させない。このように、NKエフェクター細胞は、特定のSiglecを介したシアル酸誘導性の阻害シグナル伝達のために、シアル酸リガンド陽性細胞をあまり効率的に死滅させな

30

40

50

い。このような⁵ ¹Cr放出細胞傷害性アッセイにおいてNK細胞をブロッキング抗Siglec抗体と予め温置する場合、抗体濃度依存的にシアル酸リガンド発現細胞がより効率的に死滅される。本アッセイは、各Siglec、例えばSiglec-7およびSiglec-9に対して個別に行い得る。

【0172】

抗体の阻害活性（すなわち細胞傷害性促進能）は、多くの他の方法の何れかでも、例えばその開示が参照により本明細書中に組み込まれるSivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186: 1129-1136に記載されるような細胞内遊離カルシウムにおけるその効果により、または脱顆粒マーカーCD107もしくはCD137発現などのNK細胞の細胞傷害性活性化のマーカーにおけるその影響により、評価し得る。何らかの細胞に基づく細胞傷害性アッセイを使用して、例えば、それぞれの開示全体が参照により本明細書中に組み込まれる、Sivori et al., J. Exp. Med. 1997; 186: 1129-1136; Vitale et al., J. Exp. Med. 1998; 187: 2065-2072; Pessino et al., J. Exp. Med. 1998; 188: 953-960; Neri et al., Clin. Diag. Lab. Immun. 2001; 8: 1131-1135; Pender et al., J. Exp. Med. 1999; 190: 1505-1516において開示されるように、P815、K562細胞などの標的細胞または適切な腫瘍細胞を死滅させるためにNK細胞を刺激する抗体の能力を評価するために何らかの他のパラメーターを測定することにより、NK、TまたはNKT細胞活性を評価することもできる。

10

20

【0173】

ある実施形態において、抗体標品は、Siglec限定リンパ球の細胞傷害性の少なくとも10%の増強、好ましくはNK細胞傷害性の少なくとも40%もしくは50%の増強またはより好ましくはNK細胞傷害性の少なくとも70%の増強を引き起こす。

【0174】

NK細胞のサイトカイン産生（例えば、IFN-γおよびTNF-α産生）を刺激するために抗体とNK細胞を温置するサイトカイン放出アッセイを使用して、細胞傷害性リンパ球の活性にも対処し得る。代表的なプロトコールにおいて、PBMCからのIFN-γ産生は、培養4日後の、細胞表面および細胞質内染色およびフローサイトメトリーによる分析によって評価する。簡潔に述べると、プレフェルジンA（Sigma Aldrich）を培養の最後の4時間にわたり5 μg/mLの最終濃度で添加する。次いで細胞を透過処理（IntraPrep（商標）；Beckman Coulter）およびPE-抗IFN-γまたはPE-IgG1（Pharmingen）での染色前に、抗CD3および抗CD56mAbと温置する。ELISA（GM-CSF：DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, IFN-γ：OptEIA set, Pharmingen）を使用して、ポリクローナル活性化NK細胞からのGM-CSFおよびIFN-γ産生を上清中で測定する。

30

【0175】

抗体の断片および誘導体（別段の指定がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、本願で使用される場合の1つまたは複数の「抗体」という用語に包含される）は、当該技術分野で公知の技術により作製し得る。「断片」は、インタクト抗体の一部分、一般的には抗原結合部位または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂およびFv断片；ダイアボディ；（1）1本鎖Fv分子、（2）会合する重鎖部分がなく、軽鎖可変ドメインを1つのみ含有する1本鎖ポリペプチドまたは軽鎖可変ドメインの3つのCDRを含有するそれらの断片、および（3）会合する軽鎖部分がなく、重鎖可変領域を1つのみ含有する1本鎖ポリペプチドまたは重鎖可変領域の3つのCDRを含有するその断片を含むが限定されない、近接アミノ酸残基の1つの連続した配列からなる一次構造を有するポリペプチド（本明細書中で「1本鎖抗体断片」または「1本鎖ポリペプチド」と呼ぶ）である何らかの抗体断片；および抗体断片から形成される多特異性（例えば、二特異性）抗体が挙げられる。とりわけ、ナノボディ、ド

40

50

メイン抗体、単ドメイン抗体または「dAb」が挙げられる。

【0176】

特定の実施形態において、抗体を産生するハイブリドーマのDNAは、例えば相同非ヒト配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインに対するコード配列を置換することによって（例えば、Morrisson et al., PNAS pp. 6851 (1984)）、または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全てまたは一部を共有結合により連結することにより、発現ベクターに挿入する前に修飾し得る。このようにして、オリジナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体を調製する。一般的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドが抗体の定常ドメインに対して置換される。

10

【0177】

任意選択により、抗体はヒト化される。抗体の「ヒト化」型は、マウス免疫グロブリン由来の最小配列を含有する特異的なキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合サブ配列など）である。殆どの部分に対して、ヒト化抗体は、オリジナル抗体の所望の特異性、親和性および能力を維持しながら、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基がオリジナル抗体（ドナー抗体）のCDRからの残基により置換されるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

【0178】

一部の例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基を対応する非ヒト残基により置換し得る。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または移入されたCDRもしくはフレームワーク配列の何れでも見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに高め、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、一般的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、CDR領域の全てまたは実質的に全てがオリジナル抗体のものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、最適には、通常はヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含む。さらなる詳細については、その開示全体が参照により本明細書中に組み込まれる、Jones et al., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992); Verhoeven et Science, 239, pp. 1534; および米国特許第4,816,567号明細書を参照されたい。抗体をヒト化するための方法は当技術分野で周知である。

20

30

【0179】

ヒト化抗体を作製することにおいて使用しようとするヒト可変ドメイン、軽鎖および重鎖の両方の選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「最良適合」方法に従い、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対して抗体の可変ドメインの配列をスクリーニングする。次に、マウスのものに最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク（FR）として受容される（Sims et al., J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196, 1987, pp. 901）。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列からの特定のフレームワークを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体のために同じフレームワークを使用し得る（Carter et al., PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151, p. 2623 (1993)）。

40

【0180】

抗体がSiglec受容体に対する高親和性および他の有利な生物学的特性を保有してヒト化されることはさらに重要である。この目的を達成するために、ある方法に従い、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列および様々な概念的ヒト化産物の分析

50

の過程によってヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性が高い三次元構造を例示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンのその抗原への結合能に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基を選択し、コンセンサスおよび輸入配列から組み合わせ得、標的抗原に対する親和性向上などの所望の抗体特性が達成されるようになる。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的に、および最も実質的に関与する。

【0181】

「ヒト化」モノクローナル抗体を作製する別の方法は、免疫付与のために使用されるマウスとして、XenoMouse (Abgenix, Fremont, CA)を使用することである。XenoMouseは、その免疫グロブリン遺伝子が機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子により置換されているマウス宿主である。したがって、このマウスにより、またはこのマウスのB細胞から作製されるハイブリドーマにおいて産生される抗体は既にヒト化されている。XenoMouseは、参照によりその全体において本明細書中に組み込まれる、米国特許第6,162,963号明細書に記載されている。

【0182】

ヒト抗体は、免疫付与のためにヒト抗体レパートリーを発現するように操作されている他のトランスジェニック動物を使用することによる (Jakobovitz et al., Nature 362 (1993) 255) かまたはファージディスプレイ法を用いた抗体レパートリーの選択によるなど、様々な他の技術によっても作製され得る。このような技術は、当業者にとって公知であり、本願で開示されるようにモノクローナル抗体から出発して実行され得る。

【0183】

ある実施形態において、抗Siglec抗体は、それらがヒトFc受容体、例えばCD16A、CD16B、CD32A、CD32Bおよび/またはCD64の何れか1つ以上に実質的な特異的結合を有しないように調製され得る。このような抗体は、Fc受容体に対する結合を欠くことまたは低い結合性を有することが知られている様々な重鎖の定常領域を含み得る。代替的に、Fc受容体結合を回避するために、F(ab')₂断片など、定常領域を含まない(または部分的に含む)抗体断片を使用し得る。Fc受容体結合は、例えばBIACOREアッセイにおけるFc受容体タンパク質への抗体の結合を試験することを含め、当技術分野で公知の方法に従い評価し得る。また、Fc受容体への結合を最小化または除外するためにFc部分が修飾される(例えば、1、2、3、4、5つまたはそれを超えるアミノ酸置換を導入することによって)何らかの抗体IgGアイソタイプを一般に使用し得る(例えば、その開示が参照により本明細書中に組み込まれる国際公開第03/101485号パンフレットを参照されたい)。Fc受容体結合を評価するための細胞に基づくアッセイなどのアッセイは、当技術分野で周知であり、例えば国際公開第03/101485号パンフレットに記載されている。

【0184】

ある実施形態において、抗体は、エフェクター細胞との最小限の相互作用を有する「Fcサイレント」抗体を生じるFc領域における1つ以上の特異的突然変異を含み得る。サイレンシングされたエフェクター機能は、抗体のFc領域における突然変異によって得ることができ、当技術分野において記載されてきた。N297A突然変異、LALA突然変異 (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20 (6) : 685 - 691); D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181 : 6664 - 69)、およびHeusser et al., 国際公開第2012/065950号パンフレットを参照されたい。これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態において、抗体は、ヒンジ領域に1、2、3つまたはそれを超えるアミノ酸置換を含む。一実施形態では、抗体はIgG1

10

20

30

40

50

またはIgG2であり、残基233~236、任意選択により、233~238(EU付番)において1つ、2つまたは3つの置換を含む。一実施形態では、抗体はIgG4であり、残基327、330および/または331(EU付番)に1つ、2つまたは3つの置換を含む。サイレントFc IgG1抗体の例は、IgG1 Fcアミノ酸配列におけるL234AおよびL235A突然変異を含むLALA突然変異体である。Fcサイレント突然変異の別の例は、例えばDAPA(D265A、P329A)突然変異(米国特許第6,737,056号明細書)としてIgG1抗体において用いられる、残基D265、またはD265およびP329における突然変異である。別のサイレントIgG1抗体は、残基N297における突然変異(例えば、N297A、N297S突然変異)を含み、その結果、グリコシル化/非グリコシル化抗体を生じる。他のサイレント突然変異は、残基L234およびG237における置換(L234A/G237A);残基S228、L235およびR409における置換(S228P/L235E/R409K、T、M、L);残基H268、V309、A330およびA331における置換(H268Q/V309L/A330S/A331S);残基C220、C226、C229およびP238における置換(C220S/C226S/C229S/P238S);残基C226、C229、E233、L234およびL235における置換(C226S/C229S/E233P/L234V/L235A);残基K322、L235およびL235における置換(K322A/L234A/L235A);残基L234、L235およびP331における置換(L234F/L235E/P331S);残基234、235および297における置換;残基E318、K320およびK322における置換(L235E/E318A/K320A/K322A);残基(V234A、G237A、P238S)における置換;残基243および264における置換;残基297および299における置換;EU付番系によって定義される残基233、234、235、237および238がPAAAAP、PAAAASおよびSAAAASから選択される配列を含む置換(国際公開第2011/066501号パンフレットを参照されたい)を含む。

【0185】

ある実施形態において、抗体は、Fc領域に1つ以上の特異的突然変異を含むことができ、その結果、本開示の抗体の改善された安定性がもたらされる、例えば複数の芳香族アミノ酸残基を含みかつ/または高い疎水性を有する。例えば、そのような抗体は、ヒトIgG1起源のFcドメインを含み、Kabab残基234、235、237、330および/または331における突然変異を含む。そのようなFcドメインの一例は、Kabab残基L234、L235およびP331における置換(例えば、L234A/L235E/P331Sまたは(L234F/L235E/P331S))を含む。このようなFcドメインの別の例は、Kabab残基L234、L235、G237およびP331における置換(例えば、L234A/L235E/G237A/P331S)を含む。このようなFcドメインの別の例は、Kabab残基L234、L235、G237、A330およびP331における置換(例えば、L234A/L235E/G237A/A330S/P331S)を含む。ある実施形態において、抗体は、Fcドメイン、任意選択により、ヒトIgG1アイソタイプのFcドメインを含む抗体であり、L234X₁置換、L235X₂置換、およびP331X₃置換を含み、X₁はロイシン以外の任意のアミノ酸残基、X₂はロイシン以外の任意のアミノ酸残基、X₃はプロリン以外の任意のアミノ酸残基であり、任意選択により、X₁はアラニンもしくはフェニルアラニンまたはその保存的置換であり;任意選択により、X₂はグルタミン酸またはその保存的置換であり;任意選択により、X₃はセリンまたはその保存的置換である。別の実施形態において、抗体は、Fcドメイン、任意選択により、ヒトIgG1アイソタイプのFcドメインを含む抗体であり、L234X₁置換、L235X₂置換、G237X₄置換、およびP331X₄置換を含み、X₁はロイシン以外の任意のアミノ酸残基、X₂はロイシン以外の任意のアミノ酸残基、X₃はグリシン以外の任意のアミノ酸残基、X₄はプロリン以外のアミノ酸残基であり、任意選択により、X₁はアラニンもしくはフェニルアラニンまたはその保存的置換であり;任意選択により、X₂はグルタミン酸またはその保存的置換であり;任

意選択により、 X_3 はアラニンまたはその保存的置換であり；任意選択により、 X_4 はセリンまたはその保存的置換である。別の実施形態において、抗体は、Fcドメイン、任意選択により、ヒトIgG1アイソタイプのFcドメインを含む抗体であり、L234 X_1 置換、L235 X_2 置換、G237 X_4 置換、G330 X_4 置換、およびP331 X_5 置換を含み、 X_1 はロイシン以外の任意のアミノ酸残基、 X_2 はロイシン以外の任意のアミノ酸残基、 X_3 はグリシン以外の任意のアミノ酸残基、 X_4 はアラニン以外のアミノ酸残基、 X_5 はプロリン以外のアミノ酸残基であり、任意選択により、 X_1 はアラニンもしくはフェニルアラニンまたはその保存的置換であり；任意選択により、 X_2 はグルタミン酸またはその保存的置換であり；任意選択により、 X_3 はアラニンまたはその保存的置換であり；任意選択により、 X_4 はセリンまたはその保存的置換であり；任意選択により、 X_5 はセリンまたはその保存的置換である。本明細書で使用されている略記法では、形式は、野生型残基：ポリペプチド中の位置：突然変異体残基であり、残基位置は、K a b a t によるEU付番に従って示される。

10

【0186】

ある実施形態において、抗体は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、またはそれらと少なくとも90%、95%もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むが、K a b a t 位置234、235および331にアミノ酸残基を保持する（下線）。

【化3】

```

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E A E G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号166)

```

20

30

【0187】

ある実施形態において、抗体は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、またはそれらと少なくとも90%、95%もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むが、K a b a t 位置234、235および331にアミノ酸残基を保持する（下線）。

【化4】

```

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号167)

```

40

【0188】

50

ある実施形態において、抗体は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、またはそれらと少なくとも90%、95%もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むが、Kabat位置234、235、237、330および331にアミノ酸残基を保持する(下線)。

【化5】

```

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P S S I E K T I S K A K C Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K C F Y P S D I A V E W E S N C Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号168)

```

10

【0189】

ある実施形態において、抗体は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、またはそれらと少なくとも90%、95%もしくは99%同一の配列を含むが、Kabat位置234、235、237および331にアミノ酸残基を保持する(下線)。

20

【化6】

```

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号169)

```

30

【0190】

Fcサイレント抗体は、ADCC活性を生じないかまたは低いADCC活性を生じ、すなわち、Fcサイレント抗体は、50%未満の特異的細胞溶解であるADCC活性を示す。好ましくは、抗体は、実質的にADCC活性を欠き、例えば、Fcサイレント抗体は、5%未満または1%未満のADCC活性(特異的細胞溶解)を示す。Fcサイレント抗体はまた、細胞表面(例えば、NK細胞、T細胞、単球、樹状細胞、マクロファージ)でのSiglec-9および/またはSiglec-7のFcR媒介性架橋の欠如を生じ得る。

40

【0191】

ある実施形態において、抗体は、220、226、229、233、234、235、236、237、238、243、264、268、297、298、299、309、310、318、320、322、327、330、331および409(重鎖定常領域における残基の付番はKabatによるEU付番に従う)からなる群から選択される任意の1、2、3、4、5つまたはそれを超える残基において重鎖定常領域に置換を有する。ある実施形態において、抗体は、残基234、235および322における置換を含む。

50

ある実施形態において、抗体は残基 2 3 4、2 3 5 および 3 3 1 における置換を有する。ある実施形態において、抗体は、残基 2 3 4、2 3 5、2 3 7 および 3 3 1 における置換を有する。ある実施形態において、抗体は、残基 2 3 4、2 3 5、2 3 7、3 3 0 および 3 3 1 における置換を有する。一実施形態では、Fc ドメインは、ヒト Ig G 1 サブタイプのものである。アミノ酸残基は、Kabat による EU 付番に従って示される。

【0192】

抗体 CDR 配列

抗体 mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E および - F の重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。具体的な実施形態において、モノクローナル抗体 mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F と同じエピトープまたは決定基と基本的に結合する抗体を提供し、任意選択により、本抗体は、抗体 mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F の超可変領域を含む。本明細書中の実施形態の何れかにおいて、抗体 mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F は、アミノ酸配列および/またはそれをコードする核酸配列によって特徴付けられ得る。ある実施形態において、モノクローナル抗体は、mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F の VH および/もしくは VL、または Fab もしくは F(ab')² 部分を含む。mAb 1 の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体も提供される。ある実施形態によれば、本モノクローナル抗体は、mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F の重鎖可変領域の 3 つの CDR を含む。mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F の可変軽鎖可変領域または mAb 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- A、- B、- C、- D、- E または - F の軽鎖可変領域の CDR の 1、2 または 3 つをさらに含むモノクローナル抗体も提供される。任意選択により、前記軽鎖または重鎖 CDR の何れか 1 つ以上は、1、2、3、4 もしくは 5 つまたはそれを超えるアミノ酸修飾（例えば、置換、挿入または欠失）を含有し得る。任意選択により、抗体 mAb 1 の抗原結合領域の一部または全てを含む軽鎖および/または重鎖可変領域の何れかが、ヒト Ig G 型の免疫グロブリン定常領域、任意選択により、ヒト定常領域、任意選択により、ヒト Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3 または Ig G 4 アイソタイプと融合され、任意選択により、エフェクター機能（ヒト Fc 受容体への結合）を低下させるためにアミノ酸置換をさらに含む抗体が提供される。

【0193】

別の態様において、表 A - 1 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 1 の HCDR 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 1 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 1 の HCDR 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 1 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 1 の HCDR 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 1 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 1 の LCDR 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 1 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 1 の LCDR 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 1 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 1 の LCDR 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体が提供される。

【 0 1 9 4 】

【 表 1 】

表A-1

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列番号	配列	配列 番号	配列
mAb1	Kabat	27	GGFAWN	30	YIGYGGSTSYNPSLNS	32	GDYLFAY
	Chotia	28	GYSITGGF		YGG	33	DYLFA
	IMGT	29	GYSITGGFA	31	IGYGGST	34	ARGDYLFAY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列番号	配列	配列 番号	配列
mAb1	Kabat	35	KASQDVNTA VA	38	SASYRYT	39	QQHYSTPRT
	Chotia	36	SQDVNTA		SAS	40	HYSTPR
	IMGT	37	QDVNTA		SAS	39	QQHYSTPRT

10

【 0 1 9 5 】

20

別の態様において、本発明は、表 A - 3 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 3 の H C D R 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 3 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 3 の H C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 3 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 3 の H C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 3 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 3 の L C D R 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 3 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 3 の L C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 3 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 3 の L C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

30

【 0 1 9 6 】

【表 2】

表A-3

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAb3	Kabat	27	GGFAWN	30	YIGYGGSTSYNPSLNS	32	GDYLFAY
	Chotia	28	GYSITGGF		YGG	33	DYLFA
	IMGT	29	GYSITGGFA	31	IGYGGST	34	ARGDYLFAY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAb3	Kabat	41	RASGNIHNYLA	44	NAKTLAD	45	QHFWSTPRT
	Chotia	42	SGNIHNY		NAK	46	FWSTPR
	IMGT	43	GNIHNY		NAK	45	QHFWSTPRT

10

【0197】

別の態様において、本発明は、表 A - 4 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 4 の HCDR1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 4 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 4 の HCDR2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 4 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 4 の HCDR3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 4 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 4 の LCDR1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 4 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 4 の LCDR2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 4 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAb 4 の LCDR3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0198】

【表 3】

表A-4

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAb4	Kabat	47	SYDMS	50	HIGSGGGNIYYPDTVKG	52	LIFTTGFYGM DY
	Chotia	48	GFAFSSY		S G G G	53	I F T T G F Y G M D
mAb	IMGT	49	GFAFSSYD	51	I G S G G G N I	54	A R I I F T T G F Y G M D Y
	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAb4	Kabat	55	RASQDISSYLN	58	YTSRLHS	59	QQGNALPWT
	Chotia	56	SQDISSY		YTS	60	GNALPW
	IMGT	57	QDISSY		YTS	59	QQGNALPWT

10

【0199】

別の態様において、本発明は、表 A - 5 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 5 の H C D R 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 5 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 5 の H C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 5 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 5 の H C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 5 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 5 の L C D R 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 5 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 5 の L C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 5 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b 5 の L C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0200】

【表 4】

表A-5

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAb5	Kabat	61	DYNMN	64	NIDPYYGATSYNQRFKG	66	GDSLFAFAY
	Chotia	62	GYSFSDY		PYYG	67	DSLFA
	IMGT	63	GYSFSDYN	65	IDPYYGAT	68	ARGDSLFAFAY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAb5	Kabat	69	KASQNVGINVA	72	SASSRYS	73	QQYIITYPYT
	Chotia	70	SQNVGTN		SAS	74	YITYPY
	IMGT	71	QNVGTN		SAS	73	QQYIITYPYT

10

【0201】

別の態様において、本発明は、表 A - 7 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbA の HCDR1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 7 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbA の HCDR2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 7 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbA の HCDR3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 7 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbA の LCDR1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 7 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbA の LCDR2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 7 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbA の LCDR3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0202】

【表5】

表A-7

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbA	Kabat	75	SYWMH	78	EINPSNGHTNYNEKFES	80	GVESYDFDDALDY
	Chotia	76	YFTFTSY		PSNG	81	VESYDFDDALD
	IMGT	77	YFTFTSYW	79	INPSNGHT	82	ANGVESYDFDDALDY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbA	Kabat	83	RASQDINNY LN	58	YTSRLIIS	86	QQGNTLPFT
	Chotia	84	SQDINNY		YTS	87	GNTLPF
	IMGT	85	QDINNY		YTS	86	QQGNTLPFT

10

【0203】

別の態様において、本発明は、表A-8に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbBのHCDR1領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-8に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbBのHCDR2領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-8に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbBのHCDR3領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-8に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbBのLCDR1領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-8に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbBのLCDR2領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-8に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbBのLCDR3領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0204】

【表 6】

表A-8

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbB	Kabat	75	SYWMH	90	EINPSNGHTNYNEKFKT	92	GVETYDFDDAMDY
	Chotia	88	VYTFTSY		PSNG	93	VETYDFDDAMD
	IMGT	89	VYTFTSYW	91	INPSNGHT	94	ANGVETYDFDDA MDY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbB	Kabat	83	RASQDINNYLN	95	FTSRLHS	96	QQGDTFPFT
	Chotia	84	SQDINNY		YTS	97	GDTFPF
	IMGT	85	QDINNY		FTS	96	QQGDTFPFT

10

【0205】

別の態様において、本発明は、表 A - 9 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b C の H C D R 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 9 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b C の H C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 9 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b C の H C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 9 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b C の L C D R 1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 9 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b C の L C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 9 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む m A b C の L C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0206】

【表 7】

表A-9

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbC	Kabat	98	NYEMN	101	WINTYTGESTYADDFK	103	DDYGRSYGFAY
	Chotia	99	GYTFINY		TYIG	104	DYGRSYGFA
	IMGT	100	GYTFTNVE	102	INTYTGES	105	VRDDYGRSYG FAY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbC	Kabat	106	RASESVDSYGN SFMH	109	LASKLES	110	HQNNEDPPWT
	Chotia	107	SESVDSYGNSE		LAS	111	NNEDPPW
	IMGT	108	ESVDSYGNSE		LAS	110	HQNNEDPPWT

10

【 0 2 0 7 】

20

別の態様において、本発明は、表 A - 10 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbD の HCDR1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 10 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbD の HCDR2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 10 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbD の HCDR3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 10 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbD の LCDR1 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 10 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbD の LCDR2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A - 10 に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の近接アミノ酸の配列を含む mAbD の LCDR3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の 1 つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

30

【 0 2 0 8 】

【表 8】

表A-10

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbD	Kabat	112	DYSMII	115	WIITETGEPTYADDFRG	117	DFDGY
	Chotia	113	GYTFTDY		TETG		FDG
	IMGT	114	GYTFTDYS	116	IITETGEP	118	ARDFDGY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbD	Kabat	119	RASENIYSYLA	122	NAKILIE	123	QHHYGFPWT
	Chotia	120	SENIYSY		NAK	124	HYGFPW
	IMGT	121	ENIYSY		NAK	123	QHHYGFPWT

10

【0209】

別の態様において、本発明は、表A-11に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbEのHCDR1領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-11に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbEのHCDR2領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-11に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbEのHCDR3領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-11に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbEのLCDR1領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-11に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbEのLCDR2領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-11に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbEのLCDR3領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0210】

【表 9】

表A-11

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbE	Kabat	125	TFGMH	128	YISSGSNAIYYADIVKGG	130	PGYGAWFAY
	Chotia	126	GFTFSTF		SGSN	131	GYGAWFA
	IMGT	127	GFTFSTFG	129	ISSGSNAI	132	ASPGYGAWFAY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbE	Kabat	133	RASSSVSSAYLH	136	STSNLAS	137	QQYSAYPYT
	Chotia	134	SSSVSSAY		STS	138	YSAYPY
	IMGT	135	SSVSSAY		STS	137	QQYSAYPYT

10

【0211】

別の態様において、本発明は、表A-12に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbFのHCDR1領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-12に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbFのHCDR2領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-12に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbFのHCDR3領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-12に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbFのLCDR1領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-12に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbFのLCDR2領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表A-12に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10個の近接アミノ酸の配列を含むmAbFのLCDR3領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸の1つ以上が欠失し得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。

20

30

【0212】

【表 10】

表A-12

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbF	Kabat	112	DYSMII	139	VISTYNGNTNYNQKFKG	141	RGYYGSSSWFGY
	Chotia	113	GYTFTDY		TYNG	142	GYYGSSSWFG
	IMGT	114	GYTFTDYS	140	ISTYNGNT	143	ARRGYGSSSW FGY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列
mAbF	Kabat	144	KASQNVGTDVA	147	SASYRYS	148	QQYNSFPYT
	Chotia	145	SQNVGTD		SAS	149	YNSFPY
	IMGT	146	QNVGTD		SAS	148	QQYNSFPYT

10

【0213】

本明細書中の実施形態の何れかの別の態様において、HCDR1、2、3およびLCDR1、2、3配列の何れかは、任意選択により、全てが（またはそれぞれ独立に）Kabat付番系（各CDRに対して表A-1～A-12に示されるとおり）のもの、Chotia付番系（各CDRに対して表A-1～A-12に示されるとおり）のもの、IMGT付番系（CDRに対して表A-1～A-12に示されるとおり）のものまたは何らかの他の適切な付番系のもので特定され得る。

20

【0214】

本明細書中の実施形態の何れかの別の態様において、mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5またはmAb6の重鎖および軽鎖のCDR1、2および3の何れも、その少なくとも4、5、6、7、8、9または10個の近接アミノ酸の配列、および/または対応する配列番号で挙げられる特定のCDRまたは一連のCDRと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有するものとして特徴付けられ得る。

30

【0215】

本発明の抗体の何れかにおいて、例えばmAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5またはmAb6において、特定される可変領域およびCDR配列は、配列修飾、例えば置換（1、2、3、4、5、6、7、8つまたはそれを超える配列修飾）を含み得る。ある実施形態において、重鎖および軽鎖のCDR1、2および/または3は、置換される残基が、ヒト起源の配列中に存在する残基である、1、2、3またはそれを超えるアミノ酸置換を含む。ある実施形態において、置換は保存的修飾である。保存的配列修飾は、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に顕著に影響しないかまたはこれを変化させないアミノ酸修飾を指す。このような保存的修飾としては、アミノ酸置換、付加および欠失が挙げられる。部位特異的突然変異誘発およびPCR介在性突然変異誘発など、当技術分野で公知の標準的技術によって本発明の抗体に修飾を導入し得る。保存的アミノ酸置換は、一般的には、アミノ酸残基が同様の物理化学的特性の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。特定される可変領域およびCDR配列は、1、2、3、4またはそれを超えるアミノ挿入、欠失または置換を含み得る。置換が行われる場合、好ましい置換は保存的修飾である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定められている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例

40

50

例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐状側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)があるアミノ酸を含む。したがって、本発明の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置換され得、改変された抗体は、本明細書中に記載のアッセイを用いて、保有される機能(すなわち本明細書中に記載の特性)について試験し得る。

【0216】

IMGT、KabataおよびChothia定義系によるCDRの配列を表A-1~A-12に要約する。本発明による抗体の可変領域の配列を以下の表Bに挙げる。本明細書中の何れかの実施形態において、シグナルペプチドまたはその何らかの部分を含みかまたは欠くように、VLまたはVH配列を指定し、付番し得る。

【0217】

ある実施形態において、本発明の抗体は、それらの結合および/または機能的特性を保有する抗体断片である。

【0218】

【表11】

表B

	配列番号:	アミノ酸配列
mAb1 VH	3	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQFPGNTLEWMGYIGYGGSTSYNPSLNSRISITRDTSKNHFLLQFNSVTTDDSATYYCARGDYLFAYWGQGTLVTVSA
mAb1 VL	4	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASRYTGVDPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPRTEFGGGTKLEIK
mAb2 VH	5	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQFPGNTLEWMGYIGYGGSTSYNPSLNSRISITRDTSKNHFLLQFNSVTTEDSATYYCARGDYLFAYWGQGLVTVSA
mAb2 VL	6	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASRYTGVDPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPRTEFGGGTKLEIK
mAb3 VH	7	EVQLLETGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQFPGNTLEWMGYIGYGGSTSYNPSLNSRISITRDTSKNHFLLQFNSVTTEDSATYYCARGDYLFAYWGQGLVTVSA
mAb3 VL	8	DILMTQSPASLSASVGETVSTCRASGNIHNYLAWYLQRQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGTGSGTQFSLKINSLPEDFGSYQCQHFWSTPRTEFGGGTKLEIK
mAb4 VH	9	DVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQSPEKRLIEWIAHIGSGGNIYYPDIVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLKSEDTAMYYCARLIFTTGFYGM DYWGQGTSVTVSS
mAb4 VL	10	DIQMTQTTSSLSASLGDRTVITCRASQDISSYLNWYQQKPDGTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQDDIATYFCQQGNALPWTEFGGGTKLEIK
mAb5 VH	11	EIQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFSDYNMNWVKQSNGKSLEWIGNIDPY YGATSYNQRFKGGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGDSIFAYWGHGTLVTVSA
mAb5 VL	12	DIVMTQSQEFMSTSLGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALLYASSR YSGVDPDRFTGSGSGTDFLTLISNVQSEDLAEYFCQQYITYPYTFGGGTKLEIK

【0219】

10

20

30

40

【表 1 2】

mAb6 VH	13	EIQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFSDYMNWVKQSNKGKLEWIGNIDPY YGATSYNQRFKGGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVVYFCARGDSLFAFWGQ GILVTVSA	
mAb6 VL	14	DIVMIQSQLEFMSTISLGDRVSVTCKASQNVGTVVAWYQQKPGQSPKALLYSASSR YSGVPRDFTGSGSGDFTLTINNMQSEDLAEYFCQQYTIYPYTFGGGKLEIK	
mAbA VH	15	QVQLQQPGAELVKPGSPVKLSCKASYFTFTSYWMHWVRQRPQGQGLEWIGEINPS NGHTNYNEKFKSKATLTVDRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVFYCANGVESYDFDDAL DYWGQGTSTVTVSS	
mAbA VL	16	DIQMTQTSSISASLGDRTVISCRAEQDINNYLNWYQQKPDGTIKLLIYYTSRL IISGVPSRFRSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFCQQGNTLPFTFGGGKLEIK	10
mAbB VH	17	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASVYFTFTSYWMHWVQRPGQGLEWIGEINPS NGHTNYNEKFKTKAKLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVFYCANGVETDFDDA MDYWGQGTSTVTVSS	
mAbB VL	18	DIQMTQTSSLSASLGDRTVISCRAEQDINNYLNWYQQKPDGTIKLLIYFTSRL HSGVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPFTFGGGKLEIK	
mAbC VH	19	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYEMNWVKEAPGKGLKWMGWINTY TGSTYADDFKGRFAFSLETSASTVYLQINNLKDEDVATYFCVRRDDYGRSYGFAY WGQGTSLVTVSA	
mAbC VL	20	NIVLTQSPASLTISLQQRANISCRASESVDSYGNFMHWYQQKPGQPPKLLIYL ASKLESGVPRFSGSGSRDFTLTIDPVETDDAATYYCHQNEDPPWTFGGGKLEIK	20
mAbD VH	21	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTDYSMHVWVQAPGKGLKWMGWIITE TGEPTYADDFRGRFAFSLETSANTAYLQINNLKDEDVATYFCARDFDGYWGQGT LTVSS	
mAbD VL	22	DILMTQSPASLSASVGETVITTCRASENIYSYLAWYQQKRGKSPQFLVYNAKTL TEGVPSRFRGSGSGTQFSIKINSLQPEDFGTYCYQHYYGFPWTFGGGKLEIK	
mAbE VH	23	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFTFTGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSG SNAIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCASPGYGAWFAFW GQGTSLVTVSA	
mAbE VL	24	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSSAYLIHWYQQKSGASPKLWIYSTSN LASGVPRFSGSGSGTISYSLIISVVEAEDAATYYCQQYSAYPYTFGGGKLEIK	30
mAbF VH	25	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYFTFTDYSMHVWVQSHAKSLEWIGVISTY NGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARRGYYGSSSWF GYWGQGTSLVTVSA	
mAbF VL	26	DIVMTQSQKFMSTISVGDRTVSVTCKASQNVGTDVAWYQQKPGQSPKALLYSASYR YSGVPRDFTGSGSGADFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSFPYTFGGGKLEIK	

【0220】

抗体処方物

1 mg / mL ~ 500 mg / mL の濃度で含む医薬処方物中に抗 S i g l e c 抗体が組み込まれ得、前記処方物の pH は 2 . 0 ~ 10 . 0 である。本処方物は、緩衝液系、保存剤、等張化剤、キレート剤、安定化剤および界面活性剤をさらに含む得る。ある実施形態において、医薬処方物は、水性処方物、すなわち水を含む処方物である。このような処方物は、一般に溶液または懸濁液である。さらなる実施形態において、本医薬処方物は水性溶液である。「水性処方物」という用語は、少なくとも 50 % w / w の水を含む処方物として定義される。同様に「水溶液」という用語は、少なくとも 50 % w / w の水を含む溶液として定義され、「水性懸濁液」という用語は、少なくとも 50 % w / w の水を含む懸濁液として定義される。

【0221】

別の実施形態において、本医薬処方物は、凍結乾燥処方物であり、医師または患者が使

10

20

30

40

50

用前にそれに溶媒および/または希釈剤を添加する。

【0222】

別の実施形態において、本医薬処方物は、事前に溶解する必要がない使用準備済みの乾燥処方物（例えば、凍結乾燥または噴霧乾燥）である。

【0223】

さらなる態様において、本医薬処方物は、このような抗体の水溶液および緩衝液を含み、この抗体は1mg/mLまたはそれを超える濃度で存在し、前記処方物のpHは約2.0~約10.0である。

【0224】

別の実施形態において、本処方物のpHは、約2.0~約10.0、約3.0~約9.0、約4.0~約8.5、約5.0~約8.0および約5.5~約7.5からなる一覧から選択される範囲である。

【0225】

さらなる実施形態において、緩衝液は、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびトリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン、ピシン、トリシン、リンゴ酸、コハク酸塩、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸またはこれらの混合物からなる群から選択される。これらの具体的な各緩衝液は、本発明の代替的な実施形態を構成する。

【0226】

さらなる実施形態において、本処方物は、薬学的に許容可能な保存剤をさらに含む。さらなる実施形態において、本処方物は等張剤をさらに含む。さらなる実施形態において、本処方物はキレート剤も含む。本発明のさらなる実施形態において、本処方物は安定化剤をさらに含む。さらなる実施形態において、本処方物は界面活性剤をさらに含む。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995を参照する。

【0227】

本発明のペプチド医薬処方物中に他の成分が存在し得る可能性がある。このようなさらなる成分としては、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、充填剤、等張性調節剤、キレート剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質）および双性イオン（例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リジンおよびヒスチジンなどのアミノ酸）が挙げられ得る。このようなさらなる成分は、当然ではあるが本発明の医薬処方物の全体的な安定性に悪影響を与えるべきではない。

【0228】

本発明による抗体を含有する医薬組成物は、いくつかの部位、例えば局所部位、例えば皮膚および粘膜部位、吸収を迂回する部位、例えば動脈における、静脈における、心臓における投与、および吸収を含む部位、例えば皮膚、皮下における、筋肉における、または腹部における投与において、このような処置を必要とする患者に投与し得る。本発明による医薬組成物の投与は、このような処置を必要とする患者への、いくつかの投与経路を通じて、例えば皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、舌、舌下、頬側、口腔における投与、経口、胃腸における投与、鼻腔、肺、例えば細気管支および肺胞またはそれらの組み合わせを通じた投与、上皮、真皮、経皮、膻、直腸、眼、例えば結膜を通じた投与、ウレタール（uretal）および非経口投与であり得る。

【0229】

適切な抗体処方物は、他の既に関連されている治療用モノクローナル抗体での経験を調べることによって決定し得る。いくつかのモノクローナル抗体は、リツキサ（リツキシマブ）、ハーセプチン（トラスツズマブ）、ゾーレア（オマリズマブ）、ベクザー（トシツモマブ）、キャンパス（アレムツズマブ）、ゼパリン、オンコリム（Oncolymp）など、臨床的状況で有効であることが示されており、本発明の抗体と共に同様の処方物を使用し得る。例えば、モノクローナル抗体は、100mg（10mL）または500m

10

20

30

40

50

g (5 0 m L) の何れかの単回使用バイアルで、 9 . 0 m g / m L 塩化ナトリウム、 7 . 3 5 m g / m L クエン酸ナトリウム二水和物、 0 . 7 m g / m L ポリソルベート 8 0 および注射用の滅菌水中で I V 投与用に処方された 1 0 m g / m L の濃度で供給され得る。 p H は 6 . 5 に調整する。別の実施形態において、本抗体は、 p H が 6 . 0 の約 2 0 m M クエン酸 N a 、 約 1 5 0 m M N a C l を含む処方物中で供給される。

【 0 2 3 0 】

悪性腫瘍の診断および処置

本明細書中に記載のような抗 S i g l e c 抗体を使用して、個体、とりわけヒト患者を処置する方法も提供される。ある実施形態において、本発明は、ヒト患者への投与のための医薬組成物の調製における本明細書中に記載のような抗体の使用を提供する。一般的には、患者は、癌または感染性疾患、例えば細菌性またはウイルス性疾患に罹患しているか、またはそのリスクがある。

10

【 0 2 3 1 】

例えば、ある態様において、本発明は、 S i g l e c - 7 および / または - 9 限定免疫細胞、例えばリンパ球の活性の増強を、それを必要とする患者において行う方法を提供し、この方法は、中和抗 S i g l e c 7 および / または 9 抗体を前記患者に投与するステップを含む。本抗体は、例えばヒトまたはヒト化抗 S i g l e c - 7 および / または 9 抗体であり得、この抗体は、 S i g l e c - 7 および / または - 9 受容体のシアル酸介在性活性化を低下させるかまたは妨害する。ある実施形態において、本方法は、リンパ球（例えば、 N K および / または C D 8 + T 細胞）活性の向上が有益である疾患を有する患者においてこのようなリンパ球の活性を向上させることを対象とし、この疾患は、 N K もしくは C D 8 + T 細胞による溶解の影響を受け易い細胞を含むか、このような細胞に影響を与えるか、またはこのような細胞により引き起こされ、または不十分な N K もしくは C D 8 + T 細胞活性により引き起こされるかまたは不十分な N K もしくは C D 8 + T 細胞活性によって特徴付けられ、例えば癌または感染性疾患である。例えば、ある態様において、本発明は、 S i g l e c - 7 および / または - 9 限定免疫細胞、例えば N K 細胞（例えば、 C D 5 6 ^{b r i g h t} 細胞）、 T 細胞、単球、樹状細胞、マクロファージ（例えば、免疫抑制または M 2 マクロファージ）の活性（例えば、細胞活性化、抗腫瘍免疫または活性、サイトカイン産生、増殖）の増強を、それを必要とする患者において行う方法であって、本開示の中和抗 S i g l e c 7 および / または - 9 抗体を前記患者に投与するステップを含む方法を提供する。

20

30

【 0 2 3 2 】

ある実施形態において、本開示の抗体は、 S T 3 G A L 6 および / もしくは S T 3 G A L 1 酵素（または例えば高レベルの S T 3 G A L 6 および / もしくは S T 3 G A L 1 酵素活性）の発現、任意選択により、 S T 3 G A L 6 酵素の過発現（健常個体における、例えば健常組織における発現と比較して）によって特徴付けられる腫瘍の処置において使用される。

【 0 2 3 3 】

より具体的に、本明細書中における方法および組成物は、様々な癌および他の増殖性疾患の処置のために利用される。これらの方法は、リンパ球上の阻害受容体の阻止を介して免疫反応を促進することにより効果を発揮するため、これらは癌の非常に広い範囲に適用可能である。ある実施形態において、本開示の抗 S i g l e c 抗体で処置されるヒト患者は、肝臓癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌（例えば、 H N S C C ）、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌（ N S C L C ）、去勢抵抗性前立腺癌（ C R P C ）、メラノーマ、子宮癌、結腸癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児期の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系（ C N S ）の新生物、原発性 C N S リンパ腫、腫瘍の血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、アスベストにより誘導されるもの

40

50

を含む環境誘導性の癌、例えば多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫/縦隔原発性B細胞性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、菌状息肉腫、未分化大細胞型リンパ腫、T細胞リンパ腫および前駆Tリンパ芽球性リンパ腫を含む血液系悪性腫瘍および前記癌の何れかの組み合わせを有する。本発明は転移性癌の処置にも適用可能である。患者は、処置前、処置中または処置後に、上記臨床特性の1つ以上に対して試験または選択され得る。

【0234】

抗*Siglec*抗体に基づく処置は、好ましくはウイルス、細菌、原生動物、カビまたは真菌による感染によって引き起こされる何らかの感染を含む感染性疾患を処置または予防するためにも使用され得る。このようなウイルス感染性生物としては、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I型単純ヘルペス(HSV-1)、2型単純ヘルペス(HSV-2)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器多核体ウイルス、パピローマウイルス、パピローマウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルポウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルスおよびI型または2型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1、HIV-2)が挙げられるが限定されない。細菌は、次のものを含むが限定されない感染生物の別の好ましいクラスを構成する：ブドウ球菌(*Staphylococcus*)；*S.ピオゲネス*(*S. pyogenes*)を含む連鎖球菌(*Streptococcus*)；エンテロコッカス(*Enterococcus*)；パチルス・アンスラシス(*Bacillus anthracis*)を含むパチルス(*Bacillus*)およびラクトパチルス(*Lactobacillus*)；リステリア(*Listeria*)；コリネバクテリウム・ジフテリア(*Corynebacterium diphtheriae*)；*G.バジナリス*(*G. vaginalis*)を含むガルドネラ(*Gardnerella*)；ノカルジア(*Nocardia*)；ストレプトマイセス(*Streptomyces*)；サーモアクチノマイセス・ブルガリス(*Thermoactinomyces vulgaris*)；トレポネーマ(*Treponema*)；カンピロバクター(*Campylobacter*)、*P.エルギノーサ*(*P. aeruginosa*)を含むシュードモナス(*Pseudomonas*)；レジオネラ(*Legionella*)；*N.ゴノローエ*(*N. gonorrhoeae*)および*N.メニンギティディス*(*N. meningitidis*)を含むナイセリア(*Neisseria*)；*F.メニンゴセプチクム*(*F. meningosepticum*)および*F.オドラツルン*(*F. odoratum*)を含むフラボバクテリウム(*Flavobacterium*)；ブルセラ(*Bruceella*)；*B.ペルツシス*(*B. pertussis*)および*B.ブロンキセプチカ*(*B. bronchiseptica*)を含むボルデテラ(*Bordetella*)；大腸菌(*E. coli*)を含むエシェリキア(*Escherichia*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)；エンテロバクター(*Enterobacter*)、*S.マルセツセス*(*S. marcescens*)および*S.リケファシエンス*(*S. liquefaciens*)を含むセラチア(*Serratia*)；エドワージェラ(*Edwardsiella*)；*P.ミラビリス*(*P. mirabilis*)および*P.ブルガリス*(*P. vulgaris*)を含むプロテウス(*Proteus*)；ストレプトバチルス(*Streptobacillus*)；*R.フィケツフィ*(*R. fickettsii*)を含むリケッチア科(*Rickettsiaceae*)、*C.シタツシ*(*C. psittaci*)および*C.トラコルナチス*(*C. trachornatis*)を含むクラミジア(*Chlamydia*)；*M.ツベルクローシス*(*M. tuberculosis*)、*M.イントラセルラーレ*(*M. intracellularis*)、*M.ホルイツルン*(*M. foliiturn*)、*M.ラブレ*(*M. laprae*)、*M.アビウム*(*M. avium*)、*M.ボビス*(*M. bovis*)、*M.アフリカヌム*(*M. africanum*)、*M.カンサッシ*(*M. kansasii*)、*M.*

10

20

30

40

50

イントラセラーレ (M. intracellulare) および M. レプラエルヌリウム (M. lepraerium) を含むマイコバクテリウム (Mycobacterium); およびノカルジア (Nocardia)。原生動物としては、リーシュマニア (Leishmania)、コクジディオア (Coccidioides) およびトリパノソーマ (Trypanosoma) が挙げられ得るが限定されない。寄生虫としては、クラミジア (Chlamydia) およびリケッチア (Rickettsia) が挙げられるが限定されない。

【0235】

抗体組成物は、個体が発現する対立遺伝子における Siglec-9 の 100 位 (配列番号 2 を参照されたい) または Siglec-7 (配列番号 1 を参照されたい) の 104 位に存在する残基にかかわらず、個体を処置するために使用され得る。100 位にリシンを有する Siglec-9 (例えば、配列番号 2) は集団の約 49% を表し、100 位にグルタミン酸を有する Siglec-9 (例えば、配列番号 160) は、集団の約 36% を表す。一実施形態において、抗体組成物は、Siglec-9 (配列番号 2 を参照されたい) の位置 100 にリシンを有する個体および Siglec-9 の位置 100 にグルタミン酸を有する個体を処置するために使用される。ある実施形態において、その細胞 (例えば、NK 細胞、好中球など) が Siglec-9 の 100 位 (配列番号 2 を参照されたい) にリシンを発現する個体、およびその細胞が Siglec-9 の 100 位にグルタミン酸を発現する個体を処置するために同一の投与計画が用いられる。ある実施形態において、投与計画は、個体において発現される MICA の特定の対立遺伝子に関係なく、同一の投与様式、同一の用量および同一の投与頻度を含む。

10

20

【0236】

本抗体組成物は、単剤療法において、またはその抗体が投与されている特定の治療目的のために通常利用される薬剤を含む 1 つ以上の他の治療剤との併用処置において使用され得る。さらなる治療剤は、通常、処置されている特定の疾患または状態に対する単剤療法においてその薬剤に対して一般的に使用される量および治療計画で投与される。このような治療剤としては、抗癌剤および化学療法剤が挙げられるが限定されない。

【0237】

ある実施形態において、抗 Siglec-9 および / または -7 中和抗体は、ヒト CD16 への結合を欠くが、CD16 発現エフェクター細胞 (例えば、NK またはエフェクター T 細胞) の活性を増強する。したがって、ある実施形態において、第 2 のまたはさらなる第 2 の治療薬は、(例えば、NK 細胞によって発現される CD16 を介して) それが発結合している細胞に対して ADCC を誘導することができる抗体または他の Fc ドメイン含有タンパク質である。一般的には、このような抗体または他のタンパク質は、目的の抗原、例えば腫瘍細胞上に存在する抗原 (腫瘍抗原)、および Fc ドメインまたはその一部に結合するドメインを含み、Fc ドメインを介した抗原結合ドメインおよび Fc 受容体 (例えば、CD16) への結合を示す。ある実施形態において、その ADCC 活性は、少なくとも部分的に CD16 によって媒介される。ある実施形態において、さらなる治療薬は、天然または改変ヒト Fc ドメイン、例えばヒト IgG1 または IgG3 抗体由来の Fc ドメインを有する抗体である。「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」または「ADCC」という用語は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、Fc 受容体 (FcR) を発現する非特異的細胞傷害性細胞が標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を指す。ADCC を媒介する非特異的細胞傷害性細胞には、ナチュラルキラー (NK) 細胞、マクロファージ、単球、好中球および好酸球が含まれる。「ADCC 誘導抗体」という用語は、当業者に公知のアッセイによって測定される ADCC を示す抗体を指す。そのような活性は、典型的には、Fc 領域の様々な FcR との結合によって特徴付けられる。いかなる特定の機構によっても限定されるものではないが、当業者は、抗体が ADCC を示す能力が、例えば、そのサブクラス (IgG1 または IgG3 など) による、Fc 領域に導入された突然変異による、または抗体の Fc 領域における糖パターンの改変によるものであり得ることを認識するであろう。ADCC を誘発

30

40

50

する抗体の例には、リツキシマブ（リンパ腫、CLLの処置用、トラスツズマブ（乳癌の処置用）、アレムツズマブ（慢性リンパ球性白血病の処置用）およびセツキシマブ（結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮癌の処置用）が挙げられる。ADCC増強抗体の例としては、GA-101（低フコシル化抗CD20）、margetuximab（Fc増強抗HER2）、メボリズマブ、MEDI-551（Fc操作抗CD19）、オビヌツズマブ（糖操作/低フコシル化抗CD20）、オカラツズマブ（Fc操作抗CD20）、XmAb（登録商標）5574/MOR208（Fc操作抗CD19）が挙げられるが限定されない。

【0238】

ある実施形態において、抗Siglec-9および/または-7中和抗体は、ヒトPD-1の阻害活性（例えば、PD-1とPD-L1との間の相互作用を阻害する）を中和する薬剤の有効性を、とりわけヒトPD-1の阻害活性を中和する薬剤による処置に対する応答が弱い（または敏感でない）個人において増強する。抗Siglec-9および/または-7中和抗体は、PD-1発現エフェクター細胞（例えば、NKまたはエフェクターT細胞、例えばSiglec-9発現NK細胞）の活性を増強するために有用であり得る。したがって、ある実施形態において、第2のまたはさらなる第2の治療剤は、ヒトPD-1の阻害活性を中和する抗体または他の薬剤である。

【0239】

プログラム死1（PD-1）（「プログラム細胞死1」とも呼ばれる）は、CD28ファミリーの受容体の阻害性メンバーである。完全なヒトPD-1配列は、GenBank受入番号U64863に見出すことができる。PD-1の阻害活性の阻害または中和は、PD-L1誘導PD-1シグナル伝達を妨げるポリペプチド剤（例えば、抗体、Fcドメインに融合したポリペプチド、イムノアドヘシンなど）の使用を含み得る。現在、市販または臨床評価中のPD-1/PD-L1経路を阻止する少なくとも6つの薬剤が存在する。1つの薬剤は、BMS-936558（ニボルマブ/ONO-4538、Bristol-Myers Squibb、以前はMDX-1106）である。ニボルマブ（商品名Opdivo（登録商標））は、PD-1およびCD80の両方へのPD-L1リガンドの結合を阻害するFDA認可完全ヒトIgG4抗PD-L1mAbであり、国際公開第2006/121168号パンフレットにおいて抗体5C4として記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。メラノーマ患者では、3mg/kgの用量で最も有意なORが観察されたが、他の癌のタイプでは10mg/kgであった。ニボルマブは、一般に癌の進行まで3週間ごとに10mg/kgで投与される。「ヒトPD-1の阻害活性を低下させる」、「PD-1を中和する」または「ヒトPD-1の阻害活性を中和する」という用語と、PD-1が、PD-1と、PD-L1またはPD-L2などの1つ以上のその結合パートナーとの間の相互作用から生じるシグナル伝達能力において阻害される過程を指す。PD-1の阻害活性を中和する薬剤は、PD-1と、PD-L1、PD-L2などのその結合パートナーの1つ以上との間の相互作用に起因するシグナル伝達を減少、阻止、阻害または抑制する。したがって、このような薬剤は、増殖、サイトカイン産生および/または細胞傷害性などのT細胞エフェクター機能を増強するように、Tリンパ球上に発現される細胞表面タンパク質によって媒介されるかまたはそれを介した負の共刺激シグナルを減少させることができる。

【0240】

ランプロリズマブまたはペンプロリズマブ（商品名Keytruda（登録商標））とも呼ばれるMK-3475（Merck社製ヒトIgG4抗PD1mAb）は、メラノーマの治療のためにFDAによって承認され、他の癌において試験されている。ペンプロリズマブは、疾患の進行まで2週間または3週間ごとに2mg/kgまたは10mg/kgで試験した。ヒト化抗体h409の重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNA構築物である。全てがAmerican Type Culture Collection Patent Depository（10801 University Blvd.、Manassas、VA）に寄託されている。h409A-1の重鎖をコードするDNAを含むプラスミドは2008年6月9日に寄託され、081469__SPD-Hと

10

20

30

40

50

して同定され、h409A1 1の軽鎖をコードするDNAを含むプラスミドは2008年6月9日に寄託され、0801470__SPD-L-1 1として同定された。Merck3745またはSCH-900475としても知られているMK-3475は、国際公開第2009/114335号パンフレットにも記載されている。

【0241】

MPDL3280A/RG7446 (Roche/Genentech社製、抗PD-L1)は、FcR結合およびその結果としての抗体依存性細胞傷害(ADCC)を最小限に抑えることによって効力および安全性を最適化するように設計された、操作されたFcドメインを含むヒト抗PD-L1mAbである。1、10、15、および25mg/kg以下の用量のMPDL3280Aを3週間ごとに最高1年間投与した。第3相試験では、MPDL3280AをNSCLCにおいて3週間ごとに静脈内注入により1200mgで投与する。

10

【0242】

AMP-224 (AmplimmuneおよびGSK)は、Fcドメインに融合したPD-L2細胞外ドメインを含むイムノアドヘシンである。PD-1を中和する薬剤の他の例は、PD-L2に結合する抗体(抗PD-L2抗体)を含み得、PD-1とPD-L2との間の相互作用を阻止する。

【0243】

ピディリズマブ(CT-011; CureTech) (CureTech/Teva社製ヒト化IgG1抗PD1mAb)、ピディリズマブ(CT-011; CureTech) (例えば、国際公開第2009/101611号パンフレットを参照されたい)は別の例である。薬剤はリツキシマブ感受性再発性FLを有する30人の患者において試験され、患者は、4週間ごとの3mg/kgでの静脈内CT-011の4回にわたる注入に、CT-011の最初の注入の2週間後に始まって毎週375mg/m²で4週間にわたり投与されるリツキシマブを組み合わせて処置された。

20

【0244】

さらなる公知のPD-1抗体および他のPD-1阻害剤としては、AMP-224 (GSKにライセンスされたB7-DC/IgG1融合タンパク質)、国際公開第2012/145493号パンフレットに記載のAMP-514、国際公開第2011/066389号パンフレットおよび米国特許出願公開第2013/034559号明細書に記載の抗体MED1-4736 (AstraZeneca/Medimmuneにより開発された抗PD-L1)、国際公開第2010/077634号パンフレットに記載の抗体YW243.55.S70 (抗PD-L1)、BMS-936559としても知られているMDX-1105は、国際公開第2007/005874号パンフレットに記載のBristol-Myers Squibbにより開発された抗PD-L1抗体、および国際公開第2006/121168号パンフレット、国際公開第2009/014708号パンフレット、国際公開第2009/114335号パンフレットおよび国際公開第2013/019906号パンフレットに記載の抗体および阻害剤が挙げられ、これらの開示は参照により本明細書中に組み込まれる。抗PD1抗体のさらなる例は、国際公開第2015/085847号パンフレット (Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co. Ltd.) に開示されており、例えばそれぞれ配列番号6、配列番号7および/または配列番号8の軽鎖可変ドメインCDR1、2および3、ならびにそれぞれ配列番号3、配列番号4または配列番号5の抗体重鎖可変ドメインCDR1、2および3を有する抗体であり、配列番号は国際公開第2015/085847号パンフレットに従った付番であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。PD-1またはPD-L1への結合についてこれらの抗体の何れかと競合する抗体も使用することができる。

30

40

【0245】

代表的な抗PD-1抗体は、ペンプロリズマブである (例えば、参照により本明細書中に組み込まれる国際公開第2009/114335号パンフレットを参照されたい)。抗PD-1抗体は、ATCCに081469__SPD-Hとして寄託されたDNAによって

50

コードされる重鎖可変領域、およびATCCに0801470__SPD-L11として寄託されたDNAによってコードされる軽鎖可変領域を含む、国際公開第2008/156712号パンフレットの抗体h409A1であり得る。他の実施形態において、抗体は、ペンブロリズマブの重鎖および軽鎖のCDRまたは可変領域を含む。したがって、ある実施形態において、抗体は、ATCCに081469__SPD-Hとして寄託されたDNAによってコードされるペンブロリズマブのVHのCDR1、CDR2、およびCDR3ドメイン、ならびにATCCに0801470__SPD-L-1として寄託されたDNAによってコードされるペンブロリズマブのVLのCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインを含む。

【0246】

いくつかの実施形態において、PD-1中和剤は、PD-L1のPD-1への結合を阻害する抗PD-L1mAbである。いくつかの実施形態において、PD-1中和剤は、PD-1のPD-L1への結合を阻害する抗PD1mAbである。いくつかの実施形態では、PD-1中和剤は、イムノアドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列のFc領域）に融合したPD-L1またはPD-L2の細胞外またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシンである。

【0247】

処置方法において、抗Siglec抗体および第2の治療剤は、個別に、一緒に、または連続して、またはカクテルにして投与し得る。いくつかの実施形態において、本抗原結合化合物は、第2の治療剤の投与前に投与される。例えば、抗Siglec抗体は、第2の治療剤の投与のおよそ0~30日前に投与し得る。いくつかの実施形態において、Siglec結合化合物は、第2の治療剤の投与の、約30分~約2週間、約30分~約1週間、約1時間~約2時間、約2時間~約4時間、約4時間~約6時間、約6時間~約8時間、約8時間~1日または約1~5日前に投与する。いくつかの実施形態において、抗Siglec抗体は、治療剤の投与と同時に投与する。いくつかの実施形態において、抗Siglec抗体は、第2の治療剤の投与後に投与する。例えば、抗Siglec抗体は、第2の治療剤の投与からおよそ0~30日後に投与し得る。いくつかの実施形態において、抗Siglec抗体は、第2の治療剤の投与から、約30分~約2週間、約30分~約1週間、約1時間~約2時間、約2時間~約4時間、約4時間~約6時間、約6時間~約8時間、約8時間~1日または約1~5日後に投与する。

【0248】

他の態様において、Siglec-7+および/またはSiglec-9+NK細胞および/またはT細胞、例えばCD8T細胞、CD56^{bright}NK細胞、CD56^{dim}NK細胞を同定するための方法が提供される。NK細胞および/またはT細胞上でのSiglec-7および/またはSiglec-9の同時発現を評価することは、診断または予測法において使用し得る。例えば、生体試料は、個体から（例えば、血液試料から、癌患者から得られる癌または癌隣接組織から）得ることができ、Siglec-7および/またはSiglec-9+NKおよび/またはT細胞の存在について分析し得る。このような細胞上でのSiglec-9の発現は、例えば、NKおよび/またはT細胞、例えばSiglec-9ポリペプチドにより阻害される腫瘍浸潤性NKおよび/またはT細胞を有する個体を同定するために使用し得る。このような細胞上でのSiglec-7およびSiglec-9の両方の発現は、例えば、NKおよび/またはT細胞、例えばSiglec-7およびSiglec-9の両方のポリペプチドにより阻害される腫瘍浸潤性NKおよび/またはT細胞を有する個体を同定するために使用し得る。本方法は、例えば、Siglec-7および/またはSiglec-9を中和する薬剤での処置に対する反応についての予測として有用であり得る。そのような細胞上のSiglec-9（および任意選択により、さらなるSiglec-7）の発現は、本開示の抗体での処置に適した個体を示し得る。

【0249】

特定の任意選択的な態様において、Siglec-7および/またはSiglec-9

10

20

30

40

50

に対する天然リガンドの腫瘍試料（例えば、腫瘍組織および/または腫瘍隣接組織）中での存在を評価することにより、抗 S i g - l e c - 7 および/または - 9 抗体での処置について患者を同定し得る。本明細書中での治療用途または癌治療または予防方法の何れかのある実施形態において、個体における癌の処置または予防は、

a) 癌を有する個体内の悪性細胞（例えば、腫瘍細胞）が S i g l e c - 7 のリガンドおよび/または S i g l e c - 9 のリガンドを発現するか否かを決定することと、

b) 悪性細胞（例えば、腫瘍細胞）（の例えば表面上）により S i g l e c - 7 のリガンドおよび/または S i g l e c - 9 のリガンドが顕著に発現されると判定されたら、それぞれの抗 S i g l e c 7 および/または - 9 抗体、例えば本開示の何れかの態様に従う抗体をその個体に投与することと

を含む。

【0250】

ある実施形態において、生体試料（例えば、腫瘍細胞、腫瘍組織および/または腫瘍隣接組織を含む試料）が主に S i g l e c - 7 のリガンドおよび/または S i g l e c - 9 のリガンドを発現するという判定から、それぞれ S i g l e c - 7 および/または S i g l e c - 9 ポリペプチドを阻害する抗体でその個体を処置し得る、および/またはそれにより利益を受け得る癌をその個体が有することが示される。

【0251】

ある実施形態において、S i g l e c - 7 のリガンドおよび/または S i g l e c - 9 のリガンドの顕著な発現は、特定の個体から採取される相当数の腫瘍細胞において前記リガンドが発現されることを意味する。正確なパーセンテージ値により拘束されない一方で、一部の例において、患者から採取される腫瘍細胞（試料中）の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%またはそれを超えて存在する場合、リガンドが「顕著に発現される」と言われ得る。

【0252】

本方法の何れかのある実施形態において、癌を有する個体内の悪性細胞（例えば、腫瘍細胞）が S i g l e c - 7 および/または S i g l e c - 9 のリガンドを発現するか否かを判定することは、生体試料中の悪性細胞上での S i g l e c - 7 のリガンドおよび/または S i g l e c - 9 のリガンドの発現レベルを決定することおよびそのレベルを参照レベル（例えば、値、弱いかまたは強い細胞表面染色など）と比較することを含む。参照レベルは、例えば、健常個体、抗 S i g l e c での処置から引き出せる臨床的便益がないかもしくは低い個体または抗 S i g l e c 抗体での処置から引き出せる臨床的便益がかなり大きい個体に対応し得る。生体試料が、上昇しているレベル（例えば、高値、強い表面染色、抗 S i g l e c 抗体での処置から引き出せる臨床的利益が相当なものである個体のものに対応するレベル、抗 S i g l e c 抗体での処置から引き出せる臨床的便益がないか/低い個体のものに対応するものより高いレベルなど）で S i g l e c - 7 のリガンドおよび/または S i g l e c - 9 のリガンドを発現するという判定は、その個体が抗 S i g l e c 抗体で処置し得る癌を有することを示す。

【実施例】

【0253】

実施例1：S i g l e c - 7 および S i g l e c - 9 の両方を同時発現するヒトNK細胞サブセット

C D 3 3 関連 S i g l e c の中でも、S i g l e c - 7 (C D 3 2 8) および S i g l e c - 9 (C D 3 2 9) は、癌細胞により過剰発現されるグリカンを含め、シアル酸に対する結合の特性を共有し、それらが発現される免疫細胞において阻害受容体として機能すると考えられる。リンパ球上での S i g l e c の発現を調べるために、ヒトNK細胞上での S i g l e c - 7 および S i g l e c - 9 の分布を調べた。

【0254】

ヒトドナーから精製された新鮮なNK細胞上でのフローサイトメトリーにより、NK細胞上での S i g l e c - 7 および S i g l e c - 9 発現を判定した。NK集団は、C D 3

10

20

30

40

50

- CD56+細胞と判定した(抗CD3 Pacific blue-BD Pharmingen #558124;抗CD56-PE-Vio770-Milteny #130100676)。抗Siglec-7抗体(クローン194211-IgG1 APC-R&D Systems #FAB11381A)、抗Siglec-9抗体(クローン191240-IgG2A PE-R&D Systems #FAB1139P)およびアイソタイプ対照IgG1 APCおよびIgG2A APCを使用した。50μLの染色Ab混合液と共にNK細胞を30分間温置し、染色緩衝液で2回洗浄し、Canto II(HTS)で蛍光を明らかにした。

【0255】

結果を図1に示す。代表的な結果を示す。MFI:蛍光強度の平均。NK細胞のかなりの割合(約44%)がSiglec-7およびSiglec-9の両方を発現し、このことから、NK細胞の大部分が、例えば腫瘍細胞上に存在するグリカンリガンドの機能として、これらの受容体のそれぞれ(または両方)によって阻害され得ることが示唆される。

10

【0256】

実施例2:抗Siglec抗体の作製

抗ヒトSiglec-7およびSiglec-9抗体を得るために、ヒトSiglec-7 FcおよびヒトSiglec-9 Fc細胞外ドメイン組み換えタンパク質を用いてBalb/cマウスに免疫付与を行った。2つの異なる免疫化を行った。

【0257】

Siglec-7 FcおよびSiglec-9 Fcタンパク質を用いた第1回目の免疫化において、マウスに対して、30μgの各タンパク質および完全フロインドアジュバントの乳液の腹腔内への2回の注射を行った。次いで、7.5μgの各タンパク質をマウスに静脈内投与した。2つの異なる融合(融合1および融合2)を行った。免疫促進注射から3日後に免疫脾臓細胞をX63.Ag8.653不死化B細胞と融合させ、照射した脾臓細胞の存在下で培養した。ハイドリドーマを半固体メチルセルロース含有培地に播種し、clonepix2装置(Molecular Devices)を用いて増殖クローンを採取した。

20

【0258】

再びSiglec-7 FcおよびSiglec-9 Fcタンパク質を用いて2回目の免疫化を行った。マウスに対して、30μgの各タンパク質および完全フロインドアジュバントの乳液の腹腔内への3回の注射を行った。次いで、マウスに各タンパク質5μgを静脈内投与した。3つの異なる融合(融合3、4および5)を行った。免疫促進注射から3日後に免疫脾臓細胞をX63.Ag8.653不死化B細胞と融合させ、照射した脾臓細胞の存在下で培養した。P96の培地にハイドリドーマを播種した。この免疫化において(および以下の実施例において)使用されたSiglec-7 FcおよびSiglec-9 Fcタンパク質は、CHO細胞において産生された。Siglec-7 Fcタンパク質は、以下のアミノ酸配列を有していた。

30

【化7】

QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMVCVHVRCSFSYPVDSQTDSDPVHGYWFRAGNDISWKAPVATNPNPAWAVQEE
TRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARMSDAGRYFFRMEKGNIKWNYKYDQLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCFQNL
TCSVPWACEQGTTPMISWMGTSVSPLHPSTTRSSVLTLPQPQHHGTSLTCCQVTLPGAGVTTNRTIQLNVSYPQ
NLTVTVFQEGTASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQPSNPLVLELQVHLGDEGEF
TCRAQNSLGSQHVSLSLQEQEYTGKMRPVSGVLLGAVGGGSSPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号164)

40

【0259】

Siglec-9 Fcタンパク質は、以下のアミノ酸配列を有していた。

【化 8】

QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFYSYPSHGWIYPPGVVHGYWFREGANTDQDAPVATNPNPARAVWEETRDR
 FHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQNLTCVSP
 WACEQGTTPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLPQPQDHGTSLTQCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPQNLMTV
 FQGDGTVSTVLGNSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPVWVHLRDAAEFT
 CRAQNPLGSQQVYLVNLSLQSKATSGVTQGGGGSSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号165)

【0260】

10

一次スクリーニング：親および h u S i g l e c - 7、h u S i g l e c - 9 およびカニクイザル S i g l e c - 発現 C H O 細胞株を用いて、フローサイトメトリーによって一次スクリーニングにおいて両方の免疫化の増殖クローンの上清 (S N) を試験した。ヒト S i g l e c - 7 およびカニクイザル S i g l e c 発現 C H O をそれぞれ 0 . 5 μ M および 0 . 0 5 μ M の C F S E で染色した。フローサイトメトリースクリーニングのために、全細胞を等しく混合し、a l e x a f l u o r 6 4 7 で標識されたヤギ抗マウスポリクローナル抗体 (p A b) によって上清中の反応抗体の存在を明らかにした。

【0261】

結果：それぞれ融合 1、2 および 3 / 4 / 5 における、ヒト S i g l e c - 7 および / または S i g l e c - 9 および / または S i g l e c - カニクイザルに結合するそれぞれの融合物において、20、19 および 80 を超える抗体が選択された。異なる交差反応性抗 S i g l e c - 7、S i g l e c - 9 および S i g l e c - カニクイザル抗体および異なる 3 種の融合物からの抗 S i g l e c - 9 抗体 (S i g l e c - 7 に結合しなかったもの) をクローニングし、N 結合グリコシル化の欠如および F c 受容体への結合の減少を生じる重鎖 N 2 9 7 Q (K a b a t E U 付番) 突然変異を有するキメラヒト I g G 1 抗体として産生した。

20

【0262】

図 2 は、S i g l e c - 7 に結合するが S i g l e c - 9 またはカニクイザル S i g l e c に結合しない抗体 (右パネル)、S i g l e c - 7、S i g l e c - 9 およびカニクイザル S i g l e c のそれぞれに結合する抗体 (中間パネル)、S i g l e c - 9 に結合するが S i g l e c - 7 またはカニクイザル S i g l e c に結合しない抗体 (左パネル) の例について、フローサイトメトリーによる代表的な結果を示す。

30

【0263】

【表 1 3】

表1: Siglec配列

名称	NCBI 参照配列	配列(アミノ酸)
ヒト Siglec-7	NM_0143 85.3; NP_0552 00.1	QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMVCVHVRCSFSYPVDSQTDSDPVHGYWFRAGNDIS WKAPVATNNPAWAVQEETRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARMSDAGRYFFRMEKG NIKWNYKYDQLSVNVTALHHRPNILIPGTLESGCFQNLTCVWPWACEQGTTPMISWM GTSVSPLHPSTTRSSVLTLPQPQHHGTSLTCQVTLPGAGVTTNRTIQLNVSYPQNL VTVFQEGTASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQPSN PLVLELQVHLGDEGEFTCRAQNSLGSQHVSLSLQEQEYTGKMRPVSGVLLGAVGGA GATALVFLSFCVIFIVVRSRKKKSARPAADVGDIGMKDANTIRGSASQGNLTESWADD NPRHHGLAAHSSGEEREIQYAPLSFHKGEPQDLSGQEATNNEYSEIKIPK (配列番号150)
ヒト Siglec-9	NM_0144 41.2 ;NP_0552 56.1	QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANTDQDAP VATNNPARAVWEETRDRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNY KHHRLSVNVTALHHRPNILIPGTLESGCPQNLTCVWPWACEQGTTPMISWIGTSVSPL DPSTTRSSVLTLPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPQNLMTVFIG DGTVSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGV LELPWVHLRDAAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVSLSQKATSGVTQGVVGGAGATALVF LSFCVIFVIVVRSRKKKSARPAAGVGDTGIEDANAVRGSASQGPLEPWAEDSPPDQP PPASARSSVGEGLQYASLSFQMVKPWDSEATDTEYSEIKIHR (配列番号151)
ヒト Siglec-3	NM_0017 72.3;	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPIPYDKNSPVHGYWFREGAIIISGDSPVAT

10

20

【 0 2 6 4】

【表 1 4】

	NP_0017 63.3	NKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQ LSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHKNLTCVSWACEQGTPIFSWL SAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTERTIQLNVTYV PQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTA VGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNF HGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (配列番号152)	
ヒト Siglec-5	NM_0038 30.3	EKPVYELQVQKSVTVQEGLCVLPVCSFSYPWRSWYSSPLYVYVWFRDGEIPYYAEVVA TNNPDRRVKPEQGRFRLLGDVQKKNCSLSIGDARMEDTGSYFFRVERGRDVKYSYQ QNKLNLEVTALIEKPDHIFLEPLESGRPTRLSCSLPGSCEAGPPLTFSWTGNALSPLDPE TTRSSELTLTPREDHGTNLTCQMKRQGAQVTTERTVQLNVSYA PQTITIFRNGIALEILQNTSYLPVLEGQALRLLCDAPSNNPAHLSWFQGSALNATPISN TGILELRRVRSAAEEGFTCRAQHPLGLFQIFLNLSVYSLPQLLGPSCSWEAEGHLCRCFS RARPAPSLCWRLEEKPLEGNSSQGSFKVNSSSAGPWANSSLIHGGSSDLKVSCKAW NIYGSQSGSVLLQGRSNLGTGVVPAALGGAGVMALLCICLCLIFFLIVKARRKQAAGR PEKMDDEDPIMGITITSGSRKPPWPDSPGDQASPPGDAPPLEEQKELHYASLSFSEMK SREPKDQEAPSTTEYSEIKTSK (配列番号153)	10
ヒト Siglec-6	NM_1988 45.4	QERRFQLEGPELTVQEGLCVLPVCRPTTLPASYYGYGYWFLEGADVVPATNDPDEE VQEETRGRFHLLWDP RRKNCSLSIRDARRRDNAAYFFRLKSKWMKYGYTSSKLSVRV MALTHRPNISIPGTLESGHPSNLTCVWPVCEQGTPIFSWMSAAPTSLGPRTTQSSV LTITPRPQDHSTNLTCQVTFPGAGVTMERTIQLNVSSFKILQNTSSLPVLEGQALRLC DADGNPPAHLWSFQGFALNATPISNTGVLELPQVGSAAEEDFTCRAQHPLGLSLQISL SLFVHWKPEGRAGGVLGAVWASITTLVFLCVCFIRVKTRRKAQAQPVQNTDDVNP VMVSGSRGHQHQFQTGIVSDHPAEAGPISEDEQELHYAVLHFHKVQPQEPKVTDE YSEIKIHK (配列番号154)	20
ヒト Siglec-8	NM_0144 42.2	MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAG DRPYQDAPVATNNDREVQAEQGRFQLLGDIVSNDCSLIRDARKRDKGSYFFRLE RGSIMKWSYKSQLNYKTQKLSVFTALTRPDILGTLESGHSRNLTCVWPWACKQGT PPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKQDH GTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGDASTALGNGSSLSVLE GQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNA QGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFCIIHIVRSCRKKSARP AAGVGDGTGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKPPPAVAPSSGEEGELHYATLS FHKVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETQACLRNNHNPSSKEVRG (配列番号155)	30
ヒト Siglec-10	NM_0331 30.4	MDGRFWIRVQESVMVPEGLCIVPCFSYPRQDWTGSTPAYGYWFKAVTETTKGAP VATNHQSREVEMSTRGRFQLTGDPKGNCSLVIRDAQMQDESQYFFRVERGSYVRY NFMNDGFFLKVTALTQKPDVYIPETLEPGQPVTVICVFNWAFEECPPPSFSWTGAALS SQGTPKPTTSHFVLSFTPRPQDHNTDLTCHVDFSRKGVSVQRTVRLRVAYAPRDLVISI SRDNTPALEPQPQGNVPYLEAQKQFLRLCAADSQPPATLSWVQLQNRVLSSSHWP GPRPLGLELPGVKAGDSGRYTCRAENRLGSQQRALDLSVQYPPENLRVMVSQANRT VLENLNGTSLPVLEGQSLCLVCTHSSPPARLSWTQRGQVLSQPSQSDPGVLELPRV QVEHEGEFTCHARHPLGSQHVLSLSVHSPKLLGPSCSWEAEGHLCSSQASPAPS LRWWLGEELLEGNSSQDSFEVTPSSAGPWANSSLSLHGGSSGLRLRCEAWNVAHGA QSGSILQLPDKGLISTAFSNGAFLGIGITALLFLCLALIIMKILPKRRTQTETPRPRFSRHS TILDYINVVPTAGPLAQKRNQA TPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKQYQLPSFPEPKS STQAPESQESQELHYATLNFPGVRRPEARMKGTQADYAEVKFQ (配列番号156)	40
ヒト Siglec-11	NM_0528 84.2	NKDPSYSLQVQRQVPVPEGLCIVVSCNLSYPRDGDWDESTAAAYGYWFKGRTSPKTGAP VATNNSQREVEMSTRDRFQLTGDPGKGSCLVIRDAQREDEAWYFFRVERGSRVRH SFLSNAFFLKVTALTQKPDVYIPETLEPGQPVTVICVFNWAFKCPAPSFWSWTGAALSP	

【表 15】

		RRTRPSTSHFSVLSFTSPQDHDHDLTCHVDFSRKGVSAQRTVRLRVAYAPKDLIISISH DNTSALELQGNVIYLEVQKGOFLRLLCAADSQPPATLSWVWLQDRVLSSSHWPGRPTL GLELRGVRAGDSGRYTCRAENRLGSQQQALDLSVQYPPENLRVMVSQLNRTVLENL GNGTSLPVLEGQSLRLVCVTHSSPPARLSWTRWGQTVGSPSPDGPVLELPPIQMEH EGEFTCHAQHPLGSQHVLSLSVHYPPQLLGPSCSWEAEGHLCSSQASPAPSLRW WLGEELLEGNSSQGSFEVTPSSAGPWANSLSLHGGLSSGLRRLCKAWNVAHGAQSG SVFQLLPKLEHGGGLGLGAALGAGVAALLAFCSCLVFRVKICRKEARKRAAEQDV PSTLGPISQGHQHECSAGSSQDHPPPGAATYTPGKGEQELHYASLSFQGLRLWEPA DQEAPSTTEYSEIKIHTGQPLRGPFGFLQLEREMSGMVPK (配列番号157)	
ヒト Siglec-12	NM_0530 03.3	KEQKDYLLTMQKSVTVQEGLCVSVLCSFSYPQNGWTASDPVHGYWFRAGDHVSRNI PVATNNPARAVQEETDRDRFHLLGDPQNKDCTLSIRDRES DAGTYVFCVERGNMKW NYKYDQLSVNVTASQDLLSRYRLEVPE SVTVQEGLCVSVPCSVLYPHYNWTASSPVYG SWFKEGADIPWDIPVATNTPSGKVQEDTHGRFLLGDPQTNNCSLIRDARKGDSGK YYFQVERGSRKWNYYDKLSVHVTA LTHMPTFSIPGTLES GHPRNLCSVPWACEQG TPPTITW MGASVSSLDPTITRSSM LSLIPQPQDHGTS LTCQVTLPGAGVTMTRAVRLN ISYPPQNLMTVFQGDGTASTTLRNGSALS VLEGQSLHLVCAVD SNPPARLSW TWGS LTLSPSQSSNLGVLELPRVHVKDEGEFTCRAQNPLGSQHISLSLSLQNEYTGKMRPISG VTLGAFGGAGATALVFLYFCIIFVVVRS CRKKSARPAVGVGDTGMEDANAVRG SASQ GPLIESPADDSPPHHAPPALATPSPEEGEIQYASLSFHKARQPYPQEQEAIGYEYSEINIP K (配列番号158)	10
カニクイ ザル Siglec	XM_0055 90087.1	QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCFSYPWYGWISSDPVHGYWFRAGAHT DRDAPVATNNPARAVREDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTYFFRVETGKT KWNKYAPLSVHVTA LTHRPNILIPGTLES GCPRNLCSVPWACEQGTAPMISWMGT SVSPLDPSTTRSSVLT LIPQPQDHGTS LTCQVTFPGASVTTNKTIHLNVSYPQNLMT VFQGN DTVSIVLGNSSVSVPEGPSRLVCAVD SNPPARLSL SWGGTLCP SQSPNG VLELPRVHLRDEEFTCRAQNLLGSQQVSLNVSLQSKATSGLTQGAVGAGATALVFLS FCVIFVVVP (配列番号159)	20
ヒト Siglec-9 K100E/A 315E 対立遺伝子		QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCFSYPSHGWIYPGPVHGYWFREGANTDQDAP VATNNPARAVWEETDRDRFHLLGDPHTENCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNY KHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLES GCQNLTCSVPWACEQGT PPMISWIGTSVSPL DPSTTRSSVLT LIPQPQDHGTS LTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPQNLMTVFQG DGTVSTVLGNSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSL SWRGLTLCPSQSPNGV LELPWVHLRDEAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVS LQSKATSGVTQGVVGGAGATALVFL SFCVIFVVVRS CRKKSARPAAGVGD TGIEDANAVRG SASQG PLTEPWAEDSPDQPP PASARSSVGE GELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (配列番号160)	30
ヒト Siglec-9 N末端 V-セット Ig様ドメイン		MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGKPIPNLLGLDSTQTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPC SFSYPSHGWIYPGPVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWEETDRDRFHLLGD PHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTAA TSGVTQGVV GAGATALVFLSFCVIFVVVRS CRKKSARPAAGVGD TGIEDANAVRG SASQG PLTEP WAEDSPDQPP PASARSSVGE GELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (配列番号161)	
ヒト Siglec-9 Ig様 C2型 ドメイン1		MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGKPIPNLLGLDSTLTHRPNILIPGTLES GCQNLTCSVP WACEQGT PPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLT LIPQPQDHGTS LTCQVTFPGASVTTN KTVHLNVSYPQNLMTVFQGDGTVATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVVRS CRKKSARPAAGVGD TGIEDANAVRG SASQG PLTEPWAEDSPDQPP PASARSSVGE GELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (配列番号162)	40
ヒト Siglec-9		MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGKPIPNLLGLDSTSTVLGNSSLSLPEGQSLRLVCAVD AVDSNPPARLSL SWRGLTLCPSQSPNGVLELPWVHLRDAEFTCRAQNPLGSQQVY	

【表 16】

Ig様 C2型 ドメイン2	LNVSLQSKATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVVRSRKKKSARPAAGVGDGTGIE DANAVRGSASQGPLTEPWAEDSPDQPPPASARSSVGEGLQYASLSFQMVKPWDS RGQEATDTEYSEIKIHR (配列番号163)
---------------------	---

【0267】

実施例3：CD33関連Siglecへの結合

Siglec-7および-9と配列類似性を共有するCD33関連Siglecは、一般に、2つの群、Siglec-1、-2、-4および-15から構成される第1のサブセットと、Siglec-3、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-14および-16を含むSiglecのCD33関連群とに分けられる。他のCD33関連Siglecは異なる生物学的機能を有し、および/または腫瘍監視に関与しないと考えられるため、他のCD33関連Siglecに結合しない交差反応性Siglec-7/9抗体を得ることが可能か否かを評価するために抗体をさらにスクリーニングした。

10

【0268】

Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11および-12を発現する細胞を作製し、細胞への結合についてフローサイトメトリーにより、交差反応性Siglec-7/9抗体の代表的なサブセットを試験した。本明細書中において使用される異なるSiglecに対するアミノ酸配列およびGenbank参照番号を上記の表1において以下に示す。

20

【0269】

簡潔に述べると、(Siglecの1つを発現する)HuSiglec発現CHO細胞株を使用した。フローサイトメトリースクリーニングのために、各HuSiglec発現CHO細胞株(CHO HuSiglec-3細胞株、CHO HuSiglec-5細胞株、CHO HuSiglec-6細胞株、CHO HuSiglec-8細胞株、CHO HuSiglec-10細胞株、CHO HuSiglec-11細胞株、CHO HuSiglec-12細胞株)と共に抗体を1時間温置し、染色緩衝液中で2回洗浄し、PEで標識したヤギ抗マウスポリクローナル抗体(pAb)により明らかにし、染色緩衝液で2回洗浄し、HTFCサイトメーター上で染色を得て、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。

30

【0270】

結果から、抗Siglec-9抗体mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbEおよびmAbFのうち、Siglec-3、-5、-6、-7、-8、-10、-11または-12の何れかに結合したものはなかったことが示された。

【0271】

結果から、いくつかの交差反応性Siglec-7/9抗体は、Siglec-7および-9に加えてSiglec-12またはSiglec-6にも結合できることが示された。mAb1、mAb2およびmAb3は、Siglec-7および-9に加えてSiglec-12に結合し、mAb3、mAb4、mAb5およびmAb6は、Siglec-12に結合しなかった。代表的な抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5またはmAb6のうち、Siglec-3、-5、-6、-8、-10または-11の何れかに結合したものはなかった。

40

【0272】

実施例4：Siglecへの結合のための抗体の滴定

ヒトSiglec-7、ヒトSiglec-9およびカニクイザルSiglec-9における抗体の結合を、ヒトSiglec-7およびヒトSiglec-9およびカニクイザルSiglec-9で遺伝子移入したCHO細胞でのフローサイトメトリーによる滴定

50

実験によって試験した。細胞を、一次抗体を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、かつ一連の希釈率 1 : 5 において染色緩衝液 (SB) 中で 1 時間温置した。それらを SB で 3 回洗浄し、次いでヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgG (Fc) PE (Beckman Coulter #IM05510) で 30 分間温置し、SB で 2 回洗浄した。HTFC Intellicyt サイトメーターで蛍光を明らかにした。

【0273】

2 回の免疫化における 5 つの融合体からの以下に示される 6 つの抗体は、細胞によって発現されるヒト Siglec-7 およびヒト Siglec-9 について、およびさらにカニクイザル Siglec について同等の結合親和性を有することが見出された。各抗体の結合についての EC₅₀ 値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を以下に示す。

【0274】

【表 17】

		mAb1	mAb2	mAb3	mAb4	mAb5	mAb6
EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Siglec-7	0.21	0.17	0.22	0.17	0.22	0.33
	Siglec-9	0.11	0.08	0.23	0.28	0.26	0.31
	Siglec- カニクイザル	0.67	0.53	0.85	0.17	0.14	0.17

【0275】

実施例 5 : 表面プラズモン共鳴 (SPR) による Siglec-9 結合親和性

Biacore (商標) T100 の一般手順および試薬

SPR 測定は、Biacore (商標) T200 装置 (Biacore (商標) GE Healthcare) で 25 °C において行った。全ての Biacore (商標) 実験において、HBS-EP+ (Biacore (商標) GE Healthcare) および NaOH 10 mM は、ランニング緩衝液および再生緩衝液としてそれぞれ機能した。センサーグラムは、Biacore (商標) T200 評価ソフトウェアを用いて分析した。ヒト Siglec-9 および -7 多量体タンパク質を Innate Pharma でクローニングし、産生させ、精製した。

【0276】

タンパク質 - A の固定化

タンパク質を Sensor Chip CM5 上のデキストラン層のカルボキシル基に共有結合的に固定化した。チップ表面を EDC/NHS (N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩および N-ヒドロキシスクシンイミド (Biacore (商標)、GE Healthcare) で活性化した。タンパク質を結合緩衝液 (10 mM 酢酸塩、pH 4.2 および 5.0) 中で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、適切な固定化レベルに達するまで (すなわち 600 ~ 2000 RU) 注入した。残りの活性化された基の失活は、100 mM エタノールアミン pH 8 (Biacore (商標)、GE Healthcare) を用いて行った。

【0277】

親和性研究

親和性研究は、製造業者 (Biacore (商標) GE Healthcare kinetic wizard) によって推奨される標準的な Kinetic プロトコールに従って実施した。600 nM ~ 0.975 nM の範囲の抗 Siglec-9 および -7 / 9 抗体 Fab 断片の連続的希釈物を固定化 Siglec-9 Fc および Siglec-7 Fc タンパク質上に順次注入し、再分化前に 10 分間分離させた。センサーグラムセット全体を、1 : 1 動態結合モデルを用いてフィッティングした。一価の親和性および動態学的会合および解離速度定数を以下の表 2 に示す。

【0278】

10

20

30

40

50

【表 18】

表 2

Siglec-9 Fc タンパク質上の Fab 結合		
FAB	KD (nM) (1:1 結合)	Koff ^(10⁻³) 1/S
Fab.A (mAbA の Fab)	0.04	0.025
Fab.B (mAbB の Fab)	0.37	0.31
Fab.C (mAbC の Fab)	0.55	0.43
Fab.D (mAbD の Fab)	4.12	0.11
Fab.E (mAbE の Fab)	1	1.9
Fab.F (mAbF の Fab)	1	0.46
Fab1 (mAb1 の Fab)	0.4	0.16
Fab2(mAb2 の Fab)	0.8	0.17
Siglec-7 Fc タンパク質上の Fab 結合		
Fab	KD (nM) (1:1 結合)	Koff ^(10⁻³) 1/S
Fab1	0.06	0.04
Fab2	0.07	0.04

10

20

【0279】

実施例 6：単球由来樹状細胞の滴定

単球由来樹状細胞 (moDC) の生成：

単球由来の樹状細胞は、末梢血単核球から生成した。健常ドナーから得られた軟膜から P BMC を単離した。単球をキット Monocyte Isolation Kit I I (Miltenyi Biotec) を用いて精製し、10%不活性化 FBS (GIBCO)、グルタミン (GIBCO)、MEM NEAA (GIBCO)、ビルビン酸ナトリウム (GIBCO)、IL-4 (20 ng/ml) (Pepro tech) および GM-CSF (400 ng/ml) (Miltenyi Biotec) を添加した RPMI 培地 (GIBCO) 中で合計 6 日間にわたり moDC 中で分化させた。細胞を 37 °C の加湿 CO₂ 恒温器で培養し、サイトカインを 4 日目に更新した。

30

【0280】

25 mU ノイラミナーゼ (Roche Diagnostics) を用いて moDC を 2 時間脱シアル化した。脱シアル化は、ノイラミナーゼ処理の前後で制御した：moDC 細胞を、マウス Siglec-7 Fc (IPH) およびマウス Siglec-9 Fc 組み換えタンパク質 (IPH) を含む染色緩衝液 (SB) 中において 10 μg/ml で 1 時間温置し、SB で 2 回洗浄し、ヤギ F(ab')₂ 抗マウス IgG (Fc) PE (Jackson ImmunoResearch) と共に 30 分間温置し、SB で 2 回洗浄し、蛍光を Canto II (HTS) で明らかにした。

40

【0281】

滴定

moDC および ノイラミナーゼ で処理した moDC に対する結合をフローサイトメトリーによる滴定実験で試験した。細胞を、一次抗体を 10 μg/ml とし、かつおよび一連の希釈率 1:10 で染色緩衝液 (SB) 中において 1 時間温置した。それらを SB で 2 回洗浄し、次いでヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgG (Fc) PE (Jackson Immunoresearch) で 30 分間温置し、SB で 2 回洗浄した。蛍光を HTFC Intellicyt サイトメーターで明らかにした。

50

【0282】

結果

EC₅₀はノイラミニダーゼ処理後に高度に増強され(10倍)、これは、moDC上に発現したSiglec-9がノイラミニダーゼ処理前のシアル酸リガンドとのシス相互作用に關与していることを示唆する。しかし、プラトー相レベルは改変されておらず、高親和性抗体は細胞表面上の全てのSiglec-9(結合および非結合)立体構造に結合することができ、monoDCならびに他の細胞型(例えば、NK細胞、CD8⁺T細胞、単球ならびにマクロファージM1およびM2)におけるシス相互作用およびシグナル伝達を阻害することを示唆する。結果は、moDC(左側パネル)およびノイラミニダーゼ処理moDC(右側パネル)における代表的な抗体mAbA、mAbCおよびmAbDについて、それぞれEC₅₀値を伴って図3に示す。

10

【0283】

実施例7: NK細胞におけるSiglec活性を中和する抗体の能力の評価

初代NK細胞(ヒトドナーから精製され、使用前に37℃で一晩温置した新鮮なNK細胞)を用いたNK細胞活性化アッセイにおいて、Siglec活性の阻止について、第1および第2の免疫付与において試験した抗Siglec-7/9抗体を試験した。24時間でのCD137発現上昇は、NK細胞を含む一部のリンパ球の活性化と相関する(Kohrt et al. (2011) Blood 117(8): 2423-2432)。フローサイトメトリーによるNK細胞上でのCD137発現の分析により、NK細胞活性化における抗Siglec-7/9抗体の効果および標的細胞の脱シアル化を判定した。抗Siglec-7/9 mAb mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5およびmAb6は、それぞれ24時間でCD137発現の増加を誘導した。

20

【0284】

次に、抗Siglec-7/9抗体の効果、YTS Siglec-9*エフェクター細胞株(ヒトSiglec-9で遺伝子移入したヒトNK細胞株YTS)をエフェクターとし、Ramos細胞株を標的として用いた細胞傷害性アッセイ(Cr⁵¹)で研究した。この試験は、⁵¹Cr負荷標的細胞の溶解を直接定量することにより、YTS Siglec-9*細胞株の細胞傷害性を測定する。簡潔に述べると、標的細胞をまず放射性⁵¹Cr同位体で標識し、次にエフェクター細胞と共に37℃で4時間共温置する。この間に、YTS細胞に感受性である標的細胞を溶解し、⁵¹Crを培地に放出させる。回収された上清中の⁵¹Crは、液体シンチレーション測定によって測定される。得られた結果は、NK細胞による標的細胞の溶解パーセントを評価することを可能にする。完全RPMI中、200μL最終/ウェル、E:T比5/1で、96Uウェルプレートでアッセイを行った。抗Siglec-7/9抗体およびアイソタイプ対照を10μg/mlおよび一連の希釈率1:10で添加した。

30

【0285】

抗Siglec-7/9 mAb mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5およびmAb6は、それぞれ用量依存的にYTS Siglec-9*細胞傷害性の増加を誘導した。対照として、この効果は野生型YTS細胞株(Siglec-9発現なし)では観察されなかった。同様に、抗Siglec-9 mAb mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbEおよびmAbFは、それぞれ用量依存的にYTS Siglec-9*細胞傷害性の増加を誘導する。図4は、Siglec-7および-9交差反応性抗体(図4B)およびSiglec-9単一特異性(非Siglec-7結合)抗体(図4A)中でのYTS Siglec-9*細胞傷害性の増加の用量依存的誘導を示す。

40

【0286】

実施例8: 初代ヒトNK細胞(低Siglec-9発現)におけるSiglec-9中和の詳細な研究

本発明者らは、以前の抗体がNK細胞においてSiglec-9を中和し得ないことが、例えば、その表面においてSiglec-9をより高いレベルで発現する好中球および他の細胞と比較した、初代NK細胞におけるSiglec-9発現の差異および異なるN

50

K細胞サブセットで発現されるS i g l e c - 7に関連し得る可能性を考慮した。NK細胞においてS i g l e c - 9を中和する抗体を得ることができるかどうかを調べるために、本発明者らは、フローサイトメトリーによってS i g l e c - 9上でゲートされた多数のヒトドナー由来の初代NK細胞において抗体を研究および選択した。抗S i g l e c - 9抗体の効果を、古典的^{5 1}Cr放出アッセイにおいて腫瘍細胞溶解を評価することにより、およびNK細胞上のCD137表面発現を評価することによる活性化アッセイにより、細胞傷害性によって研究した。それぞれの場合において、エフェクター細胞として初代NK細胞(ドナーから精製された新鮮なNK細胞として)を使用し、HT29結腸直腸癌細胞株を標的として使用した。

【0287】

パート1：細胞傷害性アッセイ：2人のヒトドナーにおける精製されたNK対HT29腫瘍細胞

細胞傷害性アッセイは、^{5 1}Cr負荷標的細胞の溶解を直接定量することによってNK細胞の細胞傷害性を測定した。簡潔に述べると、標的細胞をまず放射性^{5 1}Cr同位体で標識し、次にエフェクター細胞と共に37℃で4時間共温置した。この間に、NK細胞に感受性である標的細胞を溶解し、^{5 1}Crを培地に放出させた。回収された上清中の^{5 1}Crは、液体シンチレーション測定によって測定した。得られた結果は、NK細胞による標的細胞の溶解パーセントの評価を可能にする。完全RPMI中、200μL最終/ウェル、E:T比8/1において96Uウェルプレートでアッセイを行った。抗S i g l e c - 9抗体およびアイソタイプ対照を10μg/mlで添加した。

【0288】

抗S i g l e c 9抗体mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、およびmAbFならびに抗S i g l e c 7/9抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5およびmAb6は、それぞれNK細胞の細胞傷害性の増加を誘導した。図5は、2人の異なるヒトドナー(ドナーD1(左側パネル)およびD2(右側パネル))における抗体mAbA、mAbC、mAbD、mAbE、およびmAbFによって媒介される初代NK細胞の細胞傷害性の増加を示す代表的な図である。

【0289】

パート2：活性化アッセイ(CD137)：精製されたNK対HT29、mAbの単一ヒトドナーにおける比較

フローサイトメトリーによるS i g l e c - 9陽性NK細胞上のCD137発現の分析により、抗S i g l e c - 7/9および抗S i g l e c - 9抗体のNK細胞活性化における効果を決定した。エフェクター細胞は初代NK細胞(ドナーから精製された新鮮なNK細胞、使用前に37℃で一晩温置)であり、標的細胞(HT29細胞株)は1:1の比率で混合した。完全RPMI中、200μL最終/ウェルにおいて96UウェルプレートでCD137アッセイを行った。抗体をエフェクター細胞と共に37℃で30分間予備温置し、次いで標的細胞を37℃で一晩共温置した。ステップは以下の通りである：500gで3分間スピン；染色緩衝液(SB)で2回洗浄；50μLの染色Ab混合液(抗CD3パシフィックブルー-BD Pharmingen；抗CD56-PE-Vio770(Miltenyi)；抗CD137-APC(Miltenyi)、抗S i g l e c - 9 K8-PE(Biolegend))の添加；4℃で30分間の温置；SBで2回洗浄；SBでペレットを再懸濁；およびCanto II(HTS)で明らかにした蛍光。

【0290】

陰性対照は、NK細胞対HT29単独であり、アイソタイプ対照の存在下であった。図6は、1人のヒトドナーにおけるいくつかの抗S i g l e c - 9および抗S i g l e c - 7/9抗体mAbA、mAbB、mAbF、mAb6およびmAb4によって媒介されるCD137を発現するS i g l e c - 9陽性NK細胞の%の増加を示す代表的な図である。対照として、CD137を発現するS i g l e c - 9陰性NK細胞の%は、これらの抗体に影響されなかった。図に見られるように、抗S i g l e c - 9抗体は、S i g l e c - 9発現初代ヒトNK細胞の細胞傷害性を、同一ドナー由来のS i g l e c - 9陰性初代

10

20

30

40

50

ヒトNK細胞で観察されたレベルまで完全に回復させた。

【0291】

パート3：活性化アッセイ（CD137）：6人のヒトドナーにおける精製されたNK対HT29、mAbAおよびmAb1

1つの抗Siglec-9（mAb.A）および1つの抗Siglec-7/9（mAb1）を用いて、6人のドナーで実験を再現した。抗体の非存在下において（「中」設定）、NK発現CD137の％は、ドナー間で6％～27％で変動した（図7、左側パネル）を参照されたい）。データは、各実験からの対照中央値と比較して相対的な変化であるように標準化された： $(X - X_{\text{中央値}}) / X_{\text{中央値}} (\%)$ 。図7に示すように、mAbAおよびmAb1は、Siglec-9 + CD137 + NK％の増加を誘導し（図7、中央パネル）、Siglec-9 - CD137 + NK％の増加を誘導しなかった（図7、右側パネル）。

10

【0292】

実施例9：初代NK細胞の滴定

新鮮な精製ヒトNK細胞に対する抗体の結合をフローサイトメトリーによる滴定実験によって試験した。細胞を、一次抗体を10 µg/mlとし、かつ一連の希釈率1：10において染色緩衝液（SB）中で1時間温置した。それらをSBで3回洗浄し、次いでヤギFab'抗ヒトIgG（Fc）PE（Jackson ImmunoResearch）で30分間温置した。染色はBD FACS CantoIIで行い、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。以下の表にEC50値をµg/mlで示す（4パラメーターロジスティックフィットを用いて計算した）。

20

【0293】

【表19】

	平均 EC50 (µg/ml) - 4ドナー
mAb1	0.05
mAb2	0.07
mAb3	0.19
mAb4	0.61
mAb5	1.27
mAb6	1.30
mAbA	0.08
mAbB	0.10
mAbC	0.09
mAbE	0.01
mAbF	0.30

30

40

【0294】

実施例10：シアル酸リガンドへのSiglec結合の阻止

パートA：フローサイトメトリーによるシアル酸発現腫瘍細胞へのSiglec-9結合の阻止

用量範囲の抗ヒトSiglec-9 Fabを室温で30分にわたりヒトSiglec-9 Fc融合組み換えタンパク質と固定用量で共温置し、次いで様々なシアル酸発現細胞株K562 E6（ヒトHLA-Eで遺伝子移入したK562細胞株）およびRamos

50

を1時間にわたり添加した。染色緩衝液で細胞を2回洗浄した後、染色緩衝液で希釈したPE結合ヤギ抗マウスIgG Fcフラグメント二次抗体(Jackson Immuno research)を細胞に添加し、プレートを4でさらに30分間温置した。細胞を2回洗浄し、HTFCプレートリーダーを備えたAccury C6フローサイトメーターで分析した。蛍光強度の平均対FabとSiglec-9Fc融合組み換えタンパク質の比をグラフにプロットした。

【0295】

結果を図8に示す。上のパネルにおいて、Siglec-9-Fcタンパク質のRamos細胞への抗体存在下での結合を示す。抗Siglec/9mAb mAbA、mAbB、mAbCおよびmAbDは、それぞれSiglec-9-Fcタンパク質のRamos細胞への結合を阻害し、mAbEは、Siglec-9-Fcタンパク質のRamos細胞への結合阻害する部分的能力を示し、mAbFは、Siglec-9-Fcタンパク質のRamos細胞への結合を有意に阻害しなかった。図8の下のパネルにおいて、Siglec-9-Fcタンパク質のK562細胞への抗体存在下での結合を示す。抗Siglec/9mAb mAbA、mAbB、mAbCおよびmAbDは、それぞれSiglec-9-Fcタンパク質のRamos細胞への結合を阻害し、mAbEおよびmAbFの両方は、Siglec-9-Fcタンパク質のK562細胞への結合を、有意により高い抗体濃度においてのみ阻害する部分的能力を示した。結論として、抗体mAbA、mAbB、mAbCおよびmAbDは、Siglec-9の腫瘍細胞上のシアル酸リガンドへの結合を完全に阻止し、抗体mAbEは、阻止はシアル酸発現細胞株に依存し、mAbFは結合を阻止しない。

10

20

【0296】

パートB：ELISAアッセイによるシアル酸付加リガンドへのSiglec-7および-9結合の阻止

シアル酸は、グリコシル化タンパク質および形成脂質上の9炭素カルボキシル化単糖である。シアリルトランスフェラーゼ(それらの生合成を触媒する)およびノイラミニダーゼとも呼ばれるシアリダーゼ(それらの切断を触媒する)を含むいくつかの酵素は、哺乳動物系におけるそれらの発生を調整する。癌において、改変されたシアル酸プロファイルは、腫瘍成長、転移および免疫監視回避を増強し、癌細胞の生存につながる支配的な役割を果たす(Bork et al., J Pharm Sci. 2009 Oct; 98(10): 3499-508)。増加したシアル酸付加は、シアル酸付加を制御する改変された酵素プロファイルと共にいくつかの癌において報告されている。ST3GAL6酵素は、多発性骨髄腫細胞株および患者において過剰発現され、多発性骨髄腫細胞の表面上の-2, 3結合シアル酸の発現とインビトロで関連する。インビボでは、ST3GAL6ノックダウンは、腫瘍負荷の減少および生存期間の延長に加えて、骨髄微小環境への多発性骨髄腫細胞のホーミングおよび生着の減少に関連する(Glavey et al., Blood. 2014 Sep 11; 124(11): 1765-76)。グリオーマにおける高いST3GAL1酵素発現は、間葉系分子分類のより高い腫瘍等級と関連している(Chong et al., Natl Cancer Inst. 2015 Nov 7; 108(2)。プロモーターのメチル化異常は、癌におけるいくつかのシアリルトランスフェラーゼ発現の調整において役割を果たす(Vojta et al., Biochim Biophys Acta. 2016 Jan 12)。膀胱癌では、ST6GAL1プロモーターのメチル化異常がST6Gal1の発現低下を誘導する(Antony et al., BMC Cancer. 2014 Dec 2; 14: 901)。

30

40

【0297】

Siglec-7およびSiglec-9は、種々のシアル酸結合に結合する。チップ上にプリントされたシアロシドライブラリーにより、いくつかのSiglecおよび1つの選択的Siglec-7リガンドに共通するシアロシドリガンドが同定された(Rillahan et al., ACS Chem Biol. 2013 Jul 19; 8

50

(7) : 1417 - 22)。Siglec - 7およびSiglec - 9によるシアロシドの可能な差次的認識の観点から、免疫細胞上のSiglec - 7および - 9の両方を標的とすると、様々なシアリルトランスフェラーゼおよびシアル酸が与えられた場合、いくつかの癌型を標的とすることができる。

【0298】

抗Siglec - 7/9抗体によるSiglec - 7および - 9とシアル酸付加リガンドとの間の相互作用の阻止をELISAアッセイで試験した。Siglecタンパク質は、Siglec - 7ヒトFcおよびSiglec - 9ヒトFc組み換えタンパク質であり、リガンドは、シアル酸付加三糖(「Sia1」と称されるNeu5Ac2 - 3Galb1 - 4GlcNAcb - PAA - ビオチン Glycotech # 01 - 077、および6' - シアリルラクトース - PAA - ビオチン Glycotech # 01 - 039(「Sia2」と称される)でビオチン化されたポリマーであった。簡潔に述べると、プロテインAをELISAプレート上に4で一晚コーティングした。3回の洗浄および飽和後、Siglec - 7FcおよびSiglec - 9Fcを室温において1時間30分にわたり0.8 μg / ウェルで添加した。3回洗浄した後、mAbを20 μg / mlおよび一連の希釈率1 : 5で添加した。3回洗浄した後、ビオチン化シアル酸付加ポリマーを室温で3時間にわたって添加した。3回洗浄した後、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ(Beckman)を1 : 1000で添加した。最後に、Siglec - 7および - 9タンパク質におけるシアル酸付加ポリマーの結合は、暗所において室温でTMB(Inte 20rchim)を添加することによって明らかにし、反応はH₂SO₄の添加によって停止した。450 nmで吸光度を読み取った。

【0299】

結果を図9および10に示す。mAb 1、2、4、5および6はSia2とのSiglec - 7相互作用を阻止するが、mAb 3は阻止しなかった(図9)。全てのmAbは、Sia2とのSiglec - 9相互作用を阻止した(図10)が、mAb 1、mAb 2およびmAb 3はSia1とのSiglec - 9相互作用を阻害する能力が低く(図10)、したがってSia1相互作用を実質的に阻止しなかったことを示す。mAb 5およびmAb 6はSia1とのSiglec - 9相互作用を阻止し、mAb 4はSia1とのSiglec - 9相互作用を阻止する中等度の能力を有していた。Siglec - 9に対するブロック効果は、シアル酸のタイプに依存する。全体として、Siglec - 9とシ 30アル酸との間の相互作用の実質的な全阻害を達成した抗Siglec - 9抗体mAb A、mAb B、mAb CおよびmAb Dで最も完全な阻害が観察された。

【0300】

実施例11 : 点突然変異体を用いた抗Siglec抗体のエピトープ

抗Siglec - 9抗体のエピトープを定義するために、本発明者らは、まずHEK293T細胞中のタグV5を用いて各単一Siglec - 9ドメイン(V - セットIg様ドメイン、Ig様C2型ドメイン1、およびIg様C2型ドメイン2)を発現させ、抗体の各タンパク質への結合を試験することによって本抗体の結合ドメインを同定した。

【0301】

本発明者らは、次いで、N末端V - セットIg様ドメインの表面上の分子表面に露出したアミノ酸の置換によって定義されるSiglec - 9突然変異体を設計した。Siglec - 9の構造は依然として解明されておらず、入手可能なSiglec構造内において、Siglec - 7は最も近いメンバーである(Siglec - 9アミノ酸配列と80%以上の同一性)。結果的に、Siglec - 7構造を用いてSiglec - 9突然変異体を設計した。配列番号2のポリペプチドの天然Siglec - 9ペプチドリーダーを置換リーダー配列およびV5タグ(表1のSiglec - 9ドメインタンパク質V - セットIg様ドメイン、Ig様C2型ドメイン1、およびIg様C2型ドメイン2で示される)、続いて表3に列挙されたアミノ酸置換が組み込まれた表1のSiglec - 9アミノ酸配列で置換した。タンパク質は、HEK293T細胞株で発現された。

【0302】

10

20

30

40

50

全ての図(図11~14)は、前出のAlpheyet al(2003)に記載されるSIGLEC-7構造107VのN末端V-セットIg様ドメインに対応する。これらの図は、全てのSiglecで保存されている、末端シアル酸糖上のカルボキシル基との相互作用のための重要な残基である、アルギニン124、およびSiglec-7とSiglec-9との間で保存され、またシアル酸結合に必須であると記載される、周辺残基W132、K131、K135およびN133を含むリガンド結合領域を薄い陰影で示す。W132は、シアル酸のグリセロール部分との疎水性相互作用を提供する。表3の標的アミノ酸突然変異は、Siglec-7および-9の両方に存在する残基であり、Siglec-7について配列番号1、またはSiglec-9について配列番号2の付番を用いて示される(野生型Siglec-9の残基/残基の位置/突然変異体の残基)。

10

【0303】

【表20】

表3

Ref.	配列番号1のSiglec-7に関する変異	配列番号2のSiglec-9に関する変異
M1	Q19A-T20A-S21N-K22A	Q18A-T19A-S20N-K21A
M2	L27T-T29A-S47A-S49A-K104N	L22T-T24A-S42A-S44A-K100N
M3	Q31E-S33K-T35V	Q26E-S28K-T30V
M5	H43L-P45A-H96F-L98S-N105D-T107A-S109A	H38L-P40A-H92F-L94S-N101D-T103A-S105A
M6	S52L-I153T-G54D-W55S-I56A-Y57A-P58A-G59S	S47L-I148T-G49D-W50S-I51A-Y52A-P53A-G54S
M7	P60S-H62A-E126A-G128S-S129K-K131A	P55S-H58A-E122A-G124S-S125K-K127A
M8	R67A-A70T-N71A-T72R-D73R-Q74K-D75A	R63A-A66T-N67A-T68R-D69R-Q70K-D71A
M9	N82A-P83S-A84S-R85S-A86K-V87S	N78A-P79S-A80S-R81S-A82K-V83S
M10	N81A-D100A-H102W-T103R	N77A-D96A-H98W-T99R
M11	W88V-I89K-I90A-R92A	W84V-I85K-I86A-R88A
M12	D93A-R94A-R111S-D112A-R114A	D89A-R90A-R107S-D108A-R110A
M13	E38A-R115A-S116K-N142V-T144A-A118S	E33A-R111A-S112K-N138V-T140A-A114S
M14	R124A-W132Y-N133A	R120A-W128Y-N129A
M15	H137D-R138A-R120S-S32R	H133D-R134A-R116S-S27R
M16	K135M-H136W	K131M-H132W

20

30

【0304】

突然変異体の生成

Siglec-9突然変異体をPCRにより生成した。増幅した配列をアガロースゲル上に流し、Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extractionキットを用いて精製した。各突然変異体について生成した精製PCR産物を、ClonTech Infusion(商標)システムを用いて発現ベクターに連結した。突然変異した配列を含むベクターをMiniprepとして調製し、配列決定した。配列決定後、突然変異した配列を含むベクターを、Promega PureYield(商標)Plasmid Midiprep Systemを用いてMidiprep(商標)として調製した。HEK293T細胞をDMEM培地(Invitrogen)中で増殖させ、InvitrogenのLipofectamine(商標)2000を

40

50

用いてベクターで遺伝子移入し、導入遺伝子の発現を試験する前にCO₂恒温器中において37℃で24時間または48時間温置した。

【0305】

HEK293T遺伝子移入細胞への抗Siglec-9結合のフローサイトメトリー分析

抗体mAb4、mAb5およびmAb6はIg様C2型ドメイン1に結合し、mAb、mAbB、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2およびmAb3はN末端V-セットIg様ドメインに結合した。V-セットIg様ドメイン結合抗体をフローサイトメトリーによって突然変異体1~16のそれぞれへのそれらの結合について試験した。1つの濃度で1つまたは複数の突然変異体への結合を失う抗体を決定するために第1の実験を行った。結合の喪失を確認するために、結合がSiglec-9突然変異によって影響を受けていると思われる抗体について抗体の滴定を行った。結果を以下の表4に示す。

【0306】

残基K100（配列番号2のSiglec-9に関して）またはK104（配列番号1のSiglec-7に関して）における集団において異なる置換を含む突然変異体M2への結合を失った抗体はなく、したがって、抗体は、表1（配列番号160）に示されるSiglec-9対立遺伝子に結合する。

【0307】

抗Siglec-7および-9特異的抗体mAb1、mAb2およびmAb3、ならびにSiglec-9特異的抗体mAbEおよびmAbFは、全てSiglec-9の突然変異体M9、M10およびM11への結合を失ったが、他の突然変異体への結合を失わなかった。突然変異体9は、残基N78、P79、A80、R81、A82およびV83（Siglec-9への参照）におけるアミノ酸置換を含み、突然変異体の残基の1つ以上または全てがこれらの抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。突然変異体10は残基N77、D96、H98およびT99におけるアミノ酸置換を含み、突然変異体の残基の1つ以上または全てがこれらの抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。突然変異体11は、残基W84、E85、E86およびR88におけるアミノ酸置換を含み、突然変異体の残基の1つ以上または全てがこれらの抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。図11に示すように、M9、M10およびM11において置換された残基は、シアル酸結合部位（薄い陰影）を含む面から離れたN末端V-セットIg様ドメイン（濃い陰影）の面に見られる。注目すべきことに、抗体は、Siglecのシアル酸リガンド特異性を定義する（例えば、Alphery et al., 2003 J. Biol. Chem. 278(5):3372-3377を参照されたい）C-C'ループドメインにおける突然変異を有するM8またはM15への、部分的にリガンド結合領域をカバーするM16の結合を失わなかった。したがって、抗体は、シアル酸接触領域もしくは結合部位またはC-C'ループに結合することなく、Siglec-9の阻止において高い効力を達成する。

【0308】

抗Siglec-9特異的抗体mAbDは、突然変異体M6への結合を失ったが、他の突然変異体への結合を失わなかった。突然変異体6は、残基S47、H48、G49、W50、I51、Y52、P53およびG54（Siglec-9への参照）におけるアミノ酸置換を含み、突然変異体の残基の1つ以上または全てが抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。図12に示すように、M16（濃い陰影）において置換された残基は、シアル酸結合部位を含むN末端V-セットIg様ドメイン面の上部であるが、リガンド結合部位（薄い陰影）の外側に見られる。mAbDはM7への結合を失わなかったが、この変異体M7への結合の部分的な減少を示した。M7は、リガンド結合領域（薄い陰影）に部分的に重複し得る残基を含む。M7は、残基P55、H58、E122、G124、S125およびK127（Siglec-9への参照）におけるアミノ酸置換を含んでいた。したがって、M7の残基は、抗体のコアエピトープにとって重要ではない。抗体は、C-C'ループドメインに突然変異を有するM8またはM15への、部分的にリガ

10

20

30

40

50

ンド結合領域をカバーするM16の結合を失わなかった。したがって、抗体は、シアル酸接触領域もしくは結合部位またはC-C'ループに結合することなく、Siglec-9の阻止において高い効力を達成する。

【0309】

抗Siglec-9特異的抗体mAbAおよびmAbBの両方は、Siglec-9の突然変異体M16への結合を失ったが、他の突然変異体への結合を失わなかった。突然変異体16は、残基K131およびH136(Siglec-9への参照)におけるアミノ酸置換を含み、突然変異体の残基の1つ以上または全てがこれらの抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。興味深いことに、M16は、Siglec-9(図13を参照されたい)のシアル酸リガンド接触部位の近位またはその中にあり、抗体は、M8(C-C'ループドメイン突然変異体への結合もM15への結合も失わなかった。したがって、抗体は、Siglec-9の阻止において、さらにシアル酸接触領域内において、またC-C'ループに結合することなく高い効力を達成する。

10

【0310】

一方、抗体mAbCは、Siglec-9の突然変異体M8(すなわちC-C'ループ内)への結合を失ったが、M15およびM16への結合が部分的に減少したものの、M15またはM16への結合も、M6、M7またはM8への結合も、M9、M10またはM11への結合も(他の任意の突然変異体への結合も)失わなかった。M8で突然変異した残基を図14に示す。突然変異体8は、残基R63、A66、N67、T68、D69、Q70およびD71(Siglec-9への参照)におけるアミノ酸置換を含み、突然変異体の残基の1つ以上または全てがこれらの抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。したがって、抗体は、Siglecのシアル酸特異性を定義するC-C'ループドメイン中の残基に結合する。

20

【0311】

【表 2 1】

表4

変異体→ 抗体	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M14	M15	M16
mAb1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb.A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
mAb.B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
mAb.C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+/-
mAb.D	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
mAb.E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb.F	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

10

20

30

40

【0312】

本明細書中で引用される、刊行物、特許出願および特許を含む全ての参考文献は、本明細書中の他の箇所ではなされる特定の文献の何れかの個別に提供される組み込みにかかわらず、（法律によって許される最大の限度で）各参考文献が個々におよび具体的に参照によ

50

り組み込まれることが示され、本明細書中でその全体において記載されているかのように、同定度に参照により全体的に本明細書に組み込まれる。

【0313】

「1つの(a)」および「1つの(an)」および「その(the)」という語および本発明を記載する文脈中の同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、または文脈に明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含するものと解釈すべきである。

【0314】

別段の指定がない限り、本明細書中で提供される全ての厳密値は、対応する近似値の代表である(例えば、特定の要因に関して提供される全ての代表的厳密値または測定値は、必要に応じて、「約」により修飾される対応する近似測定値も提供するとみなされ得る)。

10

【0315】

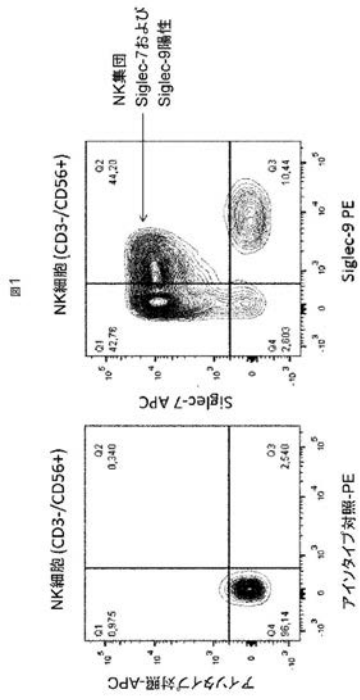
1つまたは複数の要素に関する「含む」、「有する」、「包含する」または「含有する」などの語を使用した本発明の何らかの態様または実施形態の本明細書中の記述は、別段の指定がない限り、または内容に明らかに矛盾しない限り、その特定の1つまたは複数の要素「からなる」、「から基本的になる」またはそれを「実質的に含む」本発明の同様の態様または実施形態に対する支持を提供するものとする(例えば、特定の要素を含む場合の本明細書中に記載の組成物は、別段の指定がない限り、または内容に明らかに矛盾しない限り、その要素からなる組成物も記載するものとしても理解されるべきである)。

20

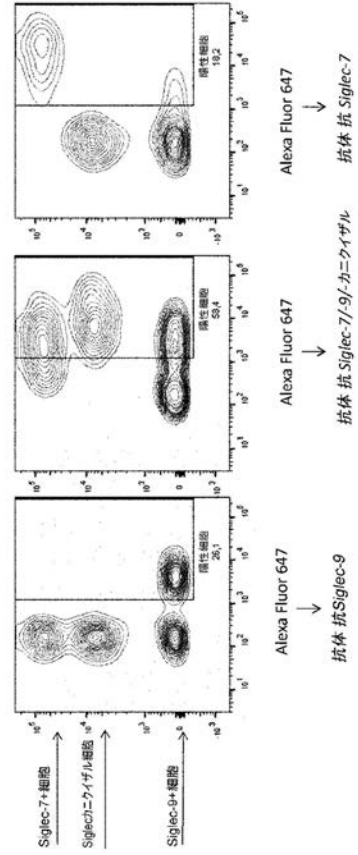
【0316】

本明細書中で提供されるあらゆる実施例または代表的な語(例えば、「など」)の使用は、本発明を単により良好に明らかにするものとして意図され、別段の主張がない限り、本発明の範囲において限定を提起しない。本明細書中のいかなる語も、何らかの請求項に記載されていない要素を本発明の実施に必須であるものとして示すものと解釈すべきではない。

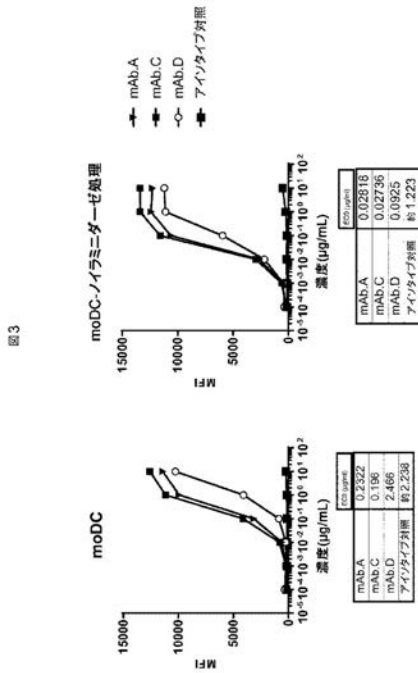
【 図 1 】



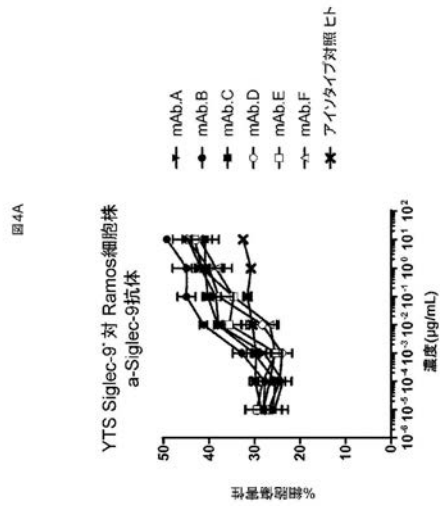
【 図 2 】



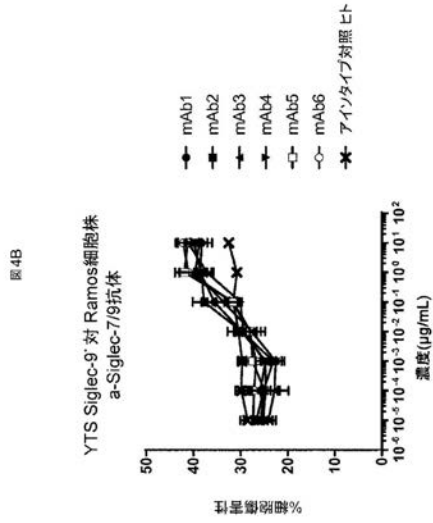
【 図 3 】



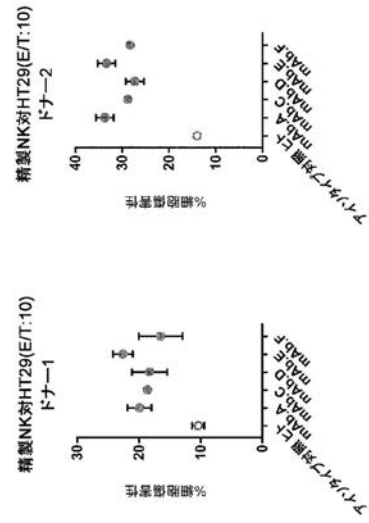
【 図 4 - A 】



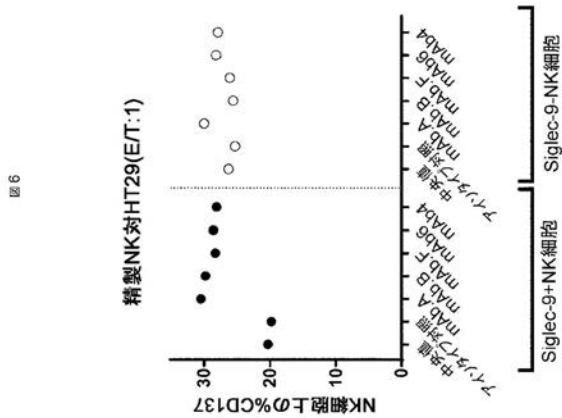
【 図 4 - B 】



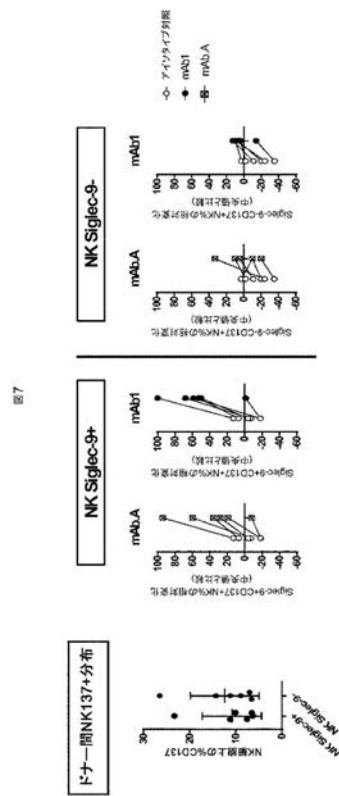
【 図 5 】



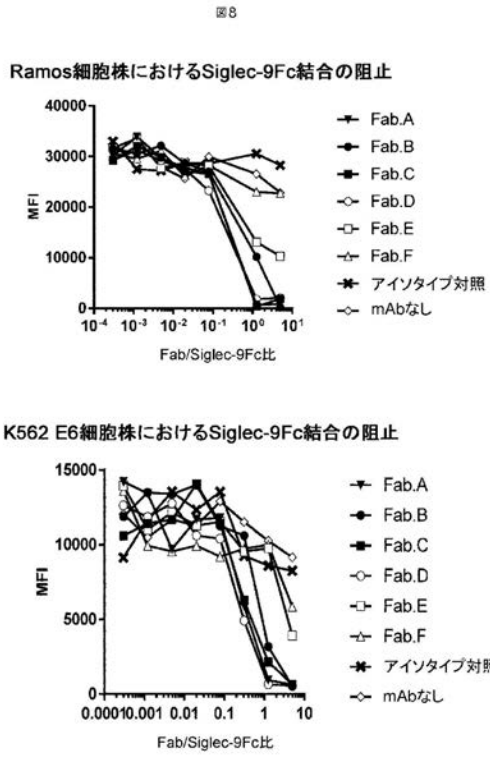
【 図 6 】



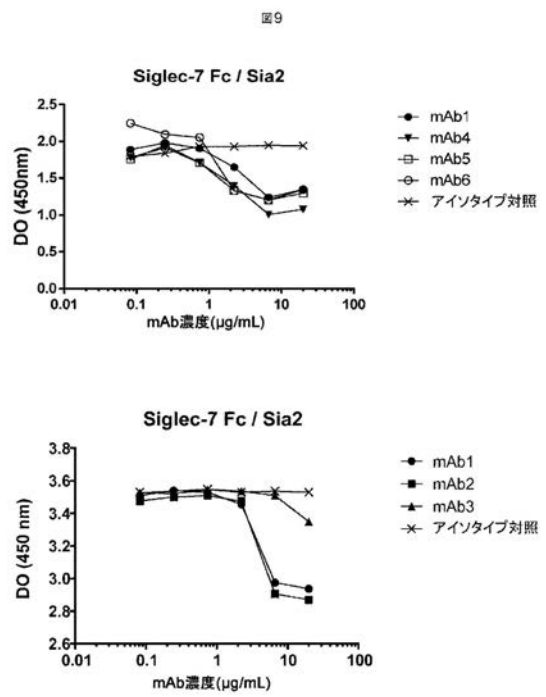
【 図 7 】



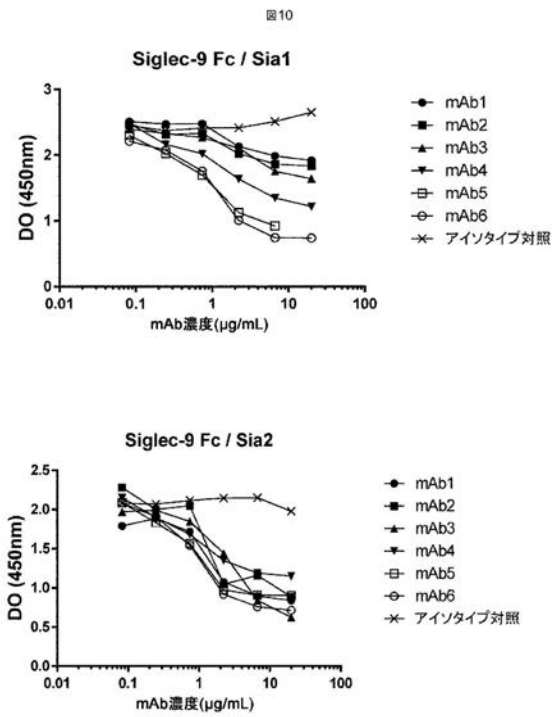
【 図 8 】



【 図 9 】



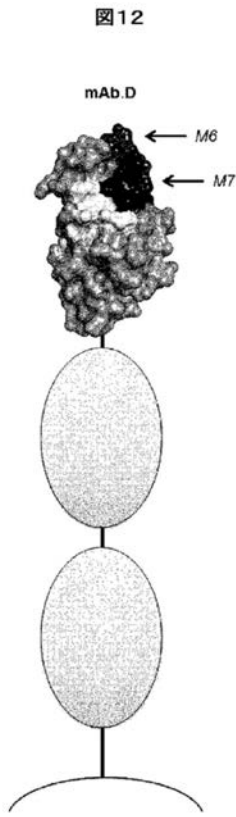
【 図 1 0 】



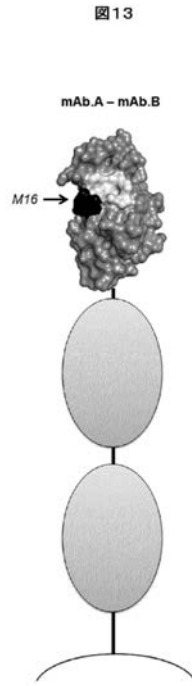
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【配列表】

2019511220000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/055364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 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		
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	CAMILLA JANDUS ET AL: "Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 124, no. 4, 24 February 2014 (2014-02-24), pages 1810-1820, XP055342636, US ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JC165899 page 1811, right-hand column, paragraph 4 figures 3A-3B page 1813, left-hand column ----- -/--	1,5-13, 15-25, 27-30, 32-44, 46,48-51
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 May 2017		12/07/2017
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
		Malamoussi, A

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/055364

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JASON E HUDAK ET AL: "Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 10, no. 1, 24 November 2013 (2013-11-24), pages 69-75, XP055312199, Basingstoke ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1388 page 71, right-hand column, paragraph 2 figure 3 online methods: "reagents and antibodies" -----	1,5-13, 15-24, 29,30, 33,34, 40,41, 48-51
X	Aaron F Carlin ET AL: "PHAGOCYTES, GRANULOCYTES, AND MYELOPOIESIS Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response", Blood, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 3333-3336, XP055372312, DOI: 10.1182/blood-2008-11-Retrieved from the Internet: URL:http://www.bloodjournal.org/content/113/14/3333.full.pdf [retrieved on 2017-05-12] page 3335, left-hand column, paragraph 1 figure 1 -----	1,5-13, 15-24, 29,30, 33,34, 40,41, 48-51
X	HEINZ LÄUBLI ET AL: "Engagement of myelomonocytic Siglecs by tumor-associated ligands modulates the innate immune response to cancer", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 111, no. 39, 15 September 2014 (2014-09-15), pages 14211-14216, XP055372314, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1409580111 page 14212, right-hand column, paragraph 3 -----	1,5-13, 15-25, 27-30, 32-44, 46,48-51
X	WO 2007/049044 A1 (UNIV DUNDEE [GB]; CROCKER PAUL RICHARD [GB]; BIEDERMANN BJOEM [GB]; BO) 3 May 2007 (2007-05-03) page 21, line 5 - line 8 page 35, line 19 - line 22 page 30, line 7 - page 31, line 15 page 17, line 23 page 19, line 10 - line 13 ----- -/--	23,31

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/055364

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>C Jandus ET AL: "Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance- Supplemental figures", The Journal of Clinical Investigation, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 1-14, XP055371656, Retrieved from the Internet: URL:https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/65000/65899/JCI65899sd.pdf [retrieved on 2017-05-11] figure 7A</p>	1,5-13, 15-25, 27-44, 46,48-51
A	<p>JASON E HUDAK ET AL: "Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion-Supplementary information", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 10, no. 1, 24 November 2013 (2013-11-24), pages S1-S21, XP055372305, Basingstoke ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1388 "reagents and antibodies"</p>	1,5-13, 15-25, 27-44, 46,48-51
A	<p>Heinz Läubli ET AL: "Supplementary Information Läubli et al, Engagement of Myelomonocytic Siglecs by Tumor-associated Ligands Modulates the Innate Immune Response to Cancer", 30 September 2014 (2014-09-30), pages 1-22, XP055372364, Retrieved from the Internet: URL:http://www.pnas.org/content/suppl/2014/09/15/1409580111.DCSupplemental/pnas.1409580111.sapp.pdf [retrieved on 2017-05-12] figures S1, S6, S10 page 3, paragraph 3</p>	1,5-13, 15-25, 27-44, 46,48-51
A	<p>STEPHAN VON GUNTEN ET AL: "Basic and Clinical Immunology of Siglecs", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1143, no. 1, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 61-82, XP055372327, US ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1196/annals.1443.011 page 72, right-hand column, paragraph 2 - page 73, right-hand column, paragraph 3 figure 3</p>	1,5-13, 15-25, 27-44, 46,48-51

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2017/055364**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1, 25(completely); 5-13, 15-24, 27-44, 46, 48-51(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2017/ 055364

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 25(completely); 5-13, 15-24, 27-44, 46, 48-51(partially)

1.1 1.1 An isolated antibody that binds a human Siglec-9 polypeptide and is capable of neutralizing the inhibitory activity of a Siglec-9 polypeptide expressed by a human NK cell.

1.2 1.2 An antibody that binds to a determinant present on an Ig-like C2 domain of a Siglec-9 polypeptide, which antibody is capable of neutralizing the inhibitory activity of the Siglec-9 polypeptide in a cell that expresses such polypeptide.

1.3 1.3 An antibody that binds human Siglec-9 , comprising CDRs of the sequences defined in claim 25.

2. claims: 2-4, 14, 26(completely); 5-13, 15-24, 27-44, 46, 48-51(partially)

2.1 An isolated antibody that specifically binds with comparable binding affinity to a human Siglec-7 polypeptide and to a human Siglec-9 polypeptide.

2.2 An antibody that binds to a determinant present on an Ig-like C2 domain of a Siglec-7 and Siglec-9 polypeptide, which antibody is capable of neutralizing the inhibitory activity of the Siglec-7 and Siglec-9 polypeptide in a cell that expresses such polypeptide.

2.3 An antibody that binds human Siglec-7 and Siglec-9 , comprising CDRs of the heavy and light chain variable region sequences defined in claim 26.

3. claims: 19-24, 27-44, 46, 48-51(all partially)

An antibody that binds to a determinant present on an Ig-like C2 domain of a Siglec-7 polypeptide, which antibody is capable of neutralizing the inhibitory activity of the Siglec-7 polypeptide in a cell that expresses such polypeptide.

4. claims: 45(completely); 46(partially)

A method for selecting subjects having a cancer that responds to a treatment with an anti-Siglec-9 and/or Siglec-7 antibody, the method comprising determining whether cancer cells in said subject express ST3GAL1 and/or ST3GAL6 enzymes (or ST3GAL1 and/or ST3GAL6 enzymatic activity), the expression of ST3GAL1 and/or ST3GAL6 enzymes, or elevated levels of ST3GAL1 and/or ST3GAL6 enzymes (or ST3GAL1 and/or ST3GAL6 enzymatic activity), being indicative of a responder subject.

International Application No. PCT/ EP2017/ 055364

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. claims: 47(completely); 50, 51(partially)

A method of producing an antibody which cross-reacts with multiple Siglec gene products and which neutralizes the inhibitory activity of such Siglecs, said method comprising the steps of:(a) providing a plurality of antibodies that bind a Siglec-9 polypeptide,(b) selecting antibodies that neutralize the inhibitory activity of a Siglec-9 polypeptide in NK cells purified from human donors .

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007049044	A1	03-05-2007	
		EP 1954318 A1	13-08-2008
		EP 3146979 A1	29-03-2017
		JP 5725693 B2	27-05-2015
		JP 2009513616 A	02-04-2009
		US 2009220509 A1	03-09-2009
		US 2011104149 A1	05-05-2011
		US 2013302317 A1	14-11-2013
		WO 2007049044 A1	03-05-2007

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	5/12	(2006.01)	C 1 2 N	5/12		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
C 1 2 N	15/06	(2006.01)	C 1 2 N	15/06	1 0 0	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		D
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		Y
			C 1 2 P	21/08		

(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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72)発明者 ステファニー・コルネン
フランス 1 3 0 0 9 マルセイユ、トラヴェルス・ドゥ・ラ・グフォンヌ 1 0 9 番、レジダンス・ヴァルマント・ミシュレ・パティマン・ベ 1

(72)発明者 バンジャマン・ロッシ
フランス 1 3 0 0 8 マルセイユ、アヴニユ・デファ 7 0 番、レジダンス・ラ・パルムレ・パティマン・セ

(72)発明者 ニコライ・ヴァクトマン
フランス 1 3 2 6 0 カシス、アブニユ・ジョゼフ・リオトー 1 6 番

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA20 QQ02 QQ08 QQ13 QQ79 QR48 QR72 QR77 QR80
QX01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA16 BB41 BB43 CC02 CC05 CC22 CC23 DD86
DD88 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	Siglec中和抗体		
公开(公告)号	JP2019511220A	公开(公告)日	2019-04-25
申请号	JP2018546850	申请日	2017-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	伊纳特医药公司 INNATE PHARMA PHARMA		
申请(专利权)人(译)	惰性制药兴业ANONYME		
[标]发明人	ステファニー・コルネン バンジャマン・ロッシ ニコライ・ヴァクトマン		
发明人	ステファニー・コルネン バンジャマン・ロッシ ニコライ・ヴァクトマン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/18 C07K16/46 C12N15/62 C12N5/12 C12N5/10 C12Q1/02 C12N15/06 A61P35/00 A61K39/395 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/2803 A61K47/6801 A61P35/00 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/70 C07K2317/76 C07K2317/92 C12N5/12 G01N33/57484		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/28.ZNA C07K16/18 C07K16/46 C12N15/62.Z C12N5/12 C12N5/10 C12Q1/02 C12N15/06.100 A61P35/00 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.Y C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	阿依鸭毛 富田健二		
优先权	62/304957 2016-03-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与在免疫细胞中具有抑制活性的人Siglec结合并中和该Siglec的抑制活性的试剂。此类试剂可用于治疗癌症或传染病。

