

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-222708

(P2016-222708A)

(43) 公開日 平成28年12月28日(2016.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/38 (2006.01)</b>	C07K 16/38 ZNA	4B063
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4B064
<b>C07K 17/02 (2006.01)</b>	C07K 17/02	4B065
<b>C12N 5/0783 (2010.01)</b>	C12N 5/0783	4C085
<b>C12N 5/12 (2006.01)</b>	C12N 5/12	4H045

審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-152697 (P2016-152697)	(71) 出願人	515292901 メドヴェット・サイエンス・ピーティーフ イ・リミテッド オーストラリア・サウスオーストラリア・ 5032・アンダーディール・ハーディズ ・ロード・65
(22) 出願日	平成28年8月3日(2016.8.3)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(62) 分割の表示	特願2013-504067 (P2013-504067) の分割	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
原出願日	平成23年4月18日(2011.4.18)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(31) 優先権主張番号	61/426,019		
(32) 優先日	平成22年12月22日(2010.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/325,093		
(32) 優先日	平成22年4月16日(2010.4.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P I 1 6 に結合するタンパク質とその利用

(57) 【要約】

【課題】例えば、診断目的で、予後予測目的で、治療目的で、および/または、予防目的で T r e g 細胞の検出と単離、または、T r e g 細胞の除去と破壊を可能にする新規のマーカ-、好ましくは、細胞表面マーカ-が当該分野において必要である。

【解決手段】本開示は、ペプチダーゼインヒビター 1 6 ( P I 1 6 ) と結合することができる少なくとも 1 つの抗体可変領域を含む単離タンパク質を提供し、前記タンパク質はまた、P T A - 1 0 6 8 5 の受託番号で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリド-マにより産生された抗体の P I 1 6 への結合を競合的に阻害することができる。本発明はまた、例えば診断、治療の際の、または細胞、好ましくは T r e g 細胞を単離するためのタンパク質の使用を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ペプチダーゼインヒビター 16 (PI 16) と結合することができる少なくとも 1 つのモノクローナル抗体可変領域を含む単離タンパク質であって、前記タンパク質がまた、PTA-10685 の受託番号で ATCC に寄託された CRCBT-02-001 という名称のハイブリドーマにより産生された抗体の PI 16 への結合を競合的に阻害することができる単離タンパク質。

## 【請求項 2】

CRCBT-02-001 という名称のハイブリドーマにより産生される抗体と結合するエピトープと重複するエピトープに結合する、請求項 1 に記載のタンパク質。

10

## 【請求項 3】

CRCBT-02-001 という名称のハイブリドーマにより産生される抗体と同じエピトープに結合する、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 4】

配列番号 32 または 38 に記載された配列を含むエピトープに特異的に結合する、請求項 3 に記載のタンパク質。

## 【請求項 5】

配列番号 33 ~ 37、39、およびその混合体からなる群から選択される配列内に含まれるエピトープに特異的に結合する、請求項 3 または 4 に記載のタンパク質。

## 【請求項 6】

PI 16 の立体構造エピトープに結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

20

## 【請求項 7】

前記立体構造エピトープが PI 16 中でのジスルフィド結合形成に依存する、請求項 6 に記載のタンパク質。

## 【請求項 8】

前記タンパク質が、還元型である PI 16 には実質的に結合しない、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

## 【請求項 9】

前記可変領域が抗体重鎖可変領域 ( $V_H$ ) または抗体軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

30

## 【請求項 10】

前記タンパク質が少なくとも 2 つの可変領域を含み、該可変領域のうちの 1 つが抗体重鎖可変領域 ( $V_H$ ) でありもう一つが抗体軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

## 【請求項 11】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

## 【請求項 12】

(i) 前記可変領域 (1 つまたは複数) がヒト可変領域であるか ;  
 (ii) 前記可変領域 (1 つまたは複数) が非ヒト可変領域であるか ; または  
 (iii) 前記可変領域 (1 つまたは複数) が非ヒト可変領域の 3 つの相補性決定領域 (CDR) を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

40

## 【請求項 13】

(i) 前記非ヒト可変領域が PTA-10685 の受託番号で ATCC に寄託された CRCBT-02-001 という名称のハイブリドーマにより産生された抗体に由来する ;  
 または

(ii) 前記可変領域が配列番号 8 に記載された配列を有する重鎖可変領域の CDR および / または配列番号 10 に記載された配列を有する軽鎖可変領域の CDR を有する、請求項 12 に記載のタンパク質。

## 【請求項 14】

50

キメラ抗体、脱免疫化抗体、またはヒト化抗体である、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 15】

(i) 配列番号 8 に記載された配列を含む重鎖可変領域の CDR と配列番号 10 に記載された配列を含む軽鎖可変領域の CDR とを有する重鎖可変領域；または

(ii) 配列番号 8 に記載された配列と少なくとも約 80% の同一性をもつ配列と、配列番号 10 に記載された配列と少なくとも約 80% の同一性をもつ配列を有する軽鎖可変領域とを有する重鎖可変領域、

を有する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 16】

P T A - 1 0 6 8 5 の受託番号で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマにより産生された抗体である、単離タンパク質。

【請求項 17】

前記タンパク質と複合体化する化合物を有する、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質と薬剂的に許容可能な担体とを含む組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をその上に固定化する固形担体または半固形担体。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を発現する単離細胞。

【請求項 21】

P T A - 1 0 6 8 5 の受託番号で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマである請求項 20 に記載の細胞。

【請求項 22】

試料中のペプチダーゼインヒビター 16 ( P I 1 6 ) または P I 1 6 発現細胞を検出する方法であって、前記方法は、試料を請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 18 に記載の組成物または請求項 19 に記載の固形担体もしくは半固形担体に接触させて、タンパク質が試料中の、もし存在するならば、P I 1 6 に結合するようにすること、および、結合タンパク質を検出することを含む方法。

【請求項 23】

前記細胞が制御性 T ( T r e g ) 細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 T r e g 細胞が内在性 T r e g 細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

内在性制御性 T ( n T r e g ) 細胞を誘導性 T r e g ( i T r e g ) 細胞と区別する方法であって、前記方法が T r e g 細胞を含む試料を請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 18 に記載の組成物または請求項 19 に記載の固形担体もしくは半固形担体に接触させて、タンパク質が試料中の P I 1 6 発現 T r e g 細胞に結合するようにすること、および、P I 1 6 発現 T r e g 細胞を検出することを含み、前記 P I 1 6 発現 T r e g 細胞が n T r e g 細胞である方法。

【請求項 26】

細胞を単離する方法であって、前記方法が、請求項 23 または 24 に記載の方法を実施することにより細胞を検出すること、および、検出した細胞を単離することまたは請求項 25 に記載の方法を実施することにより n T r e g 細胞を区別して、前記区別した n T r e g 細胞を単離することを含む方法。

【請求項 27】

P I 1 6 発現細胞が濃縮されている細胞集団を産生する方法であって、前記方法が P I

10

20

30

40

50

16 発現細胞を含む細胞集団を請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 18 に記載の組成物または請求項 19 に記載の固形担体もしくは半固形担体に接触させて、タンパク質が試料中の P I 16 発現細胞に結合するようにすること、および、前記タンパク質と結合する細胞を選択することを含む方法。

【請求項 28】

前記濃縮細胞が制御性 T ( T r e g ) 細胞である、請求項 26 または 27 に記載の方法。

【請求項 29】

P I 16、ならびに C L A、H L A D R および C C R 4 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質を発現する制御性 T ( T r e g ) 細胞が濃縮されている細胞集団。

10

【請求項 30】

細胞が対象の炎症部位または皮膚に移動することができる、請求項 26 または 28 に記載の方法により単離された細胞または請求項 27 もしくは 28 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 29 に記載の細胞集団。

【請求項 31】

炎症部位または皮膚に優先的に移動する、請求項 30 に記載の細胞または細胞集団。

【請求項 32】

対象の症状を診断および / または予後予測する方法であって、前記方法が請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法を実施して P I 16 もしくは P I 16 発現細胞を検出すること、または、対象由来の試料中の P I 16 もしくは前記細胞のレベルを測定することを含み、P I 16 もしくは P I 16 発現細胞の検出、または、P I 16 もしくは P I 16 発現細胞または P I 16 もしくは P I 16 発現細胞のレベルの未検出が症状の診断または予後予測となる方法。

20

【請求項 33】

病状を治療または予防する方法であって、前記方法が請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 18 に記載の組成物または請求項 19 に記載の固形担体もしくは半固形担体または請求項 26 もしくは 28 に記載の方法により単離された細胞または請求項 27 もしくは 28 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 29 に記載の細胞集団をそれを必要とする対象に投与することを含む方法。

【請求項 34】

前記症状が制御性 T ( T r e g ) 細胞関連症状である、請求項 32 または 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

P I 16 発現細胞に化合物を送達する方法であって、前記細胞を請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に接触させることを含む方法。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 18 に記載の組成物または請求項 19 に記載の固形担体もしくは半固形担体または請求項 26 もしくは 28 に記載の方法により単離された細胞または請求項 27 もしくは 28 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 29 に記載の細胞集団の医薬における使用。

40

【請求項 37】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のタンパク質、または、請求項 18 に記載の組成物、または、請求項 19 に記載の固形担体もしくは半固形担体または請求項 26 もしくは 28 に記載の方法により単離された細胞、または請求項 27 または 28 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 29 に記載の細胞集団の制御性 T ( T r e g ) 細胞関連症状の治療用薬剤の製造における使用。

【請求項 38】

P I 16 発現制御性 T ( T r e g ) 細胞を投与することを含む、T<sub>H</sub> 17 介在性症状を治療する方法。

【請求項 39】

50

前記 T r e g 細胞が全身投与され、T<sub>H</sub> 17 介在性症状の部位に移動する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

P I 16 発現制御性 T ( T r e g ) 細胞を炎症部位に投与することを含む、炎症を治療する方法。

【請求項 41】

前記炎症部位はインターロイキン ( I L ) 1 および / または I L 6 の発現を特徴とする、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

T r e g 関連炎症を診断する方法であって、前記方法が対象の炎症部位由来の試料における P I 16<sup>-</sup> T r e g 細胞に対する P I 16<sup>+</sup> 制御性 T ( T r e g ) 細胞の割合を検出することを含み、P I 16<sup>-</sup> T r e g 細胞に対する P I 16<sup>+</sup> T r e g 細胞の割合の変化が前記状態の指標である方法。

10

【請求項 43】

前記割合の変化が P I 16<sup>-</sup> T r e g 細胞に対する P I 16<sup>+</sup> T r e g 細胞の減少である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記炎症部位が滑液である、請求項 42 または 43 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

参照による援用

本願は、2010年4月16日に出願された「P I 16 に結合するタンパク質とその利用法」という表題の米国仮出願第 61 / 325093 号、および、2010年12月22日に提出された「P I 16 に結合するタンパク質とその利用法 2」という表題の米国仮出願第 61 / 246019 号からの優先権を主張する。これらの出願の両方の全体を参照により本明細書に援用する。

【0002】

技術分野

本発明は、P I 16 に結合するタンパク質とその利用に関する。本開示はまた制御性 T ( T r e g ) 細胞に関係する症状の診断 / 予後予測 / 治療 / 予防の方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

制御性 T ( T r e g ) 細胞は C D 4 と C D 25 の両方の発現、および、フォークヘッド / ウィングド転写因子である F o x P 3 の発現を特徴とする。マウスで最初に特徴が調べられたのだが、マウスではそれらはリンパ節と脾臓の C D 4<sup>+</sup> T 細胞集団の約 6 ~ 10 % を構成し、ヒト C D 4<sup>+</sup> T 細胞の約 5 ~ 10 % が C D 4<sup>+</sup> C D 25<sup>+</sup> 細胞である ( W i n g および S a k a g u c h i , 2010年)。以下で詳細に考察するように、T r e g 細胞は C D 4<sup>+</sup> T 細胞、および、C D 8<sup>+</sup> T 細胞の活動を抑制する能力を有する。

【0004】

40

T r e g 細胞をいくつかのサブセットに分けることができる ( B l u e s t o n e ら , 2000年)。T r e g 細胞の1つのサブセットは胸腺で発生する ( 内在性 T r e g ( n T r e g ) 細胞としても知られる)。そして、これらの胸腺由来 T r e g 細胞はサイトカイン非依存的な機構により機能し、その機構には細胞間の接触が関与する ( S h e v a c h , 2002年)。これらの細胞は自己免疫寛容の誘導と維持、および、自己免疫状態の防止に必須である ( S h e v a c h , 2000年、S a l o m o n ら , 2000年、S a k a g u c h i ら , 2001年)。これらの制御性細胞は、胸腺による除去を免れた、または、胸腺外抗原を認識する自己反応性 T 細胞の活性化と増殖を防ぎ、そして、結果として、恒常性の維持、および、免疫制御、ならびに、自己免疫状態の発生に対する宿主の防御に重要である ( S u r i - P a y e r ら , 1996年、A s a n o , 1996年、W i

50

l l e r f o r d ら , 1 9 9 5 年、 S a l o m o n ら , 2 0 0 0 年 ) 。

【 0 0 0 5 】

成熟した末梢 CD4<sup>+</sup>T 細胞を活性化することにより T r e g 細胞を作製することもできる ( これらの細胞は誘導性 T r e g ( i T r e g ) 細胞として知られる。 ) 。生体外で、例えば、成長因子に曝露することにより、および、インビボで、例えば、胃腸管でこれらの細胞を作製することができる。末梢血由来 T r e g 細胞は、トランスフォーミング増殖因子 ( T G F - ) 、および、 I L - 1 0 のような免疫抑制性サイトカインを産生することによりそれらの細胞の阻害的活性を媒介することが研究により示されている ( K i n g s l e y , 2 0 0 2 年、 N a k a m u r a , 2 0 0 1 年 ) 。これらの T r e g 細胞は、抗原特異的活性化の後、 CD4<sup>+</sup>T 細胞、または、 CD8<sup>+</sup>T 細胞のどちらかの増殖を非特異的に抑制することができる ( B a e c h e r - A l l a n , 2 0 0 1 年 ) 。自己抗原提示細胞 ( A P C ) と共に培養されるとき、 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞は抗 CD3 抗体による T 細胞の刺激を阻害することができることが研究により示されている ( 例えば、 S t e p h e n s , 2 0 0 1 年、 T a a m s , 2 0 0 1 年 ) 。

10

【 0 0 0 6 】

n T r e g 細胞と i T r e g 細胞の両方が制御性活性を持つ一方、移植片対宿主病 ( G V H D、 K o e n e c k e ら , 2 0 0 9 年 ) の最近の研究において、 i T r e g 細胞がインビボでこの活性を失うことが示された。対照的に、 n T r e g 細胞はその制御性活性を維持し、そして、 G V H D の発生を防ぐ。したがって、 n T r e g 細胞集団の同定 / 単離が可能であることが望ましい。

20

【 0 0 0 7 】

T r e g 細胞の免疫調節性活性は接触依存的であり得る、または、 T r e g 細胞はパーフォリン、もしくは、グランザイム依存的な方法で、または、免疫抑制性サイトカイン、例えば、 I L - 1 0、および / もしくは、 T G F - の分泌により CD4<sup>+</sup>T 細胞、および、 CD8<sup>+</sup>T 細胞を殺すことができる ( D e j a c o ら , 2 0 0 5 年に概説される。 ) 。

【 0 0 0 8 】

T r e g 細胞、および、自己免疫状態 / 自己免疫寛容

様々なマウス系統から T r e g 細胞を除去することで甲状腺炎、卵巣炎、胃炎、または、炎症性腸疾患を含む様々な組織特異的自己免疫疾患になることが示されている ( A s a n o , 1 9 9 6 年、 S u r i - P a y e r , 1 9 9 8 年、および、 M c H u g h , 2 0 0 2 年 ) 。さらに、 F o x P 3 遺伝子に変異を持つヒトの患者は T r e g 細胞を産生することができず、そして、自己免疫性多腺性内分泌障害 ( 特に、 1 型糖尿病、および、甲状腺機能低下症 )、および、 ( 免疫調節不全、多腺性内分泌障害、腸疾患、伴性 ( I P E X ) 症候群として集約される ) 腸疾患を発生する。 F o x P 3 の多型は自己免疫性糖尿病に関係する ( B a s s u n y ら , 2 0 0 3 年 ) 。さらに、 F o x P 3 欠損マウスは I P E X 様の症候群を発生する ( D e j a c o ら , 2 0 0 5 年を参照のこと。 ) 。

30

【 0 0 0 9 】

表 1 に示されるように、様々な疾患を患う対象で循環血液中の T r e g 細胞のレベルが減少している。さらに、これらの細胞のレベルが低くなるほど、疾患活動性が高く、および / または、予後が悪い。

40

## 【表1】

表1：血中循環CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞レベルの減少に関連する自己免疫疾患疾患

疾患	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞のレベル (対照) と有意度	引用文献
若年性特発性関節炎	1.2 (1.6) ***	De Kleer (2004年)
若年性特発性関節炎	0.4 (1.2) ***	Caorà (2004年)
リウマチ性関節炎	0.7 (1.2) *	Caorà (同上)
リウマチ性関節炎	1.2 (3.7) *	Liuら (2004年)
乾癬性関節炎	0.6 (1.2) *	Caorà (同上)
HCV混合性クリオグロブリン血症	2.6 (7.9) **	Boyerら (2004年)
自己免疫性肝疾患	2.5 (6.8) ***	Longhiら (2004年)
全身性エリスマトーデス (SLE)	1.8 (3.7) *	Caorà (同上)
SLE	0.9 (2.6) *	Crispinら (2003年)

\*: p < 0.05、\*\*: p < 0.01、\*\*\*: p < 0.001

## 【0010】

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞のレベルの上昇が炎症部位で、例えば、若年性特発性関節炎、リウマチ性関節炎、脊椎関節炎、および、感染を患う対象で観察される (De Jacorà, 2005年に概説される)。これらの細胞は局所的な免疫反応を調節して、例えば、付随組織損傷を防ぐとされている。

## 【0011】

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の養子移入がこれらの疾患の発生を防ぎ、そして、いくつかのモデルでは発症後にこれらの疾患を治すことができる (Mottetら, 2003年)。Suri-Payerら (1998年) はまた、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞が自己抗原特異的T細胞クローンにより誘導される自己免疫状態を防ぐことができ得ることを発見した。ヌードマウスへのCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞の移入はまた自己免疫疾患を発生することになるが、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の共移入によりその自己免疫疾患を防ぐことができる (Sakaguchiら, 1995年)。

## 【0012】

Tangら (2004年) は、Treg細胞はまた自己免疫疾患の治療に有用であることを証明した。筆者らは非肥満性糖尿病 (NOD) マウスからTreg細胞を単離し、自己抗原に特異的なTCR遺伝子導入細胞を増殖させた。NODマウスへのこれらの細胞の養子移入は新規の形質移入マウスの糖尿病を好転させた。

## 【0013】

Trenadoによる研究 (2002年) はまた、生体外で活性化し、そして、増殖させたCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の点滴によりマウスでの急性致死移植片対宿主病 (GVHD) がかなり抑制されることを証明した。Treg細胞はまたげっ歯類で同種移植片拒絶を抑制し、心臓同種移植片 (Van Maurik, 2002年)、または、豚島同種移植片 (Gregori, 2001年) を長期にわたり生存させることが示された。

## 【0014】

10

20

30

40

50

上で述べたことに基づくと、自己免疫疾患の治療、もしくは、予防、もしくは、対象における免疫寛容の誘導にとってTreg細胞は魅力的であること、または、Treg細胞の循環レベルを検出することがそれらの疾患の診断、もしくは、予後予測に有益であることは当業者にとって明らかであるであろう。しかしながら、Treg細胞の単離を可能にするマーカーが不十分であるため、動物モデルの結果をヒトの状況に移入させることに困難が生じている。今まで、他のT細胞からTreg細胞を明確に区別する唯一のマーカーはFoxP3である。FoxP3は細胞内タンパク質であり、そして、その結果として、生きているTreg細胞を単離するためのマーカーとしては有用ではない。したがって、例えば、診断目的で、および/または、治療目的で、および/または、予防目的でTreg細胞の検出、および/または、単離を可能にするTreg細胞の新規のマーカー、好ましくは、細胞表面マーカーが当該技術分野において必要である。

10

## 【0015】

## Treg細胞と免疫反応の誘導

Treg細胞はまた癌患者の腫瘍浸潤リンパ球、末梢血リンパ球、および/または、所属リンパ節リンパ球の中に著しく高い割合で存在する。細胞の頻度は腫瘍の進行度に関連し、治療効果と逆相関する。したがって、免疫反応を抑制するTreg細胞の能力は腫瘍細胞を殺す免疫系の能力を抑制するよう見える。

## 【0016】

Wangら(2004年)はCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>腫瘍浸潤リンパ球(TIL)をヒトの黒色腫患者から単離した。このTILは腫瘍/自己抗原であるLAG-1を認識した。卵巣癌の患者の腹水からCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>TILが単離されており、これらの細胞がT細胞活性を抑制し得ることが示された(Curieら, 2004年)。

20

## 【0017】

Treg細胞集団を取り除くことがまた注入された腫瘍細胞の排除をかなり改善することも示されている。例えば、Jonesら(2002年)では、モノクローナル抗体治療を用いるCD25発現T細胞の除去が黒色腫細胞に対する長期にわたるCD4<sup>+</sup>T細胞介在性免疫を促進した。その筆者らは、マウスが、抗CD25抗体処理の後に、マウスにおける腫瘍増殖の阻害に付随する自己抗原(チロシナーゼ)に対する免疫反応を発達させたことを示した。

## 【0018】

Goforthら(2008年)はまた、抗原性腫瘍溶解物および免疫刺激性CpGオリゴヌクレオチドで負荷された乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子が抗原提示細胞を効率よく活性化し、それらはマクロファージと樹状細胞のリソソーム内小胞に取り込まれたことを示した。免疫刺激性抗原負荷粒子(ISAP)での免疫によりT細胞が顕著に増殖することとなったが、しかし、既存の黒色腫の腫瘍増殖はわずかに抑制されるだけであった。CD25<sup>+</sup>細胞が抗CD25抗体で抑制されるとき、ISAPでの免疫は予防モデルにおいて完全な抗原特異的免疫状態を誘導した。これらの発見は、特に自己抗原に対する免疫の前に、および/または、免疫中にTreg細胞の活性を抑制することが必要である、または、抑制することが望ましい可能性があることを示唆する。

30

## 【先行技術文献】

40

## 【非特許文献】

## 【0019】

【非特許文献1】Wing and Sakaguchi, Nature Immunology, 11: 7-13, 2010

【非特許文献2】Bluestone et al., Nat. Rev. Immunol., 3: 253, 2000

【非特許文献3】Shevach, Nature Rev. Immunol 2:389, 2002

【非特許文献4】Shevach, Annu. Rev. Immunol. 18:423-449, 2000

【非特許文献5】Salomon et al, Immunity 12:431-440, 2000

【非特許文献6】Sakaguchi et al, Immunol. Rev. 182:18- 32, 2001

【非特許文献7】Suri-Payer et al, J. Immunol. 157:1799-1805, 1996

【非特許文献8】Asano et al, J. Exp. Med. 184:387-396, 1996

50

- 【非特許文献 9】Willerford et al, *Immunity* 3:521-530, 1995
- 【非特許文献 10】Kingsley et al, *J. Immunol.* 168:1080, 2002
- 【非特許文献 11】Nakamura et al, *J. Exp. Med.* 194:629-644, 2001
- 【非特許文献 12】Baecher-Allan et al, *J. Immunol.* 167:1245-1253, 2001
- 【非特許文献 13】Stephens et al, *Eur. J. Immunol.* 31:1247-1254, 2001
- 【非特許文献 14】Taams et al, *Eur. J. Immunol.* 31:1122-1131, 2001
- 【非特許文献 15】Koenecke et al., *Eur J Immunol.* 39):3091-3096, 2009
- 【非特許文献 16】Dejaco et al., *Immunology*, 117: 289-300, 2005
- 【非特許文献 17】Suri-Payer et al., *J. Immunol.*, 160: 1212-1218, 1998
- 【非特許文献 18】McHugh et al., *J. Immunol.*, 168: 5979-5983, 2002
- 【非特許文献 19】Bassuny et al., *Immunogenetics* ,55: 149-156, 2003
- 【非特許文献 20】Mottet et al., *J. Immunol.*, 170: 3939-3943, 2003
- 【非特許文献 21】Sakaguchi et al., *Nature*, 426: 454-460, 1995
- 【非特許文献 22】Tang et al., *J. Exp. Med.*, 199: 1455-1465, 2004
- 【非特許文献 23】Trenado et al., *J. Clin. Invest.*, 112: 1688-1696, 2002
- 【非特許文献 24】Van Maurik *J. Immunol.* 169: 5401-5404, 2002
- 【非特許文献 25】Gregori et al., *J Immunol.* 167: 1945-1953, 2001
- 【非特許文献 26】Wang et al., *Immunity* 20: 107-118, 2004
- 【非特許文献 27】Curiel et al., *Nat. Med.*, 10: 942-949, 2004
- 【非特許文献 28】Jones et al., *Cancer Immun.* 22;2:1, 2002
- 【非特許文献 29】Goforth et al., *Cancer Immunol Immunother.* 2008
- 【非特許文献 30】Robb et al., *J Exp Med* 154: 1455-1474, 1981
- 【非特許文献 31】Zola et al., *Immunol Cell Biol.*, 67: 233-237, 1989

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

Treg細胞の除去が、例えば、自己抗原、または、非自己抗原に対する免疫反応を改善する魅力的な方法を提供することが先の考察から明らかであるであろう。しかしながら、上で考察したように、Treg細胞を除去することを可能にするマーカーが不十分であることがこれらの細胞を標的とする治療戦略を妨げてきた。例えば、細胞表面マーカーCD25はTreg細胞でよく発現し、そして、これらの細胞を単離する、または、標的とするために伝統的に使用されてきたが、一方、このタンパク質はまた、活性型B細胞、いくつかの胸腺細胞、骨髄前駆細胞、および、オリゴデンドロサイトに加えて他のT細胞集団（例えば、活性型T細胞）で発現する（例えば、Robbら, 1981年、および、Zolara, 1989年を参照のこと）。したがって、例えば、診断目的で、予後予測目的で、治療目的で、および/または、予防目的でTreg細胞の検出と単離、または、Treg細胞の除去と破壊を可能にする新規のマーカー、好ましくは、細胞表面マーカーが当該分野において必要である。

30

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明をもたらした研究において、本発明者らはTreg細胞の新しい細胞表面マーカーを同定しようと努めた。本発明者らは、ヘルパーT細胞のようなその他のT細胞と比較してTreg細胞で発現が上昇するペプチダーゼインヒビター16 (PI16)を同定した。本発明者らはまた、PI16の発現がTreg細胞転写因子FoxP3と関連することを明らかにした。これらのデータに基づき、PI16はTreg細胞のバイオマーカーであると本発明者らは結論した。本発明者らは次にPI16に結合できるタンパク質を作製した。例えば、本発明者らは、一連のモノクローナル抗体を作製し、そのうちの1つは細胞表面のPI16に結合し、そして、Treg細胞の細胞表面マーカーを発現する細胞集団を単離する能力を持つことを明らかにした。このモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマをCRCBT-02-001と名付ける。このモノクローナル抗体、および、

40

50

このモノクローナル抗体の結合を競合的に阻害するタンパク質は、細胞、例えば、Treg細胞、好ましくはメモリーnTreg細胞、または、休止メモリーnTreg細胞のようなnTreg細胞の同定、または、単離、PI16関連症状（例えば、Treg細胞関連症状）の診断、または、予後予測、ならびに、PI16、および/または、Treg細胞関連症状の治療を含む様々な用途に有用である。

【0022】

したがって、本発明は、ペプチダーゼインヒビター16（PI16）に結合する能力がある少なくとも1つの抗体（例えば、モノクローナル抗体）の可変領域を含む単離されたタンパク質を提供し、このタンパク質は、PTA-10685の受託番号でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体のPI16への結合を競合的に阻害することもできる。

10

【0023】

1つの例において、前記タンパク質は、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体が結合するエピトープと重複するエピトープに結合する。あるいは、そのタンパク質は、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体と同じエピトープに結合する。

【0024】

1つの例において、前記タンパク質は、例えば、配列番号1のC末端21アミノ酸を含む膜結合型のPI16に結合する。

【0025】

1つの例において、前記タンパク質は、配列番号32、または、配列番号38に記載の配列を含有するエピトープに特異的に結合する。

20

【0026】

1つの例において、前記タンパク質は、配列番号33～37、配列番号39、および、その混合物から成る群より選択される配列に含まれるエピトープに特異的に結合する。

【0027】

1つの例において、前記タンパク質は、配列番号32～39、および、その混合物からなる群より選択される配列からなるペプチドに特異的に結合する。

【0028】

1つの例において、前記タンパク質は、PI16中の立体構造的エピトープに結合する。例えば、立体構造的エピトープはPI16内のジスルフィド結合に依存している。例えば、前記タンパク質が結合する立体構造的エピトープはジスルフィド結合を欠くPI16、例えば、還元型のPI16には存在しない。

30

【0029】

1つの例において、前記タンパク質は還元型のPI16に実質的に結合しない。例えば、前記タンパク質は還元型のPI16に検出できるほど結合することはない。

【0030】

1つの例において、前記タンパク質はグリコシル化PI16、または、脱グリコシル化PI16に結合する。例えば、前記タンパク質はN-グリコシル化PI16、または、非N-グリコシル化PI16に結合する。

40

【0031】

1つの例において、前記タンパク質は少なくとも約5nM、例えば、少なくとも約4nM、例えば、少なくとも約3nMの親和性(KD)でPI16に結合する。

【0032】

1つの例において、前記タンパク質は、少なくとも約1.25nMの親和性(KD)でPI16に結合する。1つの例において、Fcに融合したPI16の細胞外領域を固定化し、前記タンパク質（例えば、Fab）の固定化タンパク質への結合を表面プラズモン共鳴を用いて評価することでKDを評価する。

【0033】

1つの例において、前記タンパク質は、少なくとも約2.56nMの親和性(KD)で

50

PI16に結合する。1つの例において、前記タンパク質を固定化し、Fcに融合したPI16の細胞外領域の固定化タンパク質への結合を表面プラズモン共鳴を用いて評価することでKDを評価する。

【0034】

1つの例において、前記タンパク質は1nMと3nMの間の、例えば、約1.1nMと2.7nMの間の、例えば、約1.2nMと2.6nMの間の、例えば、約1.25nMと2.56nMの間の親和性(KD)を有する。

【0035】

1つの例において、前記タンパク質は、少なくとも約 $2 \times 10^5$ の、例えば、約 $2.4 \times 10^5$ の、例えば、約 $2.6 \times 10^5$ の、例えば、約 $2.8 \times 10^5$ の、例えば、少なくとも約 $2.97 \times 10^5$ のKaを有する。1つの例において、Fcに融合したPI16の細胞外領域を固定化し、前記タンパク質(例えば、Fab)の固定化タンパク質への結合を表面プラズモン共鳴を用いて評価することでKaを評価する。

10

【0036】

1つの例において、前記タンパク質は少なくとも約 $5 \times 10^4$ の、例えば、少なくとも約 $5.2 \times 10^4$ の、例えば、少なくとも約 $5.3 \times 10^4$ の、例えば、少なくとも約 $5.5 \times 10^4$ の、例えば、少なくとも約 $5.7 \times 10^4$ の、例えば、少なくとも約 $5.82 \times 10^4$ のKaを有する。1つの例において、前記タンパク質を固定化し、Fcに融合したPI16の細胞外領域の固定化タンパク質への結合を表面プラズモン共鳴を用いて評価することでKaを評価する。

20

【0037】

1つの例において、前記タンパク質は少なくとも約 $4.5 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $4.2 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $3.8 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $3.72 \times 10^{-4}$ のKdを有する。1つの例において、Fcに融合したPI16の細胞外領域を固定化し、前記タンパク質(例えば、Fab)の固定化タンパク質への結合を表面プラズモン共鳴を用いて評価することでKdを評価する。

【0038】

1つの例において、前記タンパク質は少なくとも約 $2.5 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $2.2 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $1.8 \times 10^{-4}$ 、例えば、少なくとも約 $1.49 \times 10^{-4}$ のKdを有する。1つの例において、前記タンパク質を固定化し、Fcに融合したPI16の細胞外領域の固定化タンパク質への結合を表面プラズモン共鳴を用いて評価することでKdを評価する。

30

【0039】

1つの例において、前記タンパク質はマウスPI16に検出できるほど結合することはない。

【0040】

1つの例において、前記タンパク質はヒトPI16に結合する。

【0041】

1つの例において、本発明のタンパク質の可変領域は抗体重鎖可変領域( $V_H$ )、または、抗体軽鎖可変領域( $V_L$ )である。

40

【0042】

あるいは、前記タンパク質は少なくとも2つの可変領域を含み、その可変領域のうちの1つは抗体重鎖可変領域( $V_H$ )であり、もう1つの可変領域は抗体軽鎖可変領域( $V_L$ )である。例えば、そのタンパク質は、 $V_L$ が $V_H$ に結合して抗原結合部位を形成するFvを含む。抗原結合部位を形成する $V_L$ と $V_H$ は単一のポリペプチド鎖に(例えば、scFvに)、または、異なるポリペプチド鎖に(例えば、抗体、または、二重特異性抗体に)存在することができる。

【0043】

前記タンパク質は抗体、例えば、モノクローナル抗体であることが好ましい。1つの例

50

において、そのタンパク質は、任意の例に従い、本明細書において考察される抗体重鎖可変領域 ( $V_H$ )、または、抗体軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) を含む抗体である。

【0044】

本発明の1つの例において、可変領域はヒト可変領域である。例えば、本発明の抗体はヒトの抗体であり得る。

【0045】

別の例において、可変領域は非ヒト可変領域である、または、その可変領域は非ヒト可変領域の3つの相補性決定領域を含むものである。例えば、そのタンパク質はキメラタンパク質、もしくは、キメラ抗体、脱免疫化タンパク質、もしくは、脱免疫化抗体、または、ヒト化タンパク質、もしくは、ヒト化抗体であり得る。

10

【0046】

1つの例において、非ヒト可変領域は、受託番号PTA-10685でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体に由来する。

【0047】

1つの例において、前記タンパク質は、配列番号8に記載の配列を含む重鎖可変領域のCDR、および、配列番号10に記載の配列を含む軽鎖可変領域のCDRを含む重鎖可変領域を含む。任意の公知の方法であって、例えば、本明細書に記載される方法に従って、CDRの特質を決定する。1つの例において、CDRは図21で示される配列を含む。

【0048】

1つの例において、前記タンパク質は、配列番号8に記載の配列に少なくとも約80%、または、85%、または、90%、または、91%、または、92%、または、93%、または、94%、または、95%、または、96%、または、97%、または、98%、または、99%同一である配列を含む重鎖可変領域を含み、および、配列番号10に記載の配列に少なくとも約80%、または、85%、または、90%、または、91%、または、92%、または、93%、または、94%、または、95%、または、96%、または、97%、または、98%、または、99%同一な配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0049】

1つの例において、前記タンパク質は、配列番号8に記載の配列を含む重鎖可変領域を含み、および、配列番号10に記載の配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【0050】

配列番号8に記載の重鎖可変領域、および/または、配列番号10に記載の軽鎖可変領域と受託番号PTA-10685でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体のその(それらの)領域の配列との間に相違がある場合、CRCBT-02-001が産生する抗体の配列が優先する。

【0051】

本発明はまた受託番号PTA-10685でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体である単離されたタンパク質を提供する。

【0052】

1つの例において、本発明のタンパク質はTreg細胞の機能を阻害する、または、妨害する。

40

【0053】

別の例において、本発明のタンパク質はTreg細胞の機能を活性化する、または、強化する。

【0054】

本発明のいくつかの例において、前記タンパク質はそのタンパク質と複合体化する化合物を有する。化合物の例は、放射性同位体、検出可能な標識物質、治療用化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象中で前記タンパク質の半減期を増加させる化合物、および、それらのうちの2つ以上の混合物からなる群より選択される。

50

## 【 0 0 5 5 】

本発明は本発明のタンパク質、および、薬剂的に許容可能な担体を含む組成物をさらに提供する。

## 【 0 0 5 6 】

本発明はまた本発明のタンパク質を固定化する固形担体、または、半固形担体を提供する。

## 【 0 0 5 7 】

本発明は本発明のタンパク質をコードする単離された核酸をさらに提供する。受託番号 P T A - 1 0 6 8 5 で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマが産生する抗体の  $V_H$  をコードする核酸の例は配列番号 8 に記載の配列を含む。受託番号 P T A - 1 0 6 8 5 で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマが産生する抗体の  $V_L$  をコードする核酸の例は配列番号 10 に記載の配列を含む。1つの例において、その核酸は発現コンストラクト中のプロモーターに機能的に結合する。

10

## 【 0 0 5 8 】

本発明は本発明のタンパク質を発現する単離された細胞をさらに提供する。例えば、その細胞は本発明の核酸、および/または、本発明の発現コンストラクトを含む。

## 【 0 0 5 9 】

あるいは、前記細胞はハイブリドーマ、例えば、受託番号 P T A - 1 0 6 8 5 で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマである。

20

## 【 0 0 6 0 】

本発明は、本発明のタンパク質を製造する方法であって、本発明の核酸、および/または、本発明の発現コンストラクトを細胞、または、無細胞系で発現させることを含む方法をさらに提供する。1つの例において、その方法は、前記タンパク質が発現するように受託番号 P T A - 1 0 6 8 5 で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマを培養することを含む。いくつかの形態において、その方法は前記タンパク質を単離することをさらに含む。

## 【 0 0 6 1 】

本発明は、試料中の P I 1 6、または、P I 1 6 発現細胞を検出する方法であって、もしあれば、試料中の P I 1 6 に本発明のタンパク質が結合するように、本発明のいずれか1つのタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体と試料を接触させることを含み、結合したタンパク質を検出する方法をさらに提供する。

30

## 【 0 0 6 2 】

1つの例において、前記方法は、

( i ) もしあれば、試料中の P I 1 6 に本発明のタンパク質が結合するように、試料をそのタンパク質と接触させること、

( i i ) もしあれば、試料中の P I 1 6 に他のタンパク質が結合するように、本発明のタンパク質が結合するのとは異なる P I 1 6 中のエピトープに結合する別のタンパク質に試料を接触させること、

40

および、結合したタンパク質のうちの1つ、または、他方、または、両方を検出することを含む。

## 【 0 0 6 3 】

1つの例において、本発明のタンパク質、または、その他のタンパク質は固形担体、または、半固形担体に固定化される。

## 【 0 0 6 4 】

1つの例において、前記方法は、P I 1 6 発現細胞が C D 4、および/または、C D 2 5、および/または、C D 1 2 7 を発現するかどうか判定することをさらに含む。1つの例において、前記細胞は T r e g 細胞である。前記細胞は n T r e g 細胞であることが好ましい。

50

## 【0065】

別の例において、前記細胞は、CD45RO、および/もしくは、CD27、および/もしくは、CD95、および/もしくは、CCR6 HLA DR、および/もしくは、CCR4、および/もしくは、CLAを発現する、ならびに/または、低レベルのCD45RA、および/もしくは、CD146、および/もしくは、CXCR5、および/もしくは、CD69を発現する。例えば、前記細胞はメモリーT細胞、好ましくはメモリーTreg細胞（例えば、CD4、CD25、CD27、CD45RO、CD95、HLA DR、CCR4、および、CCR6を発現し、ならびに、低レベルのCD127を発現し（すなわちCD127<sup>+</sup>であり）、低レベルのCD45RAを発現し（すなわちCD45RA<sup>+</sup>であり）、低レベルのCD146を発現し（すなわちCD146<sup>+</sup>であり）、低レベルのCD69を発現し（すなわちCD69<sup>+</sup>であり）、および、低レベルのCXCR5を発現する（すなわちCXCR5<sup>+</sup>である）細胞）である。別の例において、前記細胞はメモリーT細胞、好ましくは、メモリーTreg細胞（例えば、CD4、および/もしくは、CD25、ならびに/または、低レベルのCD127、および/もしくは、CD45RAを発現する細胞）である。

10

## 【0066】

本発明の1つの好ましい形態において、前記細胞はメモリーnTreg細胞、好ましくは休止nTreg細胞、または、非活性型nTreg細胞である。

## 【0067】

1つの例において、前記方法は、CLAを発現する細胞を検出することをさらに含む。CLAの発現は、その細胞が。例えば、炎症性皮膚病（例えば、乾癬）の治療のために、皮膚へ移動する能力を持つ、または、皮膚に選択的に移動することを示している。

20

## 【0068】

1つの例において、前記方法は、Treg特異的脱メチル化領域のメチル化のレベルを検出することをさらに含み、その方法では、低減されたレベルのメチル化、または、メチル化が検出されないことは、その細胞がTreg細胞であることを示す。核酸のメチル化のレベルを測定する方法（例えば、パイサルファイト処理後のメチル化特異的PCR、または、制限酵素消化、および/または、シーケンシング）は当業者に明らかであり、および/または、本明細書に記載される。

## 【0069】

本発明はまた内在性制御性T（nTreg）細胞を誘導性Treg（iTreg）細胞から区別する方法を提供し、その方法は、本発明のタンパク質が試料中のPI16を発現するTreg細胞に結合するようにTreg細胞を含む試料を本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体と接触させること、およびPI16を発現するTreg細胞を検出することを含み、PI16を発現するTreg細胞はnTreg細胞である。

30

## 【0070】

1つの例において、前記方法は、CD4、および/もしくは、CD25を発現し、ならびに/または、低レベルのCD127を発現するPI16発現細胞を検出することをさらに含む。

40

## 【0071】

1つの例において、前記方法は、CD45RO、および/または、CD45RA、および/または、CD27、および/または、CD95、および/または、CCR6、および/または、CCR4、および/または、CD146、および/または、CXCR5、および/または、CD39、および/または、CD73、および/または、CD69、および/または、HLA DR、および/または、CCR5、および/または、CXCR3、および/または、CXCR4、および/または、CLAを発現するPI16発現細胞を検出することをさらに含む。

## 【0072】

1つの例において、前記方法は、CD4、CD25、CD27、CD45RO、CD9

50

5、HLADR、CLA、CCR4、および、CCR6を発現し、ならびに、低レベルのCD45RA、CD146、CD69、および、CXCR5を発現する細胞を検出することをさらに含む。

【0073】

1つの例において、前記方法は、LRRC32、CD33、TIGIT、IL1R1、ITGAM、NPAL2、CD88、IFNGR2、および、PERPからなる群より選択される1つ以上のタンパク質の上昇したレベルを検出することをさらに含む。

【0074】

1つの例において、前記方法は、CD274、LASS6、ACVR2、CD200R1、CD82、CYBRD1、CYSLTR1、GPR174、NKG7、CD9、LRRN3、NRP2、GPR183、IER3、TMEM200A、LPCAT2、および、ITGA1からなる群より選択される1つ以上のタンパク質の減少したレベルを検出することをさらに含む。

【0075】

本発明は、細胞を単離する方法をさらに提供し、その方法は、本発明の方法を実行して細胞を検出し、検出された細胞を単離すること、または、本発明の方法を実行してnTreg細胞を区別し、区別されたnTreg細胞を単離することを含む。

【0076】

本発明は、PI16を発現する細胞を濃縮した細胞集団を作製する方法をさらに提供し、その方法は、本発明のタンパク質が試料中のPI16発現細胞と結合するようにPI16発現細胞を含む細胞集団を本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体と接触させること、およびそのタンパク質が結合した細胞を選択することを含む。1つの例において、濃縮された細胞はTreg細胞、例えば、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>である細胞である。いくつかの形態において、前記方法は単離された細胞を培養することをさらに含む。

【0077】

前記細胞を単離する方法は、薬剂的に許容可能な担体とその細胞を製剤し、それによって医薬組成物を製造することをさらに含むことができる。

【0078】

本発明はまた、任意の例に従い、本明細書に記載される方法により単離された細胞、または、任意の例に従い、本明細書に記載される方法により作製された細胞集団を提供する。

【0079】

1つの例において、前記細胞、もしくは、細胞集団は内在性制御性T(Treg)細胞であり、または、その集団ではnTreg細胞が濃縮されている。

【0080】

1つの例において、nTreg細胞は、PI16を発現しないTreg細胞よりも、炎症性サイトカインへの曝露後の免疫反応を抑制する、より高い能力を有する。

【0081】

1つの例において、nTreg細胞は、対象中の炎症部位での免疫反応を抑制するより高い能力を有する。

【0082】

1つの例において、nTreg細胞は、誘導性Treg(iTreg)細胞よりも、炎症性サイトカイン、例えば、IL-1、および、IL-6への曝露後の免疫反応を抑制する、より高い能力を有する。

【0083】

本開示はまた、PI16、ならびに、CLA、HLADR、および、CCR4からなる群より選択される1つ以上のタンパク質を発現する制御性T(Treg)細胞が濃縮した細胞集団を提供する。

【0084】

10

20

30

40

50

1つの例において、前記細胞はCCR4、および/または、CCR6を発現する。

【0085】

1つの例において、前記細胞は、CD4、および、CD25、ならびに、所望により低レベルの、または、検出できないレベルのCD127をさらに発現する。

【0086】

1つの例において、前記細胞はCD27、および/または、CD95、および/または、CCR6をさらに発現する。

【0087】

1つの例において、前記細胞は低レベルのCD45RAを発現し(すなわちCD45RA<sup>+</sup>であり)、低レベルのCD146を発現し(すなわちCD146<sup>-</sup>であり)、および、低レベルのCXCR5を発現する(すなわちCXCR5<sup>-</sup>である)。

10

【0088】

1つの例において、前記細胞は対象中の炎症部位に移動する能力を持つ。1つの例において、前記細胞は炎症部位に優先的に移動する。1つの例において、前記細胞はT<sub>H</sub>17介在性炎症部位に優先的に移動する。

【0089】

1つの例において、前記細胞は対象中の皮膚(例えば、皮膚の炎症部位)に移動する能力を持つ。1つの例において、前記細胞は皮膚(例えば、皮膚の炎症部位)に優先的に移動する。1つの例において、前記細胞はT<sub>H</sub>17介在性皮膚炎の部位に優先的に移動する。

20

【0090】

本開示はまた、受託番号PTA-10685でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体と反応する制御性T(Treg)細胞が濃縮した細胞集団を提供する。

【0091】

本発明はまた対象の症状を診断する、および/または、予後予測する方法を提供し、その方法は、本発明の方法を実行して対象由来の試料中のPI16、または、PI16発現細胞を検出することを含み、その方法においてPI16、または、PI16発現細胞の検出、または、未検出がその症状の診断に役立つ、または、その症状の予後予測に役立つ。

30

【0092】

1つの例において、前記方法は、

(i) 試料、または、その一部の中のPI16、または、PI16発現細胞の量を測定する、または、推定すること、

(ii) 正常な対象、および/または、健康な対象に由来する試料中のPI16、または、PI16発現細胞の量を比較すること、

を含み、正常な対象、および/または、健康な対象に由来する試料中のPI16、または、PI16発現細胞の量と比較して上昇した、または、減少した(i)でのPI16、または、PI16発現細胞の量は、その対象がその症状を患っていることを示す。

【0093】

別の例において、本発明は、ある症状の治療の効力をモニターする方法であって、

40

(i) 本発明の方法を実行して試料、または、その一部の中のPI16、または、PI16発現細胞の量を測定、または、推定すること、

(ii) 対照の対象に由来する試料の中のPI16、または、PI16発現細胞の量を比較すること

を含む方法を提供し、その方法において、

(a) 対照試料は正常な、または、健康な対象に由来し、そして、対照試料中のPI16、または、PI16発現細胞の量と比較して類似の(i)のPI16、または、PI16発現細胞の量は、その対象がその症状の治療に应答していることを示す、

(b) 対照試料は正常な、または、健康な対象に由来し、そして、対照試料中のPI16、または、PI16発現細胞の量と比較して上昇した、または、減少した(i)の

50

PI16、または、PI16 発現細胞の量は、その対象がその症状の治療にตอบสนองしていないことを示す、

(c) 対照試料は以前の時点の対象（例えば、治療開始前）に由来し、そして、対照試料中のPI16、または、PI16 発現細胞の量と比較して類似の(i)のPI16、または、PI16 発現細胞の量は、その対象がその症状の治療にตอบสนองしていないことを示す、または、

(d) 対照試料は以前の時点の対象（例えば、治療開始前）に由来し、そして、対照試料中のPI16、または、PI16 発現細胞の量と比較して上昇した、または、減少した(i)のPI16、または、PI16 発現細胞の量は、その対象がその症状の治療にตอบสนองしていることを示す。

10

【0094】

好ましい例において、前記症状はTreg細胞関連症状である。例えば、

(i) Treg細胞関連症状は、試料中のPI16 発現Treg細胞レベルの低減、または、PI16レベルの低減を検出することにより診断される/予後予測される自己免疫疾患である、

(ii) Treg細胞関連症状は、試料中のPI16 発現Treg細胞レベルの上昇、または、PI16レベルの上昇を検出することにより診断される/予後予測される炎症である、または、

(iii) Treg細胞関連症状は、試料中のPI16 発現Treg細胞レベルの上昇、または、PI16レベルの上昇を検出することにより診断される/予後予測される癌である。

20

【0095】

1つの例において、Treg細胞関連症状は、炎症部位に由来する試料中のPI16 発現Treg細胞のパーセンテージの変化を検出することにより診断される/予後予測される炎症である。その細胞のパーセンテージの変化はレベルの上昇、または、レベルの減少である可能性があり、好ましくは、レベルの減少である。この点について、PI16 発現Treg細胞のパーセンテージがPI16<sup>-</sup>Treg細胞に対するPI16<sup>+</sup>Treg細胞のパーセンテージとして表されることが好ましい。

【0096】

1つの例において、Treg細胞関連症状は、炎症部位に由来する試料中のPI16<sup>-</sup>Treg細胞に対するPI16<sup>+</sup>Treg細胞の割合の変化を検出することにより診断される/予後予測される炎症である。その細胞の割合の変化はレベルの上昇（PI16<sup>-</sup>Treg細胞に対するPI16<sup>+</sup>Treg細胞の数の増加）、または、レベルの減少（PI16<sup>-</sup>Treg細胞に対するPI16<sup>+</sup>Treg細胞の数の減少）である可能性があり、好ましくは、レベルの減少である。

30

【0097】

1つの例において、炎症部位は滑液を含む。1つの例において、炎症は関節炎である。1つの例において、炎症は若年性特発性関節炎である。

【0098】

本発明のタンパク質はまた、インビボでPI16、または、PI16 発現細胞を検出する画像化方法を容易にする。したがって、本発明はまたPI16 発現細胞関連症状の位置を特定し、および/または、その症状を検出し、および/または、その症状を診断し、および/または、その症状の予後予測をする方法であって、インビボで本発明のタンパク質に結合した化合物を検出することを含む方法を提供し、その方法において、結合した化合物の検出がその症状の位置を特定し、および/または、その症状を検出し、および/または、その症状を診断し、および/または、その症状の予後予測をする。

40

【0099】

1つの例において、本発明は、PI16 発現細胞関連症状の位置を特定し、および/または、その症状を検出し、および/または、その症状を診断し、および/または、その症状の予後予測をする方法であって、

50

( i ) もしあれば、 P I 1 6 発現細胞に本発明のタンパク質が結合するように、化合物 ( 例えば、検出可能な標識物質 ) と複合体化した本発明のタンパク質を対象に投与すること、および、

( i i ) そのタンパク質に結合する化合物をインビボで検出し、結合する化合物の検出がその症状の位置を特定し、および / または、その症状を検出し、および / または、その症状を診断し、および / または、その症状の予後予測をすることを含む方法を提供する。

【 0 1 0 0 】

1 つの例において、前記方法は本明細書に記載される診断方法 / 予後予測方法 / 位置特定方法 / 検出方法の結果を、紙上で、または、機械可読形式で提供することをさらに含む。

10

【 0 1 0 1 】

本発明はまたある症状を治療する、または、予防する方法であって、本明細書に記載される診断方法、または、予後予測方法の結果を得ること、および、適切な治療化合物、または、予防化合物を投与することを含む方法を提供する。例えば、その症状が癌であるとき、その化合物は化学療法化合物であり得、または、その症状が自己免疫症状であるとき、その化合物は抗炎症薬、および、抗 T N F 化合物、抗 C D 2 0 化合物などであり得る。

【 0 1 0 2 】

本発明はまたある症状を治療、または、予防する方法であって、本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体、または、本発明の方法により単離された細胞、または、本発明の細胞集団をそれを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。

20

【 0 1 0 3 】

1 つの例において、その方法は制御性 T ( T r e g ) 細胞の数、もしくは、活性の低減に関連する症状を治療し、もしくは、抑制し、および / または、免疫抑制を誘導し、および / または、細胞傷害性 T 細胞 ( C T L )、もしくは、ヘルパー T 細胞の活性を対象中で低下させ、そして、その方法は、

( i ) 本発明の方法を実行することで T r e g 細胞が濃縮した集団を単離すること、または、本発明の細胞集団を得ること、および、

( i i ) ( i ) の細胞を対象に投与することを含む。

30

【 0 1 0 4 】

1 つの例において、前記方法は T r e g 細胞機能を活性化する、または、強化する本発明のタンパク質を投与することを含む。

【 0 1 0 5 】

別の例において、前記方法は制御性 T ( T r e g ) 細胞の数、もしくは、活性の低減に関連する症状を治療し、もしくは、予防し、および / または、免疫抑制を誘導し、および / または、細胞傷害性 T 細胞 ( C T L )、もしくは、ヘルパー T 細胞の活性を対象中で低下させ、そして、その方法は本発明の固形担体、もしくは、半固形担体を対象内のある部位に投与する、または、移植することを含み、そのタンパク質が T r e g 細胞に結合し、そして、その部位にその細胞を固定化する。1 つの例において、その固形担体、または、半固形担体は、投与、または、移植の前に T r e g 細胞をその上に固定化させる。

40

【 0 1 0 6 】

例えば、前記対象は自己免疫疾患を患っている、もしくは、自己免疫疾患を発生する危険にある、および / または、前記対象は移植を受ける予定である、もしくは、受けるところである、もしくは、受けたところである。

【 0 1 0 7 】

別の例において、前記症状は対象の免疫系の制御性 T ( T r e g ) 細胞介在による抑制に関連し、および、前記方法はその対象に本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体を投与することを含む。

50

## 【0108】

例えば、前記対象は癌を患っており、そして、前記タンパク質、または、組成物、または、固形担体、もしくは、半固形担体の投与がその対象中のTreg細胞の数、および/または、活性を低減し、そして、その対象の免疫系がより効率的に癌に応答することを可能にする。1つの例において、前記タンパク質はTreg細胞を殺し、および/または、Treg細胞に毒性化合物を送達し、および/またはTreg細胞の機能を阻害する。

## 【0109】

別の例において、本発明は、ある症状を治療する、または、予防する方法であって、前記タンパク質がPI16を発現する細胞に結合するように対象の血液を本発明の固形担体、もしくは、半固形担体に接触させることを含み、そして、その血液からその細胞を除去する方法を提供する。そのような方法は対象の血液からTreg細胞を取り除くこと、および、免疫反応を誘導すること、または、免疫反応が起こることを可能にすることに有用である。この例において、固形担体、もしくは、半固形担体は、例えば、除去療法に使用される担体であることができる。処理された血液が対象に戻されることが好ましい。

10

## 【0110】

本発明はまた対象中の免疫反応を調節する方法であって、本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体、または、本発明の方法により単離された細胞、または、本発明の細胞集団をそれを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。

## 【0111】

1つの例において、前段落の方法は対象において免疫反応を誘導し、刺激し、または、促進するための方法であり、そして、その方法は本発明のタンパク質、または、本発明の組成物をそれを必要とする対象に投与することを含む。

20

## 【0112】

別の例において、前記方法は、対象の血液を本発明の固形担体、もしくは、半固形担体に接触させることを含み、前記タンパク質が制御性T(Treg)細胞に結合し、そして、血液からその細胞を除去する。

## 【0113】

1つの例において、免疫反応は抗体の産生、および/または、細胞傷害性T細胞介在性免疫反応である。

30

## 【0114】

対象で免疫反応を誘導する、刺激する、または、促進する方法の1つの例において、前記タンパク質は免疫原性化合物を含む組成物の投与の前に、または、投与と同時に投与される。

## 【0115】

別の例において、前記方法は、本発明の方法によって単離されたTreg細胞を投与して、それによって免疫反応を抑制する、または、妨害することを含む。1つの例において、Treg細胞を細胞または組織とともに、例えば、骨髄とともに投与して、それによって移植片対宿主反応、または、宿主対移植片反応を低減させる、または、防止する。Treg細胞は、前記対象、または、別の対象、好ましくは、健康な対象のTreg細胞であり得る。

40

## 【0116】

本発明はまた化合物をPI16発現細胞に送達する方法であって、化合物と複合体化している本発明のタンパク質とその細胞を接触させることを含む方法を提供する。1つの例において、対象にそのタンパク質を投与することでその細胞をインビボで接触させる。

## 【0117】

本発明はまた本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体、または、本発明の方法を実行することにより単離された細胞、または、本発明の細胞集団の医薬品での利用を提供する。

## 【0118】

50

例えば、本発明は、P I 1 6 の発現に関連する症状の治療用医薬の製造における前記タンパク質、組成物固形担体、もしくは、半固形担体、または、細胞の利用を提供する。1つの例において、その症状はT r e g 細胞関連症状である。

【0119】

1つの例において、前記医薬は本発明の方法を実行することにより単離された細胞を含み、および、それは自己免疫疾患の治療用であり、および/または、前記対象は移植を受ける予定である、もしくは、受けるところである、もしくは、受けたところである。

【0120】

1つの例において、前記医薬は前記タンパク質、または、前記組成物を含み、そして、前記症状は対象の免疫系のT r e g 細胞介在性抑制と関連する。

10

【0121】

本発明はまた対象の免疫系を調節する医薬の製造における本発明のタンパク質、または、本発明の組成物、または、本発明の固形担体、もしくは、半固形担体、または、本発明の方法を実行することにより単離された細胞の利用を提供する。

【0122】

本発明者らはまた、P I 1 6 発現T r e g 細胞は、T<sub>H</sub> 1 7 細胞によっても発現されるケモカイン受容体、例えば、C C R 4、および/または、C C R 6 を発現し、ならびに、C C R 4、および/または、C C R 6 のリガンドに応答して移動することを示した。したがって、これらの細胞はT<sub>H</sub> 1 7 細胞と同じ部位に移動し、炎症反応を抑制するので、このことがP I 1 6 発現T r e g 細胞をT<sub>H</sub> 1 7 介在性症状の治療に特に有益なものとする。

20

【0123】

したがって、本開示はまたP I 1 6 を発現する制御性T ( T r e g ) 細胞を投与することを含むT<sub>H</sub> 1 7 介在性症状を治療する方法を提供する。

【0124】

1つの例において、前記T r e g 細胞はC C R 4、および/または、C C R 6 をさらに発現する。

【0125】

1つの例において、前記T r e g 細胞は全身に投与され、そして、T<sub>H</sub> 1 7 介在性症状の部位に移動する。

30

【0126】

本発明者らはまた、P I 1 6 を発現するT r e g 細胞(例えば、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体を用いて単離したT r e g 細胞)はC L A を発現することを示した。このことは、その細胞は皮膚に移動することができることを、または、優先的に皮膚に移動することを示している。したがって、本開示はまたP I 1 6 を発現する制御性T ( T r e g ) 細胞を投与することを含む皮膚病を治療する方法を提供する。

【0127】

1つの例において、前記T r e g 細胞はC C R 4、および/または、C C R 6 をさらに発現する。

【0128】

1つの例において、前記T r e g 細胞は全身に投与され、そして、皮膚病の部位に移動する。

40

【0129】

1つの例において、前記皮膚病は炎症性皮膚病、例えば、T<sub>H</sub> 1 7 介在性皮膚病である。

【0130】

本発明者らはまた、P I 1 6 発現T r e g 細胞は炎症性サイトカインに曝露された後にエフェクターT細胞を抑制する活性を維持し、一方、P I 1 6<sup>-</sup>i T r e g 細胞はその活性を維持しないことを明らかにした。したがって、炎症反応を起こしている部位にP I 1 6 発現T r e g 細胞を直接投与して治療上の利益をもたらすことができる。

50

## 【0131】

したがって、本開示はまた、炎症部位にPI16を発現する制御性T (Treg) 細胞を投与することを含む炎症の治療方法を提供する。

## 【0132】

1つの例において、前記炎症部位はインターロイキン(IL)1、および/または、IL6の発現を特徴とする。

## 【0133】

1つの例において、前記炎症は若年性特発性関節炎である。

## 【0134】

対象に投与するのに適切な細胞は、PI16発現Treg細胞が濃縮した細胞集団を含む。1つの例において、その細胞集団は、受託番号PTA-10685でATCCに寄託されたCRCBT-02-001と反応するTreg細胞が濃縮された細胞集団である。

10

## 【0135】

本発明者らはまた、炎症部位で、例えば、若年性特発性関節炎でPI16発現Treg細胞のパーセンテージが減少し、一方、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg細胞の総数は上昇することを示した。

## 【0136】

したがって、本開示はまた、Treg細胞関連炎症の診断方法であって、炎症部位に由来する試料中のPI16発現Treg細胞のパーセンテージを検出することを含む方法を提供し、その方法においてPI16発現Treg細胞のパーセンテージの減少は前記症状の指標である。この点について、PI16発現Treg細胞のパーセンテージがPI16<sup>-</sup>Treg細胞に対するPI16<sup>+</sup>Treg細胞のパーセンテージとして表されることが好ましい。

20

## 【0137】

別の例において、本開示は、Treg細胞関連炎症を診断する方法であって、炎症部位に由来する試料中のPI16<sup>-</sup>Treg細胞に対するPI16<sup>+</sup>Treg細胞の割合を判定することを含む方法を提供し、その方法においてPI16<sup>-</sup>Treg細胞に対して減少したPI16<sup>+</sup>Treg細胞の割合は前記症状の指標である。

## 【0138】

1つの例において、前記炎症部位は滑液である。

30

## 【0139】

1つの例において、前記症状は関節炎である。

## 【0140】

1つの例において、前記症状は若年性特発性関節炎である。

## 【0141】

診断方法の1例において、PI16発現Treg細胞のレベルは、前記対象の血流、および/または、正常な、もしくは、健康な対象の血流におけるレベルと比較して低下する。

## 【0142】

本発明はまた内在性制御性T (nTreg) 細胞を誘導性Treg (iTreg) 細胞と区別する方法であって、LRRC32、CD33、TIGIT、IL1R1、ITGAM、NPAL2、CD88、IFNGR2、および、PERPからなる群より選択される1つ以上のタンパク質の発現レベルが上昇したTreg細胞を検出することを含む方法を提供し、その方法においてそのタンパク質の発現レベルが上昇したTreg細胞はnTreg細胞である。

40

## 【0143】

本発明はまた内在性制御性T (nTreg) 細胞を誘導性Treg (iTreg) 細胞と区別する方法であって、CD274、LASS6、ACVR2、CD200R1、CD82、CYBRD1、CYSLTR1、GPR174、NKG7、CD9、LRRN3、NRP2、GPR183、IER3、TMEM200A、LPCAT2、ITGA1から

50

なる群より選択される1つ以上のタンパク質の発現レベルが減少したTreg細胞を検出することを含む方法を提供し、その方法においてそのタンパク質の発現レベルが減少したTreg細胞はnTreg細胞である。

【0144】

1つの例において、前記の上昇した、または、減少した発現レベルはiTreg細胞、または、CD25<sup>-</sup>細胞の発現レベルに関連がある。

【0145】

本発明はまた誘導性制御性T(iTreg)細胞を内在性Treg(nTreg)細胞と区別する方法であって、TIGIT、CD88、IFNGR2、PERP、LASS6、GPR174、NKG7、CD9、LRRN3、MRP2、GPR183、IER3、TMEM200A、LPCAT2、および、ITGA1からなる群より選択される1つ以上のタンパク質の発現レベルが上昇したTreg細胞を検出することを含む方法を提供し、その方法においてそのタンパク質の発現レベルが上昇したTreg細胞はiTreg細胞である。

10

【0146】

本発明はまた誘導性制御性T(iTreg)細胞を内在性Treg(nTreg)細胞と区別する方法であって、LRRC32、CD33、IL1R1、ITGAM、NPAL2、CD274、CD82、および、CYBRD1からなる群より選択される1つ以上のタンパク質の発現レベルが減少したTreg細胞を検出することを含む方法を提供し、その方法においてそのタンパク質の発現レベルが減少したTreg細胞はiTreg細胞である。

20

【0147】

1つの例において、前記の上昇した、または、減少した発現レベルはCD25<sup>-</sup>細胞の発現レベルに関連がある。

【0148】

本発明はまた免疫グロブリンFc領域に融合したPI16の細胞外ドメインを含む単離されたタンパク質を提供する。例えば、PI16の細胞外ドメインは抗体、例えば、IgG1抗体のFc領域に融合した。1つの例においてPI16の細胞外ドメインは配列番号40に記載の配列を含む、または、それから成る。

30

【図面の簡単な説明】

【0149】

【図1】ヒト(Homo sapiens)(配列番号1)、マウス(Mus musculus)(配列番号2)、ラット(Rattus norvegicus)(配列番号3)、および、チンパンジー(Pan troglodytes)(配列番号4)由来のPI16タンパク質のアミノ酸配列の配列アラインメントである。星印は同一のアミノ酸を示す。“:”、および、“.”は保存されたアミノ酸残基を示す。

【図2】CD25抗体、または、FoxP3抗体とPI16ポリクローナル抗体(Abnova)による新しく単離された成体のCD4<sup>+</sup>T細胞の染色を示す一連の図表による説明である。CD25とPI16の染色は、CD25陽性、もしくは、陰性、または、PI16陽性、もしくは、陰性を表す囲みを有する左側のパネルに示される。右側のパネルは、各囲みに含まれる細胞集団のFoxP3発現レベルを示す。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup>細胞は最も高レベルのFoxP3発現を示し、一方、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>PI16<sup>-</sup>細胞はより低い平均発現レベルを示すことが結果により明らかである。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞はFoxP3<sup>-</sup>である。

40

【図3】誘導性Treg細胞(iTreg細胞)におけるPI16の発現を示す一連の図表による説明である。組換えヒトTGF-1とCD3/CD28T細胞増殖刺激ピーズの存在下、ピーズを取り除く前に全部で8日間、臍帯血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞を培養し、そして、CD25、FoxP3、および、PI16の発現を分析した。誘導性Treg細胞はFoxP3を発現した。しかし、誘導性Treg細胞はPI16について陽性ではなく、これは、PI16が誘導性Treg細胞ではなく内在性Treg細胞のマーカート

50

して機能する可能性を示唆する。

【図4】PI16発現細胞での免疫前（上段右のパネル）、および、免疫後（下段右のパネル）のマウスの血清のそれらの細胞への反応性を示す一連の図表による説明である。血清抗体の結合をフローサイトメトリーにより解析した。マウスIgGアイソタイプを負の対照として用いた（上段左のパネル）、マウスPI16ポリクローナル抗体（Abnova）を正の対照として用いた（下段左のパネル）。

【図5】ハイブリドーマ細胞培養上清のCD3<sup>+</sup>リンパ球に対するスクリーニングを示す一連の図表による説明である。X63上清をIgG対照として用いた（上段左のパネル）。Abnova社のマウスPI16ポリクローナル抗体（PI16ポリクローナル抗体）を正の対照として用いた（上段右のパネル）。ウェルP1G5（P15G）のハイブリドーマは正の対照と同様の染色を示し（下段中央のパネル）、そして、二つのその他のハイブリドーマ（P1E2、および、P1F3）は異なる染色を示した（それぞれ下段左、および、下段右のパネル）。

【図6】ハイブリドーマP1G5のサブクローンの細胞培養上清の反応性を示す一連の図表による説明である。X63上清をIgG対照として用いた（左上のパネル）。Abnova社のマウスPI16ポリクローナル抗体（PI16ポリクローナル抗体）を正の対照として用いた（上段右のパネル）。サブクローンP2B3（CRCBT-02-001と名付ける。下段右のパネル）は正の対照と同様の染色を示し、一方、サブクローンP1B7はP2B3と同様の染色を示し、および、P1G8はPI16への反応性について陰性である（下段左、および、下段中央のパネル）。

【図7】CRCBT-02-001の上清（P1G5 P2B3、右のパネル）、Abnova社のPI16ポリクローナル抗体（PI16ポリクローナル抗体）（中央のパネル）、および、X63負の対照（左のパネル）による安定的なPI16形質移入NIH3T3細胞（下段のパネル）、および、非形質移入NIH3T3細胞（上段のパネル）の染色の比較を示す一連の図表による説明である。

【図8】非形質移入対照（A、B、および、C）、および、V5エピトープ融合PI16を発現する安定的な形質移入NIH3T3細胞（A'、B'、および、C'）について抗体の免疫反応性を示す一連の顕微鏡写真である。CRCBT-02-001細胞培養上清（A、および、A'）、抗V5抗体（B、および、B'）、および、Abnova社のPI16マウスポリクローナル抗体（C、および、C'）、その次にビオチン化ウマ抗マウス抗体とインキュベートして細胞を染色した。次に、その細胞をストレプトアビジンAF488複合体（緑色）、および、DAPI（青色）とインキュベートして視覚化した（DAPIは細胞核を染色する。）。パネルA'は原形質膜に沿った緑色蛍光の蓄積を示し、CRCBT-02-001の細胞表面染色を確認する。パネルB'に見られるV5タグの染色により、NIH3T3細胞の形質移入が成功したことを確認する。パネルC'は対照としてPI16ポリクローナル抗体の細胞表面染色を示す。

【図9】CRCBT-02-001抗体、および、PI16ポリクローナル抗体（Abnova）は安定的なPI16形質移入NIH3T3細胞（PI16形質移入細胞細胞溶解物）に結合するが、非形質移入NIH3T3細胞（非形質移入細胞細胞溶解物）には結合しないことを証明するスロットプロットの結果を示す写真による説明である。両方の抗体はまた安定的なPI16形質移入NIH3T3細胞の上清（PI16形質移入細胞上清）に結合する。このことは、形質移入細胞がPI16をその細胞表面から分泌する、または、放出することを示唆する。CRCBT-02-001はAbnova社の組換えタンパク質（組換えタンパク質、Abnova）に結合しない。これらの結果は、CRCBT-02-001抗体とPI16ポリクローナル抗体（Abnova）の両方がPI16に結合することを示唆する。CRCBT-02-001モノクローナル抗体がAbnova社の組換えPI16タンパク質に結合できなかったことは、そのモノクローナル抗体は、無細胞系で産生されたPI16にではなく、細胞（例えば、哺乳類細胞）により産生されたPI16に選択的に結合することができることを示唆する。

【図10】Treg細胞表面マーカー（CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>-</sup>）に

10

20

30

40

50

基づいて単離された細胞集団中の(CRCBT-02-001上清、または、PI16ポリクローナル抗体を用いて同定された)PI16陽性細胞の割合を示す一連の図表による説明である。CRCBT-02-001の上清を用いて単離された細胞を下段のパネルに示し、PI16ポリクローナル抗体を用いて単離された細胞を上段のパネルに示す。この図は、CRCBT-02-001の上清は、前記ポリクローナル抗体(7.9%)よりも、より特定のCD4<sup>+</sup>細胞集団(2.8%)に結合することを示す。CRCBT-02-001上清もまた、PI16ポリクローナル抗体よりも、大きい割合のTreg細胞の表現型を発現する細胞を特定する。

【図11】末梢血リンパ球の様々な集団のCRCBT-02-001抗体との免疫反応性を示す一連の図表による説明である。パネルAは後の解析に用いるリンパ球を特定するために使用したゲートを示す(全てのPBMICが含まれる。白色の楕円はリンパ球を示す。)。パネルBは、CRCBT-02-001の上清はCD4<sup>+</sup>T細胞(リンパ球のみが解析された。)に結合することを示す。パネルCは、CRCBT-02-001の上清はCD8<sup>+</sup>T細胞(リンパ球のみが解析された。)にほとんど結合しないことを示す。パネルDは、CRCBT-02-001の上清は少数のB細胞(リンパ球のみが解析された。)に結合することを示す。パネルEは、大多数のCRCBT-02-001陽性CD4<sup>+</sup>T細胞はメモリー表現型(CD45RA陰性)を有することを示す(全てのCD4<sup>+</sup>T細胞が解析された。)。パネルFは、CRCBT-02-001陽性CD4<sup>+</sup>T細胞の約4分の3がCD27も発現することを示す(全てのCD4<sup>+</sup>T細胞が解析された。)。パネルGは、少数のCRCBT-02-001陽性細胞のみがエフェクターメモリー細胞サブセット(CD45RA陰性/CD27陰性)に属することを示す(全てのCD4<sup>+</sup>CRCBT-02-001<sup>+</sup>細胞が含まれる。)。パネルHは、大多数のCRCBT-02-001陽性CD4<sup>+</sup>T細胞がCD25を発現することを示す(全てのCD4<sup>+</sup>T細胞が解析された。)。パネルIは、CD4<sup>+</sup>/CRCBT-002-001陽性細胞の約4分の3がCD127を発現することを示す(全てのCD4<sup>+</sup>T細胞が解析された。)。パネルJは、全てのCD4<sup>+</sup>CRCBT-002-001陽性細胞のうち約20%の細胞がCD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>のTreg細胞表現型を示すことを示す(全てのCD4<sup>+</sup>CRCBT-02-001<sup>+</sup>細胞が解析に含まれる。)。

【図12】抗PI16モノクローナル抗体CRCBT-02-001を用いることで示される、CD4陽性リンパ球のTreg細胞サブセット、および、ヘルパーT細胞サブセットの細胞表面PI16の発現を示す一連の図表による説明を含む。CD4陽性リンパ球のみを示している。パネル「A」は、CD127陽性ヘルパーT細胞(上段右のパネル)よりもCD25bright/CD127dim Treg細胞(上段中央のパネル)において、高い割合で細胞表面にPI16が存在することを示す。パネル「B」は、PI16陰性サブセット(下段右のパネル)よりもCD4陽性リンパ球のPI16陽性サブセット(下段中央のパネル)がCD25bright/CD127dim Treg細胞を大きな割合で含有することを示す。一つの代表的な実験をn>100で示す。

【図13】CD25、および、PI16(CRCBT-02-001)の共発現を用いて定義されたCD4陽性リンパ球のサブセットのナイーブ/メモリー表現型の発現を示す一連の図表による説明である。CD4陽性リンパ球のみを示している。CD25陰性PI16陰性、CD25陽性PI16陰性、CD25陰性PI16陽性、および、CD25陽性PI16陽性を含む四象限が図の左側に示される。各象限におけるCD45RA、および/または、CD45ROの細胞表面上の発現もまた図示される。CD25、および、PI16の共発現(CD25陽性/PI16陽性画分)がメモリー表現型(CD45RA陰性/CD45RO陽性)を有するTreg細胞のサブセットを特定する。

【図14】新しく単離された成体のCD4<sup>+</sup>T細胞のCD25抗体、または、FoxP3抗体とCRCBT-02-001の上清による染色を示す一連の図表による説明である。CD25抗体とCRCBT-02-001分泌抗体の染色は、CD25陽性、もしくは、陰性、または、CRCBT-02-001分泌抗体陽性、もしくは、陰性を表す囲みを有する左側のパネルに示される。右側のパネルは、各囲みに含まれる細胞集団のFoxP3

10

20

30

40

50

発現レベルを示す。CD25陽性/PI16陽性Treg細胞画分に含まれる細胞(太線、平均蛍光強度;1457)はCD25陽性/PI16陰性Treg細胞画分に含まれる細胞(破線、平均蛍光強度;1062)よりも高レベルでFoxP3を発現する。CD25陰性/PI16陽性集団(細線、平均蛍光強度;612)、および、CD25陰性/PI16陰性集団(点線、平均蛍光強度;480)ではFoxP3染色は最も低いレベルであった。一つの代表的な実験をn>50で示す。

【図15】Miyaraら(2009年)によって説明されるゲーティング戦略を用いて分割された6画分のナイーブ、および、メモリーTreg細胞によるPI16、および、FoxP3の発現を示す一連の図表による説明を含む。CD4陽性リンパ球のみを示している。図の右側のパネルに示すように、CD45RA、および、CD25の発現を用いてCD4陽性リンパ球の画分(画分1から画分6)を定義した。これらの画分の各々における細胞のPI16(CRCBT-02-001)、および、FoxP3の発現が、標識されたように示される。各画分において、PI16<sup>+</sup>、および、PI16<sup>-</sup>細胞は同様のレベルのFoxP3を発現し、最も高いレベルのFoxP3発現はメモリーTreg細胞(画分2)で見られた。一つの代表的な実験をn=3で示す。

10

【図16】CRCBT-02-001モノクローナル抗体によるメモリーTreg細胞の検出を示す一連の図表による説明である。CD4<sup>+</sup>細胞をCRCBT-02-001モノクローナル抗体、および、CD45RA(上段のパネル)またはCD45RO(下段のパネル)のどちらかに対する抗体を用いて標識した。メモリーT細胞(CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>/low)がPI16を発現することを結果は示している。

20

【図17】CD25、および、PI16の共発現を用いて定義されるCD4陽性リンパ球のサブセットにおけるTH1/TH2/TH17サイトメトリックビーズアレイを用いて測定されるサイトカインの発現プロファイルを示す図表による説明である。図14に示されるゲートを用いて4つの集団の細胞を分別した。グラフは、CD3/CD28ビーズを用いて3日間刺激した後に単離された細胞集団によって分泌された各サイトカインの濃度を示す。エラーバーは3回繰り返した実験の標準誤差を示す。

【図18】CD25、および、PI16(CRCBT-02-001)の共発現を用いて定義されるメモリーCD4陽性リンパ球のサブセットのケモカイン受容体CCR4、および、CCR6の発現を示す一連の図表による説明を含む。CD4陽性リンパ球のみを示している。図14に示されるように4つのサブセットのCD4陽性リンパ球を定義し、そして、CD45ROの発現により各々のメモリー画分を同定した。パネル「A」は、CD25、および、PI16の共発現を用いて定義した4つのサブセットのCD45RO、および、CCR4の発現を示す。パネル「B」は、CD25、および、PI16の共発現を用いて定義した4つのサブセットのCD45RO、および、CCR6の発現を示す。一つの代表的な実験をn=3で示す。

30

【図19】刺激されなかった末梢血単核細胞(PBMC)(上二段のパネル)、SEB刺激PBMC(18時間)(中央二段のパネル)、および、CD3/CD28抗体刺激PBMC(3日)(下二段のパネル)に対するCRCBT-02-001の上清の免疫反応性を示す一連の図表による説明である。IgG1対照としてX63上清を用いた。全てのリンパ球(P1)を解析に含め、および、CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>細胞(P2)を解析した。CD25の発現は刺激中に上昇し、一方、CRCBT-02-001の免疫反応性は減少する。

40

【図20】CRCBT-02-001上清を用いたPI16発現のスロットプロット解析の結果を示す写真による説明である。刺激を受けたPBMC、および、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup>細胞の細胞溶解物、および、上清をCRCBT-02-001の上清とインキュベートした。100μl s/n SEB stimは、PBMCを一晩、SEBで刺激して、上清を回収し、および、希釈せずに100μlの上清を用いたことを意味する。200μl s/n SEB stimは、希釈せずに200μlの上清を用いたこと以外は100μl s/n SEB stimと同じことを意味する。PI16 transf. NIH3T3は、PI16で形質移入されたNIH3T3細胞を調製し、およ

50

び、全細胞溶解物を調製し、100倍希釈したものを使用したことを意味する。Unt r a n s f . N I H 3 T 3 は、非形質移入N I H 3 T 3細胞をR I P A緩衝液に溶解し、遠心し、および、100倍に希釈して抽出液を使用したことを意味する。P I 1 6 t r a n s f . N I H 3 T 3 ( o l d ) は、全細胞溶解物を先達って調製したことを意味する。C D 4 e x t r a c t は、C D 4細胞をR I P A緩衝液に溶解し、遠心し、および、100倍に希釈して抽出液を使用したことを意味する。C D 2 5 <sup>-</sup> / i n d u c e d は、T G F とC D 3 / C D 2 8ビーズで7日間C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>-</sup>細胞を刺激し、および、48時間細胞を休息させたことを意味する。細胞をN P 4 0緩衝液に溶解し、遠心し、および、希釈せずに抽出液を使用した。C D 2 5 <sup>+</sup> / i n d u c e d は、C D 2 5 <sup>-</sup> / i n d u c e d のようにC D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>+</sup>細胞を処理したことを意味する。C D 2 5 <sup>+</sup> / c o n t r o l は、T G F 無しで7日間C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>+</sup>細胞をC D 3 / C D 2 8ビーズで刺激し、および、48時間細胞を休息させたことを意味する。細胞をN P 4 0緩衝液に溶解し、遠心し、および、希釈せずに抽出液を使用した。C D 2 5 <sup>-</sup> / c o n t r o l は、C D 2 5 <sup>+</sup> / c o n t r o l のようにC D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>-</sup>細胞を処理したことを意味する。P I 1 6 <sup>+</sup> u n s t i m s / n は、C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>+</sup> P I 1 6 <sup>+</sup>細胞を分別し、および、刺激することなく4日間細胞を培養したことを意味する。上清を回収し、および、希釈せずに使用した。P I 1 6 <sup>+</sup> s t i m s / n は、C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>+</sup> P I 1 6 <sup>+</sup>細胞を分別し、および、C D 3 / C D 2 8ビーズで4日間細胞を刺激したことを意味する。上清を回収し、および、希釈せずに使用した。

10

【図21】太字で強調した、ある技術で決定したC D Rを含むC R C B T - 0 2 - 0 0 1 のV<sub>H</sub>、および、V<sub>L</sub>のアミノ酸配列を示す図である。

20

【図22A】増殖させた臍帯血T r e g細胞であって、C R C B T - 0 2 - 0 0 1を用いてP I 1 6の発現に基づいて分別した細胞を用いる代表的なチミジン取り込みサプレッサー試験の結果を示す2つの図表による説明を含む。右側のグラフはP I 1 6 <sup>+</sup> T r e g細胞を用いた結果を図示する。左側のグラフはP I 1 6 <sup>-</sup> T r e g細胞を用いた結果を図示する。エフェクター細胞に対するT r e g細胞の数の割合がX軸に示される。

【図22B】チミジン取り込みサプレッサー試験の結果のまとめ(n = 6)を示す図表による説明である。エフェクター細胞に対するT r e g細胞の数の割合がX軸に示される。C R C B T - 0 2 - 0 0 1抗体を用いて単離されたT r e g細胞(P I - 1 6 <sup>+</sup>)、および、P I - 1 6 <sup>-</sup> T r e g細胞はエフェクター細胞の増殖を抑制する。

30

【図23A】増殖させた臍帯血T r e g細胞であって、C R C B T - 0 2 - 0 0 1抗体を用いてP I 1 6の発現に基づいて分別した細胞を使用する代表的なC F S Eサプレッサー試験の結果を示す一連の図表による説明を含む。上段の2枚のパネルは負の対照(左)、および、正の対照(右)を示す。左側の下から4枚のパネルでP I 1 6 <sup>+</sup>細胞を用いた結果を示し、および、右側の下から4枚のパネルでP I 1 6 <sup>-</sup>細胞を用いた結果を示す。

【図23B】増殖させた臍帯血由来細胞から単離したT r e g細胞を用いるC F S Eサプレッサー試験の結果のまとめ(n = 6)を示す図表による説明である。エフェクター細胞に対するT r e g細胞の数の割合がX軸に示される。C R C B T - 0 2 - 0 0 1抗体を用いて単離されたT r e g細胞(P I - 1 6 <sup>+</sup>)、および、P I - 1 6 <sup>-</sup> T r e g細胞はエフェクター細胞の増殖を抑制する。

40

【図23C】新しく採取した成体の血液からC R C B T - 0 2 - 0 0 1抗体を用いてP I 1 6の発現に基づいて分別したT r e g細胞を使用する代表的なC F S Eサプレッサー試験の結果を示す一連の図表による説明を含む。図の左側に実験に用いた細胞集団の結果を示し、エフェクター細胞に対するT r e g細胞の割合を図の上に示す。対照実験の結果は図の最も右側に含まれる(負の対照、上段、および、正の対照、下段)。

【図23D】図23Dは、新しく採取した成体の末梢血由来のT r e g細胞を用いるC F S Eサプレッサー試験の累積結果(n = 4)を示す図表による説明である。エフェクター細胞に対するT r e g細胞の数の割合がX軸に示される。C R C B T - 0 2 - 0 0 1抗体を用いて単離されたT r e g細胞(P I - 1 6 <sup>+</sup>)、および、P I - 1 6 <sup>-</sup> T r e g細胞はエフェクター細胞の増殖を抑制する。

50

【図24A】増殖させた臍帯血由来細胞から単離したTreg細胞であって、CRCBT-02-001抗体を用いてPI16の発現に基づいて分別した細胞を使用する代表的なCD154サブレッサー試験の結果を示す一連の図表による説明を含む。図の左側に実験に用いた細胞集団の結果を示し、および、エフェクター細胞に対するTreg細胞の割合を各グラフの上に示す。

【図24B】増殖された臍帯血由来細胞から単離されたTreg細胞を用いるCD154サブレッサー試験の累積結果(n=4)を示す図表による説明である。エフェクター細胞に対するTreg細胞の数の割合がX軸に示される。CRCBT-02-001抗体を用いて単離されたTreg細胞(PI-16<sup>+</sup>)、および、PI-16<sup>-</sup>Treg細胞はエフェクター細胞の増殖を抑制する。

10

【図25A】増殖させた臍帯nTreg細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)、iTreg細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>TGF-β処理細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>TGFβ処理ATRA処理細胞、および、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>ATRA処理細胞)において(示される)CD4、CD25、Foxp3、および、PI16の染色を示す代表的なフローサイトメトリーのデータを示す一連の図表による説明を含む。増殖させたnTreg細胞、および、iTreg細胞の両方が高レベルのCD4、CD25、および、Foxp3を発現した。しかしながら、nTreg細胞のみが著しいレベルのPI16を発現した。

【図25B】増殖させた臍帯由来の(n=7、上段のパネル)、および、成体由来の(n=7、下段のパネル)nTreg細胞(CD25<sup>+</sup>)、および、iTreg細胞(CD25<sup>-</sup>細胞、CD25<sup>-</sup>TGF-β処理細胞、CD25<sup>-</sup>TGFβ処理ATRA処理細胞、および、CD25<sup>-</sup>ATRA処理細胞)についてのフローサイトメトリーの累積結果を示す一連の図表による説明を含む。臍帯、および、成体において、nTreg細胞はiTreg細胞よりもかなり高いレベルのPI16を発現した。

20

【図26A】増殖させた臍帯nTreg細胞、および、iTreg細胞でのリアルタイムPCRで測定したPI16発現を示す図表による説明である(n=6)。CD25<sup>-</sup>細胞に対するCt値をiTreg細胞とnTreg細胞集団の両方について推定した。

【図26B】新しく単離された成体の末梢血のCRCBT-02-001抗体を用いて単離されたPI16<sup>+</sup>、および、PI16<sup>-</sup>Treg細胞から抽出されたRNAのRT-PCRデータ(n=3)を示す図表による説明である。PI-16<sup>-</sup>Treg細胞でFoxp3が発現する一方、タンパク質レベルでPI16を発現している細胞のみがPI16メッセージを発現する。

30

【図27A】臍帯血から増殖させたiTreg細胞と比較した、臍帯血から増殖させたnTreg細胞における(グラフの左側に示される)いくつかの遺伝子の発現レベルを比較する低密度アレイ解析の結果を示す図表による説明である。

【図27B】CD25<sup>-</sup>細胞と比較したnTreg細胞における(グラフの左側に示される)いくつかの遺伝子の発現レベルを比較する、または、CD25<sup>-</sup>細胞と比較したiTreg細胞における前記遺伝子の発現レベルを比較する低密度アレイ解析の結果を示す図表による説明である。全ての細胞を臍帯血から増殖させた。

【図28】FOXP3遺伝子のイントロン1のTSDRのバイサルファイトシーケンシングによるメチル化解析の結果を示す図表による説明である。新しい3体の雄の新鮮なドナーのリンパ球はCD4陽性CD25<sup>top</sup> 2%について分別され、そして、さらにCRCBT-02-001抗体を用いて選別された。

40

【図29A】通常の細胞培養条件下での(黒棒)、ならびに、IL-1、および、IL-6に曝露した後の(白棒)、PI16<sup>+</sup>nTreg細胞のチミジン取り込み(上段のパネル)、および、CFSEサブレッサー試験(下段のパネル)によって測定される抑制能力を示す一連の図表による説明を含む。エフェクター細胞に対するTreg細胞の割合がX軸に示される。

【図29B】通常の細胞培養条件下での(黒棒)、ならびに、IL-1、および、IL-6に曝露した後の(白棒)、PI16<sup>-</sup>nTreg細胞のチミジン取り込みサブレッサー試験(上段のパネル)、および、CFSEサブレッサー試験(下段のパネル)により

50

測定される抑制能力を示す一連の図表による説明を含む。エフェクター細胞に対する T r e g 細胞の割合が X 軸に示される。

【図 29 C】通常の細胞培養条件の下での（黒棒）、ならびに、I L - 1、および、I L - 6 に曝露した後の（白棒）、P I 1 6<sup>-</sup> i T r e g 細胞のチミジン取り込み（上段のパネル）、および、C F S E サプレッサー試験（下段のパネル）により測定される抑制能力を示す一連の図表による説明を含む。エフェクター細胞に対する T r e g 細胞の割合が X 軸に示される。

【図 30】図 1 4 と同じゲーティング戦略を用いて示される、C D 2 5、および、P I 1 6 の発現レベルに基づいて選択される様々な細胞集団における H L A D R の発現を示す図表による説明である。

【図 31】若年性特発性関節炎の患者における T r e g 細胞の解析を示す一連の図表による説明を含む。成体由来の P B M C ( A B<sup>+</sup> P B<sup>+</sup> )、および、若年性特発性関節炎の患者由来の P B M C ( J I A<sup>+</sup> P B<sup>+</sup> )、および、若年性特発性関節炎の患者由来の S F M C ( J I A<sup>+</sup> S F<sup>+</sup> ) を T r e g 細胞カクテル ( C D 4 抗体、C D 2 5 抗体、C D 1 2 7 抗体 )、および、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体を用いて染色し、ならびに、F A C S A r i a I I で解析した。上段のパネルは C D 4<sup>+</sup> / C D 2 5<sup>+</sup> / C D 1 2 7<sup>-</sup> についてのゲート ( T r e g 細胞ゲート ) でリンパ球を区分したときの結果を示し、および、C D 4<sup>+</sup> T 細胞のパーセンテージを示す ( n = 9 )。下段のパネルは、T r e g 細胞ゲート内の P I 1 6 陽性細胞のパーセンテージを示す。\* p ( 確率 ) < 0 . 0 5 ( n = 1 1 )。

【図 32】各グラフの上に示される C D 2 5、および、P I 1 6 の発現レベルに基づいて選択される様々な細胞集団での C L A の発現を示す一連の図表による説明を含む。

【図 33 A】健康な成体の P B M C に由来する C D 4<sup>+</sup> C D 2 5<sup>b r i g h t</sup> C R C B T - 0 2 - 0 0 1<sup>+</sup> 細胞の、C C R 4、および、C C R 6 のリガンドである C C L 1 7、および、C C L 2 0 に応答して移動する能力を示す図表による説明である。C D 4<sup>+</sup> C D 2 5<sup>b r i g h t</sup> C R C B T - 0 2 - 0 0 1 細胞は C C L 1 7、C C L 2 0、および、C C L 1 7 / C C L 2 0 リガンドの組合せに向かって移動するが、培地だけに向かって移動することはない。

【図 33 B】図 33 B は、正常な幼体からの P B M C ( 左側のパネル )、若年性特発性関節炎を患う対象からの P B M C ( J I A、中央のパネル )、および、J I A を患う対象からの滑液単核球細胞 ( S F M C ) に由来する C D 4<sup>+</sup> C D 2 5<sup>b r i g h t</sup> C R C B T - 0 2 - 0 0 1<sup>+</sup> 細胞の、C C R 4、および、C C R 6 のリガンドである C C L 1 7、および、C C L 2 0 に応答して移動する能力を示す一連の図表による説明を含む。健康な対象、および、J I A を患う対象からの P B M C に由来する C D 4<sup>+</sup> C D 2 5<sup>b r i g h t</sup> C R C B T - 0 2 - 0 0 1 細胞は C C L 1 7、C C L 2 0、および、C C L 1 7 / C C L 2 0 リガンドの組合せに向かって移動し、一方、J I A を患う対象からの S F M C に由来する細胞は移動しなかった。

【図 34 A】天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質に結合する C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体の結合レベル ( 天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質への結合のパーセントとして結合レベルを表す。 ) を示す図表による説明である。P I 1 6 - F c 融合タンパク質の還元型アルキル化 ( 還元型 ) は C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体の結合をほぼ完全に消失させた。F c 部分を検出する対照抗体は天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 ( 非還元型 )、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 ( 還元型 ) を認識した。このことは、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質の完全性がその酸化還元状態と独立して保持されていることを示す。

【図 34 B】C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗 P I 1 6 モノクローナル抗体が、ジスルフィド結合依存的な方法で P I 1 6 - F c 融合タンパク質を認識することを示す一連の写真による説明のコピーを含む。左側のパネルは、天然型非還元型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 ( レーン 1 )、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 ( レーン 2 ) の S D S P A G E 解析を示す。4 ~ 1 2 % N u P A G E ゲル ( I n v i t r o g e n ) を

10

20

30

40

50

クマシーブリリアントブルーで染色した。各レーンに約  $1 \mu\text{g}$  の P I 1 6 を負荷した。中央のパネルは、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体と H R P 標識抗マウス免疫複合体で探索した天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質のウェスタンブロット解析を示す。それぞれ、レーン 1 ~ 3 は、 $200 \text{ ng}$ 、 $67 \text{ ng}$ 、および、 $22 \text{ ng}$  の天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質に相当し、および、レーン 4 ~ 6 は同じ濃度の還元型アルキル化 P I 1 6 に相当する。右側のパネルは、抗原の存在を確認するためにウェスタンブロットを H R P 複合体化抗ヒト F c で再探索したときに得られた結果を示し、レーン 1 ~ 3 は天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質に相当し、および、レーン 4 ~ 6 は還元型アルキル化 P I 1 6 に相当する。

【図 3 4 C】ジスルフィド結合依存的な方法で C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗 P I 1 6 モノクローナル抗体が P I 1 6 - F c 融合タンパク質を認識することを示す一連の写真による説明のコピーを含む。左側のパネルは、組換え非還元型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 (レーン 1)、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 (レーン 2) の S D S - P A G E 解析を示す。4 ~ 12 % N u P A G E ゲル ( I n v i t r o g e n ) をクマシーブリリアントブルーで染色した。各レーンに約  $1 \mu\text{g}$  の P I 1 6 を負荷した。左から中央のパネルは、10,000 倍希釈した H R P 複合体化抗ヒト F c I g G で探索した天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 (それぞれ、レーン 1、および、レーン 2) のウェスタンブロット解析の結果を示す。各レーンに約  $200 \text{ ng}$  の組換え P I 1 6 を負荷した。右側のパネルは、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体、および、H R P 複合体化抗マウス I g G で探索した非還元型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質、および、還元型アルキル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質 (それぞれ、レーン 1、および、レーン 2) のウェスタンブロット解析の結果を示す。各レーンに約  $200 \text{ ng}$  の P I 1 6 を負荷した。

【図 3 5】天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質、および、脱グリコシル化 P I 1 6 - F c 融合タンパク質への C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体の結合レベル (天然型 P I 1 6 - F c 融合タンパク質への結合のパーセントとして結合レベルを表す。) を示す図表による説明である。P N G a s e F での P I 1 6 - F c 融合タンパク質の処理は C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体の結合に対して測定可能な影響を持たなかった。対照抗体である抗 F c 抗体は融合タンパク質の C 末端を認識する。このことは、脱グリコシル化 P I 1 6 の完全性が保持されていることを示す。

【図 3 6】N 末端 C A P ドメインを含有する P I 1 6 - F c 融合タンパク質の断片に結合する C R C B T - 0 2 - 0 0 1 の結合を示す図表による説明である。加熱処理の後、P I 1 6 - F c 融合タンパク質の明確な分解産物が観察され、および、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体はそれでも約  $35 \text{ kDa}$  の断片を認識した。

【図 3 7】ファージに提示される P I 1 6 遺伝子の無作為断片ライブラリーの構築を示す 2 つの写真による説明のコピーを含む。左側のパネルは、最適に分布したサイズの断片を作成するために D N a s e I で消化した P I 1 6 コーディング D N A の臭化エチジウムで染色したアガロースゲルを示す。右側のパネルは、無作為に選択したクローンの P I 1 6 コーディング D N A 断片を意味する P C R 増幅産物を表す臭化エチジウムで染色したアガロースゲルを示す。代表的な断片のサイズは図の下に示される。

【図 3 8 A】ファージに提示された P I 1 6 断片ライブラリーの遺伝子断片を C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体に対する特異性で選択したパニングの結果を示す図表による説明である。ラウンド 3 から選択された 5 つの遺伝子断片 (4、7、10、12、および、15) が C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体と強固に結合し、そして、アイソタイプ対照 m A b ( I C ) に結合しないことを表す E L I S A の結果が示される。

【図 3 8 B】図 3 8 A において表される断片への 9 E 1 0 抗 M y c 抗体の結合を示す図表による説明であり、シグナルはファージでのインフレイム遺伝子断片の発現に対応する。

【図 3 9】ファージのパニング中に単離された P I 1 6 遺伝子断片の相対的なサイズを示す 2 つの図表による説明を含む。ラウンド 0 (パニング前)、および、ラウンド 2、および、ラウンド 3 でファージクローンを同定した。番号を振ったクローンを、図 3 8 での結

10

20

30

40

50

合について解析した。C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体に対する強固な結合を示した「\*」で印をつけた P I 1 6 断片のみを 3 回のパニングの後に単離した。

【図 4 0 A】C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体に結合するラウンド 3 のパニングからの P I 1 6 遺伝子断片の配列とヒト P I 1 6 のアミノ酸配列（配列番号 1）の配列アラインメントを示す図表による説明である。示されている断片は、クローン 1 5（配列番号 3 3）、クローン 1 2（配列番号 3 4）、クローン 1 0（配列番号 3 5）、クローン 7（配列番号 3 6）、および、クローン 4（配列番号 3 7）である。前記クローンの配列は P I 1 6 の N 末端部分（C A P ドメイン）と部分的に重なることがその結果により示される。

【図 4 0 B】ラウンド 3 のクローン 4、7、1 2、1 0、および、1 5（配列番号 3 8）の一致領域（1 6 アミノ酸）の配列を示す。これは C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体の最小結合領域である。前記クローンの配列のヒト P I 1 6 に対する位置を表す図を配列の下に示す。

【図 4 0 C】ヒト P I 1 6 の配列（配列番号 1）の中にあるラウンド 3 のクローン 4、7、1 2、1 0、および、1 5（配列番号 3 8）の一致領域（1 6 アミノ酸）の配列を示す。また、C A P ドメインとヒンジ領域の境界を示す。

【図 4 1】ヒト P I 1 6 のペプチド断片、または、負の対照ペプチドへの C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体の結合を示す図表による説明である。別のアイソタイプ対照抗体（I C）を対照として使用した。ペプチドでコートされたウェルに加えられた抗体の濃度を図の右側に示す。

【図 4 2】3 つの異なる濃度（5 0 n M、2 5 n M、および、1 2 . 5 n M）で P I 1 6 - F c 融合タンパク質に結合する P I 1 6 F a b 断片についての結合曲線（ $K_a$ ）、および、解離曲線（ $K_d$ ）を示す図表による説明である。

【図 4 3】4 つの異なる濃度（5 0 n M、2 5 n M、1 2 . 5 n M、および、6 . 2 5 n M）の P I 1 6 - F c 融合タンパク質で P I 1 6 m A b に結合する P I 1 6 - f c 融合タンパク質についての結合曲線（ $K_a$ ）、および、解離曲線（ $K_d$ ）を示す図表による説明である。

【発明を実施するための形態】

【0 1 5 0】

配列表の解説

配列番号 1 はヒト（H o m o s a p i e n s）P I 1 6 のアミノ酸配列である。

配列番号 2 はマウス（M u s m u s c u l u s）P I 1 6 のアミノ酸配列である。

配列番号 3 はラット（R a t t u s n o v i g e n i c u s）P I 1 6 のアミノ酸配列である。

配列番号 4 はチンパンジー（P a n t r o g l o d y t e s）P I 1 6 のアミノ酸配列である。

配列番号 5 はヒト P I 1 6 オープンリーディングフレームを増幅するためのオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号 6 はヒト P I 1 6 オープンリーディングフレームを増幅するためのオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号 7 はハイブリドーマ C R C B T - 0 2 - 0 0 1 で産生される抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号 8 はハイブリドーマ C R C B T - 0 2 - 0 0 1 で産生される抗体の重鎖をコードするアミノ酸配列である。

配列番号 9 はハイブリドーマ C R C B T - 0 2 - 0 0 1 で産生される抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号 1 0 はハイブリドーマ C R C B T - 0 2 - 0 0 1 で産生される抗体の重鎖をコードするアミノ酸配列である。

配列番号 1 1 はマウス免疫グロブリン軽鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 1 2 はマウス免疫グロブリン軽鎖をコードする配列をクローニングするための

10

20

30

40

50

プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 13 はマウス免疫グロブリン重鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 14 はマウス免疫グロブリン重鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 15 はマウス免疫グロブリン重鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 16 はマウス免疫グロブリン重鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 17 はマウス免疫グロブリン重鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 18 はマウス免疫グロブリン重鎖をコードする配列をクローニングするためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 19 は F o x P 3 の領域を増幅するプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 20 は F o x P 3 の領域を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 21 は P I 1 6 の領域を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 22 は P I 1 6 の領域を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 23 は R P L 1 3 a の領域を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 24 は R P L 1 3 a の領域を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 25 は P I 1 6 の 2 8 ~ 4 4 3 アミノ酸をコードする核酸を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 26 は P I 1 6 の 2 8 ~ 4 4 3 アミノ酸をコードする核酸を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 27 は P I 1 6 のペプチド断片のアミノ酸配列である。

配列番号 28 は T S D R を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 29 は T S D R を増幅するためのプライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 30 は M 1 3 ユニバーサル順方向プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 31 は M 1 3 ユニバーサル逆方向プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 32 は C R C B T - 0 2 - 0 0 1 抗体が結合するヒト P I 1 6 のペプチド断片のアミノ酸配列である。

配列番号 33 は ファージクローン 1 5 が発現する P I 1 6 の断片のアミノ酸配列である。

配列番号 34 は ファージクローン 1 2 が発現する P I 1 6 の断片のアミノ酸配列である。

配列番号 35 は ファージクローン 1 0 が発現する P I 1 6 の断片のアミノ酸配列である。

配列番号 36 は ファージクローン 7 が発現する P I 1 6 の断片のアミノ酸配列である。

配列番号 37 は ファージクローン 4 が発現する P I 1 6 の断片のアミノ酸配列である。

配列番号 38 は ファージクローン 1 5、1 2、1 0、7、および、4 の配列の重複領域のアミノ酸配列である。

配列番号 39 は ファージクローン 4、および、7 に共通のヒト P I 1 6 のペプチド断片のアミノ酸配列である。

配列番号 40 は ヒト P I 1 6 外部ドメインのアミノ酸配列である。

#### 【 0 1 5 1 】

全般的な説明

10

20

30

40

50

この明細書を通して、特に記述のない限り、または、文脈から必要とされない限り、1つのステップ、1つの組成物、1群のステップ、または、1群の組成物への言及は、単数の、および、複数の（すなわち、1つ以上の）それらのステップ、組成物、群のステップ、または、群の組成物を包含すると理解されるものとする。

【0152】

当業者は、本明細書に記載される本発明は具体的に記載されているもの以外に変形と改変の余地があること理解するであろう。本発明はそのような変形と改変の全てを含むと理解されるものとする。本発明はまたこの明細書で言及される、または、示されるステップ、特徴、組成物、および、化合物の全てを個々に、または、まとめて含み、そして、前記のステップ、または、特徴のありとあらゆる組合せ、または、任意の2つ以上の前記のステップ、または、特徴を含む。

10

【0153】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態によってその範囲が限定されるものではなく、具体的な実施形態は例示の目的のみで用いられることを意図している。同等の機能を持つ製品、組成物、および、方法は明らかに本明細書に記載される発明の範囲に入る。

【0154】

本明細書に記載のどの実施形態も、特に記載のない限り、その他のどの実施形態にも必要な変更を加えて適用されると理解されるものとする。

【0155】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語、および、科学用語は（例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、および、生化学における）当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有すると理解されるものとする。

20

【0156】

特に示されない限り、本発明で使用される組換えタンパク質技術、細胞培養技術、および、免疫学的技術は当業者に周知の標準的技法である。そのような技術は、様々な文献、例えば、Perbal（1984年）、Sambrookら（1989年）、Brown（1991年）、GloverおよびHames（1995年、および、1996年）、ならびに、Ausubelら（1988年、現時点までの全ての最新情報を含む）、HarlowおよびLane（1988年）、Coliganら（現時点までの全ての最新情報を含む）、ならびに、Zola（1987年）を通して記述され、および、説明されている。

30

【0157】

本明細書における可変領域、および、その部分、免疫グロブリン、抗体、および、その断片の叙述と定義をKabatt、1987年および/もしくは1991年、Borkら、1994年、ならびに/または、ChothiaおよびLesk、1987年および/もしくは1989年、または、Al-Lazikaniら、1997年での議論によってさらに明確にすることができる。

【0158】

「および/または」という用語、例えば、「X、および/または、Y」は、「X、および、Y」が「X、または、Y」のどちらかを意味すると理解され、両方、または、どちらかを明示的に意味するものとして理解されるものとする。

40

【0159】

この明細書を通じて、「含む（comprise）」という言葉、または、「含む（comprises）」、または、「含んでいる（comprising）」のような変形形態は、明示された要素、完全体、または、ステップ、要素の群、複数の完全体、または、ステップの包含を意味するが、他の要素、完全体、または、ステップ、要素の群、複数の完全体、または、ステップの排除を意味しないと理解されるであろう。

【0160】

50

本明細書で使用される「由来する」という用語は、特定された完全体を特定の出所から、必ずしもその出所から直接というわけではないが、得ることができることを意味すると理解されるものとする。

#### 【0161】

##### 定義選集

当業者は、「抗体」は、少なくとも1つの可変領域に含有される抗原結合部位によって1つの抗原、または、少数の近縁の抗原（例えば、P I 1 6）に特異的に結合する能力を持つ免疫タンパク質を含むことを理解するであろう。この用語は4本鎖抗体（例えば、2本の軽鎖、および、2本の重鎖）、組換え、または、修飾抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体、半抗体、二重特異性抗体）、ならびに、ドメイン抗体、および、重鎖のみ抗体のような単ドメイン抗体（例えば、ラクダ類抗体、または、軟骨魚類免疫グロブリン新規抗原受容体（I g N A R s））を含む。抗体は一般的に定常ドメインを含み、それらのドメインが並べられて定常領域、または、定常断片、または、結晶化可能断片（F c）になることができる。好ましい形態の抗体はその基本単位として4本鎖構造を含む。完全長の抗体は、共有結合で連結した2本の重鎖（約50～70 k D）と2本の軽鎖（約23 k Dずつ）を含む。軽鎖は可変領域と定常ドメインを一般に含み、そして、哺乳類では軽鎖か軽鎖のどちらかである。重鎖は可変領域、および、1つの、または、2つの定常ドメイン、および、その定常ドメインとヒンジ領域で連結されたその他の定常ドメインを一般に含む。哺乳類の重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、または、 $\alpha$ のうちの一つである。各軽鎖はまた重鎖のうちの本と共有結合する。例えば、2本の重鎖、ならびに、重鎖、および、軽鎖は、鎖間ジスルフィド結合と非共有結合性相互作用によって1つにまとめられる。鎖間ジスルフィド結合の数は様々な種類の抗体の間で変わることができる。各鎖はN末端可変領域（ $V_H$ 、または、 $V_L$ 、それぞれ長さが約110アミノ酸である。）と1つ以上の定常ドメインをC末端に持つ。軽鎖の定常ドメイン（長さが約110アミノ酸である $C_L$ ）は重鎖の第1定常ドメイン（長さが約330～440アミノ酸の $C_H$ ）と整列し、ジスルフィド結合で結合する。軽鎖可変領域は重鎖の可変領域と整列する。抗体の重鎖は2つ以上のその他の $C_H$ ドメイン（例えば、 $C_H 2$ 、 $C_H 3$ など）を含むことができ、そして、 $C_H 1$ 定常ドメインと $C_m$ 定常ドメインの間に特定することができるヒンジ領域を含むことができる。抗体は、どのようなタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、および、I g Y）、クラス（例えば、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、I g G<sub>4</sub>、I g A<sub>1</sub>、および、I g A<sub>2</sub>）、または、サブクラスでもあり得る。抗体はネズミ科（マウス、または、ラット）抗体、または、霊長類（好ましくは、ヒト）抗体であることが好ましい。

#### 【0162】

本明細書で使用される「可変領域」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を持ち、好ましくは、C D R s、すなわち、C D R 1、C D R 2、および、C D R 3、および、F Rのアミノ酸配列を含む、本明細書で定義される抗体の軽鎖、および/または、重鎖の部分の意味する。可変領域が3つ、または、4つのF R（例えば、F R 1、F R 2、F R 3、および、所望によりF R 4）を3つのC D Rとともに含むことが好ましい。 $V_H$ は重鎖の可変領域を意味する。 $V_L$ は軽鎖の可変領域を意味する。本発明の実行にあたって、K a b a t（1987年、および、1991年）、または、その他の付番方式、例えば、C l o t h i a、および、L e s kの超可変ループ付番方式（1987年および/もしくは1989年、ならびに/または、A l - L a z i k a n iら、1997年）に従ってC D RとF Rに割り当てられたアミノ酸位置を定義することができる。例えば、K a b a tの付番方式によれば、 $V_H$ のF R sとC D R sの位置は次のように残基1～25、または、1～30（F R 1）、31～25（C D R 1）、36～49（F R 2）、50～65（C D R 2）、66～94（F R 3）、95～102（C D R 3）、および、103～113（F R 4）とK a b a tの付番方式に従って番号を付けて示される。1つの例において、 $V_H$ は、前記重鎖と複数の（好ましくは、3つの、または、4つの）定常ドメインを含む抗体に由来する、または、定常断片（F c）に結合する。好ましくは、 $V_L$ は、次のよ

10

20

30

40

50

うに残基 1 ~ 23 (FR1)、24 ~ 34 (CDR1)、35 ~ 49 (FR2)、50 ~ 56 (CDR2)、57 ~ 88 (FR3)、89 ~ 97 (CDR3)、および、98 ~ 107 (FR4) と Kabat の付番方式に従って番号を付けて位置を示される FR と CDR を含む。1つの例において、V<sub>L</sub> は、1つの定常ドメインに結合した前記 V<sub>L</sub> および / または定常断片 (Fc) に結合しない前記 V<sub>L</sub> を含む抗体に由来する。

#### 【0163】

本明細書で使用される「相補性決定領域」(CDR、すなわち CDR1、CDR2、および、CDR3 と同義) という用語は、その存在が抗原の結合に必要な抗体可変ドメインのアミノ酸残基を意味する。各可変ドメインは、典型的には、CDR1、CDR2、および、CDR3 として特定される3つの CDR 領域を有する。各相補性決定領域は Kabat (1991年) によって定義される「相補性決定領域」のアミノ酸残基、および / または、Chothia、および、Lesk (1987年) の「超可変ループ」のアミノ酸残基、または、IMGT 付番方式 (Le Franc, 2003年) を含む全ての公知の付番技法、または、それらの組合せのアミノ酸残基を含むことができる。例えば、重鎖可変領域では、CDRH1 は残基 31 ~ 35 の間にあり、CDRH2 は残基 50 ~ 65 の間にあり、および、CDRH3 は残基 95 ~ 102 の間にある。軽鎖において、CDRL1 は残基 24 ~ 34 の間にあり、CDRL2 は残基 50 ~ 56 の間にあり、および、CDRL3 は残基 89 ~ 97 の間にある。これらの CDRs はまた、多数の挿入、例えば、Kabat (1987年および / または 1991年) に記載される挿入を含むことができる。

10

20

#### 【0164】

「フレームワーク領域 (これ以降、FR)」は CDR 残基以外のそれら可変ドメイン残基である。

#### 【0165】

本明細書で使用される「Fv」という用語は、複数のポリペプチドから成るにせよ、または、単数のポリペプチドから成るにせよ、V<sub>L</sub> と V<sub>H</sub> が結合して抗原結合部位を有する複合体を形成する、すなわち、抗原に特異的に結合する能力を有する任意のタンパク質を意味すると理解されるものとする。抗原結合部位を形成する V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> は1つのポリペプチド鎖、または、異なるポリペプチド鎖の中にあり得る。さらに、本発明の Fv は (ならびに、本発明の任意のタンパク質は)、同じ抗原に結合することができる、または、できない複数の抗原結合部位を有することができる。この用語は、抗体、ならびに、組換え技術を用いて作製されたそのような断片に対応するタンパク質に直接由来する断片を包含すると理解されるものとする。いくつかの例、例えば、ドメイン抗体、または、単ドメイン抗体では、V<sub>H</sub> は重鎖定常ドメイン (C<sub>H</sub>)<sub>1</sub> に結合せず、および / または、V<sub>L</sub> は軽鎖定常ドメイン (C<sub>L</sub>) に結合しない。例となる Fv 含有ポリペプチド、または、Fv 含有タンパク質は、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab') 断片、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、または、高次複合体、または、定常領域、もしくは、そのドメイン、例えば、C<sub>H</sub>2、もしくは、C<sub>H</sub>3 ドメイン、に結合する先述の例のいずれか、例えば、ミニ抗体を含む。「Fab 断片」は免疫グロブリンの一価抗原結合断片から成り、そして、酵素パインで抗体全体を消化して軽鎖全体と重鎖の一部からなる断片を作り出すことで作製され得る、または、組換え技術を用いて作製され得る。抗体の「Fab' 断片」は、抗体全体をペプシンで処理し、引き続いて還元処理し、軽鎖全体、および、V<sub>H</sub> と1つの定常ドメインを含む重鎖の一部から成る分子を作り出すことで得ることができる。この方法で処理された1つの抗体から2つの Fab' 断片を得る。Fab' 断片はまた組換え技術で作製されることができる。抗体の「F(ab')<sub>2</sub> 断片」は、2本のジスルフィド結合によって1つにまとめられた2つの Fab' 断片でできた二量体から成る。そして、抗体全体を酵素ペプシンで処理し、次に還元処理しないことで F(ab')<sub>2</sub> 断片を得る。「Fab<sub>2</sub>」断片は、例えば、ロイシンジッパー、または、C<sub>H</sub>3 ドメインを用いて結合された2つの Fab 断片を含む組換え断片である。「単鎖 Fv」、または、「scFv」は、軽鎖の可変領域、および、重鎖の可変領域が適切で柔軟なポ

30

40

50

リペプチドリンカーによって共有結合で結合されている抗体の可変領域断片 (Fv) を含有する組換え分子である。この用語の範囲内にあるタンパク質を含むFvの例についての詳細な考察は本明細書において以下に提供される。

【0166】

本明細書で使用される「抗原結合部位」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を有するタンパク質によって作られる構造を意味すると理解されるものとする。抗原結合部位は一連の連続するアミノ酸、または、単一ポリペプチド鎖の形状のアミノ酸である必要もない。例えば、2本の異なるポリペプチド鎖から作製されるFvでは、抗原結合部位は、抗原と相互作用し、および、常にというわけではないが、一般に各可変領域につき1つ以上のCDRsを有するV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>の一連の領域からなる。

10

【0167】

本明細書で使用される「定常領域」という用語は (CR、または、結晶化可能断片、または、Fcと同義)、少なくとも1つの定常ドメインを含み、ならびに、一般に (必ずというわけではないが) グリコシル化されており、ならびに、1つ以上のF受容体、および/または、(例えば、エフェクター機能を与える) 補体カスケードの構成要素に結合する抗体の一部分を意味する。重鎖定常領域は、 $\mu$ 、または、 $\mu$ の5つのアイソタイプのうちいずれかより選択されることができる。さらに、(重鎖のIgGサブクラスのような) 様々なサブクラスの重鎖が様々なエフェクター機能の原因であり、したがって、望ましい重鎖定常領域を選択することにより、望ましいエフェクター機能を有するタンパク質を作製することができる。好ましい重鎖定常領域は 1 (IgG1)、2 (IgG2)、および、3 (IgG3) である。

20

【0168】

「定常ドメイン」は、抗体/同じ種類の抗体、例えば、IgG、または、IgM、または、IgEにおいて非常に類似した配列を持つ抗体中のドメインである。抗体の定常領域は一般に複数の定常ドメインを含み、例えば、重鎖、重鎖、および、重鎖の定常領域は3つの定常ドメインを含み、そして、重鎖、重鎖、および、重鎖のFcは2つの定常ドメインを含む。 $\mu$ 重鎖、および、重鎖の定常領域は4つの定常ドメインを含み、そして、Fc領域は2つの定常ドメインを含む。

【0169】

「単離された」という用語は、タンパク質がその天然環境から実質的に取り除かれること、例えば、タンパク質が異種性の環境中にあることを意味し、および/または、タンパク質に夾雑する物質が実質的に無いこと、例えば、夾雑する物質が少なくとも約70%、もしくは、75%、もしくは、80%、もしくは、85%、もしくは、90%、もしくは、95%、もしくは、96%、もしくは、97%、もしくは、98%、もしくは、99%無いことを意味する。

30

【0170】

「タンパク質」という用語は、1本のポリペプチド鎖すなわち、ペプチド結合で連結した一連の連続するアミノ酸、または、共有結合で、もしくは、非共有結合で互いに連結する一連のポリペプチド鎖 (すなわち、ポリペプチド複合体) を含むと理解されるものとする。例えば、前記の一連のポリペプチド鎖は、適切な化学結合、または、ジスルフィド結合を用いて共有結合で連結されることができる。非共有結合の例は、水素結合、イオン性結合、ファンデルワールス力、および、疎水性相互作用を含む。本発明で考えられている非共有結合は、例えば、ある形状の二重特異性抗体、または、三重特異性抗体、または、四重特異性抗体、または、FvにおけるV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>の間の相互作用である。

40

【0171】

「ポリペプチド鎖」という用語は、ペプチド結合で連結する一連の連続するアミノ酸を意味することを前段落から意味すると理解されるであろう。

【0172】

本明細書で使用される「特異的に結合する」という用語は、本発明のタンパク質が特定の抗原、または、特定の複数の抗原、または、前記のものを発現する細胞と、別の抗原、

50

または、細胞と反応する、または、結合するよりも頻繁に、急速に、長い時間反応する、または、結合することを意味すると理解されるものとする。例えば、ある抗原に特異的に結合するタンパク質は、そのタンパク質がその他の抗原に結合するよりも高い親和性で、より強い結合力で、より容易に、および/または、より長い時間、その抗原に結合する。例えば、第1の抗原に特異的に結合するタンパク質は第2の抗原に特異的に結合することができる、または、できないということもまたこの定義を読むことにより理解される。それ故、「特異的な結合」は排他的な結合、または、別の抗原の検出限界以下の結合を必ずしも必要とせず、「選択的な結合」という用語がこのことを意味する。一般に、必ずというわけではないが、結合と言えば特異的結合を意味し、そして、各用語は他方の用語を明示的に裏付けると理解されるものとする。

10

**【0173】**

本明細書で使用される「実質的に結合しない」という表現は、タンパク質が、そのタンパク質が結合すると知られている抗原に結合するレベルの20%、または、15%、または、10%、または、9%、または、8%、または、7%、または、6%、または、5%、または、4%、または、3%、または、2%を超えるレベルで、ある抗原に結合することがないことを意味すると理解されるものとする。1つの例において、結合は、ウェスタンブロットティング、および/または、FACS、および/または、ELISA、および/または、(例えば、粒子、例えば、ファージの表面上の抗体可変領域による)抗体パニング、および/または、BIACORE解析によって検出される。例えば、本発明のタンパク質は、正しく折りたたまれ、ジスルフィド結合で結合したPI16に結合するレベルの20%以下、または、15%以下、または、10%以下のレベルで還元型アルキル化PI16に結合する。

20

**【0174】**

本明細書で使用される「検出できるほど結合しない」という表現は、バックグラウンドを有意に超えるレベルで抗原にタンパク質が結合しないことを、例えば、バックグラウンドよりも10%未満、または、8%、または、6%、または、5%高いレベルでPI16に結合することを意味すると理解されるものとする。ある抗体の場合、その抗体はアイソタイプ対照抗体よりも10%未満、または、8%、または、6%、または、5%高いレベルで抗原に結合する。1つの例において、結合は、ウェスタンブロットティング、および/または、FACS、および/または、ELISA、および/または、(例えば、粒子、例えば、ファージの表面上の抗体可変領域による)抗体パニング、および/または、BIACORE解析によって検出される。

30

**【0175】**

本明細書で使用される「ある配列を含むエピトープに特異的に結合する」という用語は、タンパク質が列挙された配列内の1つ以上の残基に結合する、または、その残基と接触することを意味すると理解されるであろう。その用語は、結合に関わるPI16のその他の成分を排除するものではない。例えば、本明細書に例示されるタンパク質はある配列に結合するが、しかしながら、結合した配列の外側にあるPI16中のジスルフィド結合の存在が結合に影響を与える。1つの例において、そのタンパク質はPI16中の他のどんなエピトープにも結合しない。

40

**【0176】**

本明細書で使用される「ある配列に含有されるエピトープ」という用語は、列挙された配列内にタンパク質が結合する配列が含有されることを意味すると理解されるであろう。その用語は、結合に関わるPI16のその他の要素を排除しない。例えば、本明細書に例示されるタンパク質はある配列に結合するが、しかしながら、結合した配列の外側にあるPI16中のジスルフィド結合の存在がその結合に影響を与える。1つの例において、そのタンパク質はPI16中の他のどんなエピトープにも結合しない。

**【0177】**

「エピトープはPI16内のジスルフィド結合の形成に依存している。」という表現は、PI16がジスルフィド結合を含むとき、あるタンパク質が結合するが、しかしながら

50

、それは、P I 1 6 がジスルフィド結合を含まないとき（例えば、還元化された、および/または、アルキル化されたとき）、実質的に結合しないエピトープを意味すると理解されるであろう。

【0178】

本明細書で使用される「還元型」という用語は、ジスルフィド結合を壊すように処理されたタンパク質、および/または、タンパク質中のスルフヒドリル(SH)基の酸化を還元するように処理されたタンパク質を意味すると理解されるものとする。

【0179】

本明細書で使用される「CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマ」という用語は、受託番号PTA-10685でATCCに寄託された米国標準培養コレクション(ATCC)という名称のハイブリドーマを意味すると理解されるものとする。本明細書のいくつかの場合において、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって分泌される抗体はCRCBT-02-001と称される。

10

【0180】

本明細書で使用される「ペプチダーゼインヒビター16」、または、「P I 1 6」（高システイン分泌タンパク質9、CRISP9、PSP96結合タンパク質、または、PSPBPと同義）は、前立腺分泌タンパク質(PSP)94と相互作用する高システイン分泌タンパク質(CRISP)ファミリーのタンパク質を意味すると理解されるであろう。P I 1 6の例はReevesら(2005年)に記載される。ヒトP I 1 6の配列の例は配列番号1に示される。マウスP I 1 6の配列の例は配列番号2に示される。ラットP I 1 6の配列の例は配列番号3に示される。チンパンジーP I 1 6の配列の例は配列番号4に示される。図1に示される配列アラインメントにおいて明らかにされるように、ヒト、マウス、ラット、および、チンパンジーのP I 1 6という最も多様な配列は52%の配列同一性を共有する。したがって、「P I 1 6」という用語と関連の用語は、配列番号1~4の1つ以上に記載の配列と少なくとも約52%同一の配列を含むタンパク質を包含する。好ましくは、P I 1 6はヒトP I 1 6である。

20

【0181】

本明細書で使用される、「エピトープ」（「抗原決定基」と同義）は、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマが産生する抗体が結合するP I 1 6の領域を意味すると理解されるものとする。この用語は、その抗体が接触する特定の残基、または、構造に必ずしも限定されない。例えば、この用語は、その抗体が接触する数アミノ酸に及ぶ領域、および/または、この領域の外側の5~10アミノ酸、または、2~5アミノ酸、または、1~3アミノ酸を含む。ある例において、前記エピトープはP I 1 6の一連の連続するアミノ酸である。しかしながら、あるエピトープはまた、P I 1 6が折りたたまれるときに互いに近接する一連の非連続的なアミノ酸、すなわち、「立体構造的エピトープ」を含むことができる。当業者はまた、「エピトープ」という用語はペプチド、または、ポリペプチドに限定されないということを理解するであろう。前記のものを含むエピトープ、または、ペプチド、または、ポリペプチドを、そのエピトープに対する抗体を作成するために動物に投与することができる。

30

【0182】

「競合的に阻害する」という用語は、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって産生されるP I 1 6に対する抗体の結合を本発明のタンパク質が低減させる、または、妨害することを意味すると理解されるものとする。CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって産生される抗体の結合をそのタンパク質が完全に阻害する必要はなく、むしろ、統計学的に有意な量まで、例えば、少なくとも約10%、または、20%、または、30%、または、40%、または、50%、または、60%、または、70%、または、80%、または、90%、または、95%まで結合を低減する必要があるだけであると上述のことから明らかであるだろう。結合の阻害を競合的に測定する方法は当該分野において公知であり、および/または、本明細書に記載される。例えば、前記タンパク質が存在する状態で、または、存在しない状態で前記抗体はP I 1 6に

40

50

曝露される。前記タンパク質が存在しない状態よりも、前記タンパク質が存在する状態で少ない抗体が結合するとき、前記タンパク質は抗体の結合を競合的に阻害したと考えられる。前記タンパク質と抗体が実質的に同時に P I 1 6 に曝露されることが好ましい。

【0183】

2つのエピトープの関係において「重複する」という表現で、1つのエピトープに結合する抗体が、他方のエピトープに結合する抗体の結合を競合的に阻害することを可能にするほどに十分な数のアミノ酸残基を2つのエピトープが共有することを意味すると理解されるものとする。例えば、本発明は、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマによって産生される抗体がそのエピトープに結合するのを阻害するのに十分な数の残基を共有するあるエピトープと結合するタンパク質を包含する。

10

【0184】

本明細書で使用される、「T r e g」、または、「制御性T細胞」という用語は、T r e g細胞以外のT細胞の活性を低減させる、もしくは、抑制する能力を持ち、および/または、T細胞を殺す能力を持つ、少なくともC D 4、および/または、C D 2 5を発現するT細胞を意味すると理解されるものとする。この用語は、低レベルのI L - 2、I L - 4、I L - 5、および、I L - 1を産生し、そして、免疫系の活性化を抑制するように作用するT細胞を含む。制御性T細胞は、活性化シグナルによって（例えば、抗原、および、抗原提示細胞、またはM H Cについて抗原を模倣するシグナルによって、例えば、抗C D 3抗体、および、抗C D 2 8抗体によって）培養液中で刺激を受けたT<sub>H</sub> 1、T<sub>H</sub> 2、または、ナイーブT細胞の増殖とサイトカイン産生を活発に抑制する。1つの例において、T r e g細胞はF o x P 3を発現する（しかしながら、ある細胞がT r e g細胞であるか、または、そうではないか決定するためにF o x P 3の発現を検出することは必要ではない。）。この用語はまた変異型のT r e g細胞、例えば、T r e g細胞に由来するが、表現型のレベルで、または、機能のレベルで、または、構造的なレベルで少なくとも1つの差異を示す細胞を包含する。例えば、治療用タンパク質、すなわち、T r e g細胞の機能を変化させる、または、強化するタンパク質を発現するように変異体、または、変異型が作り変えられている可能性がある。そのような変化は、自然突然変異的に生じる、または、（例えば、細胞株の作成を達成するために）細胞が意図的に癌化される、または、形質移入されるときのように、指向された操作の結果として生じる可能性がある。

20

【0185】

「T r e g細胞の活性」という用語は、免疫反応、例えば、（本明細書に記載されるもののような）混合リンパ球反応を用いて評価される、および/または、本明細書に記載されるインビボアッセイを用いて評価される免疫反応を抑制する、または、低減させる能力を含む。この用語はまた、ある細胞の抗炎症性サイトカイン、例えば、トランスフォーミング増殖因子（T G F - ）、および、I L - 1 0を分泌する能力を包含する。T r e g細胞の別の活性はF o x P 3の発現である。

30

【0186】

「T r e g細胞関連症状」という用語は、T r e g細胞の数、および/または、活性の調節が有益な作用をもたらすことができる任意の疾病、または、疾患、または、病状を包含すると理解されるものとする。この用語は対象の免疫系の制御性T細胞介在性抑制に関連する症状、例えば、（例えば、ヘルパーT細胞、または、C T L細胞、または、T<sub>H</sub> 1 7細胞、または、1つ以上のT細胞によって調節されるその他の細胞による）過剰な免疫反応に関連する、または、それが原因の症状を包含する。したがって、この用語は炎症、および/または、自己免疫症状を包含する。T r e g細胞関連症状の例として、神経系の炎症性疾患（例えば、多発性硬化症）、または、粘膜炎症性疾患（例えば、炎症性腸疾患、喘息、または、扁桃炎）、または、炎症性皮膚疾患（例えば、皮膚炎、乾癬、または、接触過敏症）、または、自己免疫性関節炎（例えば、リウマチ性関節炎）が挙げられる。好ましいT r e g細胞関連症状として、リウマチ性関節炎が挙げられる。ある実施形態において、炎症性疾患はアレルギー性炎症性疾患である。T r e g細胞関連症状のその他の例として、T r e g細胞の過剰な数、および/または、活性を特徴とする症状が挙げられ

40

50

る。例えば、移植片に対する免疫反応、または、移植片対宿主病、または、宿主対移植片病もまた T r e g 細胞関連症状である。この用語はまた、癌を含み、例えば、その癌では、T r e g 細胞が癌細胞に対する免疫細胞の活性を抑制し、それによってその疾患が発生することが可能になる。

【0187】

本明細書で使用される「T<sub>H</sub>17 介在性症状」という用語は、T<sub>H</sub>17 細胞の過剰な数、または、活性によって特徴づけられる、または、それが原因の任意の症状を意味すると理解されるものとする。T<sub>H</sub>17 細胞は、I L 17 を発現する C D 4<sup>+</sup> T 細胞であることを当業者は理解するであろう。T<sub>H</sub>17 細胞はまた、一般に C C R 6、および/または、C C R 4 を発現する。T<sub>H</sub>17 介在性症状の例として、自己免疫/炎症（例えば、乾癬、炎症性腸疾患、関節炎（例えば、リウマチ性関節炎）、多発性硬化症、および、炎症性腸疾患（例えば、クローン病））、および、移植片対宿主病が挙げられる。

10

【0188】

本明細書で使用される「優先的に移動する」という用語は、対象中の特定の部位（例えば、炎症部位、および/または、皮膚に）に、対象中のその他の細胞よりも速く、または、高濃度で、好ましくは、P I 16（および、所望により C C R 6、および/または、C C R 4）を発現しない T r e g 細胞よりも速く、または、高濃度で移動する細胞を意味する。

【0189】

本明細書で使用される「予防すること（preventing）」、「予防する（prevent）」、または、「予防（prevention）」という用語は、特定の疾患、または、症状の少なくとも1つの症状の発生を止める、または、妨げるのに十分な治療上有効量の本発明のタンパク質を投与することを含む。

20

【0190】

本明細書で使用される「治療すること（treating）」、「治療する（treat）」、または、「治療（treatment）」という用語は、特定の疾患、または、症状の少なくとも1つの症状を低減させる、または、除去するのに十分な治療上有効量の本明細書に記載のタンパク質を投与することを含む。

【0191】

本明細書で使用される「対象」という用語は、ヒトを含む任意の動物、好ましくは哺乳類を意味すると理解されるものとする。対象の例にヒト、霊長類、家畜（例えば、ヒツジ、ウシ、ロバ、ブタ）、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター）、捕らえられた野生の動物（例えば、キツネ、シカ）が含まれるが、これらに限定されない。前記動物はヒト、または、霊長類であることが好ましい。前記動物はヒトであることがさらに好ましい。

30

【0192】

「試料」という用語は、列挙された試料（例えば、血液試料）、および、その任意の画分（例えば、血漿、血清、または、白血球層）、または、それに由来する細胞（例えば、末梢血単核球細胞）、または、その加工された形状を包含すると理解されるものとする。

【0193】

本明細書で使用される、細胞集団について「濃縮された（enriched）」、または、「濃縮する（enrich）」という用語は、T r e g 細胞の数、または、パーセンテージが天然の細胞集団における細胞数、または、パーセンテージよりも大きいことを意味すると理解されるものとする。例えば、T r e g 細胞が濃縮された集団は、前記細胞の少なくとも約 0.02%、または、前記細胞の少なくとも約 0.05%、または、前記細胞の少なくとも約 0.1%、または、前記細胞の少なくとも約 0.2%、または、前記細胞の少なくとも約 0.5%、または、前記細胞の少なくとも約 0.5%、または、前記細胞の少なくとも約 0.8%、または、前記細胞の少なくとも約 1%、または、前記細胞の少なくとも約 2%、または、前記細胞の少なくとも約 3%、または、前記細胞の少なくとも約 4%、または、前記細胞の少なくとも約 5%、または、前記細胞の少なくとも約 10

40

50

%、または、前記細胞の少なくとも約15%、または、前記細胞の少なくとも約20%、または、前記細胞の少なくとも約25%、または、前記細胞の少なくとも約30%、または、前記細胞の少なくとも約40%、または、前記細胞の少なくとも約50%、または、前記細胞の少なくとも約60%、または、前記細胞の少なくとも約70%、または、前記細胞の少なくとも約80%、または、前記細胞の少なくとも約85%、または、前記細胞の少なくとも約90%、または、前記細胞の少なくとも約95%、または、前記細胞の少なくとも約97%、または、前記細胞の少なくとも約98%、または、前記細胞の少なくとも約99%から成る。

#### 【0194】

##### PI16ポリペプチド

好ましいポリペプチドPI16は配列番号1~4のいずれか1つ以上に少なくとも約52%の配列同一性を示す配列を含む。配列同一性の程度は少なくとも約53%、または、55%、または、60%、または、62%、または、70%、または、75%、または、80%、または、85%、または、90%、または、95%、または、99%であることが好ましい。当業者に知られることになるであろうが、インシリコ解析を含む標準的な技法を用いて、例えば、BLASTを用いて前記核酸、および/または、タンパク質の天然の変異型、および/または、変異体を同定することが可能である。

#### 【0195】

核酸、または、ポリペプチドのパーセント同一性は、ギャップクリエーションペナルティー (gap creation penalty) = 5、および、ギャップエクステンションペナルティー (gap extension penalty) = 0.3を用いるGAP解析 (GCGプログラム) (NeedlemanおよびWunsch, 1970年) で決定される。クエリー配列の長さが少なくとも50残基であり、そして、GAP解析が少なくとも50残基の領域にわたって2つの配列を整列させる。クエリー配列の長さが少なくとも100残基であり、そして、GAP解析が少なくとも100残基の領域にわたって2つの配列を整列させることがさらにずっと好ましい。2つの配列がその全長にわたって整列することが最も好ましい。

#### 【0196】

##### 可変領域含有タンパク質

本発明は、抗体CDRを含むタンパク質であって、PI16に結合し、そして、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって産生される抗体のPI16への結合を競合的に阻害するタンパク質を含む任意のタンパク質を企図する。

#### 【0197】

本発明はまた、少なくとも3つの抗体CDRsを含む (および、いくつかの実施形態において、6つの抗体CDRsを含む) 任意のタンパク質であって、PI16に結合し、そして、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって産生される抗体のPI16への結合を競合的に阻害するタンパク質を提供する。

#### 【0198】

本発明は、PI16に結合し、そして、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって産生される抗体のPI16への結合を競合的に阻害する抗体可変領域を含む任意のタンパク質を企図する。抗体可変領域の例は、モノクローナル抗体、および、その修飾型 (例えば、ヒト化抗体)、および、ラクダ類免疫グロブリン、および、IgNARのような重鎖抗体の可変領域である。

#### 【0199】

##### 抗体

抗体を作成する方法は当該分野において公知であり、ならびに/または、HarlowおよびLane (1988年)、もしくは、Zola (1987年) に記載される。一般的に、そのような方法では、PI16タンパク質、または、免疫原性断片、または、そのエピトープ、または、前記のものを発現し、および、提示する細胞 (すなわち、免疫原) は、所望により任意の適切な、または、望ましい担体、アジュバント、または、薬剂的に

10

20

30

40

50

許容可能な賦形剤と製剤されて、非ヒト動物対象、例えば、マウス、ニワトリ、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ウマ、ウシ、ヤギ、または、ブタに投与される。前記免疫原は鼻腔内投与経路で、筋肉内投与経路で、皮下投与経路で、静脈内投与経路で、皮内投与経路で、腹腔内投与経路で、または、その他の公知の投与経路で投与されることができる。

#### 【0200】

免疫後に様々な時点で免疫した動物の血液試料を採取することによりポリクローナル抗体の産生をモニターすることができる。望ましい抗体の力価を達成することが必要である場合、1回以上の免疫を行うことができる。適切な力価に達するまで、追加免疫と力価測定ステップが繰り返される。望ましいレベルの免疫原性が得られたとき、免疫した動物から採血し、そして、血清が単離され、保存される、および/または、モノクローナル抗体(Mabs)を作成するためにその動物を使用する。

10

#### 【0201】

モノクローナル抗体が好ましい。「モノクローナル抗体」、または、「MAb」という用語は同じ抗原に、好ましくは、その抗原内の同じエピトープに結合する能力を持つ均一な抗体の集団を意味する。この用語は、抗体の出所、または、抗体の作製方法に関して限定的であることを意図するものではない。

#### 【0202】

Mabsの作製について、例えば、米国特許第4,196,265号、または、HarlowおよびLane(1988年)、または、Zola(1987年)に例示される技法のような多くの公知の技術のうちのいずれか1つを用いることができる。

20

#### 【0203】

例えば、抗体産生細胞を刺激するのに十分な条件で、効果量のタンパク質、または、免疫原性断片、または、そのエピトープ、または、前記のものを発現する細胞で適切な動物を免疫する。ウサギ、マウス、および、ラットのようなげっ歯類動物が好ましい動物であり、マウスが最も好ましい。(例えば、国際公開第2002/066630号、Lomborgら、1994年、Tomizukaら、2000年、および、Jakobovitsら、2007年に記載される)ヒト免疫グロブリンタンパク質を発現し、および、好ましくは、ネズミ科免疫グロブリンタンパク質を発現しないように遺伝子操作されたマウスもまた本発明の抗体を作成するために好ましい。

30

#### 【0204】

免疫の次に、抗体、特にBリンパ球(B細胞)を産生する可能性がある体細胞を、MAb作成プロトコルにおいて使用するために選択する。これらの細胞は脾臓、扁桃、もしくは、リンパ節の生体検査材料から、または、末梢血試料から得ることができる。次に、免疫した動物のB細胞を、一般に免疫原で免疫した動物と同種の動物に由来する不死化骨髄腫細胞と融合する。細胞膜の融合を促進する(化学的、または、電氣的な)1つの作動因子、または、複数の作動因子の存在下で前記細胞種の混合物をインキュベートしてB細胞と不死化細胞の細胞を融合する。センダイウィルスを用いる融合方法がKohlerおよびMilstein、(1975年)、ならびに、KohlerおよびMilstein、(1976年)によって記述されている。ポリエチレングリコール(PEG)、例えば、37%(体積/体積)PEGを用いる方法がGeftersら(1977年)によって詳述されている。電氣的融合促進方法の使用もまた適切である。

40

#### 【0205】

組織培養培地中にヌクレオチドの新規合成を妨げる薬剤を含む選択培地でハイブリッド細胞を培養して増殖させた。好ましい薬剤の例はアミノプテリン、メトトレキサート、および、アザセリンである。

#### 【0206】

例えば、フローサイトメトリー、および/または、免疫組織化学、および/または、免疫アッセイ(例えば、放射免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ、細胞毒性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫アッセイなど)で増殖したハイブリドーマを抗体特異性、および

50

／または、力価についての機能選択に供する。本発明はまた、例えば、本明細書に例示される抗体産生細胞のサブクローニングを企図する。

【0207】

あるいは、MAbを分泌する細胞株を作成するために（例えば、Largae Spadaraら、1996年、および、Kumarら、1999年に記載されるように）ABL-MYC技術（NeoClone、マジソン、ウィスコンシン州 53713、米国）を用いる。

【0208】

米国特許第6,300,064号、欧州特許第0368684号、および／または、米国特許第5,885,793号に記載されるように、ディスプレイライブラリー、例えば、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングして抗体を作製、または、単離することもできる。

【0209】

キメラ抗体、および、キメラタンパク質

1つの例において、本発明の抗体はキメラ抗体である。「キメラ抗体」という用語は、重鎖、および／または、軽鎖の一部が、特定の種（例えば、マウスのようなネズミ科動物）に由来する抗体に対応する配列と同一であり、もしくは、相同であり、または、特定の抗体クラス、もしくは、サブクラスに属し、一方、その鎖の残りの部分は別の種（例えば、ヒトのような霊長類）由来の抗体に対応する配列と同一であり、もしくは、相同であり、または、別の抗体のクラス、もしくは、サブクラスに属する抗体を意味し、ならびに、望ましい生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片を意味する。典型的には、キメラ抗体は、主としてヒトのドメインを用いる抗体を作製するために、げっ歯類動物の、または、ウサギの可変領域とヒト定常領域を利用する。キメラ抗体の作製方法は、例えば、米国特許第4,816,567号、および、Morrissonら、1984年に記載される。

【0210】

本発明はまたキメラタンパク質、例えば、ある種、または、抗体サブタイプの可変領域が別の種、または、抗体サブタイプのタンパク質のある領域に融合するキメラタンパク質を含む。例えば、本発明は、ある種の1つの定常ドメインに融合した別の種の可変領域を含むタンパク質を企図する。

【0211】

ヒト化、および、ヒト抗体／タンパク質

本発明の抗体、または、タンパク質はヒト化抗体、もしくは、ヒト抗体、または、ヒト化タンパク質、もしくは、ヒトタンパク質であり得る。

【0212】

「ヒト化抗体」という用語は、キメラ分子であって、組換え技術を用いて一般に調製され、ヒトではない種の抗体に由来する抗原結合部位、または、可変領域、ならびに、前記分子の残りの抗体構造にヒト抗体の構造、および／もしくは、配列に基づく抗体構造を有するキメラ分子を意味すると理解されるものとする。その抗原結合部位は、ヒト抗体の可変ドメイン中の適切なフレームワーク領域に融合した非ヒト抗体由来の相補性決定領域（CDRs）、および、ヒト抗体由来の残りの領域を含むことが好ましい。抗原結合部位は野生型であり得るし、または、1つ以上のアミノ酸置換によって修飾され得る。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、受容側抗体にも移入されるCDR配列、または、フレームワーク配列にも見られない残基を含むことができる。

【0213】

非ヒト抗体、または、その部分（例えば、可変領域）をヒト化する方法は当該技術分野において公知である。米国特許第5,225,539号、または、米国特許第US5,585,089号の方法に従い、げっ歯類のCDR、または、CDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することでヒト化を本質的に行うことができる。抗体をヒト化するその他

10

20

30

40

50

の方法を排除することはない。

【0214】

抗体分子、および、結合タンパク質との関連で本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト、例えば、ヒト生殖系列細胞、または、体細胞に見られる配列由来の、または、配列に対応する可変抗体領域（例えば、 $V_H$ 、 $V_L$ 、CDR、および、FR領域）、および、所望により定常抗体領域を有する抗体を意味する。「ヒト」抗体という用語はヒト配列にコードされないアミノ酸残基、例えば、無作為突然変異、または、インビトロで部位特異的突然変異（特に、保存的置換を含む突然変異、または、前記抗体の少数の残基、例えば、前記抗体の1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは、5つの残基、好ましくは、例えば、前記抗体の1つ以上のCDRを構成する1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは、5つの残基の突然変異）を含むことができる。実際には、これらの「ヒト抗体」をヒトが産生する必要はなく、むしろ、組換え技術を用いてそれらを作製することができ、ならびに/または、（例えば、上述したような）ヒト抗体の定常領域、および/もしくは、可変領域をコードする核酸を含む形質導入動物（例えば、マウス）からそれらを単離することができる。（例えば、HoogenboomおよびWinter, 1991年、Marksら, 1991年、米国特許第5,885,793号に記述される）ファージディスプレイライブラリーを含む当該分野に公知の様々な技術を用いてヒト抗体を作製することもできる。

10

【0215】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体を「ガイドドセレクション」と呼ばれる技術を用いて作成することもできる。この取り組みにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を導くために用いる（Jespersら, 1988年）。

20

【0216】

本発明のヒトタンパク質はヒト抗体の可変領域を含む。

【0217】

脱免疫化抗体、および、脱免疫化タンパク質

本発明はまた脱免疫化抗体、および、脱免疫化タンパク質を企図する。脱免疫化抗体、および、脱免疫化タンパク質は1つ以上のエピトープ、例えば、B細胞エピトープ、または、T細胞エピトープを除去させて（すなわち、変異させて）、それによって対象がその抗体、または、タンパク質に対して免疫反応を生じる可能性を低減させる。脱免疫化抗体、および、脱免疫化タンパク質の作製方法は当該技術分野において公知であり、および、例えば、国際公開第00/34317号、国際公開第2004/108158号、および、国際公開第2004/064724号に記載される。

30

【0218】

適切な変異を導入する方法、ならびに、その結果生じるタンパク質を発現させ、および、検定する方法は、本明細書における解説に基づき当業者に明らかであるだろう。

【0219】

重鎖抗体

重鎖抗体は、それらが重鎖を含むが、軽鎖を含まない限りにおいて、多くのその他の形態をとる抗体と構造的に異なる。したがって、これらの免疫グロブリンはまた「重鎖のみ抗体」とも称される。例えば、ラクダ類、および、軟骨魚類（IgNARとも呼ばれる）で重鎖免疫グロブリンが見られる。

40

【0220】

天然重鎖抗体に存在する可変領域は、それらを通常の4本鎖抗体に存在する（「 $V_H$ ドメイン」と称される）重鎖可変領域、および、通常の4本鎖抗体に存在する（「 $V_L$ ドメイン」と称される）軽鎖可変領域と区別するために、一般にラクダ類抗体では「 $V_{HH}$ ドメイン」、および、IgNARではV-NARと称される。

【0221】

ラクダ類の重鎖抗体、および、その可変領域、ならびに、その作製、および/または、

50

単離、および/または、利用の方法の一般的な解説は、特に次の引用文献、国際公開第94/04678号、国際公開第97/49805号、および、国際公開第97/49805号に見られる。

【0222】

軟骨魚類の重鎖免疫グロブリン、および、その可変領域、ならびに、その作製、および/または、単離、および/または、利用の方法の一般的な解説は、特に国際公開第2005/118629号、Shaoら(2007年)、ならびに/または、DoolleyおよびFlajnik(2006年)に見られる。

【0223】

可変領域含有タンパク質

単一ドメイン抗体

いくつかの例において、本発明のタンパク質は単一ドメイン抗体である(それは「ドメイン抗体」、または、「dAb」という用語と互換的に使用される)。単一ドメイン抗体はある抗体の重鎖可変ドメインの全部、または、一部分を含む一本鎖ポリペプチドである。ある実施形態において、単一ドメイン抗体はヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc.、ウォルサム、マサチューセッツ州、例えば、米国特許第6,248,516号、国際公開第90/05144号、国際公開第2003/002609号、および/または、国際公開第2004/058820号を参照のこと。)

【0224】

二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体

抗体可変領域を含む好ましいタンパク質の例は二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、および、国際公開第98/044001号、および、国際公開第94/007921号に記載されるもののような高次タンパク質複合体である。

【0225】

例えば、二重特異性抗体は、2本の結合したポリペプチド鎖を含むタンパク質であり、各ポリペプチド鎖は構造 $V_L - X - V_H$ 、または、 $V_H - X - V_L$ を含み、 $V_L$ は抗体軽鎖可変領域であり、 $V_H$ は抗体重鎖可変領域であり、 $X$ は一本鎖ポリペプチド中の $V_H$ 、および、 $V_L$ が結合する(もしくは、Fvを形成する)ことを可能にするには不十分な残基を含むリンカーであり、または、 $X$ は存在せず、および、1つのポリペプチド鎖の $V_H$ は他方のポリペプチド鎖の $V_L$ に結合して抗原結合部位を形成する、すなわち、1つ以上の抗原に特異的に結合する能力を持つFv分子を形成する。各ポリペプチド鎖において $V_L$ 、および、 $V_H$ は同じであることができ、または、各ポリペプチド鎖において $V_L$ 、および、 $V_H$ は、二特異的な(すなわち、異なる特異性を持つ2つのFvsを含む)二重特異性抗体を形成するように、異なっていることができる。

【0226】

当業者は二重特異性抗体、三重特異性抗体、および/または、四重特異性抗体、ならびに、その作製方法を理解するであろう。二重特異性抗体、三重特異性抗体、および/または、四重特異性抗体について記述する文献の例として、国際公開第94/07921号、国際公開第98/44001号、Holligerら(1993年)、HudsonおよびKortt(1999年)、HolligerおよびHudson(2005年)、ならびに、それらで引用される文献が挙げられる。

【0227】

単鎖Fv(scFv)断片

当業者は、scFvが一本鎖ポリペプチド中に $V_H$ 領域、および、 $V_L$ 領域を含むことを理解するであろう。そのポリペプチド鎖が、scFvが抗原結合にとって望ましい構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーを $V_H$ 、および、 $V_L$ の間にさらに含む(すなわち、一本鎖ポリペプチドの $V_H$ 、および、 $V_L$ が互いに結合してFvを形成するために、)ことが好ましい。例えば、そのリンカーは、scFvにとってより好ましいリンカーのうちの一つである(グリシン<sub>4</sub>セリン)<sub>3</sub>を有する12アミノ酸より多いアミノ酸残基を含む。

10

20

30

40

50

## 【0228】

本発明はまたジスルフィド結合で安定化されたFv（または、diFv、もしくは、dsFv）を考慮し、そのFvでは1つのシステイン残基がV<sub>H</sub>のFR、および、V<sub>L</sub>のFRに導入され、ならびに、そのシステイン残基がジスルフィド結合によって連結されて安定的なFvを生じる（例えば、Brinkmannら、1993年を参照のこと。）。

## 【0229】

代わりに、または、加えて、本発明は、二量体型scFv、すなわち、非共有結合、または、共有結合で、例えば、（例えば、Fos、または、Jun由来の）ロイシンジッパードメインにより連結された2つのscFv分子を含むタンパク質（例えば、KruifおよびLogtenberg、1996年を参照のこと。）を提供する。あるいは、十分な長さのペプチドリンカーで2つのscFvを連結して、例えば、米国特許第20060263367号に記載されるように、両方のscFvが抗原を形成し、および、抗原に結合するのを可能にする。

10

## 【0230】

scFvの概説については、Pluckthun（1994年）を参照のこと。

## 【0231】

## ミニ抗体

当業者は、ミニ抗体はある抗体のC<sub>H</sub>2ドメイン、および/または、C<sub>H</sub>3ドメインに融合したある抗体のV<sub>H</sub>ドメイン、および、V<sub>L</sub>ドメインを含むことを理解するであろう。所望により、そのミニ抗体はV<sub>H</sub>、および、V<sub>L</sub>の間にヒンジ領域を含んでいてよく、時には、この立体構造はFlexミニ抗体（Hura、1996年）と称される。ミニ抗体はC<sub>H</sub>1、または、C<sub>L</sub>を含まない。V<sub>H</sub>ドメイン、および、V<sub>L</sub>ドメインが抗体のヒンジ領域、および、C<sub>H</sub>3ドメインに融合することが好ましい。前記ミニ抗体の可変領域の少なくとも1つは本発明の方法でPI16に結合する。ミニ抗体の例、および、その製造方法は、例えば、国際公開第94/09817号に記載される。

20

## 【0232】

## その他の可変領域含有タンパク質

本発明はまたその他の可変領域含有タンパク質、例えば、

- (i) 米国特許第5,731,168号に記載の「鍵と鍵穴」二特異性タンパク質、
- (ii) 例えば、米国特許第4,676,980号に記載のヘテロ複合体タンパク質

30

(iii) 例えば、米国特許第4,676,980号、または、Brennan（1985年）に記載の化学架橋剤を用いて作製したヘテロ複合体タンパク質、

(iv) Shalaby（1992年）に記載のFab'-SH断片、

(v) 単鎖Fab（例えば、Hustら、2007年）、または、

(vi)（例えば、欧州特許第19930302894号に記載の）Fab<sub>3</sub>

を企図する。

## 【0233】

## 定常領域融合体

本発明は、可変領域、および、定常領域（例えば、Fc）、または、そのドメイン、例えば、C<sub>H</sub>2ドメイン、および/または、C<sub>H</sub>3ドメインを含むタンパク質を包含する。当業者は、本明細書における開示、および、本明細書において考察される引用文献に基づいて、定常領域、および、定常ドメインという用語の意味を理解するであろう。

40

## 【0234】

本発明のタンパク質の作製に有用である定常ドメイン配列を数多くの異なる出所から得ることができる。いくつかの例において、前記タンパク質の定常ドメイン、または、その一部分はヒト抗体に由来する。さらに、定常ドメイン、または、その一部分は、IgM、IgG、IgD、IgA、および、IgEを含む任意の抗体クラス、ならびに、IgG1、IgG2、IgG3、および、IgG4を含む任意の抗体アイソタイプに由来することができる。好ましい例において、ヒトIgG1アイソタイプが使用される。

50

## 【0235】

様々な定常ドメイン遺伝子配列（例えば、ヒト定常ドメイン遺伝子配列）は公に利用可能な寄託物の形で入手可能であり、または、その配列は公に利用可能なデータベースから入手可能である。特定のエフェクター機能を持つ（または、特定のエフェクター機能を欠く）、または、免疫原性を低下させるために特定の修飾を有する定常ドメインを選択することができる。

## 【0236】

本明細書で使用される「エフェクター機能」という用語は、Fc領域、または、その一部分（例えば、C<sub>H</sub>2ドメイン）が免疫系のタンパク質、および/または、細胞に結合し、そして、様々な生物学的作用を媒介する機能上の能力を意味する。エフェクター機能は抗原依存的、または、非抗原依存的であり得る。「抗原依存性エフェクター機能」は、ある抗体の対応する抗原への結合に引き続いて通常誘導されるエフェクター機能を意味する。典型的な抗原依存性エフェクター機能には、補体依存性細胞毒性、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、抗体依存性T細胞介在細胞毒性（ADCC）、炎症メディエーターの放出、免疫系細胞活性化の調節、胎盤通過、および、抗体産生の制御が挙げられる。

10

## 【0237】

本明細書で使用される「非抗原依存性エフェクター機能」という用語は、免疫グロブリンがその対応する抗原に結合しているかに関わらず、それによって誘導され得るエフェクター機能を意味する。典型的な非抗原依存性エフェクター機能には、抗体の細胞輸送、循環半減期、および、排除速度、ならびに、精製の容易化が挙げられる。

20

## 【0238】

1つの例において、本発明のタンパク質変異体は、あるいは、より定常領域ドメインが部分的に、または、完全に欠質されている合成変異型定常領域（「ドメイン欠質型定常領域」）を含む。本発明はまた、エフェクター機能を変化した、例えば、エフェクター機能を改善した、または、低減させた修飾型Fc領域、または、部分を包含する。多くのそのような修飾型Fc領域は当該技術分野において公知であり、および、例えば、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/063815号、または、国際公開第2005/047327号に記載される。

## 【0239】

## 親和性成熟

さらなる例において、現有の抗体、例えば、CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマによって分泌される抗体、または、そのヒト化型は親和性成熟を受けて、高くなった親和性でPI16に結合する能力を有する抗体を産生する。例えば、V<sub>L</sub>、および/または、V<sub>H</sub>をコードする配列を単離し、ならびに、1つ以上のアミノ酸置換を導入してCDRをコードする領域（例えば、V<sub>L</sub>、および/または、V<sub>H</sub>のCDR3をコードする領域）に突然変異を起こさせる。次に、その結果生じた変異型タンパク質をPI16への結合について、例えば、競合アッセイでスクリーニングにかける。

30

## 【0240】

本発明に従うタンパク質は可溶性分泌タンパク質であり得る、または、細胞、もしくは、粒子（例えば、ファージ、または、その他のウイルス、リボソーム、または、孢子）の表面上に融合タンパク質として提示されることができる。ファージディスプレイ法の例は、例えば、米国特許第5,821,047号、米国特許第6,248,516号、および、米国特許第6,190,908号に記載される。標的抗原、例えば、PI16への結合に十分な立体構造を持つ提示されたタンパク質を同定するために、これらの方法を用いて作製されるファージディスプレイ粒子を次にスクリーニングされる。

40

## 【0241】

## タンパク質の作製

1つの例において、本発明のタンパク質は、そのタンパク質を産生するのに十分な条件で、例えば、本明細書に記載される、および/または、当該技術分野において公知である条件の下で本発明のハイブリドーマを培養することで、作製される。

50

## 【0242】

## 組換え発現

組換えタンパク質の場合、前記のものをコードする核酸を発現ベクターに組み込むことが好ましく、そのベクターは次に宿主細胞、好ましくは、ジスルフィド架橋、または、ジスルフィド結合を生じることができる細胞、例えば、大腸菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または、哺乳類細胞、例えば、本来は免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または、骨髄腫細胞に、組換え宿主細胞でタンパク質の合成を得るために形質移入される。免疫グロブリンをコードするDNAの細菌での組換え発現についての総説には、Skerrall（1993年）、および、Pluckthun（1992年）が挙げられる。これらの目的を達成するための分子クローニング技術は当該技術分野において公知であり、および、例えば、Ausubel、または、Sambrookにおいて記載される。様々なクローニング方法、および、インビトロ増幅方法が組換え核酸の構築に適切である。組換え抗体の作製方法がまた当該技術分野において公知である。米国特許第4,816,567号、および、Queenら（1989年）を参照のこと。

10

## 【0243】

単離に引き続いて、本発明のタンパク質をコードする核酸をさらなるクローニングのために（DNAの増幅のために）、または、無細胞系、もしくは、細胞での発現のために発現コンストラクト、または、複製可能なベクターに挿入することが好ましい。その核酸がプロモーターに機能的に結合することが好ましい、

20

## 【0244】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、その最も広い文脈で理解されるものとし、ならびに、例えば、発生刺激、および/もしくは、外部刺激に応答して、または、組織特異的な様式で核酸の発現を変化させるその他の調節要素（例えば、上流域活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサー、および、サイレンサー）と共に、または、それら調節要素無しで正確な転写開始に必要なTATAボックス、または、転写開始エレメントを含むゲノム遺伝子の転写調節性配列を含む。本明細書において、「プロモーター」という用語はまた、それに機能的に結合する核酸が発現するようにし、発現を活性化し、または、発現を増大させる組換え核酸、合成核酸、もしくは、融合核酸、または、派生物を説明するために用いられる。好ましいプロモーターは、前記核酸の発現をさらに増大するため、ならびに/または、空間的発現、および/もしくは、時間的発現を変化させるために1つ以上の特定の調節要素のコピーをさらに含有することができる。

30

## 【0245】

本明細書で使用される「～に機能的に結合する」という用語は、ある核酸について、その核酸があるプロモーターによって制御されるようにそのプロモーターが位置することを意味する。

## 【0246】

無細胞発現系がまた本発明よって企図される。例えば、本発明のタンパク質をコードする核酸は適切なプロモーター、例えば、T7プロモーターに機能的に結合し、そして、その結果生じる発現コンストラクトを転写、および、翻訳に十分な条件に曝す。インビトロ発現、または、無細胞発現に典型的な発現ベクターが説明されてきており、および、TNT-T7システム、および、TNT-T3システム（Promega）、pEXP1-DESTベクター、および、pEXP2-DESTベクター（Invitrogen）を含むが、これらに限定されない。

40

## 【0247】

細胞での発現のために多くのベクターが利用可能である。ベクター要素は一般に、シグナル配列、（例えば、本明細書で提供される情報に由来する）本発明のタンパク質をコードする配列、エンハンサー要素、プロモーター、および、転写終結配列うちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。当業者はタンパク質の発現に適切な配列を理解するであろう。例えば、シグナル配列の例には、原核生物分泌シグナル（例えば、pelBシグナ

50

ル、アルカリホスファターゼシグナル、ペニシリナーゼシグナル、I p pシグナル、または、熱安定性エンテロトキシンI Iシグナル)、酵母分泌シグナル(例えば、インペルターゼリーダー配列、因子リーダー配列、または、酸ホスファターゼリーダー配列)、または、哺乳類動物分泌シグナル(例えば、ヘルペスシンプレックスg Dシグナル)が含まれる。

【0248】

プロモーターの例には、原核生物で活性があるプロモーター(例えば、p h o Aプロモーター、 - ラクタマーゼプロモーター、および、乳糖プロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン(t r p)プロモーター系、および、t a cプロモーターのようなハイブリッドプロモーター)が挙げられる。

10

【0249】

哺乳類細胞で活性があるプロモーターの例には、サイトメガロウイルス最初期(i m m e d i a t e e a r l y)プロモーター(C M V - I E)、ヒト伸長因子1プロモーター(E F 1)、核内低分子RNAプロモーター(U 1 a、および、U 1 b)、ミオシン重鎖プロモーター、シミアンウイルス40プロモーター(S V 4 0)、トリ肉腫ウィルスプロモーター(R S V)、アデノウイルス主要後期プロモーター、アクチンプロモーター、C M Vエンハンサー/アクチンプロモーターを含むハイブリッド調節要素、または、免疫グロブリンプロモーター、もしくは、その活性断片が含まれる。有用な哺乳類動物宿主細胞株の例は、S V 4 0で形質変換されたサル腎臓C V 1株(C O S - 7、A T C C C R L 1 6 5 1)、ヒト胚性腎臓細胞株(293細胞、または、懸濁培養での増殖に適したサブクローンされた293細胞)、ハムスター幼体腎臓細胞(B H K、A T C C C C L 1 0)、または、チャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O)である。

20

【0250】

例えば、ピチア パストリス(P i c h i a p a s t o r i s)、出芽酵母、および、分裂酵母を含む群より選択される酵母細胞のような酵母細胞での発現に適した典型的なプロモーターには、A D H 1プロモーター、G A L 1プロモーター、G A L 4プロモーター、C U P 1プロモーター、P H O 5プロモーター、n m tプロモーター、R P R 1プロモーター、または、T E F 1プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0251】

前記のものを含む核酸分子、または、遺伝子コンストラクトを発現のために細胞に導入する方法は当業者に公知である。所与の細胞に用いられる技術は公知の成功した技術による。細胞に組換えDNAを導入する方法には、数ある中でも、マイクロインジェクション、D E A Eデキストラン介在性形質移入、リボソームが介在する形質移入、例えば、リボフェクタミン(G i b c o、メリーランド州、米国)、および/または、セルフェクチン(G i b c o、メリーランド州、米国)を使用することが介在する形質移入、P E G介在性DNA取り込み、電気穿孔法、および、例えば、DNA被覆タングステン粒子、または、DNA被覆金粒子(A g r a c e t u s I n c .、ウイスコンシン州、米国)を用いることによる微小粒子銃法が含まれる。

30

【0252】

本発明のタンパク質を作製するために使用する宿主細胞は、使用される細胞種に応じて、様々な培地で培養されることができる。ハムF10(S i g m a)、最小基本培地(( M E M)、( S i g m))、R P M I - 1 6 4 0(S i g m)、および、ダルベッコ改変イーグル培地(( D M E M)、S i g m)のような市販の培地が哺乳類細胞の培養に適している。本明細書において議論されるその他の細胞種の培養のための培地は当該技術分野において公知である。

40

【0253】

タンパク質の単離

本発明のタンパク質は単離されることが好ましい。

【0254】

本発明のタンパク質の精製方法は当該技術分野において公知であり、および/または、

50

本明細書に記載される。

【0255】

組換え技術を使用するとき、本発明のタンパク質は細胞内に、周辺質の空間に産生される、または、培地中に直接分泌されることができる。そのタンパク質が細胞内に産生されるとき、第1ステップとして、特定の破片、宿主細胞が溶解された細胞の断片のどちらかが、例えば、遠心分離、または、限外濾過によって除去される。そのタンパク質が培地中に分泌される場合、そのような発現系の上清は一般に、まず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、アミコン、または、Milliporeのペリコン限外濾過ユニットを用いて濃縮される。タンパク質分解を阻害するためにPMSFのようなプロテアーゼ阻害剤を前述のステップのいずれのステップにも含むことができ、および、外来性の汚染菌の増殖を防ぐため抗生物質を含むことができる。

10

【0256】

前記細胞から調製されるタンパク質を、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、親和性クロマトグラフィー（例えば、プロテインA親和性クロマトグラフィー、または、プロテインGクロマトグラフィー）、または、上述のものの任意の組合せを用いて精製することができる。これらの方法は当該技術分野において公知であり、および、例えば、国際公開第99/57134号、または、Zora（1997年）に記載される。

20

【0257】

当業者はまた、精製、または、検出を容易にするためにタグ、例えば、ポリヒスチジンタグ、例えば、ヘキサヒスチジンタグ、または、インフルエンザウィルスヘマグルチニン（HA）タグ、または、シミアンウィルス5（V5）タグ、または、FLAGタグ、または、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）タグを含むように本発明のタンパク質を改変することができるを理解するであろう。そのタグはヘキサヒスチジンタグであることが好ましい。その結果生じたタンパク質は次に当該技術分野において公知である方法を用いて、例えば、親和性精製を用いて精製される。例えば、ヘキサヒスチジンタグを含むタンパク質は、そのタンパク質を含む試料を固形担体、または、半固形担体に固定化された、ヘキサヒスチジンタグと特異的に結合するニトリロ三酢酸ニッケル（Ni-NTA）に接触させ、結合していないタンパク質を除去するために試料を洗浄し、および、その後、結合したタンパク質を溶出することによって精製される。代わりに、または、加えて、タグに結合するリガンド、または、抗体が親和性精製方法で用いられる。

30

【0258】

複合体

本発明はまた任意の実施形態に従う本明細書に記載されるタンパク質の複合体を提供する。タンパク質が複合体化することができる化合物の例は、放射性同位体、検出可能な標識物質、治療用化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象中で前記タンパク質の半減期を増加させる化合物、および、その混合物を含む群より選択される。治療薬剤の例には、抗血管新生剤、抗新血管形成薬剤、および/もしくは、その他の抗血管形成薬剤、抗増殖薬剤、アポトーシス促進薬剤、化学療法薬剤、または、治療用核酸が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0259】

毒素には、細胞に有害な（例えば、細胞を殺す）任意の薬剤が含まれる。当該技術分野において公知であるこれらの部類の薬剤、および、その作用機序の解説については、Goodmanら（1990年）を参照のこと。免疫グロブリン-免疫毒複合体の調製に関する追加の技術は、例えば、Vitetta（1993年）、および、米国特許第5,194,594号に提供される。毒素の例として、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）の）エクソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴ

50

ボウ (*Phytolaca americana*) タンパク質 (PAPI、PAPII、および、PAP-S)、ツルレイシ (*Momordica charantia*) 阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ (*Saponaaria officinalis*) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン (*mitogellin*)、レストリクトシン (*restriectocin*)、フェノマイシン (*phenomycin*)、エノマイシン (*enomycin*)、および、トリコテセン系が挙げられる。例えば、国際公開第93/21232号を参照のこと。

#### 【0260】

本発明の免疫複合体を形成するのに適した化学療法剤には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド (*tenoposide*)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン (*dihydroxyanthracin dione*)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デ-ヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、および、ピューロマイシン、抗代謝薬類 (例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン (*decarbazine*)、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピン、クラドリピン)、アルキル化剤類 (例えば、メクロレタミン、チオエパ (*thioepa*)、クロラムブチル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、および、他のプラチナ派生物、例えば、カルボプラチン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (以前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ダウノルピシン (以前のダウノマイシン)、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン (AMC)) が挙げられる。

#### 【0261】

1つの例において、任意の実施形態に従う本明細書に記載されるタンパク質は、例えば、本明細書に記載される抗体、または、それに由来するタンパク質のような本発明の別のタンパク質、または、抗体可変領域を含むタンパク質を包含する別のタンパク質と複合体化する、または、結合する。他のタンパク質が排除されることはない。さらなるタンパク質は当業者に明らかであろう。そして、その他のタンパク質には、数ある中でも例えば、免疫調節因子、または、半減期延長タンパク質、もしくは、ペプチド、または、血清アルブミンに結合するタンパク質が含まれる。

#### 【0262】

血清アルブミン結合ペプチド、または、タンパク質の例は、米国特許第20060228364号、または、米国特許第20080260757号に記載される。

#### 【0263】

放射性複合体化タンパク質の作製のために様々な放射性核種が利用可能である。 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^2\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{43}\text{K}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$  等のような (例えば、診断目的に適切な) 低エネルギー放射性核種が例に含まれるが、これらに限定されない。その放射性核種は、投与から画像化部位への局在化まで時間が経過した後の放射活性、または、検出を可能にするのに適した半減期を有する線放出核種、光子放出核種、または、陽電子放出核種であることが好ましい。本発明はまた、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、および、 $^{188}\text{Re}$  のような (例えば、治療目的の) 高エネルギー放射性核種を包含する。これらの同位体は、典型的に、短飛程の高エネルギー粒子、または、粒子を発生する。そのような放射性核種は近傍にある細胞、例えば、前記複合体が付着した、または、入り込んだ新生物細胞を殺す。それらは、それらが局在していない細胞にはほとんど、または、全く作用を持たず、および、

本質的に非免疫原性である。あるいは、本来は安定な同位体の熱照射、例えば、ホウ素中性子捕捉療法（Guánら，1998年）のような熱照射によって高エネルギー同位体を作成することができる。

【0264】

別の実施形態において、前記タンパク質は細胞プレターゲットングに用いる（ストレプトアビジンのような）「受容体」と複合体化し、その複合体は患者に投与され、引き続いて、除去剤を用いて血流から結合していない複合体が除去され、そして、治療薬剤（例えば、放射性ヌクレオチド）と複合体化している「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

【0265】

当該技術分野において公知であるさらなる非タンパク質性部分を含有するように、本発明のタンパク質を修飾することができる。そのタンパク質の誘導体化に適した部分は生理的に許容できる高分子であることが好ましく、水溶性高分子であることが好ましい。そのような高分子は本発明のタンパク質の安定性の増大、および/または、（例えば、腎臓による）排除の低減、および/または、免疫原性の低減に有用である。水溶性高分子の非限定的な例にポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、または、プロピレングリコール（PPG）が含まれるが、これらに限定されない。

【0266】

1つの例において、任意の実施形態に従う本明細書に記載されるタンパク質は検出、および/または、単離を容易にする1つ以上の検出可能なマーカーを含む。例えば、前記化合物は、例えば、フルオレセイン（FITC）、5,6-カルボキシメチルフルオレセイン、テキサスレッド、ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル（NBD）、クマリン、塩化ダンシル、ローダミン、4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）、および、シアニンダイ類Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、および、Cy7、フルオレセイン（5-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、ローダミン（5,6-テトラメチルローダミン）のような蛍光標識を含む。これらの蛍光物質の最大吸光波長、および、最大発光波長は、それぞれ、FITC（490nm、520nm）、Cy3（554nm、568nm）、Cy3.5（581nm、588nm）、Cy5（652nm、672nm）、Cy5.5（682nm、703nm）、および、Cy7（755nm、778nm）である。

【0267】

代わりに、または、加えて、任意の実施形態に従う本明細書に記載されるタンパク質は、例えば、（例えば、米国特許第6,306,610号に記載される）蛍光量子ドットで標識される。

【0268】

代わりに、または、加えて、前記タンパク質は、例えば、鉄、銅、ニッケル、コバルト、希土類、ネオジウム-鉄-ホウ素、鉄-クロム-コバルト、ニッケル-鉄-コバルト-プラチナ、または、ストロンチウムフェライトのような磁性、または、常磁性化合物で標識される。

【0269】

固定化タンパク質

1つの例において、タンパク質は固形の、または、半固形の基材に固定化される。「固定化」という用語は、タンパク質を、例えば、国際公開第99/56126号、または、国際公開第02/26292号に記載の特定の基材に固定化する様々な方法、および、技術を含むと理解されるものとする。例えば、固定化はタンパク質を安定化するように役立つことができ、その結果、特に保存の間に、または、1回分使用している間に、生物学的、化学的、または、物理的曝露によってタンパク質の活性が低下することがない、または、不利に改変されることがない。

【0270】

例えば、Treg細胞を捕捉するように、および/または、基材に植え付けたTreg

10

20

30

40

50

細胞を保持するように、対象への移植を可能にする基材にタンパク質を固定化することができる。

【0271】

あるいは、試料、好ましくは、血液試料を前記基材と、例えば、連続的に反応させる。

【0272】

本発明の趣旨において、3つの基本的な方法が固定化のために用いられ得る。タンパク質を基材に固定化する様々な方法は当該技術分野において公知であり、および、架橋、担体への結合、半透過性基材内での保持を含む。

【0273】

基材の例に、多孔性ゲル、酸化アルミニウム、ベントナイト、アガロース、デンプン、ナイロン、または、ポリアクリルアミドが含まれる。

10

【0274】

本発明のタンパク質の活性試験

競合的結合の決定

CRCBT-02-001により分泌される抗体の結合を競合的に阻害するタンパク質の測定試験は、当業者に明らかであろう。例えば、CRCBT-02-001により分泌される抗体を、検出可能な標識、例えば蛍光標識または放射性標識と複合体化する。次いで、標識抗体および試験用タンパク質を混合してPI16もしくはそのエピトープと接触またはこれらを発現する細胞と接触させる。次いで標識抗体レベルを測定し、タンパク質の非存在下で標識抗体をPI16、エピトープ、または細胞と接触させた場合に測定されたレベルと比較する。試験用タンパク質存在下での標識抗体レベルが、非存在下と比較して減少している場合、タンパク質がCRCBT-02-001により分泌される抗体の結合を競合的に阻害している。

20

【0275】

任意で、試験用タンパク質をCRCBT-02-001により分泌される抗体とは異なる標識と複合体化する。これにより、試験用タンパク質のタンパク質、エピトープ、または細胞に対する結合レベルを検出することができる。

【0276】

別の例において、タンパク質のエピトープがCRCBT-02-001により分泌される抗体と結合したエピトープと同じ、または重複しているかどうかを、タンパク質のエピトープをマッピングして決定する。エピトープマッピングの方法は、当業者に明らかであろう。例えば、PI16配列に及ぶ一連の重複ペプチド例えば10~15アミノ酸を含むペプチドを産生する。次いで、タンパク質を各ペプチドと接触させて、タンパク質が結合したペプチドを決定する。これにより、タンパク質が結合したエピトープを含むペプチドの測定が可能となる。複数の非近接ペプチドがタンパク質と結合している場合、タンパク質は立体構造エピトープに結合している。

30

【0277】

あるいは、またはさらに、PI16中のアミノ酸残基を、例えばアラニン系統的変異導入法(alanine scanning mutagenesis)により突然変異させ、タンパク質の結合を減少させるまたは防ぐ突然変異体を決定する。任意のタンパク質の結合を減少させるまたは防ぐ突然変異株体は、タンパク質により結合されたエピトープ内にある可能性が高い。

40

【0278】

あるいは、またはさらに、タンパク質はCRCBT-02-001により分泌される抗体が結合するエピトープを用いて産生し、したがってタンパク質は同じエピトープに結合する可能性が高い。

【0279】

任意で、PI16またはそのエピトープに関するタンパク質の解離定数(Kd)。本発明のPI16結合タンパク質に関する「Kd」または「Kd値」は、放射性標識PI16結合試験(RIA)により測定されるものの一例である。この試験は、非標識PI16の滴定系列の存在下でタンパク質と放射性PI16の最小濃度の平衡を保たせる。非結合P

50

I 16 を除去するための洗浄に続いて、タンパク質の K d を示す放射エネルギーを測定する。別の例によると、K d または K d 値を、B I A c o r e 表面プラズモン共鳴 ( B I A c o r e 、 P i s c a t a w a y 、 ニュージャージー州 ) を用いて P I 16 を固定する表面プラズモン共鳴試験を用いることにより測定する。好ましくは、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体と同様の K d またはこれより高い K d を有するタンパク質が選択され、これらのタンパク質は P I 16 への結合と競合する可能性が高い。

#### 【 0 2 8 0 】

##### インビトロ機能試験

本発明のタンパク質を用いて単離された細胞の T r e g 活性への効果または本発明のタンパク質の効果を測定するインビトロの例示的方法は、例えば、混合リンパ球反応 ( M L R ) または混合リンパ球培養 ( M L C ) である。そのような方法は、細胞混合物例えば本明細書に記載の方法により単離された T r e g 細胞とアロタイプが異なる T 細胞と一緒に培養することを含む。次いで T r e g 活性を測定するため数種類の計測が行われることができ、例えば細胞増殖を標準的手法、例えば、 $^1\text{H}$ チミジン取り込み試験 ( T r e g 細胞の不活性状態を示す活性 T 細胞の増殖を示す ) ; および / または T r e g 細胞または T r e g の活性もしくは不活性を示し得る他の T 細胞のいずれかによるサイトカイン分泌試験を用いて計測する。そのような方法は、制御能力をもつ T r e g 細胞を同定するおよび / または T r e g 活性を誘発する / 増強するもしくは抑制する / 防止する化合物を同定するのに有用である。例示的な M L R については W a n g ら , 2 0 0 8 年に記載される。

10

#### 【 0 2 8 1 】

あるいは、またはさらに、タンパク質の T r e g 細胞への効果を測定するインビトロな方法は、5 , 6 - カルボキシフルオセイン二酢酸サクシニミジルエステル ( C F S E ) サプレッサー試験、例えば実施例において本明細書に記載の方法である。そのような試験では、 $\text{CD}4^+ \text{CD}25^-$  細胞を C F S E で標識化する。次いで、 $\text{CD}4^+ \text{CD}25^-$  の C F S E 標識 T 細胞を、本発明に従って単離された様々な量の細胞の存在下で、照射 P B M C で培養する。十分な時間の後、 $\text{CD}4^+ \text{CD}25^-$  C F S E 標識 T 細胞の増殖をフローサイトメトリにより試験する。各 C F S E シグナルピークは 1 つの分裂周期を表す。T r e g 細胞の細胞増殖抑制能を、制御性細胞集団が存在しない  $\text{CD}4^+ \text{CD}25^-$  C F S E 標識 T 細胞の C F S E シグナルピークと比較することにより評価する。例示的な C F S E サプレッサー試験については Venken ら , ( 2 0 0 7 年 ) に記載されている。

20

30

#### 【 0 2 8 2 】

さらなる例において、本発明に従って単離された T r e g 細胞をエフェクタ T 細胞の存在下で培養し、 $\text{CD}154$  (  $\text{CD}40\text{L}$  ) を発現するエフェクタ T 細胞 (  $\text{CD}4^+ \text{CD}25^-$  ) 数を測定する。T r e g 細胞非存在下での  $\text{CD}154^+$  細胞数と比較して  $\text{CD}154$  を発現する細胞 ( すなわち活性化 T 細胞 ) 数を減少させる細胞は、T r e g 活性を有すると考えられる。この試験については、以下でより詳細に記載する。

#### 【 0 2 8 3 】

あるいは、またはさらに、T r e g 細胞を本明細書に記載のように単離し、試験用化合物の存在下または非存在下で培養し、活性化させる。次いで I L - 1 0 および / または T G F -  $\beta$  の分泌を標準的な方法、例えば E L I S A または F L I S A を用いて評価する。

40

#### 【 0 2 8 4 】

本発明のタンパク質の転移細胞に対する活性を評価する例示的方法は、例えばマトリゲルでの細胞遊走アッセイまたはコロニー形成である。遊走アッセイでは、P I 16 を発現する転移細胞集団を細胞培養装置のチャンバ内に、すなわち液体伝達内に、転移細胞を誘引する化合物 ( 化学誘引物質 ) を含む別のチャンバと共に留置する。この 2 つのチャンバは膜、例えば、対象に見られる細胞外マトリックスを模倣した膜により分離されている。膜を介した一方のチャンバから別のチャンバへの細胞遊走量が、タンパク質の存在下または非存在下で評価され、(タンパク質を含有しない) 対照試料と比較して遊走量が減少したタンパク質は、転移を阻害すると考えられる。例示的方法については Albin ら , ( 1 9 8 7 年 ) および Repesh , ( 1 9 8 9 年 ) に記載されている。

50

## 【0285】

本発明のタンパク質の心筋細胞に対する活性を評価する例示的方法は、PI16を過剰発現する心筋細胞集団をタンパク質と接触させることである。PI16の過剰発現は心筋細胞の発育不全を誘発する（または成長を防止する）。したがって結果として心筋細胞を拡大させて心筋細胞にPI16を過剰発現させるタンパク質は、心疾患の治療に有用であると考えられる。

## 【0286】

当業者に明らかであるように、スクリーニング方法は、細胞死、細胞増殖および/または細胞生存のレベルの検出が関与し得る。そのような方法は当業者に公知である。

## 【0287】

ある実施形態では、タンパク質活性での細胞死を、例えばアポトーシスなどの細胞死に関連する細胞成分の検出方法を用いて、（例えば、細胞を殺す化合物を単離するため）評価する。細胞における細胞死の検出方法は当業者に公知である。例えば、APOPTES T (Immunotechから入手可能)は細胞をアポトーシス初期に染色し、細胞試料を固定する必要がない。この方法は、アポトーシスを起こしている細胞に特徴的な細胞膜再構成を検出するアネキシンV抗体を利用する。この方法により染色されたアポトーシスを起こした細胞は、次いで固定したアネキシンV抗体を用いて、蛍光標識細胞分取(FACS)、ELISAのいずれかにより、または接着とパニングにより分別され得る。あるいは、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介ビオチン化UTPニックエンドラベル化(TUNEL)試験を用いて細胞死のレベルを測定する。TUNEL試験は酵素の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてアポトーシスの際に生じる3'-OH DNA末端を標識し、ヌクレオチドをビオチン化する。次いでビオチン化ヌクレオチドを、検出可能なマーカーと複合体化されたストレプトアビジンを用いることにより検出する。TUNEL染色キットは、例えば、Intergen Company、Purchase、ニューヨーク州から入手可能である。Treg細胞を選択的に殺す化合物を同定および/または単離するために、そのような試験を他の細胞、例えばヘルパーT細胞および/またはCTLにより実施することができる。

## 【0288】

あるいは、細胞生存率または細胞代謝を検出および/または評価することができる。例として、非蛍光性レザズリンを、本発明のタンパク質存在下で培養した細胞に添加する。生存細胞はレザズリンを、例えば顕微鏡または蛍光プレートリーダーを用いて容易に検出できる赤色蛍光レゾルフィンに還元する。この細胞生存率マーカーは細菌から高等真核細胞まで種々の異なる細胞型に有用である。細胞生存率分析キットは例えばMolecular Probes、Eugene、OR、USAから入手可能である。細胞生存率に関する他の試験として、例えば、生細胞内での水溶性テトラゾリウムGLT008(WST-8)のホルマザン塩への還元を検出する試験(Alexis Biochemicals)、細胞内エステラーゼにより蛍光性カルセインに変換する細胞透過性カルセイン-アセトキシメチル(カルセインAM)による生細胞の染色、3-{1-[フェニルアミノ]カルボニル}-3,4-テトラゾリウム}-ビス(4-メトキシ-6-ニトロ)ベンゼンスルホン酸水和物(XTT)のホルマザン塩への還元検出(Intergen)、または(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)PES:フェナジンエトスルファート(MTS)のホルマザン塩への還元(Promega Corporation)が挙げられる。

## 【0289】

## インビボ機能試験

本発明のタンパク質は、Treg機能および/またはTreg数(例えば、Treg細胞を殺すことによる)を抑制するその機能を試験し、本発明のタンパク質を試験対象に投与し、Treg細胞の細胞数を標準的手法または本明細書に記載の方法を用いて検出/単離し得る。未治療対象由来のTreg細胞数と比較した際のTreg細胞数の減少は、そ

10

20

30

40

50

のタンパク質が T r e g 数を減少させることを示す。

【 0 2 9 0 】

あるいは、またはさらに、タンパク質を、腫瘍細胞投与の際に、投与前に、または投与後に試験対象に投与する。次いで、結果として生じる任意の腫瘍の存在 / 非存在および / またはそのサイズを評価し、タンパク質ではなく腫瘍細胞を投与した対象と比較する。腫瘍サイズを減少させおよび / または腫瘍形成を防止するタンパク質は、T r e g 機能を減少させ、また腫瘍細胞への免疫応答を引き起こすことができると考えられる。例示的な方法については Jones ら , (2002年) により記載されている。

【 0 2 9 1 】

別の例において、本発明の試験用タンパク質を、免疫原性化合物を含む組成物の投与の際または投与前に投与する。次いで、免疫応答を、免疫原性化合物に対して、例えば、抗体応答 (例えば、E L I S A / F L I S A により) または T 細胞応答 (例えば、E L I S P O T または F l u o r o s p o t ) に対して計測する。あるいは、またはさらに、免疫原性化合物および組成物を、免疫応答により治療可能な症状、例えば感染または腫瘍に罹患しているまたは発症した対象に投与する。良好なモデルは、当業者に公知および / または本明細書に記載されている。

10

【 0 2 9 2 】

別の例において、本発明のタンパク質を使用して単離された細胞集団を、細胞を T r e g 細胞に関連する症状の動物モデルに投与することにより、決定する。例えば、細胞を、例えば骨髄破壊の結果により T r e g 細胞が欠如した動物または、例えば (Asano(1996年); Suri-Payer(1998年); および McHugh(2002年) に記載された F o x P 3 発現が欠如したマウスに投与する。自己免疫応答を抑制する、防止する、減少させる、または遅延させる細胞は、制御性 T 細胞機能を有すると考えられる。

20

【 0 2 9 3 】

あるいは、またはさらに、任意の実施形態に従った本明細書に記載の方法により単離された細胞を、(自己免疫疾患を誘発する) C D 4 + C D 2 5 - の移入の際、移入前、または移入後に、例えば Sakaguchi ら , (1995年) に記載のようにヌードマウスに投与する。自己免疫応答を抑制する、防止する、減少させる、または遅延させる細胞は、制御性 T 細胞機能を有すると考えられる。

【 0 2 9 4 】

単離細胞はまた、糖尿病を抑制する、防止する、治療する、または遅延させる能力を試験するための N O D マウス (例えば、Tang ら , (2004年) に記載) におよび / または G V H D のマウスモデルに (例えば Trenado(2002年) に記載) および / または乾癬のマウスモデルに (例えば Wang ら , 2008 に記載) および / または関節リュウマチのモデル、例えば、マウスの S K G 株に (Sakaguchi ら , 1995年)、ラット 2 型コラーゲン関節炎モデル、マウス 2 型コラーゲン関節炎モデルもしくは数種において関節炎モデルを誘発する抗原 (Bendele, 2001年) および / または多発性硬化症のモデル (例えば、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E ; Bradl および Linington, 1996年) ) および / または炎症性気道疾患 (例えば O V A チャレンジまたはゴキブリ抗原チャレンジ (Chen ら , 2007年; Lukacs ら , 2001年) ) および / または炎症性腸疾患のモデル (例えば、デキストラン硫酸ナトリウム (D S S ) 誘発大腸炎もしくは大腸炎の M u c 2 欠損マウスモデル (Van der Sluis ら , 2006年) ) もしくは大腸炎の C D 4 5 R b 養子移入モデル (例えば、Kanai ら , 2006年) ) に投与し得る。上記列挙したモデルのそれぞれを、好ましくは照射されヒト造血細胞により再生した造血系をもつマウスを用いて産生し、これにより「ヒト化」モデルを得る。これらのモデルはまた、T r e g 機能を増強または増大させる能力について、化合物を試験するのに有用である。

30

40

【 0 2 9 5 】

さらなる例において、本発明のタンパク質の効果を、転移モデルに関し評価する。例えば、転移細胞を、マウスの例えば静脈内または腹腔内、または肺などの臓器の近傍に接種し、臓器 (例えば肺) で成長する腫瘍数を評価する。細胞を、例えば蛍光色素で標識化し

50

て検出を容易することができる。臓器で成長する腫瘍数が、タンパク質により治療してきた動物での腫瘍数と比較して減少している本発明のタンパク質は、転移を減少させると考えられる。例示的手法については、Price(1990年);およびKerbel(1998年)に記載されている。

#### 【0296】

##### 医薬組成物および治療方法

本発明のタンパク質（活性成分と同義語）は、非経口、局所、経口、もしくは局所投与、エアロゾル投与、または経皮投与用の医薬組成物、予防的治療用の医薬組成物、または療法的治療用の医薬組成物に製剤するのに有用である。医薬組成物を、投与方法に依存して様々な単位剤形で投与し得る。例えば、経口投与に適する単位剤形として、粉末、錠剤、丸剤、カプセル剤、およびトローチ剤が挙げられる。本発明の医薬組成物は、経口投与される場合、消化から保護すべきであることが認識される。これは、典型的には、ある組成物で化合物を錯化して酸加水分解および酵素加水分解に耐性を与えるか、またはリポソームなどの適切な耐性をもつ担体に化合物をパッケージングすることにより、達成される。タンパク質を消化から保護する手段は、当業者に公知である。

10

#### 【0297】

本発明の医薬組成物は特に、静脈内投与または臓器もしくは関節の体腔もしくは管腔への投与などの非経口投与に有用である。投与用の組成物は通常、薬剤的に許容可能な担体、好ましくは水性担体中に溶解した本発明のタンパク質の溶液を含む。様々な水性担体、例えば緩衝食塩水などが使用され得る。組成物は、生理的条件に近づけるのに必要な薬剤的に許容可能な補助物質、例えばpH調整剤や緩衝剤、毒性調整剤など、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有することができる。これらの製剤での本発明の化合物濃度は多種多様であってよく、また液量、粘度、体重などに基づいて、選択した特定の投与モードと患者の必要性に従って選択され得る。例示的な担体として、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。混合油やオレイン酸エチルなどの非水賦形剤もまた使用することができる。リポソームもまた、担体として使用することができる。賦形剤は、等張性および化学安定性を増強する少量の添加剤、例えば緩衝液や保存料を含有することができる。

20

#### 【0298】

本発明のタンパク質は、非経口投与用に製剤され得、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、または例えば腫瘍部位もしくは疾病部位への蠕動投与および直接的点滴注入（腔内投与）などの他のそのような経路を介する注入用に製剤され得る。活性成分として本発明の化合物を含有する水溶性組成物の調製は、当業者に公知であろう。

30

#### 【0299】

本発明による好適な医薬組成物は、一般に本発明のタンパク質を許容できる薬学的希釈剤または賦形剤、例えば滅菌水溶液と混合した量で、使用目的によって様々な最終濃度にする量を含む。調製手法は一般にRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980年、（引用により本明細書に援用される）など、当技術分野で公知である。

40

#### 【0300】

製剤後、本発明の化合物を、剤形に適合する方法で、および治療効果/予防効果がある量で投与し得る。本発明の化合物の好適な用量は、特定の化合物、治療すべき症状および/または治療を受ける対象により様々であり得る。例えば最適以下の用量で開始して、最適なまたは有効な用量を決定するために徐々に用量を変更していくことにより好適な用量を決定することは、当業者の能力の範囲内である。

#### 【0301】

PI16はまた、腫瘍転移、心拍停止に続く心筋細胞肥大の減少または予防に関与することが示されている。したがって、本発明はさらに対象での転移を治療する方法を提供し、前記方法は本発明のタンパク質を転移に苦しむまたは転移を起こしやすい対象に投与す

50

ることを含む。1つの例において、対象は乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌に罹患している。好ましくは、対象は乳癌またはその転移を罹患している。

【0302】

本発明はまた、心機能障害を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明のタンパク質を心機能障害または心機能障害を起こしやすい対象に投与することを含む。あるいは、またはさらに、本発明は心臓機能を改善する方法を提供し、前記方法は投与を必要とする対象に本発明のタンパク質を投与することを含む。あるいは、本発明は、対象にて心筋細胞肥大を誘導する方法を提供し、前記方法は投与を必要とする対象に本発明のタンパク質を投与することを含む。

【0303】

細胞の単離または濃縮

本発明はまた、PI16発現に基づく細胞の検出および/または単離を企図する。

【0304】

1つの例において、細胞はTreg細胞、例えばnTreg細胞、好ましくはメモリーnTreg細胞、好ましくは、休止メモリーnTreg細胞である。

【0305】

1つの例において、方法は、別のマーカー、例えばTreg細胞のマーカーを検出することを含む。例示的なさらなるタンパク質または核酸としては、CD4、CD25、FoxP3、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)、CD62リガンド(CD62L)、CD134(OX40)、グルコシルチコイド誘発性腫瘍壊死因子レセプター(GITR)、膜結合型TGF- $\beta$ 、CD196(CCR6)、プログラム細胞死リガンド1(PD-L1)、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンまたは $\alpha_4\beta_1$ インテグリンが挙げられる。さらに好ましいタンパク質または核酸はCD4および/またはCD25である。好ましくは、CD25を高いレベルで発現する。

【0306】

別の例において、Treg細胞を検出または単離する方法はさらに、非Treg細胞により発現される核酸またはタンパク質の低レベルまたは検出不可能な発現を検出することを含む。例示的な核酸および/またはタンパク質としては、CD19および/またはCD20および/またはCD14および/またはCD56および/またはCD127が挙げられる。好ましくは、本発明はCD127(CD127<sup>neg</sup>)を検出可能に発現しない、または低レベルのCD127(CD127<sup>low</sup>)を発現する細胞を検出または単離することを含む。

【0307】

本明細書に使用される用語「正の発現」または「+」は、アイソタイプ対照化合物、例えば抗体を用いて検出した場合のバックグラウンドのレベルを上回る発現を意味するものとする。

【0308】

本明細書に使用される用語「アイソタイプ対照化合物」は、化合物、好ましくは、タンパク質の発現を検出するために使用されるものと同様のアイソタイプであるが、タンパク質の特異性に関連せずにタンパク質の発現を検出するために使用される化合物と同じ検出可能部分と複合体化する抗体を意味するものとする。そのような対照は、特異的結合から非特異的な「バックグラウンド」結合を識別するのに役に立つ。

【0309】

「高い」レベルまたは「ハイ」レベルな発現に対する言及は、FACS解析を用いて測定した場合に、列挙したマーカー(例えば、PI16)を最も高いレベルで発現する細胞集団のうち、細胞の50%、好ましくは40%、30%、またはより好ましくは20%、より好ましくは細胞の10%を意味する。

【0310】

本明細書に使用される用語「負の発現」または「-」は、アイソタイプ対照化合物、例えば抗体を用いて検出した場合のバックグラウンドのレベルと同等か下回る発現を意味す

10

20

30

40

50

るものとする。

【0311】

例えばCD127発現との関連において「低い」レベルまたは「ロー」レベルな発現に対する言及は、細胞集団の列挙した核酸またはタンパク質発現が最も低いレベルである細胞が50%または60%または70%または80%または90%であることを意味するものとする。

【0312】

所望の細胞を濃縮する一つの例示的な手法は、磁気細胞分離法(MACS)または磁気を利用するその他の細胞分離方法、例えばDynabeads(登録商標)である。従来のMACS手順はMiltenyiら、(1990年)により記載されている。この手順では、細胞を、細胞表面マーカーまたはタンパク質に結合する抗体または他の化合物に結合する電磁ビーズで標識し、その細胞を、常磁性分離カラムを通過させるかまたは別の形状の磁場に曝露させる。分離カラムを強力な磁石に置き、これによりカラム内に磁場を形成する。磁気標識された細胞をカラムに捕捉し;すなわち細胞は通過しない。次いで、捕捉細胞をカラムから溶出する。

10

【0313】

本発明の細胞を、MACSを用いて好適な試料から濃縮して、好適なタンパク質を発現する細胞を分離し得る。試料をタンパク質に結合する免疫磁性ビーズと共にインキュベートする。インキュベーション後に、試料を洗浄して再懸濁して磁場を通過させて免疫磁性ビーズに結合した細胞を取り除き、タンパク質に結合した細胞を回収する。これらの技術は、陰性選択、例えばTreg細胞の場合の好ましくないマーカーを発現する細胞、CD8の除去に同様に適用される。

20

【0314】

別の例において、タンパク質または細胞表面マーカーに結合する化合物を固体表面上に固定して、細胞集団を固体表面と接触させる。洗浄して未結合細胞を取り除いた後、化合物に結合した細胞を回収し、例えば溶出することにより、化合物と結合するタンパク質を発現する細胞について単離および濃縮する。あるいは、所望であれば化合物に結合しない細胞を回収することができる。

【0315】

好ましい例において、細胞を、蛍光標識細胞分取(FACS)を用いて単離または濃縮し得る。FACSは、粒子例えば細胞を粒子の蛍光特性に基づき分離する、例えばKamarch, 1987年に記載の公知の方法である。一般にこの方法は、細胞集団が1以上のタンパク質または細胞表面マーカーと結合することができる化合物と接触することを伴い、このうち区別可能なマーカーに結合する化合物は、様々な蛍光部分、例えば蛍光体で標識化される。流れが速い狭小の液体の流れの中心に細胞が乗って移動する。この流れは、細胞が細胞の寸法に関連して細胞同士が分離しているように配置されている。振動膜により、細胞にストリームが生じ、個々の液滴に分解する。その系を調整し、1以上の細胞を液滴にする確率が低くなるようにする。ストリームが液滴に分解する直前に、その流れを蛍光測定位置に貫通させ、そこで各細胞対象の蛍光特性、例えば標識化合物が対象と結合しているか否かを測定する。荷電リングをストリームが液滴に分解する点に配置する。電荷を蛍光強度測定の直前にリング上に配置し、ストリームから分解されたとき、対立する電荷を液滴上で捕捉する。次いで、荷電した液滴が静電偏向系を通り抜けて液滴を、その電荷例えば標識化合物が細胞と結合している場合は一方の容器に、そうでない場合は別の容器に移す。いくつかの系では、電荷が直接ストリームに印加され、分解した液滴はそのストリームと同じサインの電荷を保持する。次いで、液滴分離後にストリームを中性に戻す。

30

40

【0316】

細胞培養

単離後、本発明の細胞を標準の細胞培養条件下で維持し得る。例えば細胞は、ダルベッコ最少必須培地(DMEM)、または当技術分野で公知の、例えば上記のその他の適する細胞培養培地で維持し得る。他の適する培地として、例えば、MCDB、最少必須培地(

50

MEM)、IMDM、およびRPMIが挙げられる。

【0317】

細胞培養を、好ましくは加湿インキュベータにて約37℃でインキュベートする。細胞培養条件は本発明の細胞により大幅に異なり得る。好ましくは、細胞を細胞増殖に好適な環境、例えば、空気中に5%O<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub>、85%N<sub>2</sub>または10%CO<sub>2</sub>を含む環境で維持する。

【0318】

1つの例において、Treg細胞を、任意でIL-2および/またはTGF-βの存在下で増殖を促進するために抗CD3抗体の存在下で増殖させる。1つの例において、細胞をビーズ(例えば、CD3およびCD28に対する抗体で被覆された鉄デキストラン磁気ビーズ-Dynabeads)の存在下で培養する。抗CD28抗体は例において低増殖性Treg細胞の増強活性と成長に関する信号をもたらす。低い比率(抗CD28と比較して低い抗CD3)のビーズにより増殖したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ははるかに安定性があり、従来のT細胞による異常増殖が起こりにくい。ビーズは磁気カラムによる培養細胞の通過により容易に除去できる。細胞選別の必要はない。

10

【0319】

Treg細胞をまた、T細胞および/またはIL-10の生存率を高め、制御性T細胞および/またはIL-15の産生に部分的に関与し、IL-2と共に相乗作用を与えてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の増殖を誘発することが示されているサイトカイン、例えばIL-4および/またはIL-7の存在下で培養し得る。

20

【0320】

いくつかの例において、自己CD4<sup>+</sup>T細胞を支持細胞として使用する。あるいは、feeder-freeの培養は例えばIL-2と共に上記のビーズを用いて実施し得る。さらに培養拡大を宿主APC例えばDCにより、またはそれなしで達成し得る。

【0321】

細胞組成物

1つの例において、本発明にしたがって単離された細胞(例えば、Treg細胞および/またはその子孫細胞)は、組成物の形態で投与される。好ましくは、そのような組成物は、薬剂的に許容可能な担体を含む。

【0322】

好適な本発明のための担体としては従来使用される担体が挙げられ、例えば水、生理食塩水、水性デキストロス、ラクトース、リンゲル液、緩衝液、ヒアルロン酸、およびグリコール類が、特に(等張である場合の)溶液に関しては好ましい液体担体である。好適な医薬担体としてはまた、スターチ、セルロース、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、塩化ナトリウム、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。

30

【0323】

別の例において、担体は、例えば細胞を成長または懸濁させる媒体組成物である。好ましくは、そのような媒体組成物は、投与された対象にいかなる副作用も誘発しない。

40

【0324】

好ましい担体は、細胞の生存性および/または細胞活性例えばTreg関連症状を減少させる、防止する、もしくは遅延させるための細胞能力に不都合な影響を与えない。

【0325】

1つの例において、担体は細胞および/または可溶性因子を好適なpHで維持する緩衝作用をもたらす、これにより生物活性を発揮する。例えば、担体または無効成分はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。PBSは、細胞や因子との相互作用が最小限であり、また細胞や因子の迅速な遊離を可能にするため、魅力あるの担体または無効成分である。そのような場合、本発明の組成物は、血流にまたは組織もしくは組織の周辺や近傍内に例えば注入により直接適用するために、液体として作製することができる。

50

## 【0326】

本発明に従って単離された細胞（例えば、T r e g細胞および/またはその子孫細胞）はまた、受容者適合性であり受容者に有害でない産物に分解する足場内に組み込まれるか埋め込まれることができるそのような。例示的な足場としては、ポリグリコール酸の骨格（例えばVacantiら, 1988年; Cimaら, 1991年; Vacantiら, 1991年に記載された）; またはポリ酸無水物、ポリオルトエステル類、および、ポリ乳酸などの合成高分子が挙げられる。

## 【0327】

好ましくは、組成物は、有効量または治療有効量もしくは予防有効量の細胞を含む。例えば、組成物は、細胞を約  $1 \times 10^5$  細胞 / k g から約  $1 \times 10^9$  細胞 / k g または約  $1 \times 10^6$  細胞 / k g から約  $1 \times 10^8$  細胞 / k g または約  $1 \times 10^6$  細胞 / k g から約  $1 \times 10^7$  細胞 / k g 含む。投与する細胞の正確な量は、様々な要因、例えば患者の年齢、体重、および性別、ならびに治療または防止する症状の範囲と重症度に依る。

10

## 【0328】

本発明の細胞組成物は、任意の周知方法により対象の全身にまたは局所部位に投与され得る。

## 【0329】

免疫応答の刺激または増強

本明細書の基づき当業者に明らかであるように、本発明はまた、対象でT r e g細胞を減少または枯渇させることにより対象での免疫応答を増強する方法を企図する。1つの例において、対象でのT r e g細胞を減少または激減させることは、例えば、腫瘍に対しおよび/または病原体に対し（例えば、免疫原性組成物の投与なしに）免疫応答を十分に誘発する。別の例において、対象に免疫応答を誘発する方法は、対象でのT r e g細胞を減少または激減させること、および免疫原性化合物を含む組成物を投与することを含む。

20

## 【0330】

本明細書に使用される、用語「免疫原性化合物」は、対象に取り込まれた場合に免疫応答を引き起こす（免疫状態を作る）任意の物質または有機体を意味する。いくつかの実施形態では、免疫原をワクチン形態での治療剤で使用し得る。本明細書に使用される場合、特定の定めがないかぎり用語「増強した免疫応答」は免疫原を本発明のタンパク質と組み合わせ投与した場合に、当技術分野でのまたは本明細書に記載の任意の標準的手法を用いて測定された、投与を受けた対象での免疫応答、好ましくはT細胞応答および/または抗体応答が本発明の化合物を投与されていない対象と比較して増加していることを意味する。

30

## 【0331】

本発明の方法で使用される免疫原性化合物は、癌抗原または腫瘍抗原であり得る。当業者に知られる任意の癌または腫瘍抗原は、本発明の免疫原性組成物に応じて使用されることができ、免疫原性組成物として、これに限定されないが、K S 1 / 4 汎腫瘍性抗原 (PerezおよびWalker, 1990年)、悪性卵巣腫瘍抗原 (C A 1 2 5) (Yuら, 1991年)、前立腺酸性リン酸塩 (Tailorら, 1990年)、前立腺特異的抗原 (HenttuおよびVihko, 1989年)、黒色腫関連抗原 p 9 7 (Estinら, 1989年)、黒色腫抗原 g p 7 5 (Vijayasardahlら, 1990年)、高分子量黒色腫抗原 (H M W - M A A) (Nataliら, 1987年)、前立腺特異的膜抗原、癌胎児性抗原 (C E A) (Foon et al, 1994)、T A G - 7 2 (Yokataら, 1982年)、C O 1 7 - 1 A (Ragnhammarら, 1993年); ヒトB - リンパ腫抗原 - C D 2 0 (Reffら, 1994年)、G D 2 (Salehら, 1993年)、ガングリオシドG M 2 (Livingstonら, 1994年)、E G F R (上皮成長因子受容体)、H E R 2 抗原が挙げられる。さらなる腫瘍抗原は、例えばNovellinoら, 2005に記載されている。

40

## 【0332】

別の例において、免疫原は癌細胞またはその溶解物である。

## 【0333】

1つの例において癌は乳癌である。

50

## 【0334】

別の例において、癌は脳腫瘍、例えば、神経膠腫である。

## 【0335】

さらなる例において、癌は胃癌である。

## 【0336】

別の例において、癌は前立腺癌である。

## 【0337】

別の例において、癌は黒色腫である。

## 【0338】

別の例において、癌はリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫である。

10

## 【0339】

本発明の方法で使用される免疫原はまた、感染症薬剤であることができ、感染症薬剤としてはこれに限定されないが、インフルエンザウイルス血球凝集素 (Genbank Accession No. J02132; Air, 1981年)、B型肝炎ウイルス表面抗原 (Itohら, 1986年)、B型肝炎ウイルスコアタンパク質および/もしくはB型肝炎ウイルス表面抗原またはそれらのフラグメントもしくは誘導体 (例えば英国特許第2034323号明細書を参照のこと) が挙げられる。

## 【0340】

1つの例において、免疫原性化合物はポリペプチド抗原をコードするDNAである。

## 【0341】

1つの例において、免疫原性組成物はさらにアジュバントを含む。アジュバントは、抗原免疫原性を向上させる分子および調製物である。好適なアジュバントとしては、サイトカインなどの全ての許容できる免疫刺激化合物、毒素、または合成組成物が挙げられる。多くの場合好ましいアジュバントの例としては、これに限定されないが、完全フロインドアジュバント (死滅結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)) を含有する免疫応答の非特異的刺激剤)、不完全フロインドアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

20

## 【0342】

抑制および免疫応答

本発明はまた、対象において、Treg細胞数またはTreg活性の減少に関連する症状を治療または予防する、および/または免疫抑制を誘発するおよび/またはCTLもしくはヘルパーT細胞活性を減少させる方法を提供し、前記方法は：

30

(i) 本明細書に記載の方法を任意の実施形態にしたがって実施することによりTreg細胞集団を単離すること；および

(ii) 対象に(i)の細胞を投与すること、を含む。

## 【0343】

別の例において、方法は、Treg機能を活性化する本発明のタンパク質を投与することを含む (例えば、本明細書に記載の方法を用いて評価される)。

## 【0344】

別の例において、方法は、固形または半固形担体を移植することを含み、固形または半固形担体には本発明のタンパク質が固定され、また任意でTreg細胞が結合している。

40

## 【0345】

1つの例において、対象は、Treg数および/またはTreg活性の減少に関連する症状に罹患しているかまたはその発症の危険性があり、および/または対象はCTLもしくはヘルパーT細胞活性の減少を必要とし (例えば、対象は自己免疫疾患に罹患しているか発症の危険性がある)、および/または対象は免疫抑制 (例えば、移植を受けているもしくは受けようとしている、または移植片対宿主病に罹患している) を必要とする。ある症状に罹患している対象を決定する方法は、本明細書の記載に基づき当業者に明らかである。

## 【0346】

50

1つの例において、対象は1型糖尿病に罹患している。

【0347】

別の例において、対象は多発性硬化症に罹患している。

【0348】

さらなる例において、対象は炎症性腸疾患に罹患している。

【0349】

好ましい例において、対象は関節炎例えば関節リュウマチに罹患している。

【0350】

さらなる例において、細胞は移植片（例えば細胞移植片または組織移植片または臓器移植片）を用いて投与され、これにより移植片対宿主または宿主対移植片の免疫応答を抑制または減少させる。

10

【0351】

治療用Treg細胞を同定および/または単離および/または培養および/または製剤する方法は、本明細書に記載されている。

【0352】

診断検査/予後予測試験

本発明がPI16発現に関する症状、特にTreg関連症状を診断/予後予測する様々な方法を提供することは、本明細書の記載から明らかであろう。PI16は転移、前立腺癌、および心拍停止において脱制御されていることが示されている。したがって、本発明の方法は、転移を診断または予後予測する方法（例えば、乳癌転移）に準用することを理解されるべきであり、PI16またはPI16発現細胞レベルの増加は転移を示す。本発明の方法は、心臓肥大または心拍停止を診断または予後予測する方法に準用することを理解されるべきであり、PI16またはPI16発現細胞レベルの増加は、心臓肥大または心拍停止を示す。本発明の方法は、前立腺癌を診断または予後予測する方法に準用することを理解されるべきであり、PI16またはPI16発現細胞レベルの増加は、前立腺癌を示す。

20

【0353】

タンパク質検出試験

本発明の一例は、PI16またはこれを発現する細胞の有無を検出する。タンパク質または細胞の量、レベル、または有無は、当業者が周知の様々な技術、例えば、フローサイトメトリ、免疫組織化学的検査、免疫蛍光検査、免疫プロット法、ウエスタンプロット法、ドットプロット法、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定法、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、マトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI-TOF)、エレクトロスプレーイオン化(ESI)、質量分析法(タンデム質量分析法、例えばLCMS/MSなど)、バイオセンサ技術、エバネセント光ファイバ技術(evanescent fiber-optics technology)、またはタンパク質技術チップからなる群から選択される技術のいずれかを用いて測定される。

30

【0354】

一実施形態ではタンパク質の量またはレベルを測定するために使用される試験法は半定量分析である。

40

【0355】

別の実施形態では、タンパク質の量またはレベルを測定するために使用される試験法は定量分析である。

【0356】

好ましくは、タンパク質は、イムノアッセイにより検出される。好ましくは、免疫組織化学的検査、免疫蛍光検査、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、蛍光結合免疫吸着測定法(FLISA)、ウエスタンプロット法、ラジオイムノアッセイ(RIA)、バイオセンサ試験、タンパク質チップアッセイ、および免疫染色（例えば免疫蛍光検査）からなる群から選択される試験を用い、好ましくは、検出方法はフローサイトメトリ法であり、例えばTreg細胞数の検出は当技術分野に知られているおよび/または本明細書に記

50

載の蛍光標識細胞分取 ( F A C S ) を用いる。

【 0 3 5 7 】

標準的な固相 E L I S A または F L I S A 形式は特に様々な試料由来のタンパク質濃度を測定する際に有用である。

【 0 3 5 8 】

一形態では、E L I S A または F L I S A は、本発明のタンパク質または P I 1 6 の異なるエピトープに結合するタンパク質を固体マトリックス、例えば、薄膜、ポリスチレンもしくはポリカーボネートマイクロウェル、ポリスチレンもしくはポリカーボネート製ディップスティック、またはガラスサポート上で固定化することを含む。次いで、試料を固定したタンパク質と物理的に関係をもたせ、P I 1 6 を結合または「捕捉 ( 捕捉する ) 」する。次いで、結合した P I 1 6 を異なる P I 1 6 のエピトープ ( 例えば本発明のタンパク質 ) に結合する第 2 の標識化合物を用いて検出する。あるいは第 2 の ( 検出 ) 抗体に結合する第 3 の標識抗体を用い得る。

10

【 0 3 5 9 】

別の形態では、本発明のタンパク質を用いて、P I 1 6 を発現する細胞を捕捉する。次いで、異なるタンパク質に結合する第 2 のタンパク質を用いて、この細胞を検出する。例えば、T r e g 細胞の場合、第 2 のタンパク質は C D 4 または C D 2 5 に結合し得る。当然、第 2 のタンパク質に結合する第 3 のタンパク質を検出試薬として使用し得る。

【 0 3 6 0 】

本明細書に記載の試験形式がハイスループットフォーマット、例えばMendozaら、1999 に記載されているスクリーニングフォーマットまたはマイクロアレイの自動化などに適していることは、当業者に明らかであろう。さらにまた、上記試験の変形が、例えば競合 E L I S A などが、当業者には明らかであろう。

20

【 0 3 6 1 】

代替的な実施形態では、ポリペプチドは、当技術分野で公知の方法、例えば、免疫組織化学的検査または免疫蛍光検査などを用いて細胞内または細胞上にて検出される。免疫蛍光検査を用いる方法が、定量的または少なくとも半定量的であるので好ましい。染色した細胞の蛍光強度を定量化する方法は、当業者に公知であり、例えばCuello、1984年に記載されている。

【 0 3 6 2 】

バイオセンサ装置は一般に電極表面を、装置に組み込まれた素子を試験基質 ( 基質 ) と組み合わせて測定する電流またはインピーダンスと組み合わせて利用する ( 例えば米国特許第 5 , 5 6 7 , 3 0 1 号などに記載される ) 。本発明のタンパク質をバイオセンサ装置とこの装置に接触した生体試料の表面に取り込む。バイオセンサ装置により検出した電流またはインピーダンスの変化が前記タンパク質と結合するタンパク質を示す。当技術分野で公知のバイオセンサのなかにはまた、表面プラズモン共鳴に頼りタンパク質の相互作用を検出するものもあり、これにより、表面プラズモン共鳴の反射面の変化がタンパク質のリガンドまたは抗体への結合を示す ( 米国特許第 5 , 4 8 5 , 2 7 7 号および米国特許第 5 , 4 9 2 , 8 4 0 号 ) 。

30

【 0 3 6 3 】

バイオセンサは、そのようなシステムをマイクロまたはナノスケールに適応させることが容易であるので、ハイスループット解析の際に特に使用される。さらにまた、そのようなシステムは好都合に適応されて数種類の検出試薬が組み込まれ、単一のバイオセンサ単位で診断試薬を多重化することができる。これにより、少量の体液で数種類のタンパク質またはペプチドを同時に検出することができる。

40

【 0 3 6 4 】

画像検査方法

前述から、当業者に明らかであるように、本発明はまた、本発明のタンパク質を用いた画像検査方法を企図する。画像検査では、タンパク質を一般に検出可能な標識と複合体化するが、前記検出可能な標識は画像検査により検出可能な信号を発し得る任意の分子また

50

は薬剤であり得る。しかし、本発明のタンパク質に特異的に結合する二次標識化合物もまた使用することができる。例示的な検出可能な標識としては、タンパク質、放射性同位体、蛍光体、可視発光蛍光体、赤外線発光蛍光体、金属、強磁性体、電磁放射体、特異的な核磁気共鳴（MR）の分光学的特徴をもつ物質、X線吸収またはX線反射物質、または音変換物質（sound altering substance）が挙げられる。

【0365】

本発明のタンパク質（および使用するなら二次標識化合物）は、全身にまたは局所の臓器もしくは組織（もしくは癌の場合は腫瘍）に投与され画像化し得、その後画像処理される。一般には、タンパク質は、腫瘍、組織、または臓器の所望の光学イメージングをなし得るのに効果的な用量で投与される。そのような用量は、使用される特定のタンパク質、画像化する状態、画像処理する組織または臓器、使用される画像処理装置などに依存して、大幅に変化し得る。

10

【0366】

本発明のいくつかの例において、タンパク質は、これに限定されないが、腫瘍の画像化、臓器の断層画像化、臓器機能の監視、冠動脈造影、蛍光内視鏡検査、レーザー誘導手術、超音響法、および音響蛍光法（sonofluorescence method）など様々な生物医学的応用での組織および臓器のインビボ光学造影剤として使用される。

【0367】

画像検査方法の例としては、核磁気共鳴映像法（MRI）、MR、X線撮影、コンピュータ断層撮影（CT）、超音波、プラナー像のガンマ線カメラ映像、単光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）、ポジトロン放出断層撮影法（PET）、他の核医学に基づくイメージング、可視光を用いた光学イメージング、ルシフェラーゼを用いた光学イメージング、蛍光体を用いた光学イメージング、他の光学イメージング、近赤外光を用いた画像化、または赤外光を用いた画像化が挙げられる。

20

【0368】

いくつかの例において、造影剤は、ヒト例えば本明細書に記載のモデルに使用する前に、インビトロまたはインビボ試験を用いて検査される。

【0369】

試料

本発明の方法が、インビボに基づくスクリーニングとしてよりむしろ単離組織試料でのインビトロで実施される範囲において、用語「試料」は、これに限定されないが、体液（例えば、血液または滑液または髄液）、細胞物質（例えば組織の吸引物（組織吸引物））、組織生検標本、または外科的標本などの動物由来の生体物質の任意の試料を意味することを理解すべきである。好ましくは、試料はTreg細胞を含むか、またはTreg細胞を含む可能性が高い。

30

【0370】

本発明の方法にしたがって使用される試料は、直接使用されることができ、または使用前に何らかの処理を必要とし得る。例えば、生検試料または外科的試料は、使用前に均質化または細胞分散の他の形式を必要とすることができる。さらにまた、生体試料が液体形態でないに限りでは、（そのような形式が必要とされるまたは所望される場合）緩衝液などの試薬を添加して試料を動態化する必要があり得る。

40

【0371】

上記説明から明らかなように、そのような試験は、例えば定量化するために好適な対照例えば正常もしくは健康な個体または典型的な個体群を使用する必要があり得る。

【0372】

本明細書に使用される用語「正常な個体」は、対象が、その対象のPI16発現細胞例えば対象由来の試料でのTreg細胞が異常な数でないという前提で選択されることを意味するものとする。

【0373】

「健康な個体」は、症状例えばTreg関連症状に罹患していると診断されていないお

50

よび / またはその症状を発症する危険性がない個体である。

【0374】

あるいは、またはさらに、好適な対照試料は、ある症状の罹患が知られていない対象の典型的な個体群に関し試験されるマーカー測定を含む対照用データセットである。

【0375】

一実施形態では、基準試料は試験において含まれない。むしろ好適な基準試料は、典型的な個体群から以前発生した既存のデータセットに由来する。試験用試料の処理、分析および / または試験から得られるデータは、次いで試料個体群のために得られたデータと比較される。

【0376】

キット

本発明はまた、本発明の検出 / 単離 / 診断 / 予知 / 治療 / 予防方法で用いる、本発明の化合物を含む治療 / 予防 / 診断キットを提供する。そのようなキットは、一般に好適な容器手段内に本発明のタンパク質を収容し得る。キットはまた、例えば検出 / 単離 / 診断 / 画像検査または併用療法のための他の化合物を収容することができる。例えばそのようなキットは、様々な抗炎症薬および / または化学療法薬もしくは放射線治療薬；血管新生阻害剤；抗腫瘍細胞抗体；および / または抗腫瘍血管系もしくは抗間質腫瘍免疫毒素、またはコアグリガンドまたはワクチンのうちいずれか1つまたはそれ以上を含むことができる。

【0377】

1つの例において、キットはPI16の検出用であり、またさらに検出を容易にする試薬（検出可能な標識および / または検出可能な標識の基質）を含む。そのようなキットはさらに陽性対照を含むことができる。

【0378】

別の例において、キットは、細胞または細胞個体群の単離用である。そのようなキットでは、本発明のタンパク質を、FACSを容易にするために検出可能な標識で標識化することができる。タンパク質をまた、MACSを容易にするために磁性粒子または常磁性粒子により標識化することができる。タンパク質をまた、単離を容易にするために固形または半固形基質上に固定することができる。

【0379】

さらなる例において、キットは病状の治療または予防用である。そのようなキットでは、タンパク質を溶液としてまたは凍結乾燥形態（任意で再懸濁用溶液とともに）で供与することができる。タンパク質を、治療化合物と複合体化することが可能であり、またはキットがタンパク質と複合体化するための治療化合物を含むことができる。上記説明のように、キットはまた、さらなる治療化合物または予防化合物を含むことができる。

【0380】

微生物寄託詳細

CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマを、2010年2月24日に、寄託番号PTA10685で米国標準培養コレクション（ATCC）に寄託した。

【0381】

これらの寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約およびその下位の規則に従い行った。これにより、寄託日から30年間にわたり生存培養の維持が保証される。本生物は、培養物の子孫の永続的および非制限的入手を保証するブダペスト条約の条件のしたがいATCCにより利用可能となる。

【0382】

本出願の譲渡人は、好適な条件下で培養した際に寄託培養物が死滅または消失、または損なわれた場合、直ちに通知し生存可能な同じ培養物の標本と置き換えることに同意している。寄託株の入手可能性は、政府の権限下でその特許法に準拠して付与された特許権に違反し本発明を実行する権利と解釈されるべきではない。

【実施例】

10

20

30

40

50

## 【0383】

以下の非制限的な実施例で、本発明をさらに説明する。

## 実施例1 Treg細胞でのPI16の同定

## 1.1 材料および方法

## 1.1.1 臍帯血T細胞集団の単離およびインビトロ増殖および特性解析

## 【0384】

臍帯血を、Children's, Youth and Women's Health Service Research Ethics Committeeが定める母体インフォームド・コンセント (informed maternal consent) により得た。単核細胞 (MNC) を、抗凝血剤を含有する採血バッグ (Fenwell) 中の分娩後の臍帯血から単離した。臍帯血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (ヘルパーT) 細胞を、Dynabeads Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞キット (Invitrogen) を用いてMNCから単離した。各細胞型の純度をCD4およびCD25の発現のために2色フローサイトメトリにより常に90%超にした。T細胞集団 (24穴プレートにて1×10<sup>6</sup>細胞/穴) の生体外での増殖を、20mM HEPES (pH7.4)、5%熱不活性化ヒトプール血清 (Lonza)、2mM l-グルタミン、および500U/ml組み換えヒトインターロイキン-2 (rhIL2; R&D Research) を補充したX-Vivo15培地 (BioWhittaker) にて、細胞比が3:1のビーズであるDynabead (登録商標) CD3/CD28T細胞増殖刺激ビーズ (Invitrogen; Cat# 111-41D) の存在下で行った。細胞を8日間Dynabeadsの存在下で増殖し、その後ビーズの磁気除去を行い、100U/mlのrhIL2を除く上記成分を補充したX-Vivo15培地で培養した。使用当日、増殖した細胞の表現型について、Beckman CoulterのEpics Elite ESPフローサイトメータでの3色フローサイトメトリによるFoxP3 (FoxP3-Alexa 488、BDクローン259D/C7; ヒトFoxP3緩衝液セット、BDカタログ番号560098) の細胞内検出と組み合わせた、CD4 (PEcy5、ebioscience クローンRPA-T4)、CD25 (PE、BDクローンM-A251)、およびCD127 (PE、ebioscience クローンebioRDR73) の表面発現の特性解析を行った。

## 1.1.2 RNAの調製および発現アレイ

## 【0385】

差次的発現解析をAffymetrixヒトExon1.0ST試験を用いて実施した。総RNAを、およそ60時間静止させ次いで8日間の増殖手順の後に、賦形剤 (DMSO) またはイオノマイシン処理 (2時間) のいずれかを行った増殖CD4<sup>+</sup>25<sup>-</sup> (ヘルパーT) およびCD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> (Treg) 細胞より単離した。低分子量RNAを含む総RNAを、QIAshredderおよびmiRNeasy mini キット (QIAGEN) を用いて単離した。AffymetrixヒトExon1.0STアレイへの標識化とハイブリダイゼーションを、Biomolecular Resource Facility (John Curtin School of Medical Research, Australian National University) にて基本的に製造業者のプロトコルに従って行い、Agilent Systems Bioanalyzerを用いてRNA品質の試験を行った。

## 【0386】

## 1.1.3 RNA発現アレイデータ正規化

プローブ標識データを、RMAモデル (Irizarryら, 2003年) を用いて、プローブレベルモデル化 (probe-level modelling) (Bolstadら, 2003年) を用いたEntreZ Gene centric cdf (Daiら, 2004年) のv11.0に基づき得られた最終転写レベル予想で、処理した。全処理を、統計ソフトウェアR (R Development Core Team) を用いて、aroma.affymetrixフレームワーク (Bengtssonら, 2006年、ならびに、BengtssonおよびHossjer, 2006年) のもとで行った。各試験に関するハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーション品質を、偽像 (pseudo-image) プロット、N U S E、R L E (Bolstadら, 2001年) およびプロレベルデータのヒストグラムを用いて評価した。Loess正規化後、個体ドナー中のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg細胞対CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>ヘルパーT細胞のfour way comparisonの静止処理と刺激処理とのログ比 (Log fold-change) を推定した。最終の発現解析をアレイレベル重量 (array level weight) およびR package limma (Smythら, 2005年、ならびに、WettenhallおよびSmyth, 2004年) を用いて行った。各項の生P値を全体的に調整し、FDRの推定値 (HochbergおよびBenjamini, 1990年) を得た。

#### 【0387】

##### 1.1.4 半定量的リアルタイムPCR

発現アレイ解析により同定された別々に制御される標的遺伝子の検証を、5つの別個のドナーからの増殖したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞より単離したRNAで行った。増殖、刺激、およびRNA単離条件は、発現アレイ実験で使用されるものと同じであった。無作為にプライミングされたcDNAを、Quantitect reverse transcriptaseキット (QIAGEN) を用いて総RNAから調製した。cDNAを、1.25 Units FastTaq DNAポリメラーゼ (Roche)、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μMの各プライマー、200 μM dNTP mix、1.1x SYBR green (Molecular Probes、Invitrogen) 1x FastTaq PCR緩衝液からなる25 μlのqPCR反応物中にて使用した。qPCRに関する遺伝子特異的プライマー対をプライマーバンク (WangおよびSeed Nucleic Acids Res 31: e154, 2003年) から選択した。RPL13aに特異的なプライマーセットを内部対照として用いた。サイクル条件は94 で50秒、60 で25秒、および72 で50秒を40サイクルであり、その後Rotor gene 6000 PCR machine (Corbet Research) を用いた融解曲線を作製した。結果を、Rotor-Gene 6000、Q-geneソフトウェア (Mullerら, 2002年) およびRを用いて解析した。

10

20

#### 【0388】

##### 1.1.5 細胞表面分子発現の検証

表面分子解析について、成人末梢血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>TregまたはCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>ヘルパーT細胞を、CD3/CD28ビーズ (ビーズ細胞比、1:1) および100 U/mlのIL2の存在下で新たに単離または単離および一晩刺激し、その後、CD4、CD25、FoxP3およびPI16に対する抗体を用いた4色フローサイトメトリを行った。

30

#### 【0389】

##### 1.2 結果

##### 1.2.1 ヒト臍帯血Tregの単離および検証

発現プロファイリング検査のための十分なヒトTregを産生するため、ヒト臍帯血から単離したおよそ $1 \times 10^6$ のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>細胞を抗CD3/CD28ビーズを用いてインビトロで増殖させた。生体外での1ラウンドの増殖後、臍帯血Tregの100倍から200倍の増殖が常に得られた。これらの細胞は増殖においてTreg表現型を維持し、増殖した細胞の90%超がCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>hi</sup>、およびFoxP3陽性に染色した。これらの細胞はまたCD127<sup>dim</sup>であった。増殖後、細胞が不適合ドナーの混合白血球抑制試験でCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞の増殖をインビトロで確実に抑制することができたことから、細胞は制御機能を保持していた。増殖した機能的なTreg細胞を発現プロファイリング実験に用いた。

40

#### 【0390】

##### 1.2.2 静止および活性化Treg細胞での差次的遺伝子発現

発現プロファイリングを、単離およびインビトロで増殖した臍帯血Tregで実施した。4ウェイTreg遺伝子発現アレイ実験を考案してTregおよび適合ヘルパーT細胞の刺激または静止状態での発現プロファイルを明らかにした。この4ウェイ比較はTreg

50

gの内因性発現パターンを有する遺伝子、Treg特異的活性サインの一因となる遺伝子、およびT細胞活性化に通常応答することが示される遺伝子を同定した。全体で、1851遺伝子がTregのヘルパーTと比較した作用に有意差を示すとみなされ、さらに746遺伝子が細胞型両方での活性化に同様の応答を示した。同定された遺伝子の1つであるPI16は静止および活性化ヒトTreg細胞の両方においてかなりの割合で発現した。

#### 【0391】

Tregアレイでの遺伝子発現プロファイルを確実にするため、遺伝子特異的な半定量的リアルタイムPCR(qPCR)を実施した。PI16を含む差次的に発現した候補遺伝子のグループを選択し、Treg対ヘルパーT細胞の5つの生物学的複製でのその発現を検査した。定量的RT-PCRおよび低密度アレイによりPI16の差次的発現が確実なものとなり、またその結果はアレイ解析で同定した遺伝子の作用と比較的に一致していた。

10

#### 【0392】

##### 1.2.3 Treg上のPI16細胞表面分子解析

上記説明したアレイデータを解析して、Treg細胞を同定するためのFoxP3発現の代わりとなるものとして使用され得るバイオマーカーを同定した。これらのデータより、PI16をそのようなバイオマーカーの1つとして同定した。CD25陽性成人CD4<sup>+</sup>細胞をPI16とFoxP3の共発現について抗PI16ポリクローナル抗体を用いてスクリーニングし、PI16がFoxP3と正の相関を有することが見いだされた(図2)。

20

#### 【0393】

PI16の発現をまたTGFB誘導性Tregにて試験を行った(iTreg; 図3)。TGFBは実質的にCD25およびFoxP3発現を上方制御したが、PI16は一過的に誘発したこれらの細胞では実質的に発現されず、PI16発現が内在性Tregと誘導性Tregとを区別し得ることを示唆している。

#### 【0394】

##### 実施例2 PI16に対する抗体の作製および特性解析

##### 2.1 材料および方法

##### 2.1.1 末梢血単核細胞単離

末梢血単核球(PBMC)を全血(Children's, Youth and Women's Health Service, South Australiaの研究所倫理審査委員会からの倫理的許可に準拠してインフォームド・コンセントにより健常者から得られた)からLymphoprep(Nycomed, オスロ)上での密度遠心法により単離し、PBS-アジ化物で2回洗浄した。血液を、ヘパリンリチウム抗凝血剤を用いて収集した。

30

#### 【0395】

##### 2.1.2 PI16発現細胞の産生

pCMV-SPORT6の完全長PI16コード配列を含む構築物を、Open Biosystems(Thermo, MHS1010-708293)より購入した。Gateway vector system(Invitrogen)に適合する挿入物を産生するため、PI16コード配列を本ベクターから次のプライマーを用いて増幅した:  
 PI16-F: 5' - ggggacaaagtttgtacaaaaaagcaggctgccaccATGCACGGCTCCTGCAGTT-3' (配列番号5) (NCBI RefSeq NM\_153370のヌクレオチド329~347に対応する)およびPI16-R: 5' - ggggaccactttgtacaaagaagcctgggtcGAAGATTCCAGCCAACACCA-3' (配列番号6) (参照配列のヌクレオチド1698~1717の逆方向配列および相補配列)。プライマーの大文字部はPI16コード配列に特異的であるが、プライマーの下線部はGateway vectorのためのアダプターである。PCR産物を精製し、およびGateway vector pDONR201(Invitrogen)中にクローン化して「エントリークローン」p

40

50

DONR201/PI16を作製した。クローン挿入物の同一性を、pDONR201/PI16をGateway Technology Instruction Manualに記載の順方向および逆方向配列プライマーを用いて配列決定することにより、確かめた。PI16挿入物をpDONR201ベクターからpDEST40ベクターまで、Gateway Technology Instruction Manualに記載の手順を用いて転写した。複数の単一コロニーを単離し、PCRによりスクリーニングして、挿入物が存在することを確認した。pDEST40/PI16構築物のプラスミドDNAをQiagen Midi-Prepキット(Qiagen)を用いて調製した。

#### 【0396】

免疫化のため、pDEST40/PI16ベクターを用いて一過的な形質移入L929マウス線維芽細胞(ATCC)および安定的な形質移入NIH3T3細胞(ATCC)を産生した。細胞を2mM L-グルタミン(Glutamax, Gibco)、0.5U/mlのペニシリン(Sigma)、0.5μg/mlのストレプトマイシン(Sigma)、および10%のFCS(SAFC Bioscience)を補充したDMEM培地中に維持した。20μgのプラスミドDNA、20μlのLipofectamine LTX(Invitrogen)、20ulのPLUS試薬の混合物を、Opti-MEMを用いて4000μlにした。この混合物を用いて半集密性(60~80%の集密性)L929およびNIH3T3細胞をT75フラスコ(75cm<sup>2</sup>)中で形質移入した。6時間後、形質移入混合物を取り除き、DMEMと置き換えた。pDEST40/PI16プラスミドを含有する形質移入細胞を、G418(Invitrogen)を500μg/mlの濃度で培養培地に添加することにより選択した。安定的な形質移入細胞を産生するため、PI16発現NIH3T3細胞を3回選別した(FACSAriaII; BD Biosciences)。

10

20

30

40

50

#### 【0397】

##### 2.1.3 免疫化およびハイブリドーマ産生

PI16タンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するため、6~8週齢の雌性Balb/cマウスを、PI16タンパク質を発現するL929細胞により免疫化した。非免疫性血清試料を全マウスから取り出し第1回目の免疫化を行った。マウス2匹でのグループのいくつかを、500ulのPBS中の5000万細胞を皮下注射することにより最初に免疫化した。4週間後、マウスを500ulのPBS中の5000万細胞を皮下注射することにより追加免疫した。2回目の注射後6日間検査出血を行い、以下に記載の反応性についてスクリーニングを行った。14日後、マウスを500ulのPBS中の5000万細胞により最終の追加免疫に処し、および4日後に殺して脾臓をハイブリドーマの調製のために回収した。

#### 【0398】

融合のため、SP2/0骨髓腫細胞をATCCから得た。ハイブリドーマ細胞をMacardleおよびBailey(2006年)の指示に従って、10<sup>8</sup>マウス脾臓細胞および10<sup>7</sup>SP2/0骨髓腫細胞(比率10:1)を用いて産生した。

#### 【0399】

選択したウェルからのハイブリドーマ細胞を、PBMCおよびPI16-形質移入NIH3T3細胞上にてスクリーニングし、ACDUを備えたFACSAriaIIセルソータ(BD Biosciences)を用いて単一細胞ソーティングにより増殖およびクローン化した。選別した細胞から生じるコロニーを再びフローサイトメトリによりスクリーニングした。

#### 【0400】

市販のPI16ポリクローナル抗体が末梢血の区別可能な染色パターンを示したので、フローサイトメトリを用いて、末梢血リンパ球の同じ画分と反応する抗体のためのハイブリドーマコロニーをスクリーニングした。染色は以下に記載のように行った。選択したウェルからのハイブリドーマ細胞を単一細胞ソーティングにより増殖および再クローン化した。選別した細胞から生じるコロニーを、親ハイブリドーマと同様のPBMCとの反応性

を持つ抗体の発現に関し、フローサイトメトリによりスクリーニングした。CRCBT-02-001ハイブリドーマがポリクローナルPI16抗体と同様の反応性を持つモノクローナル抗体を発現するとみなされた。

#### 【0401】

##### 2.1.4 フローサイトメトリ

CRCBT-02-001の反応性解析を、three-step「高感度」染色プロトコル(Mavrangelosら, 2004年)を用いて末梢血の単核細胞(PBMC)およびPI16-形質移入NIH3T3細胞に対して実施した。末梢血単核球を全血(健常者より採取)からLymphoprep(Nycomed、オスロ)上での密度遠心法により単離し、PBS-アジ化物(Sigma)で2回洗浄した。血液を、ヘパリンリチウム抗凝血剤を用いて収集した。

10

#### 【0402】

PI16完全長組み換えタンパク質に対して産生したマウスのポリクローナル抗体をAbnova社(台北、台湾)より購入した。CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD127、FoxP3、CD154、CD45RA、CD45RO、CD73、CD95、CD69、CD44、HLA-DR、CLA、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3、CXCR4に対するモノクローナル抗体の染色用緩衝液、Tregカクテル(CD4-APC、CD127-FITCおよびCD25-PE/Cy7の最適化した混合物)および蛍光体-ストレプトアビジン複合体をBD Biosciences(San Jose、カリフォルニア州)より得た。CD39に対するモノクローナル抗体をeBioscience(San Diego、カリフォルニア州)により、ビオチン化ウマ抗マウスIgをVECTOR Laboratories(Burlingame、カリフォルニア州)により、および正常マウス血清をDako(Glostrup、デンマーク)により購入した。

20

#### 【0403】

PI16発現をPBMCにより特性解析する多重パラメータフローサイトメトリ実験を、FACS Aria IIセルソータを用いて行った。複合体化していない抗体を用いた実験を、three-step「高感度」染色プロトコルを用いて、基本的にはZolaら,(1990年)に記載のように実施した。簡単には、PBMCを複合体化していない一次抗体と30分間氷上でインキュベートし、洗浄した。ビオチン化ウマ抗マウスIg試薬を添加して、30分間氷上でインキュベートした。洗浄後、正常マウス血清を添加し(抗マウスIg試薬での遊離型Ig-結合部位を阻害するため)、10分間インキュベートし、その後、蛍光体-ストレプトアビジン複合体検出試薬と直接複合体化する任意の抗体を添加した。マウスIgのインキュベーションと最終試薬の添加の間に洗浄は行わなかった。細胞を上記のようにインキュベートし、2回洗浄した。細胞内抗原に対する抗体を用いる実験では、上記のような表面染色をまず行い、次いで細胞を製造者の指示に従って透過処理および染色を行った。

30

#### 【0404】

##### 2.1.5 免疫蛍光検査によるCRCBT-02-001の表面染色の検証

細胞を8-ウェルのチャンバースライド(Lab-Tek、Naperville、イリノイ州)上で培養し、PBSで洗浄し、2%パラホルムアルデヒド溶液(pH7.4)で15分間固定し、その後洗浄し、0.2%Triton X-100を含有するPBS中で透過処理を行った。PBS中で1%ウシ血清により30分間ブロッキングした後、細胞を一次抗体、いずれのマウス対照IgG(1μg/ml)(BD Biosciences、San Jose、カリフォルニア州)、IgG1対照X-63(ニート、100μl/ウェル)(in-house)、PI16マウスポリクローナル抗体(1μg/ml)(Abnova、Taipei、Taiwan)、マウス抗V5抗体(1:300)(Invitrogen、Carlsbad、カリフォルニア州)およびCRCBT-02-001培養上清(neat、100μl/ウェル)(in-house)を用いて1時間、室温で免疫染色を行った。次いで、細胞を洗浄して、ビオチン化ウマ抗マウスIgG(

40

50

1 : 5 0 ) ( V E C T O R , B u r l i n g a m e , カリフォルニア州 ) によりインキュベートし、その後ストレプトアビジン Alexa Flour 4 8 8 複合体 ( 1 : 5 0 0 ) ( M o l e c u l a r P r o b e s , E u g e n e , オレゴン州 ) により 1 時間、室温で標識化した。最後に、細胞を核染色のため D A P I 溶液と共にインキュベートし、封入剤 ( D a k o C y t o m a t i o n , C a r p i n t e r i a , カリフォルニア州 ) により封入して顕微鏡検査のために調製した。画像を、蛍光顕微鏡 ( L e i c a , ドイツ ) により、ライフサイエンス用顕微鏡のための O l y m p u s 細胞<sup>F</sup> Imaging ソフトウェアを搭載する O l y m p u s D P - 7 2 カメラを用いて取得した。

#### 【 0 4 0 5 】

##### 2 . 1 . 6 P B M C の 刺 激

P B M C を、 2 m M L - グルタミン ( G l u t a m a x , G i b c o )、 0 . 5 U / m l ペニシリン ( S i g m a )、 0 . 5 μ g / m l ストレプトマイシン ( S i g m a )、および 1 0 % F C S ( S A F C B i o s c i e n c e ) を補充した R P M I 1 6 4 0 中で培養した。細胞を 9 6 U - ウェル培養皿 ( 0 . 5 - 1 x 1 0 <sup>6</sup> / ウェル ) 中でブドウ球菌 ( S t a p h y l o c o c c u s ) エンテロトキシン B ( S i g m a ; 1 μ g / m l ) により 1 8 時間、または製造者 ( D y n a b e a d s ( 登録商標 ) C D 3 / C D 2 8 T 細胞増殖刺激ビーズ、 D y n a l / I n v i t r o g e n ) の指示に従って固定された抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体により 3 日間刺激した。刺激後、細胞を採取し、 P B S で洗浄し、およびフローサイトメトリにより分析した。

#### 【 0 4 0 6 】

##### 2 . 1 . 7 抗体サブクラスの決定

マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット ( R o c h e ) を用いて、 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 のサブクラスを製造業者の指示に基本的に従って決定した。

#### 【 0 4 0 7 】

##### 2 . 1 . 8 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体の精製

C R C B T - 0 2 - 0 0 1 を、 1 0 % F C S、 0 . 5 U ペニシリン / m l、 0 . 5 μ g ストレプトマイシン / m l、および 2 0 0 m M G l u t a m a x ( G i b c o ) を含む R P M I - 1 6 4 0 中で成長させた。上清を 5 0 0 x g で遠心分離し、 0 . 4 5 μ m、次いで 0 . 2 2 μ m のシリンジフィルタ ( M i l l e x ; M i l l i p o r e ) でろ過する前に細胞残屑およびサイズの大きい物質を除去した。

#### 【 0 4 0 8 】

精製を、 B i o L o g i c L P クロマトグラフィ装置 ( B i o r a d ) を用いて行い、カラム ( 5 m l P r o t e i n G カラム ; I n v i t r o g e n r P r o t e i n G アガロースを用いた B i o R a d ) を 1 0 カラム体積超の P B S ( p H 7 . 4 ) で 1 m L / 分で洗浄した。 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 上清をカラム上に 2 回 1 m L / 分で適用した。通過画分をその後の解析のために回収した。カラムを P B S ( p H 7 . 4 ) により基準 UV 吸光度まで洗浄した。結合 I g G を溶出するため、 0 . 1 M グリシン H C l ( p H 2 . 8 ) ( A m r e s c o ) をカラム上に、 1 m l / 分にて 2 0 ~ 4 0 カラム体積に 0 % ~ 1 0 0 % の勾配で適用した。溶出した抗体を、回収した画分の体積の 2 0 % に等しくなるように 1 M T r i s H C l ( p H 7 . 4 ) でチューブに回収した。回収する画分を、読み出し部分から UV ピーク内に認めた。次いで、選択した画分をプールし、体積を測定し、少量の試料をさらに分析した。残余試料を G E スピнкаラム 1 0 0 k D a M W C O ( G E H e a l t h c a r e ) を用いて、脱塩 / P B S ( p H 7 . 4 ) 中への緩衝液交換を行った。次いで抗体を定量し、最終 P B S 体積で 1 ~ 2 m g / m l まで 1 % B S A および 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム ( S i g m a ) を用いて希釈した。

#### 【 0 4 0 9 】

##### 2 . 1 . 9 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 の増殖および細胞生存効果

P B M C を、上記のように 1 8 時間および 3 日間刺激した。 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 から分泌された精製 ( アジド遊離 ) 抗体を 2 μ g / m l、 5 μ g / m l および 1 0 μ g / m l、ならびに未精製 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 - 含有上清 ( 無血清および血清含有 ) を

10

20

30

40

50

培地に培養物に添加した。さらに精製 IgG (BD Biosciences)、CD28 mAb および CD49d mAb (BD Biosciences) および培地を陰性対照として添加した。SEB および CD3 / CD28 ビーズを陽性対照として添加した。刺激された細胞を、活性化マーカー、CD25 および CD69 のために (上記のように) 染色した。細胞死を決定するため、細胞を取得する前に 7 - アミノアクチノマイシン D (7AAD; Sigma Aldrich) にて 15 分間インキュベートしておき、その後フローサイトメトリにより解析した。

#### 【0410】

CRCBT - 02 - 001 から分泌される固定された抗体が増殖および細胞生存に対するいかなる効果を持つかどうかを検査するため、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の精製抗体 (無アジ化物) を一晩培地中でインキュベートし、培地を廃棄して、PBM C を添加した。1 日後および 3 日後に細胞を採取して、アポトーシスおよび活性化マーカーのために染色した。

#### 【0411】

##### 2.1.10 スロットプロット

$100 \mu\text{l}$  の試料 (表示のように) を、真空下で各スロットのニトロセルロース膜 (Protran; Schleicher & Schuell) 上に負荷した。負荷後、プロットを、3% スキムミルク粉末 (Diploma) の PBS Tween 0.05% (ブロッキングバッファー) により、1 時間、室温にてブロッキングした。一次 Ab (CRCBT - 02 - 001 から分泌された、または、Abnova 社のポリクローナル PI16 抗体) をブロッキングバッファー中にて 2 倍に希釈し、プラットホーム型振とう器で 1 時間、室温でインキュベートした。プロットを  $3 \times 5$  分間、PBS tween で洗浄した。ブロッキングバッファー中の  $1/1000$  希釈ビオチン化ウマ抗マウス (VECTOR) を添加して、rocking platform 上で 1 時間、室温でインキュベートした。プロットを  $3 \times 5$  分間 PBS tween で洗浄した。 $1/1000$  希釈 SA:HRP (GE Healthcare) のブロッキングバッファーを添加して、rocking platform 上で 1 時間、室温でインキュベートした。プロットを  $3 \times 5$  分間、PBS tween で洗浄した。ECL 溶液 A および B の適当量 (膜表面を覆うほどの量; ECL Advance ウエスタンプロットキット、GE Healthcare) を添加し、一定で振とうしながら 1 分間インキュベートした。プロットを 15 秒の UV 曝露後すぐに G:Box (Syngene) にて読み取った。

#### 【0412】

##### 2.1.11 サイトカイン分泌の特性解析

PI16 および CD25 を用いて特定した CD4 陽性細胞から分泌されたサイトカインのプロファイルを同定するため、 $T_H 1 / T_H 2 / T_H 17$  Cytometric Bead Array (CBA; BD Biosciences) を用いて細胞上清中のサイトカイン IL2、IL4、IL6、IL10、IL17A、TNFalpha、IFNgamma のレベルを測定し、続いてインピトロで刺激した。CD4 陽性リンパ球を、RosetteSep CD4<sup>+</sup>T 細胞濃縮キットを用いて軟膜から単離し、CD25 および PI16 に対する抗体により染色した。CD25 および PI16 により特定した 4 つの CD4 陽性サブセットを、FACS Aria II セルソータを用いて無菌条件下で選別した。

#### 【0413】

細胞を刺激するため、 $5.0 \times 10^5$  の選別細胞集団を、CD3 / CD28 ビーズ (DynaT cell expander kit; Invitrogen) により 3 日間インキュベートした。非刺激対照細胞をビーズなしでインキュベートした。インキュベーション後、上清を回収して、 $T_H 1 / T_H 2 / T_H 17$  CBA キットを用いて製造者の指示に従ってサイトカインについて試験を行った。各サブセットについて、サイトカイン濃度を、非刺激細胞の濃度値を刺激細胞の濃度値から減算することにより算出した。

#### 【0414】

## 2.1.12 CRCBT-02-001の配列決定

メッセンジャーRNA (mRNA) を、RNeasy midi kit (Qiagen、ドイツ) を用いてCRCBT-02-001ハイブリドーマ細胞から単離した。RT-PCRをone-step RT-PCR kit (Qiagen) を用いて製造者の指示に従い実施した。簡潔に述べると、1 µgのmRNAをcDNA合成のテンプレートとして使用し、Zang et al、2005に記載のように縮重プライマーによりマウス可変軽鎖および重鎖を増幅した。

## 【0415】

軽鎖を、10 pMの5' - GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA - 3' (配列番号11) および5' - GGTGCATGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC - 3' (配列番号12)、それぞれ順方向および逆方向プライマーを用いて増幅した。重鎖を、等モル濃度 (10 pM最終濃度) の以下の順方向プライマー：

## 【表2】

MH3	5' - CTTCCGGAATTC CAGGTTACTCTGAAAGWGTSTG - 3' (配列番号13)
MH4	5' - CTTCCGGAATTC GAGGTCCARCTGCAACARTC - 3' (配列番号14)
MH5	5' - CTTCCGGAATTC CAGGTCCAAC TVCAGCARCC - 3' (配列番号15)
MH6	5' - CTTCCGGAATTC GAGGTGAASSTGGTGGAAATC - 3' (配列番号16)
MH7	5' - CTTCCGGAATTC GATGTGAACTTGGAAAGTGTC - 3' (配列番号17)

とIgG1特異的逆方向プライマー：IgG1：5' - ggaagatctATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC - 3' (配列番号18) を用いて増幅した。RT-PCR産物を1%アガロースゲル上で泳動させ、バンドを切り取り、Promega SVgel extraction (Promega、A9282) を用いてDNAを精製し、その後配列決定を行った。

## 【0416】

## 2.2 結果

ヒトPI16 (Abnova) に対するマウスポリクローナル抗体を、多色フローサイトメトリに用いた (図2)。この抗体は、およそ18%のリンパ球を染色し、その大部分がCD4陽性でもあった。PI16がTreg細胞により発現されることを確実にするため、細胞を、PI16抗体に加えてCD4、CD25およびFoxP3に対する抗体により染色した。図2に示すように、CD25<sup>bright</sup>PI16<sup>+</sup>細胞の50%超がまた、FoxP3を発現した。

## 【0417】

ポリクローナル抗体の使用による特異的事象を避けるため、ヒトPI16タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を産生した。ヒトおよびマウスアミノ酸配列の比較 (図1) により、免疫応答を誘発する十分な分化が存在する可能性があることが示された。

## 【0418】

10

20

30

40

50

マウスを、P I 1 6 を発現する L 9 2 9 細胞により免疫化し、フローサイトメトリを用いて抗体産生のためのスクリーニングを行った（図 4）。P I 1 6 発現 L 9 2 9 細胞に反応性の抗体を産生するマウスを、ハイブリドーマ産生のために選択した。

【 0 4 1 9 】

融合後、ハイブリドーマ培養上清を、フローサイトメトリを用いてスクリーニングして P I 1 6 発現 L 9 2 9 細胞への結合を検出した。図 5 に示すように、ハイブリドーマウェル P 1 G 5 ( P 1 5 G ) での細胞が、以前検査したポリクローナル抗体と同じ様式で C 3 + 細胞を染色する抗体を分泌した。

【 0 4 2 0 】

次いで、P 1 G 5 を単一細胞ソーティングにより再クローン化し、フローサイトメトリにより C D 4 + T 細胞への結合を検査した。図 6 に示すように、クローン P 1 G 5 - P 2 B 3 は、以前検査したポリクローナル抗体と同じ様式を示したが、一方でクローン P 1 G 5 - P 1 B 7 および P 1 G 5 - P 1 G 8 は同じ様式でなかった。P 1 G 5 - P 2 B 3 を増殖のため選択し、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 と称した。C R C B T - 0 2 - 0 0 1 はマウス I g G 1 であると判断される。

10

【 0 4 2 1 】

P I 1 6 発現 N I H 3 T 3 細胞を用いて C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により産生されたハイブリドーマ培養上清の反応性を確認し、以前検査した市販のポリクローナル抗体の反応性ちと比較した。図 7 に示すように、ポリクローナル抗体およびハイブリドーマ上清は、同じ染色様式であることが立証された。

20

【 0 4 2 2 】

C R C B T - 0 2 - 0 0 1 上清により検出された P I 1 6 の細胞内局在性を確認するため、非形質移入または安定的形質移入 N I H 3 T 3 細胞をチャンバースライドにて成長させた。図 8 に示すように C R C B T - 0 2 - 0 0 1 の上清が細胞膜に貯留し、細胞の表面染色を立証した。図 8 はまた、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 上清（図 8 A '）の形質移入細胞表面への染色が市販の抗 P I 1 6 ポリクローナル抗体（図 8 C '）より強い事を示す。

【 0 4 2 3 】

モノクローナル抗体が結合するタンパク質を決定するため、スロットプロットを実施した。図 9 は、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 上清および P I 1 6 ポリクローナル抗体（A b n o v a）の両方が P I 1 6 安定トランスフェクタント N I H 3 T 3 細胞（P I 1 6 形質移入細胞溶解物）と結合するが非トランスフェクタント N I H 3 T 3 細胞（非形質移入細胞溶解物）には結合しないことを実証するスロットプロットを示す。両抗体がまた、P I 1 6 安定トランスフェクタント N I H 3 T 3 細胞（P I 1 6 形質移入細胞上清）の上清に結合し、これは、形質移入細胞がその表面から P I 1 6 を分泌および放出することを示唆する。C R C B T - 0 2 - 0 0 1 は A b n o v a 社の組み換えタンパク質（A b n o v a 社由来組み換えタンパク質）に結合しない。これらの結果は、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 および P I 1 6 ポリクローナル抗体（A b n o v a）の両方が P I 1 6 と結合することを示唆する。C R C B T - 0 2 - 0 0 1 モノクローナル抗体が A b n o v a 社の（小麦胚芽無細胞系を用いて発現させた）組み換え P I 1 6 タンパク質に結合しないことは、モノクローナル抗体が、ポリクローナル抗体よりも例えば真核細胞などの細胞で産生された P I 1 6 に対してより選択的であることを示唆する。これらのデータは、モノクローナル抗体が天然哺乳類 P I 1 6 と反応性があり、モノクローナル抗体が天然哺乳類タンパク質、例えば天然ヒトタンパク質と同様のタンパク質を取得する方法で処理および/または組み合わせていない P I 1 6 との交差反応を制限していることを示す。

30

40

【 0 4 2 4 】

C R C B T - 0 2 - 0 0 1 上清が T r e g 細胞と結合することができることを確認するため、上清を用いて C D 4 + 細胞を C D 2 5 と C D 1 2 7 の共発現に関して解析した。図 1 0 に示すように、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 は、市販のポリクローナル抗体より多くの C D 4 + C D 2 5 <sup>h i</sup> C D 1 2 7 <sup>-</sup> ( T r e g ) 細胞を検出した。

50

## 【0425】

新鮮PBM C由来の様々なリンパ球サブセットをまた、C R C B T - 0 2 - 0 0 1上清の免疫反応性のために染色した。この染色は、P I 1 6発現細胞の大部分がC D 4陽性リンパ球(C D 4陽性サブセットのおよそ20% ; 図11B)であり、残余細胞はC D 8陽性T細胞(C D 8 - b r i g h tサブセットのおよそ10% ; 図11C)であることを示した。ごくわずかなC D 1 9陽性リンパ球B細胞)がC R C B T - 0 2 - 0 0 1上清(図11D)と反応する。

## 【0426】

C R C B T - 0 2 - 0 0 1上清免疫反応性C D 4<sup>+</sup>T細胞の大部分がメモリー表現型(C D 4 5 R A<sup>+</sup>) (図11E)をもち、大部分がまたC D 2 7を発現する(図11F)。

10

## 【0427】

C R C B T - 0 2 - 0 0 1上清免疫反応性C D 4<sup>+</sup>T細胞の大部分はC D 2 5を発現し(図11H)、C D 4<sup>+</sup>/C R C B T - 0 0 2 - 0 0 1上清陽性細胞の約4分の3がC D 1 2 7を発現する(図11I)。なかでもC D 4<sup>+</sup>/C R C B T - 0 0 2 - 0 0 1上清陽性細胞のおよそ20%がT r e g表現型C D 2 5<sup>+</sup>/C D 1 2 7<sup>-</sup>を発現する(図11J)。

## 【0428】

P I 1 6の発現をT r e g細胞および他のT<sub>H</sub>細胞によりさらに特性解析するために、末梢血単核細胞をC R C B T - 0 0 2 - 0 1モノクローナル抗体ならびにC D 4、C D 2 5およびC D 1 2 7に対する抗体で染色し、Seddikiら(2006年)のゲーティング戦略を用いてC D 2 5 - b r i g h t / C D 1 2 7 - d i m T r e gおよびC D 1 2 7陽性T h細胞サブセットを同定した(図12)。染色により、P I 1 6がC D 4陽性リンパ球のT r e gとT hサブセットの両方のうちごくわずかにより発現され、T r e gのより高い比率がP I 1 6を発現することが示される。

20

## 【0429】

さらなるP I 1 6陽性T r e g細胞の特性解析を、C D 4、C D 2 5、P I 1 6(C R C B T - 0 2 - 0 0 1)、C D 4 5 R AおよびC D 4 5 R Oに対するモノクローナル抗体によりリンパ球を染色することにより実施した。P I 1 6およびC D 2 5の両方を発現したC D 4陽性リンパ球の大部分がC D 4 5 R O陽性/C D 4 5 R A陰性「メモリー」表現型をもっていた(図13)。

30

## 【0430】

T r e gを転写因子F o x P 3の発現により特定する。C D 4、C D 2 5、P I 1 6(C R C B T - 0 2 - 0 0 1)およびF o x P 3に対する抗体はまた、P I 1 6の有無により特定したT r e gサブセットによるF o x P 3の発現を試験するものであった(図14)。F o x P 3発現の高いレベルが、P I 1 6陰性/C D 2 5陽性画分(M F Iが1062)と比較してP I 1 6陽性/C D 2 5陽性画分(個体群は1457の蛍光強度(M F I)を意味する)で検出された。P I 1 6陽性/C D 2 5陰性画分(M F Iが613)でのF o x P 3レベルは、P I 1 6陰性/C D 2 5陰性エフェクタ細胞画分(480のM F I)のバックグラウンドレベルと同様であった。

40

## 【0431】

ゲーティング戦略を基本的にはMiyaraら(2009年)に記載のように使用し、P I 1 6陽性メモリーT r e gがまたF o x P 3転写因子を発現することを示した(図15)。

## 【0432】

C D 4<sup>+</sup>C D 2 5<sup>+</sup>細胞をさらに、C R C B T - 0 2 - 0 0 1上清とT r e gサブセットマーカーとの共染色に関しフローサイトメトリにより解析した。この解析の結果を表2に示す。

【表 3】

表 2 : 図 1 4 に示される CD 2 5 と P I 1 6 ( C R C B T - 0 2 - 0 0 1 ) の共発現を用いた、同定 CD 4 陽性リンパ球サブセットによる T 細胞マーカーの各発現。表示する値は特定マーカーを発現する、各四分円内での細胞のパーセントである。

マーカー	CD 2 5 陽性 P I 1 6 陰性	CD 2 5 陽性 P I 1 6 陽性	CD 2 5 陰性 P I 1 6 陰性	CD 2 5 陰性 P I 1 6 陽性
アイソタイプ	0	1	0	0
CD 4 5 R A	3 4	1 0	8 6	1 9
CD 4 5 R O	6 9	9 6	1 4	9 2
CD 9 5	8 6	9 9	1 7	9 7
CD 3 9	1 0	2 3	1	1
CD 7 3	9	9	3	1 2
CD 4 4	9 9	9 9	9 9	9 9
CD 6 9	0	0	0	0
C C R 6	1 7	4 2	2	3 7
H L A D R	2 1	6 0	2	8

10

20

## 【 0 4 3 3 】

CD 4 5 R O、CD 4 5 R A、CD 3 9 および C C R 6 を用いた分別染色から、P I 1 6 陽性 T r e g 個体群が、両 P I 1 6 陰性 T r e g 個体群からおよび他の P I 1 6 陽性 T<sub>H</sub> 細胞から表現型上で区別可能なメモリー T r e g のサブセットであることが示される。

## 【 0 4 3 4 】

図 1 6 はさらに、メモリー T r e g 細胞に結合する C R C B T - 0 2 - 0 0 1 分泌抗体の機能を裏付ける。簡単には、CD 4<sup>+</sup> 細胞を C R C B T - 0 2 - 0 0 1 上清および CD 4 5 R A か CD 4 5 R O のいずれかに対する抗体で標識化した。CD 4 5 R A の染色は、メモリー細胞サブセット ( CD 4 5 R O<sup>+</sup> ) に属する CD 4 5 R A<sup>-</sup> 細胞によりメモリー細胞を天然細胞から識別するために広く使用されている。したがって、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 は、CD 4<sup>+</sup> CD 2 5<sup>+</sup> CD 4 5 R A<sup>-</sup> CD 4 5 R O<sup>+</sup> メモリー T r e g 細胞集団を同定するようだ。

30

## 【 0 4 3 5 】

C y t o m e t r i c B e a d A r r a y ( C B A ) を用いて、どのサイトカインが T 細胞レセプターを介した刺激の後に P I 1 6 陽性 T r e g により発現されかを決定した ( 図 1 7 )。これらの実験により、P I 1 6 陽性 T r e g 細胞のサイトカイン発現プロファイルが P I 1 6 陰性 T r e g 細胞と同じであり、P I 1 6 陽性 T<sub>H</sub> 細胞がその P I 1 6 陰性 T<sub>H</sub> 細胞と同じサイトカインを発現することが示される。

40

## 【 0 4 3 6 】

P I 1 6 陽性メモリー T r e g をさらに特性解析するため、P I 1 6 陽性メモリー T r e g による数種類のケモカインレセプターの発現を、P I 1 6 陰性メモリー T r e g と他の P I 1 6 陽性メモリー T<sub>H</sub> 細胞と比較した ( 表 3 参照 )。C C R 4 および C C R 6 ケモカインレセプターは、P I 1 6 陰性 T r e g または T<sub>H</sub> 画分のメモリー要素と比較してメモリー P I 1 6 陽性 T r e g とメモリー P I 1 6 陽性 T<sub>H</sub> 細胞のより高い比率により発現される ( 図 1 8 )。ケモカインレセプターの差次的発現は、T<sub>H</sub> 細胞サブセットの遊走を

50

予測する、またT<sub>H</sub>細胞の機能的サブセットを同定するために使用され得る。本明細書に提供されるデータにより、P I 1 6 陽性メモリーT<sub>re</sub>gにより発現されたケモカインレセプターのプロファイルが、P I 1 6 陰性メモリーT<sub>re</sub>gおよび他のP I 1 6 陽性T<sub>H</sub>細胞の両方と異なることが示される。C C R 4 およびC C R 6 などのケモカインレセプターの発現から、P I 1 6 陽性メモリーT<sub>re</sub>gが、T<sub>H</sub> 1 7 細胞が遊走し得る炎症部位と同じ部位に遊走し得ることが示される。

【表 4】

表 3 : 図 1 4 に示されるCD 2 5 とP I 1 6 (C R C B T - 0 2 - 0 0 1) の共発現を用いて、同定メモリーCD 4 陽性リンパ球サブセットによるケモカインレセプターの各発現であり、それぞれのメモリー画分がCD 4 5 R O の発現により同定された。表示する値は特定マーカーを発現する、各四分円内での細胞のパーセントである。

マーカー	メモリー CD 2 5 陽性 P I 1 6 陰性	メモリー CD 2 5 陽性 P I 1 6 陽性	メモリー CD 2 5 陰性 P I 1 6 陰性	メモリー CD 2 5 陰性 P I 1 6 陽性
アイソタイプ	0. 4	1. 5	0. 9	1. 2
C C R 4	2 6. 7	7 1. 8	1 1. 1	4 7. 6
C C R 5	2 9. 4	4 5. 9	2 2. 2	2 1. 3
C C R 6	2 3. 8	4 1. 7	2 2. 1	3 1. 6
C X C R 3	2 6. 2	2 9. 1	3 7. 8	3 4. 4
C X C R 4	3 4. 4	3 9. 4	4 2. 0	4 0. 4

【 0 4 3 7 】

図 1 9 に示すようにC D 2 5 の上方制御にもかかわらず、P I 1 6 に相当する上方制御は存在しない。

【 0 4 3 8 】

P B M C を一晩および3日間刺激した。C R C B T - 0 2 - 0 0 1 から分泌された精製抗体(無アジ化物)を培地に2 μ g / m l、5 μ g / m l および10 μ g / m l 添加するか、または細胞を固定した抗体と接触させて活性化マーカーC D 2 5 およびC D 6 9 のために染色した。細胞死を決定するために、細胞を7 A A D と共に15分間インキュベートし、その後回収してフローサイトメトリにより解析した。結果を表 4 および 5 に示す。

【表 5】

表 4 : 溶解性CRCBT-02-001の増殖および細胞生存への効果

溶解性CRCBT-02-001	一晚刺激			3日間刺激		
	7AAD+ (%)	CD2+ (%)	CD6+ (%)	7AAD+ (%)	CD2+ (%)	CD6+ (%)
培地のみ	11.4	16.4	12.5	22.3	20.2	24.4
IgG1対照	9.8	17.5	15.6	27.1	21.2	24.2
CD28/CD49d	8.9	14.3	9.1	20.8	20.2	23.1
2ug/ml CRCBT-02-001	5.4	17.7	9.9	23.1	22.8	26.6
5ug/ml CRCBT-02-001	6.8	17.4	11.2	22.5	22.6	24.8
10ug/ml CRCBT-02-001	8.8	18.6	12.2	23.3	21.1	25.3
無血清 CRCBT-02-001 s/n	10.8	19.4	12.1	37.3	30.5	28.4
CRCBT-02-001 s/n	6.6	18.3	20.4	83.9	57.9	45.8
SEB(o/n) resp. 抗CD3/CD28(3日間)	18.1	46.4	57.9	74.3	71.4	85.7

10

20

30

【表 6】

表 5 : 固定される CRCBT-02-001 の増殖および細胞生存への効果

固定される CRCBT-02-001	一晚刺激			3日間刺激		
	7AAD+ (%)	CD2+ (%)	CD6+ (%)	7AAD+ (%)	CD2+ (%)	CD6+ (%)
培地のみ	11.7	16.2	13.1	23.6	25.4	22.6
培地およびPBS	13.7	24.6	15.8	18.3	23.1	17.1
IgG1対照	10	19.1	14.4	19.4	22.4	20.3
CD28/CD49d	25.8	23.7	17.3	16.5	22.7	16.3
2ug/ml CRCBT-02-001	7.8	18.8	16.6	14.9	15.3	16.3
5ug/ml CRCBT-02-001	14.4	24.5	15.9	11.9	22.1	16.7
10ug/ml CRCBT-02-001	9.9	20.3	13.5	13.5	22.4	15.7
無血清 CRCBT-02-001 s/n	8.9	21.7	15.3	17.9	23.5	18.8
CRCBT-02-001 s/n	11.8	25.1	35.1	17.3	23.1	18.9
SEB (o/n) resp. CD3/CD28 (3日間)	45.1	57.3	74.8	33.7	65.3	74.3
新規SEB	35	54.3	77.8			

10

20

30

40

## 【0439】

表 3 および 4 に提示される結果は、CRCBT-02-001 は Treg 表現型をもつ細胞を、エフェクタ細胞非存在下で殺さないまた分化を起こさないことを示す。これは、この抗体または同抗体のエピトープに結合するタンパク質を使用して細胞に多大な悪影響をもたらすことなく Treg 細胞を単離するのに有用である。

## 【0440】

図 20 に示すように、CRCBT-02-001 により分泌される抗体は、刺激した PBMC を含む上清で PI16 を検出し、これは PI16 が刺激後すぐに放出または分泌され得ることを示唆する。CD4 細胞溶解物で検出された信号は存在しなかった。しかしながら、PI16 は CD4 細胞の 5% しかないので、この抽出物は PI16 の抽出のために

50

最も希釈しやすかった(1:100)。CRCBT-02-001は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>刺激および静止細胞溶解物にのみ結合し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞溶解物とは結合しない抗体を分泌した。CRCBT-02-001分泌抗体は、刺激したTreg(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup>)の上清でPI16を検出し、これはPI16がTreg細胞刺激後すぐに発散または分泌され得ることを示唆する。

#### 【0441】

CRCBT-02-001により分泌される抗体はまた、ヒトPI16に結合することが見出されているが、マウスPI16に検出可能に結合していなかった。

#### 【0442】

CRCBT-02-001の可変領域をコードする核酸配列およびそのコードアミノ酸が推測された。重鎖可変領域をコードする配列を配列番号配列番号7に記載し、またコードアミノ酸を配列番号8に記載する。軽鎖可変領域をコードする配列を配列番号配列番号9に記載し、またコードアミノ酸を配列番号10に記載する。図21では、CDRの配列を強調して示している。V<sub>H</sub>のCDRは、Komatsuら、(2003年)により公表されたAB089648.1との比較により見いだされた。

#### 【0443】

実施例3：CRCBT-02-001を用いて単離されたTregによる免疫応答の抑制

3.1.抑制試験のための新鮮な成人型TregおよびエフェクタTサブセットの単離  
RosetteSep CD4<sup>+</sup>T細胞濃縮キット(Stem Cell Technologies、Vancouver、カナダ)を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞をまず濃縮した後、軟膜からTreg細胞を単離した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>PI16<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>PI16<sup>-</sup>を、無菌条件下でFACSARIA IIセルソータを用いて基本的には実施例2に記載のように選別した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタ細胞を第2ドナー軟膜から単離し、magnetic-activated cell-sorting(MACS)ビーズ(Miltenyi Biotech)を用いて精製した。

#### 【0444】

3.1.2.ヒト臍帯nTreg細胞およびiTreg細胞の増殖

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞を新鮮臍帯血から抽出しInvitrogen Dynal Bead Regulatory T細胞キット(cat#113.63D)を用いて精製した。単離CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg細胞をDynal Bead Human T Expander CD3/CD28ビーズ(比率3:1)(cat#111.41D)および500U/mlのIL-2のX-Vivo15完全培地(Lonza cat#04-418Q)で7日間インキュベートした。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞を、Treg対照群を示す同じ条件下で増殖した。iTreg細胞を、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T細胞をCD3/CD28ビーズ(3:1ビーズ細胞比)、10μM全トランスレチノイン酸(ATRA)(Sigma)を含有する500U/mlのIL-2および5ng/mlのTGF- $\beta$ によりインキュベートすることにより産生した。全Treg細胞サブセットを7日間増殖させた。7日目に、CD3/CD28ビーズを取り除き、細胞をさらに7日間、100U/mlのIL-2を含むX-Vivo15完全培地中で静止させた。

#### 【0445】

3.2 チミジン取り込み試験

増殖した臍帯血からのPI16<sup>+</sup>nTreg(CRCBT-02-001<sup>+</sup>)およびPI16<sup>-</sup>nTreg(CRCBT-02-001<sup>-</sup>)を、混合リンパ球反応(MLR)に対する抑制活性について試験した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタT細胞(およそ2x10<sup>4</sup>)を96ウェルプレートで培養し、1x10<sup>5</sup>照射された(30Gy)PBMC存在下で成長させた。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup>細胞を、基本的には実施例2に記載のような方法で単離した。細胞を1:1、2:1、4:1、8:1、16:1、32:1、64

10

20

30

40

50

: 1の比率で添加した。細胞を100 ng/mlの抗CD3 (OKT3)モノクローナル抗体 (e Bioscience)により活性化した。ウェルを4日目に<sup>3</sup>H-チミジンを用いて培養の最後の16時間パルス処理した。全時点を3連にて測定した。結果を1分あたりのシンチレーション計数で表した。図22Aは、増加した臍帯血からのチミジン試験がそれぞれエフェクタ細胞のPI-16<sup>+</sup>およびPI-16<sup>-</sup>nTregによる抑制を実証していることを示す。

#### 【0446】

図22Bに示すように、CRCBT-02-001により単離したPI16<sup>+</sup>Treg細胞は、PI-16<sup>-</sup>nTreg (n=6)と同じ有効性を伴い1:1から16:1の比率においてエフェクタ細胞の増殖を抑制する。

10

#### 【0447】

3.3 5、6-カルボキシフルオセイン二酢酸サクシニミジルエステル (CFSE) サプレッサー試験

混合リンパ球反応でのエフェクタ細胞の細胞分裂をまた、CFSE希釈 (Venkenら, 2009年)により解析した。エフェクタCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞を3.1に記載のように単離し、PBS中で1mM CFSE (Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州)により10分間、37で標識化した。2×10<sup>4</sup>CFSE標識エフェクタ細胞を、1:1、2:1、4:1、8:1、16:1、32:1のEffector/Treg比率でTreg細胞によりインキュベートした。エフェクタおよびTreg細胞を、96ウェルU-ボトムプレートにおいて、1×10<sup>5</sup>の照射された(30 Gy)PBM Cおよび100 ng/mlの抗CD3 (OKT3)モノクローナル抗体 (e Bioscience)により200 μlのcRPMI中でインキュベートした。共培養物をインキュベーションの5日後に採取し、レスポナー個体群の増殖を、フローサイトメトリにより、細胞分裂に伴うCFSE蛍光を希釈することにより可視化した。図23Aは増殖臍帯血Tregを用いた典型的なCFSEサプレッサー試験を提供する(PI-16<sup>+</sup>およびPI-16<sup>-</sup>)。6つの増殖臍帯血Treg (PI-16<sup>+</sup>/<sup>-</sup>)に関する累積結果を図23Bに示す。PI-16<sup>+</sup>およびPI-16<sup>-</sup>Tregは、正常培養条件下で、同等の効力で抑制する。

20

#### 【0448】

末梢血から新鮮単離PI16<sup>+</sup>発現Treg細胞は、刺激CD25<sup>-</sup>Tエフェクタ細胞の増殖を抑制することができた(図23C)。これらのデータは、CRCBT-02-001により単離したPI16<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>細胞がPI-16<sup>-</sup>Tregと同様な抑制能をもつ機能的Treg細胞であることを確認する。累積CFSEサプレッサー試験の新鮮な成人型nTreg (PI-16<sup>+</sup>およびPI-16<sup>-</sup>)における結果は、末梢血から単離したPI-16<sup>+</sup>Tregの抑制能力を確認する(n=4)(図23D)。正常細胞培養条件下での、成人血液からのPI-16<sup>+</sup>およびPI-16<sup>-</sup>Treg間の抑制能の違いはない。

30

#### 【0449】

3.4 CD154抑制試験

増殖臍帯血由来のPI16<sup>+</sup>nTreg (CRCBT-02-001<sup>+</sup>)およびPI16<sup>-</sup>nTreg (CRCBT-02-001<sup>-</sup>)サブセットを、基本的に実施例2に記載のように単離し、完全X-Vivo15培地 (Lonza)にて一晚、37で静止し、その後試験に添加した。新たに回収もしくは以前凍結乾燥したMACSまたはFACS単離CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞をこの試験でエフェクタ細胞として使用した。新たに回収したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタ細胞は回収の12時間以内に使用され、凍結乾燥したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタ細胞は、試験に使用する前に完全RPMI培地にて12~20時間、37で静止させる。

40

#### 【0450】

Treg細胞サブセットを、96ウェルプレートに1:1、2:1、4:1、8:1、16:1および32:1のEffector/Treg細胞比率でプレーティングした。

50

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタ細胞を $5 \times 10^4$ 細胞/50 $\mu$ l/ウェルでプレATINGし、Tregを $5 \times 10^4$ 細胞/50 $\mu$ l/ウェル(1:1)でプレATINGして、 $1.56 \times 10^3$ 細胞/50 $\mu$ l/ウェルまで連続的に希釈した。およそ $5 \times 10^4$ のTreg単独およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタ単独(刺激と非刺激の両方)の対照ウェルが含まれた。非刺激ウェルはCD154-APC(BDBiosciences(BD));1ウェルあたり5 $\mu$ l)を含有するカクテルを受け;刺激ウェルはCD154-APC(1ウェルあたり5 $\mu$ l)とCD3/CD28T細胞増殖刺激ピーズ(0.25:1ピーズ/細胞の比率)を含有するカクテルを受けた。培養物を暗所で7~8時間、37にてインキュベートした。インキュベーション後、96ウェルプレートを最大15時間冷蔵した後、染色した。

10

## 【0451】

細胞をCD4(FITC、BD)およびCD25(PECy7、BD)の表面発現のために、96ウェルプレート中室温で30分間染色し、次いで洗浄した。細胞を、BD FACSCantoフローサイトメータでの3色フローサイトメトリにより、CD154発現について解析した。解析の際、Treg(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>brigh</sup>t)細胞応答はCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞上にgatingすることにより除外される。T細胞活性の抑制を、刺激CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタ単独でのCD154発現とTregで共培養した刺激CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクタでのCD154発現とを比較することにより評価した(図24A)。

20

## 【0452】

図24Bに示すように、4つの増殖臍帯血試料からのCRCBT-02-001を用いて単離したTreg細胞はCD154発現を抑制することができ、このことはこれらの細胞がT細胞活性化を抑制することを示す。正常細胞培養条件下での、PI-16+およびPI-16-Treg間の抑制能の違いはない。

## 【0453】

実施例4:nTreg細胞およびiTreg細胞サブセットの特性解析

## 4.1 増殖nTregおよびiTregのフローサイトメトリ

nTregおよびiTreg細胞サブセット(基本的に3.1.2に記載)を、7日間の増殖と7日間の低レベルのIL-2での静止後に、多色フローサイトメトリおよびリアルタイムRT-PCRにより解析した。インピトロで産生したnTreg細胞およびiTreg細胞を基本的に実施例2に記載のようにFACS解析によりプロファイル化し、CD4、CD25、PI16およびFoxP3の発現を比較した。

30

## 【0454】

図25Aにより、nTreg細胞およびiTreg細胞の両方が高いレベルのCD4、CD25およびFoxP3を発現したが増殖nTregは増殖臍帯血iTregより著しくPI16を発現したことが示される。これは、7つの増殖臍帯血試料および7つの増殖成人血液試料において確認された(図25B、n=7、p<0.05)。

## 【0455】

## 4.2 増殖したnTregおよびiTreg定量的リアルタイムPCR

RNAをまた、セクション4.1に記載のTregサブセットより抽出し、リアルタイムRT-PCRを実施して、PI16およびFoxP3の相対的発現を調査した。総RNAをRNeasyキット(Qiagen、Hildenドイツ)を用いて抽出し、その後Quantitect Reverse Transcriptionキット(Qiagen)を用いてcDNAに変換した。半定量的RT-PCRをKAPA SYBR Fast Universal qPCRキット(KAPA Biosystems、Cambridge、マサチューセッツ州、米国)を用いて3連にて実施した。PCR反応をCorbettリアルタイムPCR装置(Rotorgene 6000)にて実施した。6つの個々の実験結果をRotor-Gene 6000ソフトウェアを用いて解析し、基準転写物、リボソームタンパク質L13a(RPL13a)の発現へ正規化した。

40

## 【0456】

50

RT-PCRプライマー配列は次のとおりであった；FoxP3順方向-5'-ATGGCCAGCGGATGAG-3'（配列番号19）および逆方向5'-GAAACA GCACATTCCCAGAGTTC-3'（配列番号20）；PI16順方向5'-GAGAATCTGTTCGCCATCACAA-3'（配列番号21）および逆方向5'-GAAACAGCACATTCCCAGAGTTTC-3'（配列番号22）；およびRPL13a順方向5'-CGAGGTTGGCTGGAAAGTACC-3'（配列番号23）および逆方向5'-CTTCTCGGCCTGTTTCCGTAG-3'（配列番号24）。

【0457】

図26Aは、PI16がnTreg細胞個体群にてメッセージレベルで発現することを確証する。nTregは、CD25<sup>-</sup>細胞と比較した場合に、Foxp3の2.2 log<sub>2</sub> foldの増加（p<0.01）およびPI-16の4.48 log<sub>2</sub> foldの増加（P<0.01）を表す（表6）。FOX P3およびPI16はnTregおよびiTregの両方に存在するが、FOX P3（p<0.001）およびPI16（p<0.05）は統計的にnTregよりiTregにおいてのほうが少ない（表7）。図26BはCRCBT-02-001を用いて単離した3つの新鮮単離成人末梢血PI16<sup>+</sup>およびPI16<sup>-</sup>Tregから抽出したRNAのRT-PCRデータを表す。このデータは、細胞表面PI16陰性である細胞中に成人血液Treg PI16が存在しないことを実証する。このことは、区別可能なTregのPI16<sup>+</sup>サブセットとCRCBT-02-001を用いて単離し得るPI16<sup>-</sup>サブセットが存在することを示唆し重要である。

【表7】

表6：iTregおよびnTregでのFOX P3およびPI16両方に関する単一試料t検定の結果。CD25<sup>-</sup>細胞に対するlog<sub>2</sub>倍率変化の推定値を提供する。調整済P値<0.01はダブルアスタリスク（\*\*）で表され、いっぽうで0.05より低い値はシングルアスタリスク（\*）で表される。

遺伝子	細胞型	推定値	t-統計値	d f	P値	adj. P値
FOX P3	i T r e g	1.28	4.35	5	0.0073	0.0146 *
	n T r e g	2.27	8.32	5	0.0004	0.0016 *
PI16	i T r e g	1.61	2.73	5	0.0410	0.0410 *
	n T r e g	4.48	7.62	5	0.0006	0.0019 *

10

20

30

40

【表 8】

表 7 : FOXP3 および PI16 両方に関する対応のある t 検定の結果。iTreg および nTreg 間の相対的レベルに関する推定差を提供する。P 値 < 0.001 はトリプルアスタリスク (\*\*\*) で表され、いっぽうで 0.05 より低い値はシングルアスタリスク (\*) で表される。

遺伝子	推定値	t-統計 値	d f	P 値	下限	上限	
FOXP3	-0.933	-7.25	47	0.0008	-1.34	-0.64	**
PI16	-2.8647	-3.65	59	0.0146	-4.87	-0.85	*

10

## 【0458】

4.3 RNA 調製および Custom TaqMan (登録商標) 低密度配列による発現解析

総 RNA を、増殖した臍帯血 CD25<sup>+</sup> ヘルパー T、nTreg、および iTreg 細胞 (7 日間の増殖プロトコル後に 7 日間静止させた) から単離した。総 RNA を QIAshredder および RNeasy mini キット (QIAGEN) を用いて単離した。総 RNA (2 µg) を High Capacity cDNA Transcription キット (Applied Biosystems) を用いて cDNA に変換した。各 cDNA 合成反応を TaqMan (登録商標) Universal PCR master mix と組み合わせて、Custom TaqMan (登録商標) 低密度配列 (Format 96b) の 4 つの試料液体リザーバに均等にロードした。増幅およびデータ収集を 900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で行った。ドナー適合対照ヘルパー T、nTreg、および iTreg 試料を同じアレイ上にロードした。Custom TaqMan (登録商標) 低密度配列を有効な TaqMan (登録商標) 遺伝子発現試験を用いて構築した。データを RPL13a への正規化を伴う CT 法を用いて解析した。比 (比) を細胞型間で算出し、T 検定を各遺伝子について実施した。

20

30

## 【0459】

nTreg と iTreg (図 27A)、および nTreg と CD25 (図 27B) との比較により、iTreg は FOXP3 を発現するが、PI16 または nTreg で PI16 と共発現する遺伝子のいくつかを発現しないが実証される。このことから、PI16 が nTreg には強力な代理マーカーであるが iTreg では代理マーカーではないことが示唆される。

40

## 【0460】

## 4.4 メチル化

ゲノム DNA を CRCBT-02-001 で標識化された新鮮な成人型 Treg から単離し、また基本的 to 実施例 2 に記載のように CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>PI16<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>PI16<sup>-</sup> 個体群に選別した。両個体群からの DNA を QIAamp DNA 血液 Mini キット (Qiagen) を用いて抽出し、次いで EpiTect Bisulfite キット (Qiagen) を用いてメチル化解析のための DNA の変換および清浄化を行った。Treg 細胞特異的脱メチル化領域 (TSDR) のための PCR を基本的に Baron ら (2007 年) に記載のように実施した。PCR プライマー

50

は以下のとおりである；順方向 - 5' - TGT TTTGGGGGTAGAGGATTT - 3' (配列番号28) および逆方向 - 5' - TATCACCCACCTAAACCAA - 3' (配列番号29)。PCR産物をゲル抽出し、Qiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)を用いて清浄化した。次いで、PCRフラグメントを、配列決定用TOPO-TAクローニングキット(Invitrogen)を用いてPCR4-TOPOへクローン化し、One Shot Top10 Chemically competent大腸菌中に形質転換し、アンピシリン寒天プレートにプレーティングした。コロニーを掻き取りアンピシリン含有Luria Broth培地にで一晩培養し、その後QuickLyse Mini-prepキット(Qiagen)を用いてDNAを単離した。プラスミドDNAを、M13universal順方向および逆方向プライマー、順方向5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3' (配列番号30) および逆方向5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3' (配列番号31)を適用して配列決定し、その後ABI Big Dye Terminator labelling (Applied Biosystems)、およびAB3730x1でのcapillary separationを行った。次いで、配列ファイルをCpGモチーフでGからAへの変更について解析した。

10

## 【0461】

図28に示すように、CRCBT-02-001を用いて単離したPI16<sup>+</sup>Tregは、FOXp3のイントロン1のTSDRで脱メチル化された表現型を示す。逆に、PI16発現に欠けるTregは部分的にメチル化された、誘導性Tregと一致した表現型である。

20

## 【0462】

実施例5： nTregおよびiTregサブセットの機能的特性解析とその後の炎症性サイトカインへの曝露

PI16の表面発現に基づき単離した増殖臍帯血Tregサブセットに、炎症性サイトカインへの曝露後の適合した比較対照個体群への機能的特徴の変化が見られるかを決定するために、CD25<sup>-</sup>レスポナー細胞の抗CD3 OKT3刺激を用いる混合白血球反応試験を用いた。チミジンサプレッサー試験を、実質的に実施例3に記載のように実施した。増殖臍帯血nTreg (PI16<sup>+</sup>およびPI16<sup>-</sup>) およびiTreg (PI16<sup>-</sup>)をフローサイトメトリにより単離し、次いで完全X-vivo培地に3日間静止させた。PI16<sup>+</sup>、PI16<sup>-</sup>nTregおよびPI16<sup>-</sup>iTregのサブグループを、10ng/mlのIL-1 および50ng/mlのIL-6中で3日間インキュベートした。細胞を十分に洗浄し、その後サプレッサー試験のために細胞を封入した。

30

## 【0463】

図29Aは、サプレッサー試験に添加前に3日間炎症性サイトカインIL1 およびIL6への曝露の場合と比較した、正常細胞培養条件下でのPI16<sup>+</sup>nTreg細胞によるエフェクタ細胞の抑制レベルを示す。PI16<sup>+</sup>nTregの機能をチミジンおよびCFSEサプレッサー試験により測定した。炎症性環境に曝露した時、抑制は変化せず、これらの細胞は抑制機能を維持した(n=2)。

## 【0464】

図29Bは、正常細胞培養条件下とIL1 およびIL6が存在する炎症状態下とでのPI16<sup>-</sup>nTregの抑制機能を、チミジンおよびCFSEサプレッサー試験を用いて比較している。PI16<sup>-</sup>nTregは炎症環境下で抑制能力を維持している(n=2)。

40

## 【0465】

図29Cは同様に、TGF- およびATRAと共に、実質的に実施例3.1.2に記載のように臍帯血から増殖したiTreg (PI16<sup>-</sup>)の機能特性解析を比較している。これらの細胞を、正常細胞培養条件下またはIL1 およびIL6が存在する炎症状態下のいずれかで、培地に3日間静止した。抑制機能を、チミジンおよびCFSEサプレッサー試験を用いて測定した。個体群と異なり、増殖したiTregは正常条件下では良

50

好に抑制したが、I L 1 および I L 6 への事前の曝露後では全ての抑制機能を失った。

【0466】

これらのデータは、P I 1 6 + T r e g 細胞は、通常炎症部位で見られる炎症性サイトカインへの曝露後であっても抑制活性を保持する強力な ( r o b u s t ) 細胞型であることを実証する。P I 1 6 - i T r e g 細胞は炎症性サイトカインの存在下では抑制活性を保持しない。

【0467】

実施例6： P I 1 6 + T r e g 細胞は H L A D R を発現する

C D 2 5 および P I 1 6 ( C R C B T - 0 2 - 0 0 1 ) の共発現を用いて特定されたメモリー C D 4 陽性細胞のサブセットによる、M H C クラス2タンパク質 H L A D R の発現を評価した。C D 4 陽性リンパ球のサブセットを図14に示すように特定し、各メモリー画分を C D 4 5 R O の発現により同定した。図30に提示したデータは、P I 1 6 陽性 T r e g 細胞 ( C D 2 5 陽性 P I 1 6 陽性 ) のより高い比率で C D 4 陽性 T 細胞と抗原提示細胞との抗原特異的同族相互作用に関連する H L A D R を発現することを示す。いかなる理論または作用機序に縛られるものではないが、T r e g 細胞による H L A D R の発現により、T r e g 細胞が C D 4 陽性 T 細胞および抗原提示細胞の正常な同族相互作用を妨げ、これによりエフェクタ T 細胞の正常な抗原特異的活性化を混乱させることができる。

10

【0468】

実施例7： 若年性特発性関節炎での P I 1 6 + T r e g 細胞

成人および若年性特発性関節炎 ( J I A ) に罹患する患者からの P B M C および J I A 患者からの滑液を T r e g カクテル ( C D 4 、 C D 2 5 、 C D 1 2 7 ) および C R C B T - 0 2 - 0 0 1 と共に染色し、F A C S A r i a I I で解析した。

20

【0469】

図31に示すように、適合血液試料および成人健常者ドナーからの血液試料と比較して、J I A に罹患している患者の滑液での T r e g で著しい増加がみられる。いっぽうで、適合血液試料および成人健常者ドナーからの血液試料と比較して、炎症関節での P I 1 6 陽性 T r e g で著しい減少がみられる。

【0470】

J I A 患者の炎症関節で T r e g 細胞の濃縮が見られるが、これらの T r e g は末梢での T r e g 細胞よりもきわめて少量が P I 1 6 を発現する。いかなる理論または作用機序に縛られるものではないが、本明細書に提示される結果は、健常者では P I 1 6 陽性 T r e g 細胞および T<sub>H</sub> 1 7 細胞が T<sub>H</sub> 1 7 免疫応答を制御する T r e g 細胞と同じ炎症部位に存在し得ることを示す。一方で、P I 1 6 陽性 T r e g 細胞での異常、または該細胞の不足または減少が自己免疫の一因となり得る。

30

【0471】

いかなる理論または作用機序に縛られるものではないが、本明細書に提示される結果は、健常者では P I 1 6 陽性 T r e g 細胞および T<sub>H</sub> 1 7 細胞が T<sub>H</sub> 1 7 免疫応答を制御する T r e g 細胞と同じ炎症部位に存在することを示す。一方で、P I 1 6 陽性 T r e g 細胞での異常が自己免疫の一因となり得る。

40

【0472】

実施例8： P I 1 6 + T r e g 細胞は C L A を発現する

規定のメモリー C D 4 + 細胞サブセットによる、C D 2 5 と P I 1 6 ( C R C B T - 0 2 - 0 0 1 ) との共発現を用いた皮膚リンパ球抗原 ( C L A ) 発現を評価した。図32に示されるデータから、より高い比率の P I 1 6 + T r e g 細胞 ( C D 2 5 + P I 1 6 + ) は細胞の皮膚への遊走を伴う C L A を発現する事が示される。いかなる理論または作用機序に縛られるものではないが、C L A の P I 1 6 + T r e g 細胞による発現により、これらの細胞が皮膚の炎症に遊走し得、一方で P I 1 6 - T r e g 細胞は C L A を発現せず、皮膚へ遊走し得ない。

【0473】

実施例9： C R C B T - 0 2 - 0 0 1 を用いて単離した P I 1 6 発現 T r e g 細胞の

50

## 走化性

## 9.1 走化性試験

組み換えヒト胸腺および活性化調節ケモカイン (CCL17、CCR4へのリガンド) および組み換えヒトマクロファージ炎症性タンパク質-3アルファ (CCL20、CCR6へのリガンド) を Raybiotech (Norcross, GA) より購入した。走化性試験を5- $\mu$ m孔 (Corning) をもつトランスウェルプレートを用いて実施した。ボトムウェルには培地単独、CCL17およびCCL20両方の100ng/mlのCCL17、100ng/mlのCCL20、または100ng/mlのいずれを入れた。末梢血単核球 (PBMC) および滑液単核細胞 (SFMC) を標準的な密度勾配遠心法により単離した。アッパーウェルに1ウェルあたり $1 \times 10^6$ の細胞をロードし、細胞を2時間、37°Cで遊走させた。走化性後、トップおよびボトム (遊走済み) ウェル中の細胞を回収し、CD4、CD25、CCR4、CCR6およびCRCBT-02-001に対するモノクローナル抗体で染色した。

10

## 【0474】

成人健常者PBMCからのCD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CRCBT-02-001<sup>+</sup>細胞のCCR4およびCCR6リガンド、CCL17およびCCL20に対する応答での遊走能力を、5 $\mu$ m孔Transwells (商標) を用いて検査した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CRCBT-02-001細胞はCCL17、CCL20および複合CCL17/CCL20リガンドへ遊走した (図33A)。

20

## 【0475】

若年性特発性関節炎に罹患した対象からのPI16<sup>+</sup>Tregの能力についても評価した。成人健常者と同様に、健常児からのCD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CRCBT-02-001<sup>+</sup>Treg細胞 (Normal Juvenile PBMC) およびJIA患者からのCD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CRCBT-02-001<sup>+</sup>Treg細胞はリガンドCCL17、CCL20およびCCL17およびCCL20に遊走することができた (図33B)。一方で、JIA患者からの滑液単核細胞 (SFMCs) はリガンド、CCL17、CCL20およびCCL17およびCCL20への遊走能力が見られなかった。

## 【0476】

上記提示したデータは、PI16 (CRCBT-02-001で検出する場合) はケモカインCCL17およびCCL20への遊走能力をもつ機能的安定なメモリーTregの区別可能なサブセットを同定し、したがって炎症誘発T<sub>H</sub>17細胞と同様の炎症部位である可能性が最も高いことを示す。

30

## 【0477】

JIAの場合、炎症関節をPI16<sup>+</sup>Treg細胞中で濃縮する (およびT<sub>H</sub>17細胞中で濃縮する) が、PI16<sup>+</sup>Treg細胞中では濃縮しない。

## 【0478】

実施例10: PI16に結合するCRCBT-02-001の確証

## 10.1 質量分析を用いたCRCBT-02-001と結合したタンパク質の同定

CRCBT-02-001を用いて精製したタンパク質を10mM DTTの50mM Tris (pH8.0) で1時間、60°Cで還元し、50mM ヨードアセトアミドで30分間、室温でアルキル化し、その後0.5 $\mu$ g トリプシンを添加し、タンパク質を2時間、40°Cで消化した。消化物をRPカラム (150mm x 150 $\mu$ m Vydac everest C18) 上に接種し、溶離液を2, 4% シアノ桂皮酸飽和溶液と共にMALDI-MS target plate上にスポットティングし、放置して乾燥させた。次いで試料を、質量分析法を用いて解析した。

40

## 【0479】

## 10.2 結果

質量分析法を用いてまた、CRCBT-02-001がPI16に結合することを確証した。CRCBT-02-001は、質量2926.31DaのPI16の配列からのペプチドの予測分子量に適合するイオン質量をもつペプチドを含むタンパク質に結合するこ

50

とが認められた。このペプチドはペプチド<sup>80</sup> GENLFAITDEGM DVPLAME EWHHER<sup>105</sup> (配列番号27)の予測質量に対応した。その後MALDI-t of / t of - MS解析でペプチド配列を確かめた。

#### 【0480】

実施例11: CRCBT-02-001と結合したエピトープのマッピング

##### 11.1 手法の概略:

##### エピトープの特性解析

まず、エピトープが立体(不連続、3-D構造に依存して)であるか線形(順次的なミノ酸)であるかを決定する。還元およびアルキル化(R&A)ステップを実施して、PI16組み換え抗原のジスルフィド結合構造を隠した。mAbが依然としてR&Aタンパク質に結合している場合、ジスルフィドは必要なく、エピトープがアミノ酸の線状伸長部内に大部分含まれている可能性が最も高い。

10

#### 【0481】

エピトープがグリコシル化されているか決定するため、PI16を糖タンパク質からアスパラギン結合高マンノースならびにハイブリッドオリゴ糖および複合オリゴ糖を切断する酵素ペプチド-N4-アセチル- -グルコサミニル(PNGase F)で処理した。mAbが脱グリコシル化されたPI16に結合する場合、エピトープはエピトープに結合する糖鎖構造に依らない。

#### 【0482】

mAbのPI16への最小結合領域を決定する。

20

ファージディスプレイ法を用いて、ヒトPI16 ORFを断片化しバクテリオファージ表面でフラグメントを発現させることにより遺伝子フラグメントライブラリ構築した。目的は、パニングと呼ばれる選択処理を用いて、ライブラリから抗体または「エピトープ」としても特定された最小結合断片に結合する遺伝子の最小結合部分を選択することである。

#### 【0483】

##### 11.2 方法:

溶解性 Fc-融合としてのヒトPI16の細胞外ドメインのクローニング(PI16-Fc)

ヒトPI16のシグナルペプチド(アミノ酸28~443)を差し引いた細胞外ドメインをコードするDNAを以下のプライマーを用いて増幅した:

30

PI16\_\_pFUSE\_\_EcoRVFnew: 5' ttgatatacactcacagatgaggagaaacgtttgat3' (配列番号25)

PI16\_\_pFUSE\_\_BglIIR: 5' aaagatctaccctgaaaaatacagggtttcatgaccagggcccgagttcagccct3' (配列番号26)。

#### 【0484】

5'EcoRV部位、3'tev-プロテアーゼ切断部位、およびBglII部位を添加した。次いで、増幅した配列をベクターpFUSE-hIgG1-Fc2(INVIVOGEN)中にクローニングし、結果としてN末端分泌ペプチド、PI16(アミノ酸28~443)、tevプロテアーゼ切断部位およびC末端ヒトFc部分を含む構築物を得た。この構築物をPI16-Fcと称する。

40

#### 【0485】

##### PI16-Fcの発現および精製

PI16-Fcをコードする作製構築物を、Lipofectamine2000(INVITROGEN)を用いて、製造者の指示に従ってHEK293T細胞に形質移入した。形質移入して16時間後で、培養培地を、FCSを含まない不完全DMEMに変更し、細胞を6日間、37、5%CO<sub>2</sub>で培養した。培養上清を0.22μmでの無菌濾過により回収した。上清を1/3体積の結合緩衝液(20mMリン酸ナトリウムpH7.0/150mM塩化ナトリウム)で希釈し、200μlのProteinA Seph

50

arose 6MBスラリー (GE Healthcare、蒸留水および結合緩衝液で前洗淨した) により、4 で16時間インキュベートした。混合物を空カラム (Econo、1.5 x 15 cm、BIO-RAD) に適用し、通過画分を廃棄した。3 x 15 ml 結合緩衝液で洗淨後、結合タンパク質の溶出を3 x 0.5 ml 0.1 M グリシン (pH 2.2) を添加することにより実施した。25 µl の1.5 M Tris (pH 11.0) / 0.5 ml 溶出画分をすぐに添加し、試料のpHを平衡に保った。クマシー染色前のSDS-PAGE解析により、タンパク質バンドが、質量スペクトル解析により標的PI16-Fc構築物であることを確かめた全ての溶出画分中に存在することが明らかになった。CRCBT-02-001 mAbは免疫検出試験にて得られた溶出画分のSDS-PAGEおよびウェスタン転写後に同じバンドを同様に認識した (データは非表示)。

10

## 【0486】

CRCBT-02-001の天然ならびに還元化およびアルキル化 (R & A) PI16-Fcへの結合

精製構築物PI16-Fcを用いて、ウェスタンブロット法解析によりCRCBT-02-001との結合を解析した。CRCBT-02001エピトープの性質を明らかにするため、精製PI16-Fc試料を、セクション8で先に述べたように還元しアルキル化した。天然およびR & A PI16試料を4~12% NuPAGEゲルを用いて分離し、クマシー brilliant blue染色で染色、またはPVDF膜上で電気ブロッティングした。膜を5%スキムミルクでブロッキングし、CRCBT-02-001を用いて抗体、続いてペルオキシダーゼ複合体化抗マウスまたは抗ヒト抗体およびECLを展開した。

20

## 【0487】

CRCBT-02-001の天然および脱グリコシル化されたPI16-Fcへの結合  
精製構築物PI16-Fcをまた使用してCRCBT-02-001への結合が任意のN-グリコシル化残基に依存的であるかどうかを解析した。この疑問に取り組むため、精製PI16-Fc試料をPNGase Fにより以下のように処理した: 8 µg PI16-Fcを80 ngのPNGase F (SIGMA) と共に最終体積300 µlのPBS中で35、3時間インキュベートした。同量のPI16-Fcを含有するが酵素は含まない対照試料を、同じ方法でインキュベートした。処理PNGase FとPI16-Fcの未処理試料との両方を用いて、並行してELISAプレート (Nunc Maxi sorp flat bottom 96ウェル) をコート (3 µg/mlのタンパク質濃度でPBSにて4、16時間) した。その後、コートしたウェルをPBSで2回洗淨し、5%ミルク粉末のPBS溶液にて2時間ブロッキングした (全ての洗淨およびブロッキングステップは、特に記載がない限り200 µlの緩衝液体積を含んだ)。非コート対照ウェルを、これに応じてブロッキングした。PBSで2回洗淨後、CRCBT-02-001溶液をウェルにPBS中5 µg/ml濃度で添加し、22、60分インキュベートした。非コート対照ウェルをCRCBT-02-001でこれに応じてインキュベートした。PBSで2回洗淨後、ウェルを抗マウス二次抗体 (HRP複合体化抗体、PBS中1:2000) と共にインキュベートした。処理/未処理PI16-Fc PNGaseでコートした対照ウェルを、精製融合タンパク質のC末端Fc部分に対する抗Fc抗体 (HRP複合体化抗体、PBS中1:4000) でプローブ化した。22 で1時間30分インキュベーションを行った後、ウェルをPBSで3回洗淨し、各ウェルを100 µlの基質溶液 (120 mMクエン酸、1 mM ABTS、0.03% 過酸化水素) でプローブ化し、22、30分間インキュベートした。その後、プレートをプレートリーダーで414 nmにて読み取った (4連で試料を処理)。

30

40

## 【0488】

バクテリオファージにディスプレイされたヒトPI16遺伝子フラグメントライブラリの構築およびパニング

本方法の変形 (Coleyら, 2001年) を用いてM13バクテリオファージ上で発現されるヒトPI16遺伝子フラグメントライブラリを調製した。ファージミドベクターpHEN

50

H 6 (Hoogenboomら, 1991年) は、ファージ粒子表面上の p I I I タンパク質と周辺質標的配列およびその機能遺伝子 I I I 配列間のマルチクローニング部位とをコードする M 1 3 バクテリオファージ遺伝子 I I I のコピーを含有する。d s D N A のマルチクローニング部位へのライゲーションの結果、遺伝子 I I I 産物に融合した挿入フラグメントが発現し、次いで M 1 3 バクテリオファージ表面上に融合タンパク質がディスプレイされる。

#### 【 0 4 8 9 】

ヒト P I 1 6 のコード領域に隣接するオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、鋳型として P I 1 6 O R F D N A を用いたポリメラーゼ連鎖反応により細胞外のリーディングフレームを増幅した。その後 P I 1 6 P C R 産物を D N a s e I で消化し、様々な時点の消化産物をアガロースゲル電気泳動で試験して最適反応条件を決定した。最も広いフラグメントサイズ分布を示す条件を選択し、5 μg の D N A を 2 0 n g の D N A s e I を用いて反応緩衝液 ( 5 0 m M T r i s , p H 7 . 6 , 1 0 m M M n C l 2 , 0 . 1 m g / m l B S A ) 中にて 2 時間消化した。反応を、E D T A を 5 0 m M の最終濃度になるまで添加することにより終了させ、7 0 、 1 0 分間で熱失活させた。消化した D N A を精製して末端を V e n t D N A ポリメラーゼを用いて平滑末端化した。5 . 4 μg の p H E N H 6 ファージミドベクターを P s t I で消化し、その後 V e n t D N A ポリメラーゼを用いて平滑末端化した。ベクターの再環状化を避けるため、アルカリホスファターゼ ( C I P ) で処理した。次いで、ランダム消化物により産生した平滑末端化した P I 1 6 遺伝子フラグメントを、1 : 9 の比率で挿入するベクターを用いて調製 p H E N H 6 ベクター中にライゲートした。ライゲート産物を W i z a r d ( 登録商標 ) S V G e l および P C R C l e a n - U p S y s t e m ( P R O M E G A ) を用いて精製し、電気穿孔法により E . c o l i T G 1 コンピテント細胞 ( S t r a t a g e n e ) に形質転換した。

10

20

#### 【 0 4 9 0 】

形質転換細菌細胞を数回希釈して、遺伝子ライブラリサイズを約  $1 \times 10^7$  個体クローンであると推定した。一方向性のクローニングのため、およそ 6 クローン中 1 つがフレーム内にあり ( 4 0 % ) 、ワークライブラリのおよそのサイズは  $1 \times 10^6$  であると推定された。ライブラリでのフラグメントサイズの多様性をポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) により試験し、個体クローンの配列決定を行った。配列の包含はランダムであると思われた。

30

#### 【 0 4 9 1 】

ライブラリグリセロールストックを 2 0 0 m l の 2 Y T 培地にて増幅し、実質的に Coley ら, 2001 年に記載されるようにファージ粒子をヘルパーファージによりレスキューした。パニングの 3 つのラウンドを、イムノチューブ ( N U N C m a x i s o r p ) を 1 0 μg / m l の m A b C R C - B T - 0 2 - 0 0 1 で一晚、4 でコーティングすることにより実施した。チューブを、5 % スキムミルク粉末を含む P B S でブロッキングし、ライブラリ (  $10^{11}$  ファージミド粒子 ) を m A b に結合させた。1 時間後、チューブを P B S で洗浄し、m A b に結合していないファージを取り除き、付着ファージを 0 . 1 M グリシン ( p H 2 . 2 ) で溶出し、1 . 5 M T R I S 緩衝液で中和させた。溶出ファージを T G 1 大腸菌細胞中で再感染させ、レスキューし、増幅し、パニングの次のラウンドのために実質的に Coley ら, 2001 年に記載のように P E G 沈殿を行った。パニングの第 2 ラウンドのために、P B S 含有 0 . 1 % T W E E N 2 0 ( P B S T ) による 2 回の洗浄を行い、その後 2 回の P B S による洗浄、およびラウンド 3 にて 2 回の P B S T による洗浄を追加した。C R C - B T - 0 2 - 0 0 1 m A b に結合する P I 1 6 のフラグメントの同一性を明らかにするため、ラウンド 3 からのクローンを D N A 配列決定し、パニングのより初期のラウンドとクローンを比較した。

40

#### 【 0 4 9 2 】

遺伝子フラグメントの結合がファージ外で生じるかを決定するため、R 3 4 および R 3 7 の重複領域からなるピオチン化ペプチドを合成した ( G L B i o c h e m , 中国 ) ( 配列番号 3 9 ) 。ペプチドを P B S 中で可溶化し、n e u t r A v i d i n ( P i e

50

rice) で前コーティングしたマイクロ力価プレートと結合させた。ウェルを洗浄し、モノクローナル抗体CRCBT-02-001をペプチドおよび対照ペプチドとカップリングしたウェルに添加する。対照として、別のアイソタイプコントロール抗体(IC)をペプチドでコートしたウェルに添加した。抗マウスHRPを用いて結合抗体を検出し、TMB基質を用いてELISAを展開した。

【0493】

11.3 結果

PI16のCRCBT-02-001エピトープはジスルフィド結合の有無に依存する。

CRCBT-02-001 mAbは結合のためにPI16抗原内にジスルフィド結合(3D構造)の存在が必要であることを評価するため、ヒトPI16-Fcの還元およびアルキル化を行った。

【0494】

図34A~Cのデータは、CRCBT-02-001 mAbは天然PI16に結合するがR&A PI16には結合しないことを説明している。図34A~Cは組み換えタンパク質PI16-FcのFc部分が検出され得ることを確認し、これはPI16の完全性がR&A後に保持されていることを確認している。図34A~CはELISA、SDS PAGEゲル、およびウエスタンブロット法が、CRCBT-02-001はR&A PI16に結合しないことを確認する。

【0495】

CRCBT-02-001の結合は抗原のN-グリコシル化状態と無関係である

アスパラギン結合型糖鎖構造を除去するための、PI16-FcのPNGase Fによる脱グリコシル化は、CRCBT-02-001の結合への影響を測定可能に有していなかった。対照抗体(抗ヒトFc)は融合タンパク質のFc部分が認められる(図35)。このことはCRCBT-02-001のエピトープが抗原のN-グリコシル化状態に依存していないことを示す。

【0496】

PNGase F処理および未処理PI16-Fcの両方をSDS PAGEおよびWestern transferにより解析した。PNGase F処理後のPI16-Fcに関し分子量の明確な変化が認められた(マイナス約5kDa)(データ非表示)。

【0497】

エピトープを狭小化したPI16に結合するCRCBT-02-001の特性解析

精製PI16-Fcは試料の熱処理後に区別可能な分解産物を示していた(図36)。SDS-PAGEを用いて解析しCRCBT-02-001で免疫修飾される際、PI16-Fcのフラグメントは、約35kDaの分子量の抗体を認めた。使用したタンパク質構築物でのPI16の細胞外ドメインに融合されるC末端Fcタグに対する対照抗体抗Fcは、記載した分解産物といかなる結合も示さなかった(データは非表示)。

【0498】

試料をSDS-PAGEに処し、クマシー染色後、対応するタンパク質バンドをゲルから切り取った。トリプシンを含むゲル断片のゲル中消化後、抽出したトリプシンペプチドを解析し、PI16のN末端CAPドメインに属するペプチドを、MALDI-tof/tof-MS法を用いて配列決定した: PI16 アミノ酸59~68(配列: WDEELAAFAK(配列番号32))。

【0499】

これらの結果は、PI16のN末端CAPドメインがmAb CRCBT-02-001の実際の結合部位において関与していることを示す。

【0500】

ランダムなPI16フラグメントを発現するファージライブラリの産生

PI16(アミノ酸28~443)細胞外ドメインのコード領域を増幅し、DNase Iで消化した。1200から100bp間のフラグメントをもたらす条件を用いてファ

10

20

30

40

50

ージミドベクター p H E N H 6 中にクローン化した P I 1 6 遺伝子フラグメント ( 図 3 7 ) の混合物を産生し、遺伝子フラグメントライブラリを作製した。無作為に選択したクローンのいくつかは、遺伝子フラグメントの広範囲の分布を示した ( 図 3 7 ) 。

【 0 5 0 1 】

m A b C R C - B T - 0 2 - 0 0 1 での P I 1 6 遺伝子フラグメントライブラリのパニング

3 ラウンドのパニングを実施して m A b C R C - B T - 0 2 - 0 0 1 に結合した P I 1 6 の遺伝子フラグメントを選択した。P I 1 6 遺伝子フラグメントクローンの m A b への結合性を E L I S A により解析し、その結果を図 3 8 A に示す。ラウンド 3 ( R 3 4、7、10、12 & 15 ) で選択された、抗 P I 1 6 m A b に強力に結合する 5 つのクローンは E L I S A 高シグナルを示し、一方でラウンド 2 およびラウンド 0 での非クローンは m A b と結合した。これらの配列は、フレーム外、図 4 0 で示される配列データの概略外であり得る。図 3 8 B に示す 9 E 1 0 または抗 m y c シグナルは、m y c タグが遺伝子フラグメントの C 末端 ( 遺伝子 I I I の N 末端 ) に存在するため、ファージの相対量を反映している。抗 m y c 抗体への高い結合シグナルが、ファージ表面で良好に発現する指標である ( 図 3 8 B ) 。フラグメントのなかには、陽性抗 M y c シグナルに示されるファージ上で発現するが抗 P I 1 6 m A b には結合しないものもあった。

10

【 0 5 0 2 】

個々のクローンをラウンド 3 にて選択し、P C R を行い、遺伝子フラグメントを配列決定した。パニングしていないライブラリ ( ラウンド 0 ) およびラウンド 1 において、フラグメントサイズの広範囲の広がりが存在した一方でラウンド 3 ではフラグメントの多くがごく小さいサイズであった ( 図 3 9 ) 。ラウンド 3 選択 P I 1 6 遺伝子フラグメントの配列同一性を図 4 0 に示す。これらのフラグメントは C R C B T - 0 1 - 0 0 1 の最小結合領域を示す P I 1 6 配列に重複し、このことは、この領域が、抗体が結合する P I 1 6 のエピトープを形成することを示す。

20

【 0 5 0 3 】

遺伝子フラグメントライブラリからの C R C B T - 0 2 - 0 0 1 結合性クローンの重複配列を図 4 0 C の下線部に示す。

【 0 5 0 4 】

上記提示したデータにより、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 に関するエピトープは分子内ジスルフィド結合の有無に依存的であるが、N 結合炭水化物に依存的でないことが示される。本データは、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 に関するエピトープは N 末端 C A P ドメインとファージディスプレイにより同定された短配列、R W D E E L A A F A K A Y A R Q ( 配列番号 3 8 ) に配置されている ( いずれかがエピトープを含むまたは含有する ) ことを示唆する。

30

【 0 5 0 5 】

ファージディスプレイにより同定された最小結合領域はシステインまたはジスルフィド結合を含まない。エピトープはファージ外のジスルフィド結合に依存し得る可能性がある。しかしペプチド L H M R W D E E L A A F F A K A Y A R Q C V W G H N K E R - ビオチン ( 配列番号 3 9 ) が合成され、m A b C R C B T - 0 2 - 0 0 1 に結合することが E L I S A により示された ( 図 4 1 ) 。このペプチドは同定された最小結合領域含む ( 下線 ) 。このことは、m A b C R C B T - 0 2 - 0 0 1 が単離の際に P I 1 6 のこの領域に結合するが、全 P I 1 6 抗原中に存在する場合には同族エピトープと反応するために抗原中に存在するさらなる構成成分を必要とすることを実証する。

40

【 0 5 0 6 】

発明者らは、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 のエピトープが一次配列 R W D E E L A A F A K A Y A R Q 内に含まれ、また全 P I 1 6 抗原中に存在する場合にジスルフィド結合が完全であることにより m A b に接触容易性をもたらすことを結論付けている。

【 0 5 0 7 】

実施例 1 2 : C R C B T - 0 2 - 0 0 1 の親和性

50

2つの方法を比較してCRCBT-02-001の親和性を測定した。解析を、BIO-RAD Proteon XPR36 (商標)タンパク質相互作用アレイシステムを用いて、表面プラズモン共鳴に基づき実施した：

方法1：チップに直接抗原PI16-Fcをカップリングして分析物CRCBT-02-001 Fabの上に流す方法。

方法2：抗PI16 Mabを捕捉し、分析物としてのPI16-Fc上に流す抗マウス捕捉方法。

#### 【0508】

##### 12.1 方法

方法1：センサーチップにカップリングしたPI16-FcとCRCBT-02-001 (Fab)との相互作用 10

ProteOnセンサーチップ(GLC)を、0.2M N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)および0.05M スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(スルホ-NHS)の混合物をチップ(150 $\mu$ l、30 $\mu$ l/分で5分間)に流すことにより活性化した。組み換えPI16-Fcを、150 $\mu$ lの50 $\mu$ g/mL溶液を含む10mM 酢酸緩衝液(pH4.5)を30 $\mu$ l/分で流すことにより、垂直方向にチップにカップリングした。次いで、残余活性化カルボキシル基を、150 $\mu$ lの1M エタノールアミン-HCl(pH8.5)を30 $\mu$ l/分で流すことにより、非活性化した。PBS Tween20(0.005%)に希釈した抗PI16 Fabフラグメントを、次の濃度：50nM、25nM、12.5nM、6.25nMおよび3.125nMでの5つのチャンネルで、リガンドに水平方向に通過させた(100 $\mu$ l、100 $\mu$ l/分)接触時間60秒および解離時間600秒)。PBS Tween20(0.005%)のみを残余チャンネルに通過させた。結合しているセンサグラムを回収して、ラングミュア動態モデルを用いたProteOn Manager 2.1 XPR36ソフトウェアで解析し、データを適合し親和性定数(KD)を測定した。 20

#### 【0509】

方法2：CRCBT-02-001 Mabと抗マウス捕捉試薬を用いたPI16-Fcとの相互作用

proteOnセンサーチップ(GLM)を、0.2M EDCおよび0.05M sulpho-NHSの混合物をチップ(150 $\mu$ l、30 $\mu$ l/分で5分間)に流すことにより活性化した。次いで、ウサギ抗マウスIgG全分子(Sigma M-7023)を、150 $\mu$ lの50 $\mu$ g/mL溶液を含む10mM 酢酸緩衝液(pH4.5)を30 $\mu$ l/分で流すことにより、チップに垂直方向にカップリングした。次いで、残余カップリング部位を、150 $\mu$ lの1M エタノールアミン-HCl(pH8.5)を30 $\mu$ l/分で流すことにより、非活性化した。次いで、マウスモノクローナル抗PI16 IgGを流して、150 $\mu$ lの100 $\mu$ g/mL IgG、25 $\mu$ l/分でセンサーチップのシングルチャンネル上を平行方向に流すことによりカップリングした抗マウスIgG抗体により捕捉した。次いで、PBS Tween20(0.005%)に希釈した組み換えPI16-Fcを、次の濃度：50nM、25nM、12.5nM、6.25nMおよび3.125nMでの5つのチャンネルで、GLMセンサーチップに垂直方向に通過させた(150 $\mu$ l、25 $\mu$ l/分、接触時間240秒および解離時間1200秒)。PBS Tween20(0.005%)のみを残余チャンネルに通過させて、参照用とした。結合しているセンサグラムを回収して、ラングミュア動態モデルを用いたProteOn Manager 2.1 XPR36ソフトウェアで解析し、データを適合し親和性定数(KD)を測定した。 30 40

#### 【0510】

##### 12.2 結果

##### 方法1

このカップリング方法を、PI16-FcのGLCチップへのカップリングを最適化するための様々なpHを用いて実施した。最適カップリングpHは4.5であった。結合曲 50

線および解離曲線ならびに親和性測定を、図 4 2 および表 8 に示す P I 1 6 の 3 つの希釈により実施した。データは、全体的適合を用いたラングミュア動態モデルに良好に適合した（曲線のすべてが同時に適合した）。

【表 9】

表 8：解析したデータおよび動態測定に用いられたパラメータの概要。C h i 2 はラングミュアモデル（< 5 0 の値が良好なモデル適合度と考えられる）への最適な適合度の尺度である。

パラメータ	K a	K d	K D	C h i 2
単位	1 / M s	1 / s		R U
範囲	広範囲	広範囲	自動特定	
タイプ	適合	適合	適合	
動態－ラングミ ュア	2 . 9 7 E + 0 5	3 . 7 2 E - 0 4	1 . 2 5 E - 0 9	4 . 9 8

10

20

【 0 5 1 1 】

方法 2

公開された方法（Nahsholら，2008年）を用いて、P I 1 6 m a b の動態を抗マウス捕捉により測定した。これは比較的穏やかな方法、カップリング方法であり、結合曲線および解離曲線ならびに親和性測定を、P I 1 6 - F c の 4 種類の希釈で実施した（図 4 3 および表 9）。データは、全体的適合を用いたラングミュア動態モデルに良好に適合した（曲線のすべてが同時に適合した）。

【表 1 0】

表 9：解析したデータおよび動態測定に用いられたパラメータの概要。C h i 2 はラングミュアモデル（< 5 0 の値が良好なモデル適合度と考えられる）への最適な適合度の尺度である。

パラメータ	K a	K d	K D	C h i 2
単位	1 / M s	1 / s		R U
範囲	広範囲	広範囲	自動特定	
タイプ	適合	適合	適合	
動態－ラングミ ュア	5 . 8 2 E + 0 4	1 . 4 9 E - 0 4	2 . 5 6 E - 0 9	8 . 2 9

30

40

【 0 5 1 2 】

C R C B T - 0 2 - 0 0 1 の P I 1 6 - f c への親和性は方法 2 を用いて測定された。両方法を用いた親和性（K D）は同程度の 1 . 2 5 ~ 2 . 5 6 n M である。

【 0 5 1 3 】

実施例 1 3： G V H D の治療

50

骨髄移植を必要とする対象は放射線治療される。好適な時間につき、対象は骨髄移植または造血幹細胞の移植を受ける。検査患者では、移植片はさらに実施例 2 および 3 に記載のように単離した T r e g 細胞を含む。次いで、生存率を測定し、T r e g 細胞を受ける対象の生存率が伸びている場合は細胞が機能的であることを示す。

【 0 5 1 4 】

実施例 1 4 : 自己免疫疾患の治療

自己免疫疾患に罹患する対象に、実施例 2 および 3 に記載のように単離した精製 T r e g 細胞または担体単独を投与する。自己抗体、サイトカインのレベルおよび自己免疫性症状を測定する。症状の緩和および / または炎症性サイトカインの血清レベルの減少の検出が、単離 T r e g 細胞が自己免疫疾患を治療または予防し得ることが示す。

10

【 0 5 1 5 】

例示的な自己免疫疾患は、関節リュウマチである。この疾患の場合、対象に実施例 2 および 3 に記載のように単離した精製 T r e g 細胞または担体単独を投与する。抗コラーゲン抗体レベル、サイトカインおよび / または関節炎の症状を測定する。関節炎症状の緩和ならびに / または T N F - a l p h a および / もしくは I L - 6 などのサイトカインの血清レベルの減少の検出は、単離 T r e g 細胞が関節リュウマチを治療または予防し得ることが示す。

【 0 5 1 6 】

実施例 1 5 : 糖尿病治療

前糖尿病性の表現型に罹患する対象 ( 症候性 1 型得糖尿病、および好ましくは自己反応性 B および / または T 細胞で検出されるレベルではないが例えば耐糖能異常 ) を、実施例 2 および 3 に記載のように単離された精製 T r e g 細胞または担体単独で処理する。処理後、対象を糖尿病の症状、例えば血糖値の増加、インスリン反応異常、耐糖能異常、または自己抗体レベルなどについて評価する。糖尿病の 1 以上の症状の発症の防止または遅延は、単離 T r e g 細胞が自己免疫性糖尿病を治療し得ることの指標となる。

20

【 0 5 1 7 】

実施例 1 6 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体の可変領域のクローニングおよび配列決定

メッセンジャー R N A を、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 ハイブリドーマ細胞から、産生およびオリゴ - d T プライマーを用いて逆転写することにより調製し c D N A を作製する。別個の P C R 反応のいくつかを、リーダー配列、可変領域および下流配列のいくつかに結合し、これらの配列をコードする c D N A の増幅を容易にするプライマーにより実施する。P C R 単位複製配列をアガロースゲル上に分離する。単位複製配列をゲルから単離し、クローニングし、配列決定する。

30

【 0 5 1 8 】

実施例 1 7 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体の可変領域を含むキメラ抗体の作製

C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体の可変領域を、ヒト I g G 1 F c 領域と融合することにより全抗体に変換する。可変領域を実施例 1 または 1 6 に記載のクローニングベクターより P C R 増幅し、抗体配列の直前のリーダー配列により抗体発現ベクター内にインフレーションでクローン化する。ベクターでは、軽鎖および重鎖に関する全定常領域のゲノム D N A 配列がすでにベクターにて遺伝子操作されている。発現はヒトサイトメガロウイルス ( C M V ) 早期プロモーター、次いで S V 4 0 ポリアデニル化信号により促進される。可変領域のインフレーション融合により、全抗体の適切な発現が可能となる。設計により、マウス軽鎖および重鎖からのリーダー配列を、抗体オープンリーディングフレームの直前に含む。

40

【 0 5 1 9 】

組み合わせた軽鎖および重鎖プラスミド D N A または 1 : 1 の混合比の対応する軽鎖および重鎖プラスミド D N A の混合物のいずれかをリポフェクションにより C H O 細胞中に形質移入する。培養培地を採取して、ろ過し、低速 M i l l i p o r e C e n t r i c

50

on (登録商標)遠心分離濃縮器を用いて濃縮する。

【0520】

実施例18: CRCBT-02-001により分泌される抗体のヒト化

CRCBT-02-001により分泌される抗体のヒト化形態を、基本的に国際公開第92/22018号に記載のように作製する。簡単には、CRCBT-02-001により分泌される抗体と高い相同性を持つ配列を有するPI16ヒト抗体の結合親和性を保持するヒト化抗体を作製するために選択され、アクセプター軽鎖および重鎖ヒトフレームワークの両方を得る。

【0521】

本明細書で決定される配列を用いて、コンピュータプログラムABMODおよびENCAD (Levitt、1983年およびZilberら、1990年)にて各マウス抗体の可変領域モデルを構築する。このモデルを使用して、アミノ酸と潜在的に相互作用するほどCDRに近い各フレームワークでのアミノ酸を決定する。

【0522】

各ヒト化抗体を設計する際、各位置にて、アミノ酸は、以下の1つ以上のカテゴリ(1)~(4)に該当する場合を除いては、ヒトアクセプター配列でのアミノ酸と同様であるものを選択した:

カテゴリ1:アミノ酸位置がKabatらにより特定されたCDR内にある;

カテゴリ2:ヒトアクセプター免疫グロブリンのフレームワーク内でのアミノ酸が異常な場合(すなわち「まれ」であり、本明細書に使用される場合、アミノ酸がその位置で、代表的なデータバンクでのヒト重鎖(各軽鎖)V領域配列の約20%未満であるが通常約10%未満で生じることを示す)、またその位置でのドナーのアミノ酸がヒト配列に典型的なものである場合(すなわち本明細書に使用される場合「一般的」はアミノ酸が代表的なデータバンクでの配列の約25%超であるが通常約50%超で生じることを示す)、アクセプターよりむしろドナーアミノ酸が選択され得る;

カテゴリ3:ヒト化免疫グロブリン鎖の一次配列での3つのCDRのうち1以上とごく近接する位置において、アクセプターアミノ酸よりむしろドナーアミノ酸が選択され得る。

カテゴリ4:本来のドナー抗体の典型である3次元モデルがCDR外の特定のアミノ酸がCDRに近接し、またCDRでのアミノ酸と、水素結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用などにより良い確率の相互作用をもつ。これらのアミノ酸位置で、アクセプター免疫グロブリンアミノ酸よりむしろドナー免疫グロブリンアミノ酸が選択され得る。

【0523】

上記カテゴリのいずれかに該当するマウスドナー配列でのアミノ酸を用いる。

【0524】

ヒト化抗体をコードする遺伝子の構築のために、ヒト化重鎖および軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選択し、典型的にはマウス抗体鎖からのシグナルペプチドを含み、一般にマウス配列に見られるコドンを利用する。数種類の縮重コドンを変更して反応部位を作製するか、好ましくない部分を取り除く。ヌクレオチド配列はまた、免疫グロブリン遺伝子の典型的なものとしてスプライスドナーシグナルを含んでいた。重複する合成オリゴヌクレオチドから構築された各遺伝子。各可変ドメイン遺伝子について、交互ストランド上の2対の重複オリゴヌクレオチドは、全コード配列ならびにシグナルペプチドおよびそのスプライスドナーシグナルを包含するように合成される。二重鎖DNAフラグメントはKlenowまたはTaqポリメラーゼを用いてまたはオリゴヌクレオチドの各対からの配列を用いて合成され、制限酵素で消化され、pUC18ベクターにライゲートされ、また配列決定する。次いで、各々正確な2つのフラグメント半配列を発現ベクター中に適する方向でライゲートし、完全重鎖および軽鎖遺伝子を作製する。

【0525】

重鎖および軽鎖プラスミドを、リポフェクションによりCHO細胞内に形質移入させる。

【0526】

10

20

30

40

50

培養上清でのヒト抗体の産生を、捕捉試薬としての組み換え P I 1 6 または実施例 1 もしくは 2 に記載の F A C S を用いて E L I S A により試験することにより、クローンをスクリーニングし、抗体を最適に産生されたクローンから精製する。P r o t e i n A カラムに組織培養上清を通すことにより抗体を精製する。結合抗体を酸性溶出緩衝液により溶出し、該緩衝液は P D 1 0 カラム ( P h a r m a c i a ) を通過させることにより P B S に変換する。

【 0 5 2 7 】

次いで、対応する抗原を発現する細胞型へのヒト化抗体の結合性を、実施例 3 に記載のように検査する。

【 0 5 2 8 】

実施例 1 9 : ヒト化抗体の親和性成熟

実施例 1 8 に記載のヒト化抗体の可変重鎖および可変軽鎖をコードする D N A を、F a b ファージディスプレイベクターまたは s c F v ファージディスプレイベクターにてクローン化する。次いで、クローン D N A を、可変重鎖および軽鎖 C D R 3 領域 (各ライブラリは  $> 10^8$  機能多様性をもつ) にて無作為に突然変異する。ついで結果としてできた変異株を、標準的なファージディスプレイパニングプロトコル (例えばファージディスプレイ法 : A Laboratory Manual, 2001年, Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照) を用いて、P I 1 6 (実施例 2 に記載) を発現する細胞に対してパニングする。パニングの各後続周期 (続くラウンド) において標的細胞濃度を低下させることによりパニングのストリンジェンシーを効果的に上昇させ、これにより、各後続周期にてより増大した高い親和性ファージを濃縮する。ファージ E L I S A を一次試験として用いて、ファージ結合組み換え F a b s または s c F v の P I 1 6 発現細胞認識能力を測定する。

【 0 5 2 9 】

P I 1 6 発現細胞と結合することができるフラグメントを、発現、産生および特性解析のため、ヒトサブクラス I g G 1 の完全長抗体へ変換する。

【 0 5 3 0 】

実施例 2 0 : 競合的結合試験

C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により産生された抗体を蛍光標識で標識化し、キメラ抗体 (実施例 1 7)、ヒト化抗体 (実施例 1 8)、親和性成熟抗体 (実施例 1 9)、またはナイーブ完全ヒトファージディスプレイライブラリディスプレイ s c F v と 1 : 1 の割合で混合した。対照のため、標識 C R C B T - 0 2 - 0 0 1 を単独で使用した。

【 0 5 3 1 】

P I 1 6 を安定的に発現する (実施例 2) N I H 3 T 3 細胞のほぼ同等量が、9 4 ウェルプレートで培養される。細胞は、抗体の存在下で、結合する抗体ために十分な時間培養される。上清は単離され、細胞は洗浄される。細胞に結合したおよび / または上清での蛍光レベルが次いで測定される。

【 0 5 3 2 】

細胞に結合した蛍光レベルが減少する抗体および / または上清で蛍光性が増大する抗体は、C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体の結合を競合的に阻害すると考えられる。

【 0 5 3 3 】

任意の競合的ファージディスプレイ s c F v はヒトアイソタイプ I g G 1 完全抗体中にて遺伝子操作される。

【 0 5 3 4 】

実施例 2 1 : 免疫応答の誘発

対象に腫瘍細胞株、例えば N e u r o - 2 A または C T 2 6 結腸直腸癌細胞を投与する。細胞投与に続いてまたは投与時点で、対象に実施例 2 0 で同定された競合的抗体を投与する。あるいは、対象を、T r e g 細胞を捕捉する C R C B T - 0 2 - 0 0 1 により分泌される抗体を用いて白血球除去療法により治療する。対象のサブセットにもまた死滅癌細胞を投与する。腫瘍細胞に対する免疫応答をまた E L I S A および / または E L I S P O

10

20

30

40

50

Tを用いて測定する。抗体単独または抗体および細胞のワクチンで治療した対象と対比した、抗体治療なしで腫瘍細胞を投与したマウスでの生存率、腫瘍の存在、腫瘍サイズおよび/または腫瘍に対する免疫応答の程度を測定する。細胞および抗体を投与された、または抗体単独もしくは抗体/白血球除去療法に対比して白血球除去療法を受けたマウスでの、生存率または免疫応答のさらなる増加および/または腫瘍の存在またはサイズの減少により、治療がワクチン治療に対するより強力な応答を可能にすることを示す。

#### 【 0 5 3 5 】

##### 参考文献

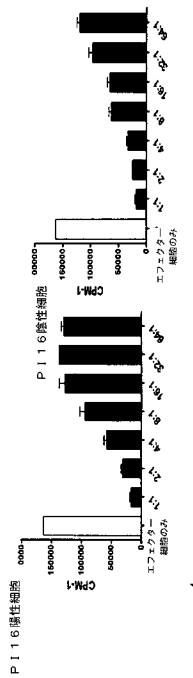
- Albini et al., *Cancer Research* 47: 3239-3245, 1987;
- Al-Lazikani et al., *J Mol Biol* 273, 927-948, 1997; 10
- Andersson-Engels et al, *Phys. Med. Biol*, 42:815-824, 1997;
- Asano et al, *J. Exp. Med.* 184:387-396, 1996;
- Ausubel et al.,(editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience(1988, including all updates until present);
- Baecher-Allan et al, *J. Immunol.* 167:1245-1253, 2001;
- Baron et al., *Eur. J. Immunol.*, 37: 2378-2389, 2007;
- Bassuny et al., *Immunogenetics* ,55: 149-156, 2003;
- Bendele J *Musculoskel Neuron Interact*; 1(4):377-385, 2001;
- Bengtsson et al., *BMC Bioinformatics* 7: 96, 2006;
- Bengtsson and Hossjer *BMC Bioinformatics* 7: 100, 2006; 20
- Bluestone et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 253, 2000;
- Bolstad et al., *Bioinformatics(Oxford, England)*19: 185-193, 2003;
- Bork et al., *J Mol. Biol.* 242, 309-320, 1994;
- Boyer et al., *Blood*, 103: 3428-3430, 2004;
- Brinkmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7538-7542, 1993;
- Brown(editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press(1991);
- Cao et al., *Arthritis Res. Ther.*, 6: R35-R46, 2004;
- Chen et al., *Nature*, 446:203-207, 2007;
- Chothia and Lesk *J. Mol Biol.* 196:901 -917, 1987; 30
- Chothia et al., *Nature* 342, 877-883, 1989;
- Cima, et al., *Biotechnol. Bioeng.* 38:145 1991;
- Cohen et al., *Hum. Gene Ther.* 10:2701-2707, 1999;
- Coley et al., *Protein Engineering* 14: 691-698, 2001;
- Coligan et al.,(editors) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons(including all updates until present);
- Crispin et al., *J. Autoimmun.*, 21: 273-276, 2003;
- Curiel et al., *Nat. Med.*, 10: 942-949, 2004;
- Dai et al., *J Bioinform Comput Biol* 1: 627-645, 2004;
- De Kleer et al., *J. Immunol.*, 172: 6435-6443, 2004; 40
- Dejaco et al., *Immunology*, 117: 289-300, 2005;
- Dooley and Flajnik, *Dev Comp Immunol.* 30:43-56, 2006;
- Estin et al, *J Natl. Cancer Instil* 81(6): 445-446, 1989;
- Foon et al, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294, 1994;
- Gefter et al, *Somatic Cell Genet.* 3, 231-236, 1977;
- Glover and Hames(editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press(1995 and 1996);
- Goforth et al., *Cancer Immunol Immunother.* 2008;
- Goodman et al., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990; 50

- Gregori et al., *J Immunol.* 167: 1945-1953, 2001;
- Harlow and Lane(editors) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory,(1988);
- Henttu and Vihko, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160(2): 903-910, 1989;
- Hochberg and Benjamini *Stat Med* 9: 811-818, 1990;
- Holliger et al., *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993;
- Hollinger and Hudson *Nature Biotechnology*, 23: 1126-1136, 2005;
- Hoogenboom and Winter *J Mol Biol*, 227:381, 1991;
- Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137, 1991
- Hu et al., *Cancer Res.*, 56: 3055-3061, 1996; 10
- Hudson and Kortt *J. Immunol. Methods*, 231: 177-189, 1999;
- Itoh et al, *Nature* 308: 19, 1986;
- Irizarry et al., *Biostatistics* 4: 249-264, 2003;
- Jakobovits et al., *Nature Biotechnology* 25, 1134 - 1143 2007;
- Jespers et al, *Bio/technology* 12:899-903, 1988;
- Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1989;
- Jones et al., *Cancer Immun.* 22;2:1, 2002;
- Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991;
- Kamarch, *Methods Enzymol*, 151:150-165, 1987; 20
- Kanai et al., *Inflamm Bowel Dis.*, 12: 89-99, 2006;
- Kerbel *Cancer Metastasis.* 17: 301-304, 1998;
- Kingsley et al, *J. Immunol.* 168:1080, 2002;
- Koenecke et al., *Eur J Immunol.* 39):3091-3096, 2009
- Kohler and Milstein, *Nature* 256, 495-497, 1975;
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519, 1976;
- Komatsu et al., *J Immunol Methods.* 272:161-175, 2003;
- Kruif and Logtenberg *J. Biol. Chem.*, 271: 7630-7634, 1996;
- Kumar et al, *Immuno. Letters* 65, 153-159, 1999;
- Largaespada et al, *J. Immunol. Methods.* 197(1-2), 85-95, 1996; 30
- Le Franc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77, 2003;
- Levitt, *J. Mol. Biol.* 168: 595, 1983;
- Lonberg et al., *Nature* 368(1994): 856-859;
- Lonberg, N. "Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies." *Handbook of Experimental Pharmacology* 113(1994): 49-101;
- Liu et al., *Scand. J. Immunol.*, 59: 198-202, 2004;
- Livingston et al., , *J Clin. Oncol.* 12: 1036-1044, 1994;
- Longhi et al., *J. Hepatol.*, 41: 31-37, 2004;
- Lukacs et al., *J. Exp. Med.*, 194: 551-555, 2001;
- Macardle and Bailey *Cell Biology: A Laboratory Handbook. Chapter 57: Preparation of Monoclonal Antibodies.* 2006; 40
- Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991;
- Mavrangelos et al., *J Immunol Methods.* 289:169-178 2004;
- McHugh et al., *J. Immunol.*, 168: 5979-5983, 2002;
- Miltenyi et al., *Cytometry* 11:231-238, 1990;
- Miyara et al., *Immunity* 30:899-911, 2009;
- Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci USA* 81:6851-6855, 1984;
- Mottet et al., *J. Immunol.*, 170: 3939-3943, 2003;
- Muller et al., *BioTechniques* 32: 1372-1374, 1376, 1378-1379, 2002;
- Nakamura et al, *J. Exp. Med.* 194:629-644, 2001; 50

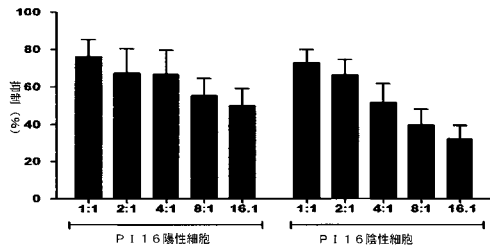
- Nahshol et al., *Anal. Biochem.* 383: 52-60, 2008;
- Natali et al, *Cancer* 59: 55-63, 1987;
- Novellino et al., *Cancer Immunol Immunother.* 54(3):187-207, 2005;
- Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons(1984);
- Perez and Walker, *J. Immunol.* 142: 3662-3667, 1990;
- Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188, 1992;
- Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer Verlag, New York, pp. 269-315, 1994;
- Presta *Curr Op Struct Biol*, 2:593-59, 1992;
- Price *Prog. Clin. Biol. Res.*, 354A: 237-255, 1990; 10
- Queen et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029 10033, 1989;
- Ragnhammar et al, *Int. J. Cancer* 53: 751-758, 1993;
- Ramanujam et al, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48:1034-1041, 2001 ;
- Reeves et al., *Biochem J* 385: 105-114, 2005;
- Reff et al, *Blood* 83: 435-445, 1994;
- Repush, *Invasion Metastasis.* 9:192-208, 1989;
- Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988;
- Robb et al., *J Exp Med* 154: 1455-1474, 1981;
- Roux et al., *J. Immunol.* 161:4083, 1998; 20
- Sakaguchi et al., *Nature*, 426: 454-460, 1995;
- Sakaguchi et al, *Immunol. Rev.* 182:18- 32, 2001;
- Saleh et al, *J.Immunol.*, 151, 3390-3398, 1993;
- Salomon et al, *Immunity* 12:431-440, 2000;
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989);
- Seddiki et al., *J Exp Med* 203:1693-1700, 2006;
- Shalaby et al, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225, 1992;
- Shao et al., *Mol Immunol.* 44:656-65, 2007;
- Shevach, *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-449, 2000; 30
- Shevach, *Nature Rev. Immunol* 2:389, 2002;
- Skerra et al, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262, 1993;
- Smyth et al., *Bioinformatics(Oxford, England)*21: 2067-2075, 2005;
- Stephens et al, *Eur. J. Immunol.* 31:1247-1254, 2001;
- Suri-Payer et al, *J. Immunol.* 157:1799-1805, 1996;
- Suri-Payer et al., *J. Immunol.*, 160: 1212-1218, 1998;
- Taams et al, *Eur. J. Immunol.* 31:1122-1131, 2001;
- Tang et al., *J. Exp. Med.*, 199: 1455-1465, 2004;
- Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727, 2000;
- Trenado et al., *J. Clin.Invest.*, 112: 1688-1696, 2002; 40
- Vacanti, et al., *J. Ped. Surg.* 23:3-9 1988;
- Vacanti, et al., *Plast. Reconstr. Surg.* 88:753-9 1991;
- Van der Sluis et al., *Gastroenterology* 131: 117-129, 2006;
- Van Maurik *J. Immunol.* 169: 5401-5404, 2002;
- Venken et al., *J. Immunol. Methods*, 322: 1-11, 2007;
- Vijayasardahl et al, *J Exp. Med.* 171(4): 1375-1380, 1990;
- Wang et al., *Immunity* 20: 107-118, 2004;
- Wang et al., *J Clin Invest.* 118(7): 2629-2639, 2008;
- Wettenhall and Smyth *Bioinformatics(Oxford, England)*20: 3705-3706, 2004;
- Willerford et al, *Immunity* 3:521-530, 1995; 50



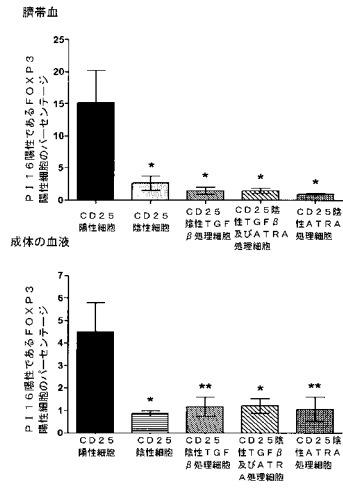
【図 2 2 A】



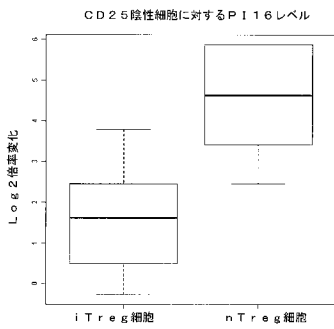
【図 2 2 B】



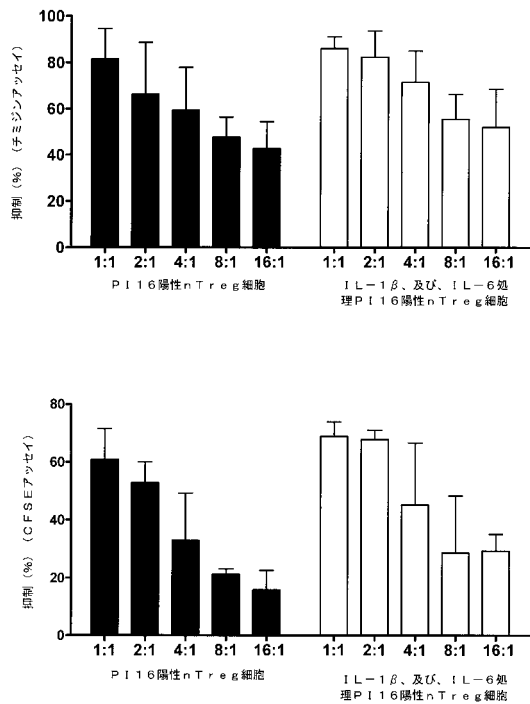
【図 2 5 B】



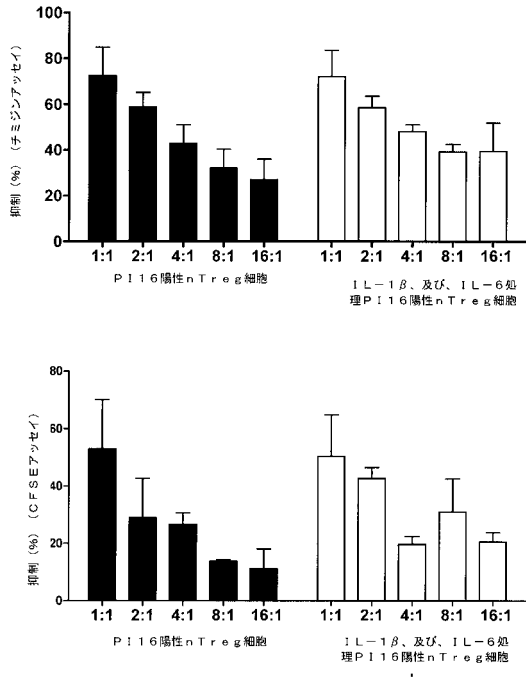
【図 2 6 A】



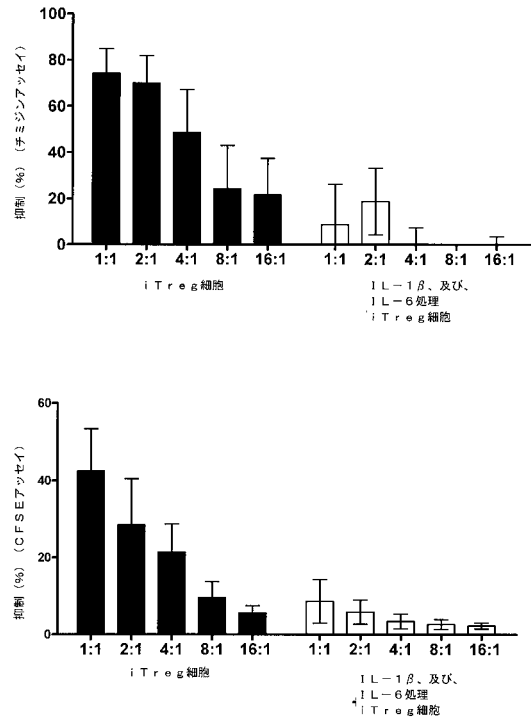
【図 2 9 A】



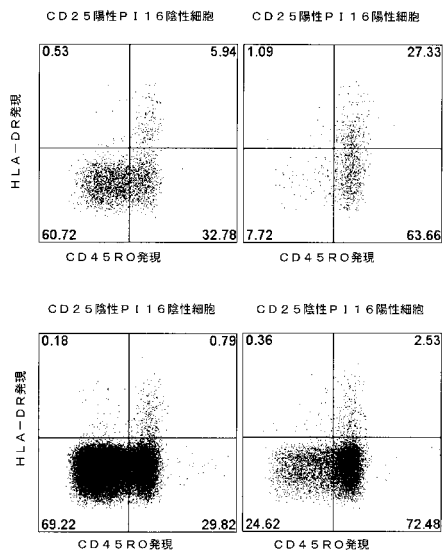
【図 29 B】



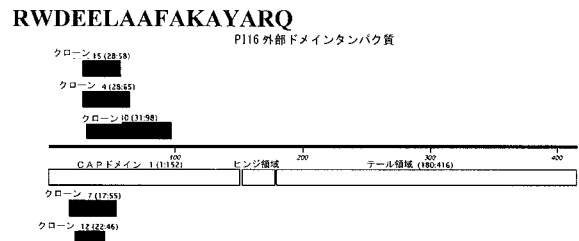
【図 29 C】



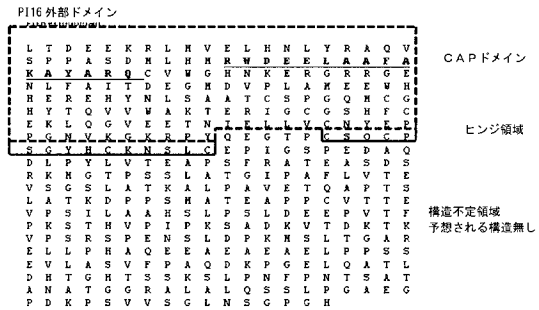
【図 30】



【図 40 B】

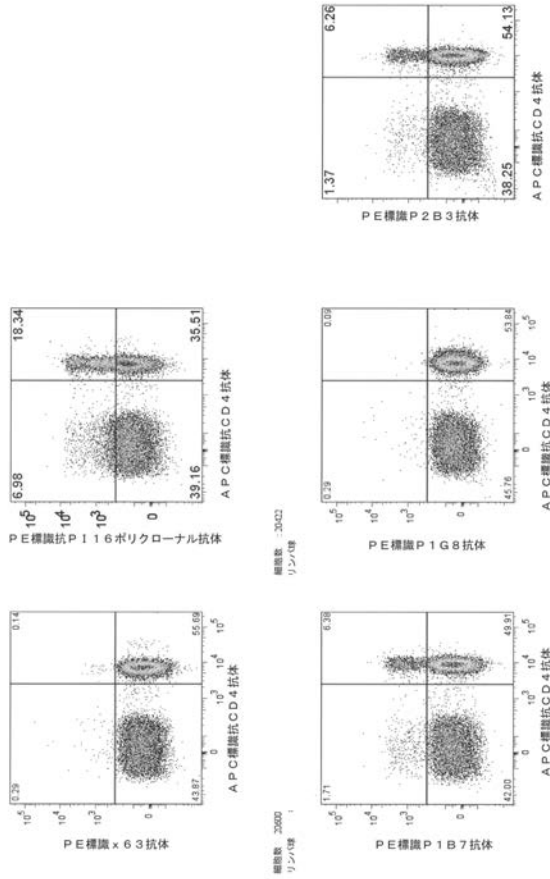


【図 40 C】

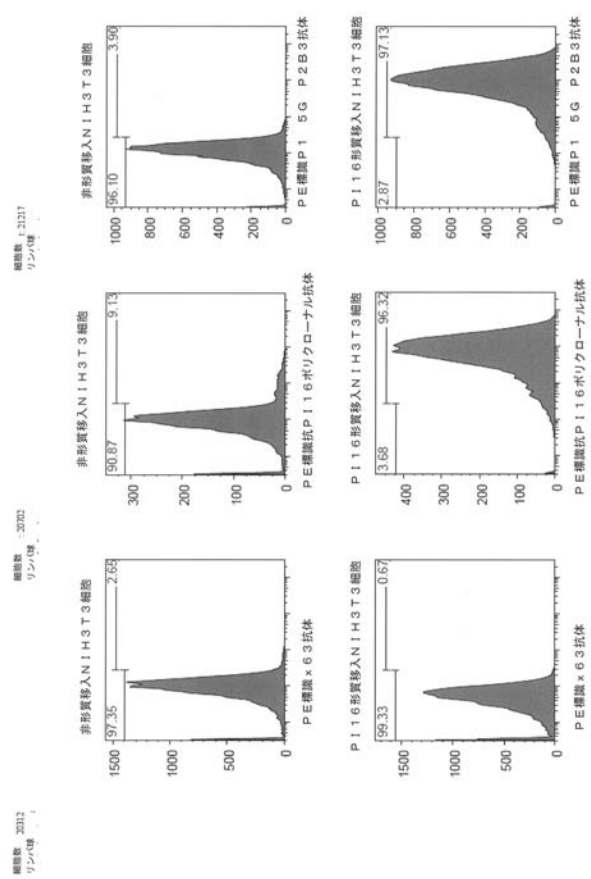




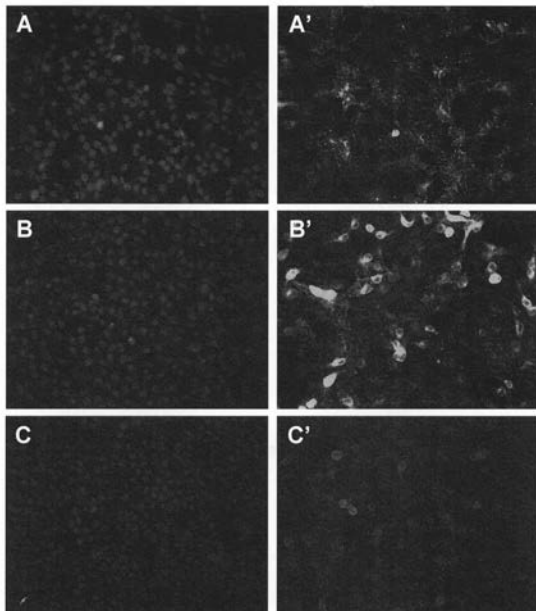
【 図 6 】



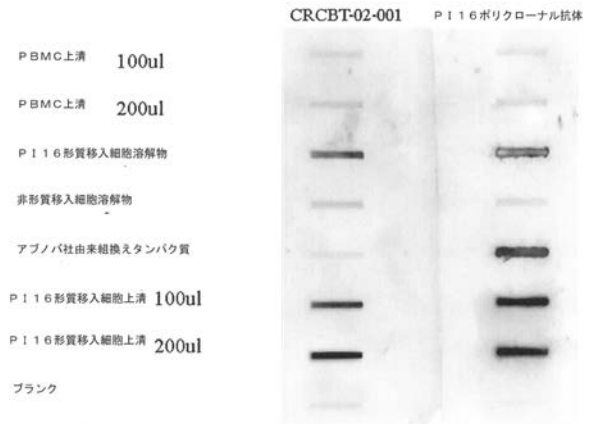
【 図 7 】



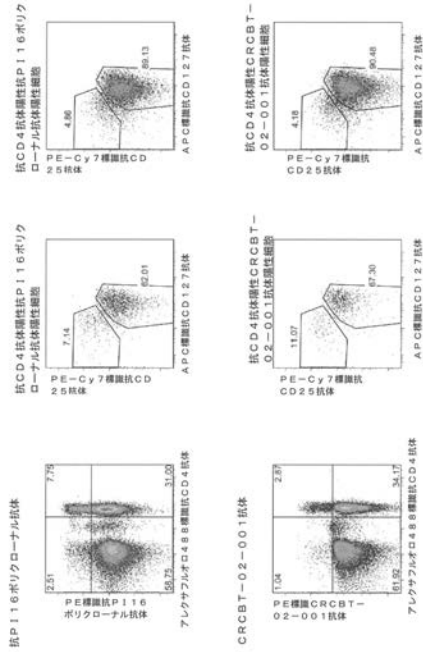
【 図 8 】



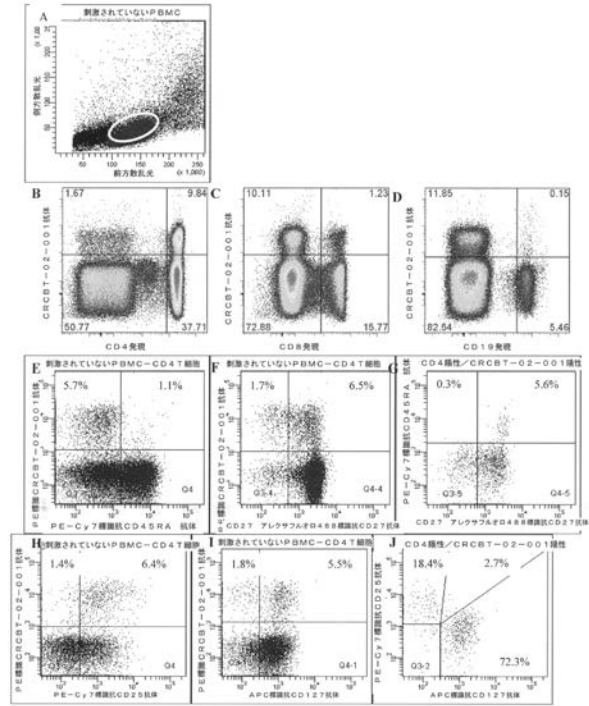
【 図 9 】



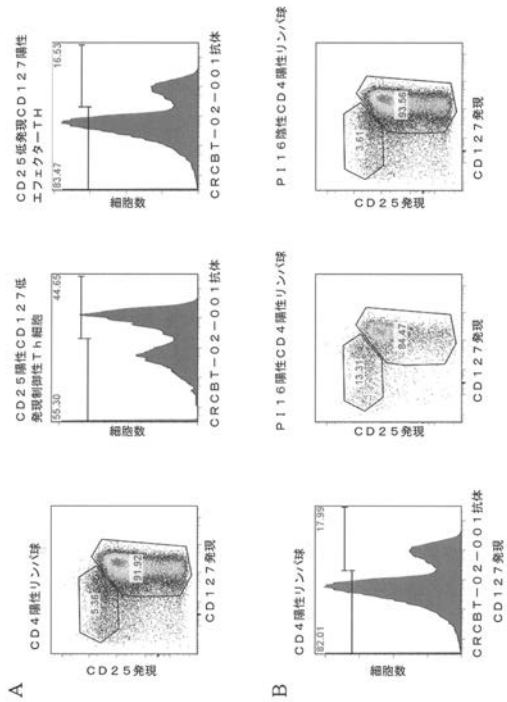
【図 10】



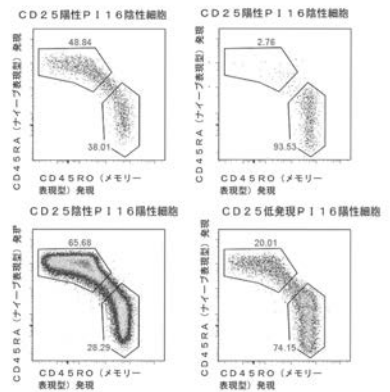
【図 11】



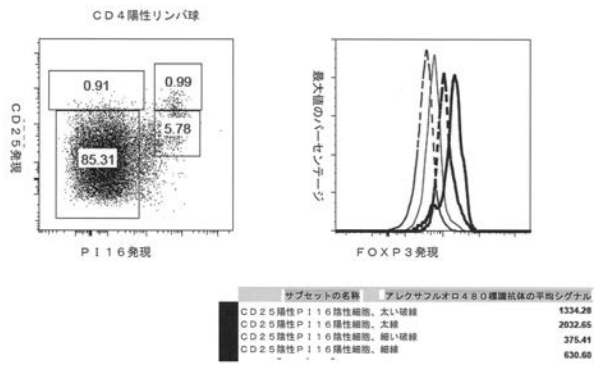
【図 12】



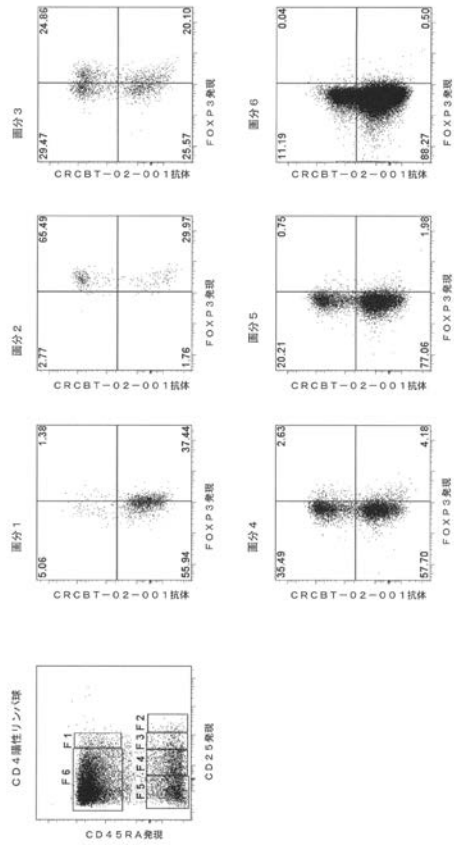
【図 13】



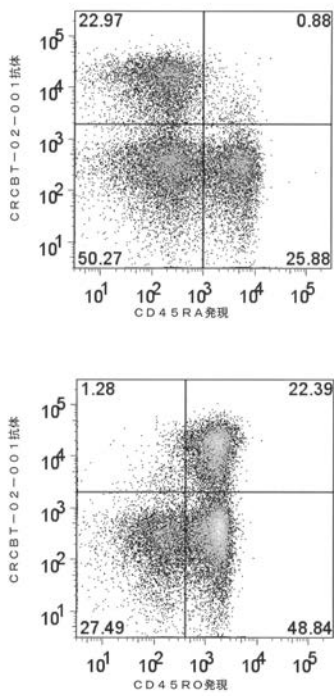
【 図 1 4 】



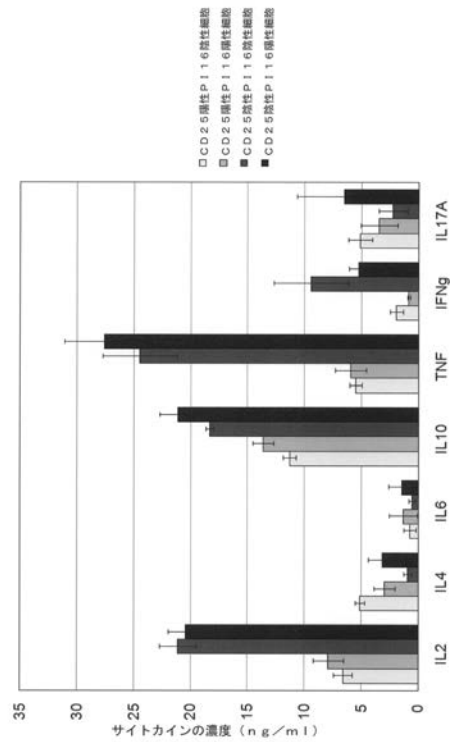
【 図 1 5 】



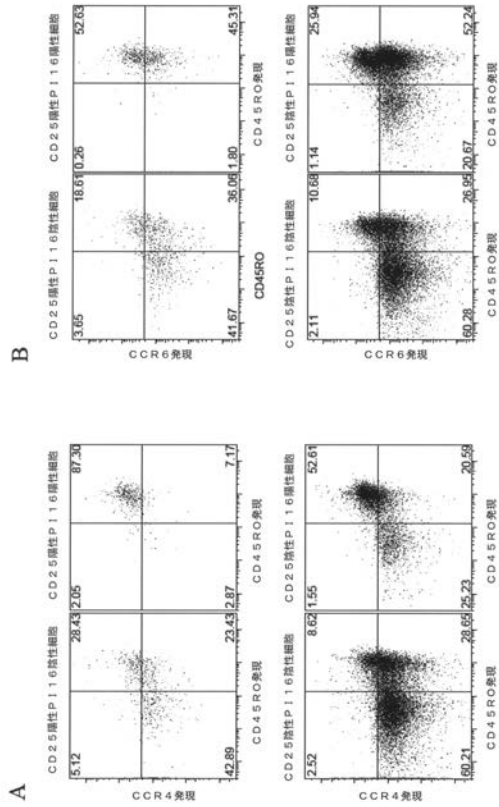
【 図 1 6 】



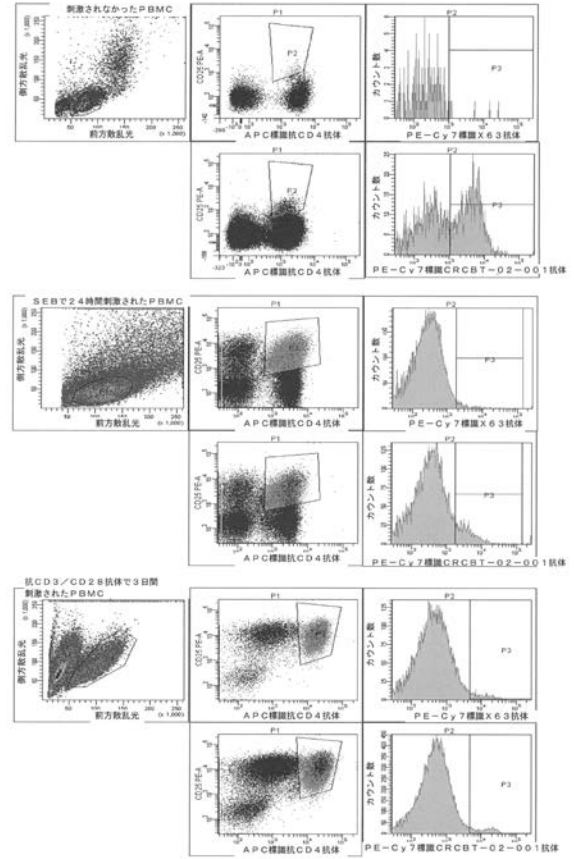
【 図 1 7 】



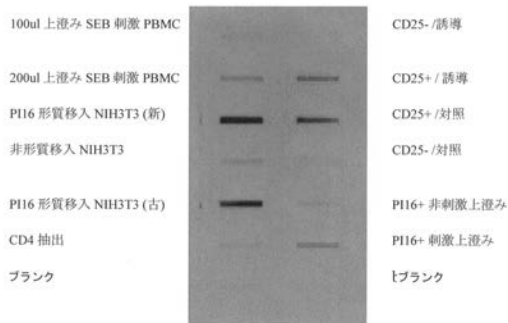
【 図 1 8 】



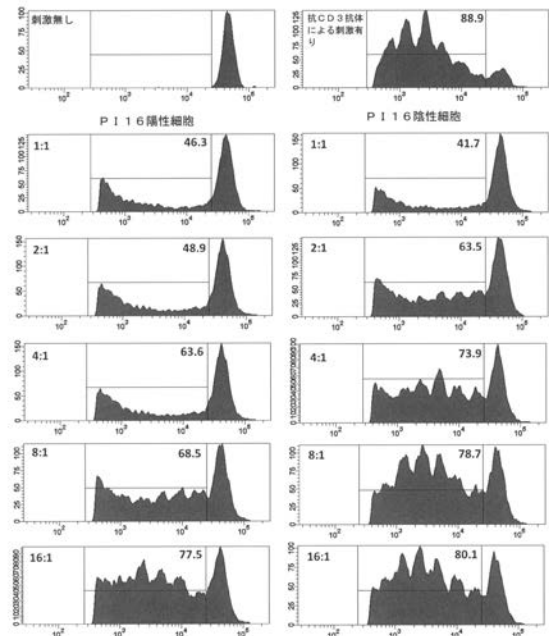
【 図 1 9 】



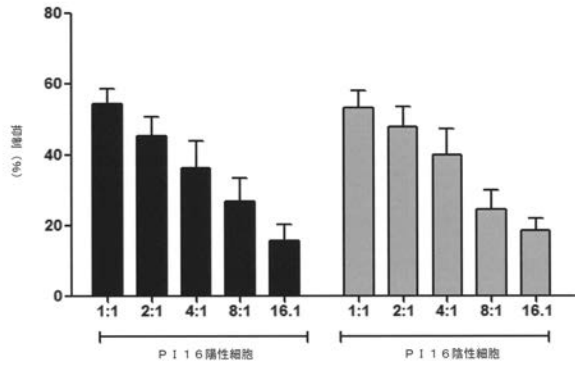
【 図 2 0 】



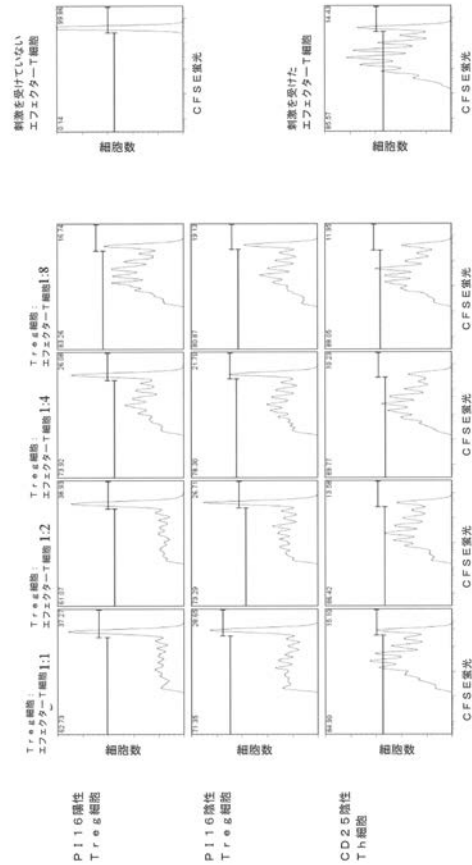
【 図 2 3 A 】



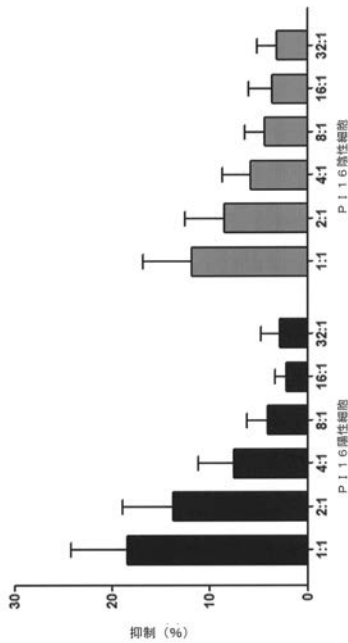
【図 2 3 B】



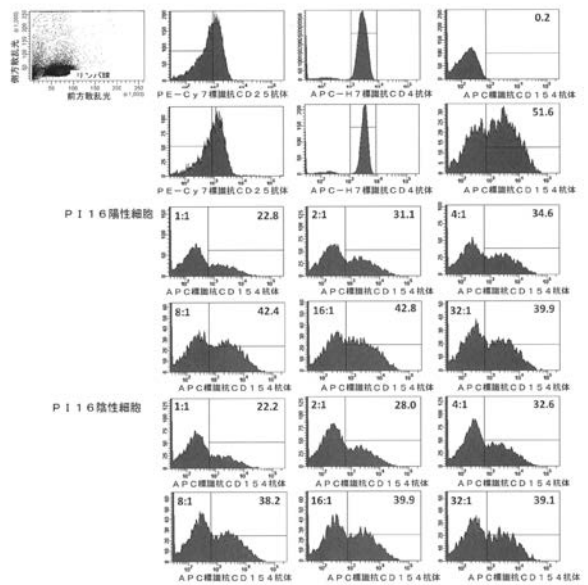
【図 2 3 C】



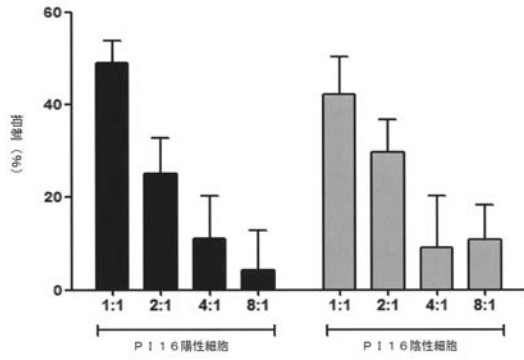
【図 2 3 D】



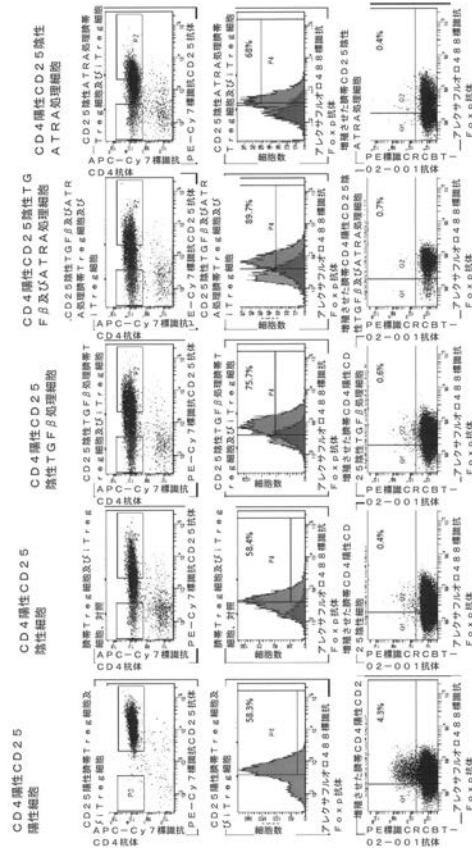
【図 2 4 A】



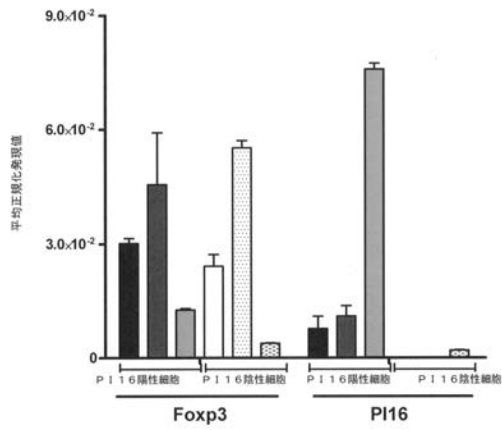
【図 2 4 B】



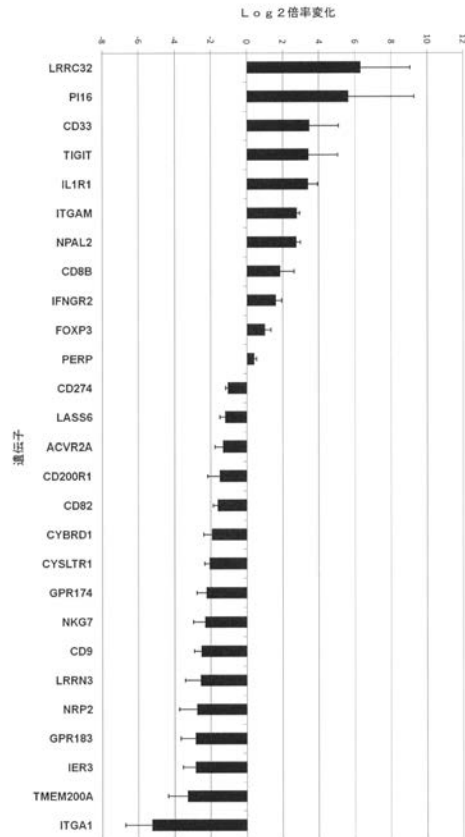
【図 2 5 A】



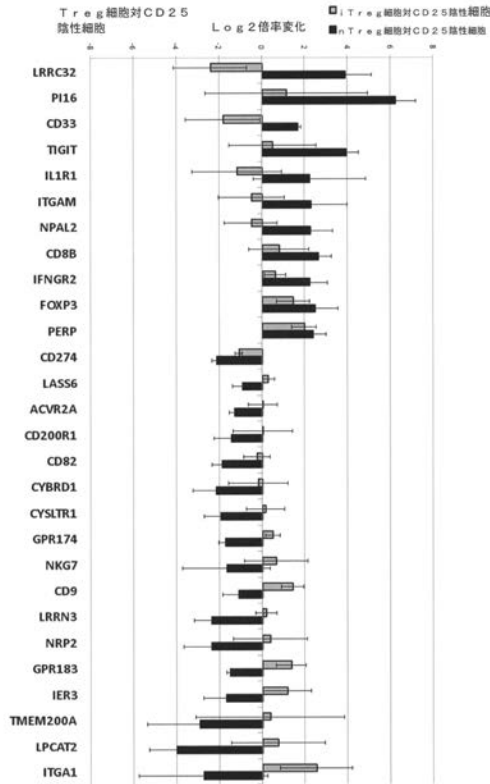
【図 2 6 B】



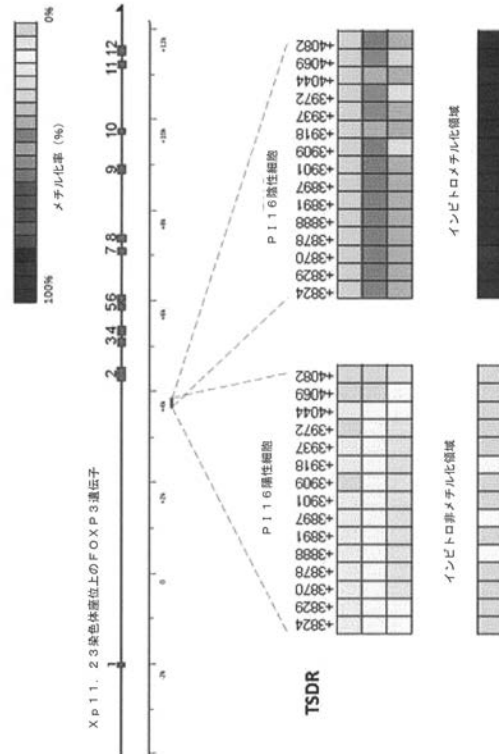
【図 2 7 A】



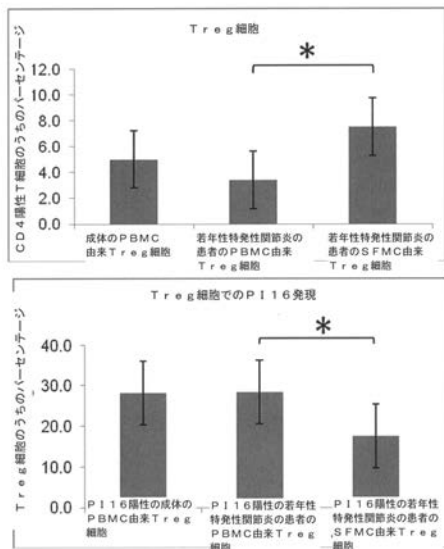
【 図 2 7 B 】



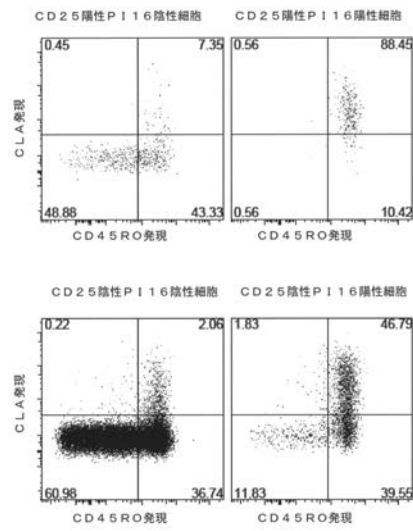
【 図 2 8 】



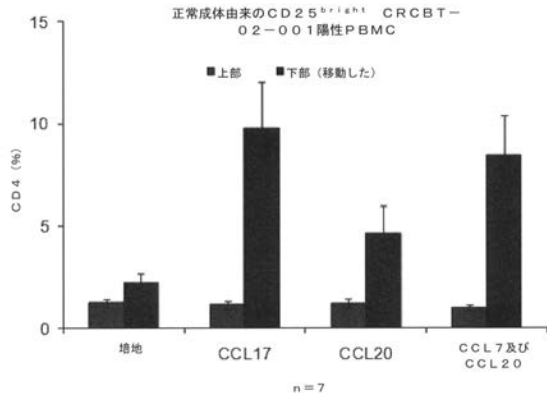
【 図 3 1 】



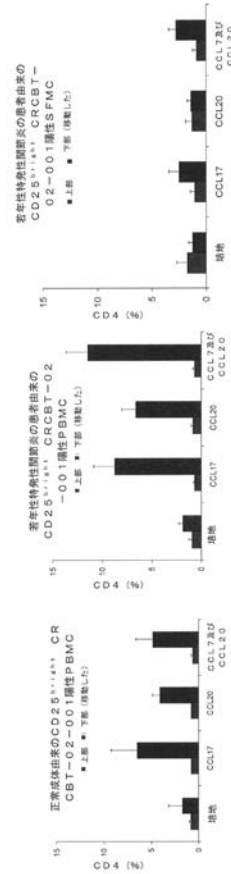
【 図 3 2 】



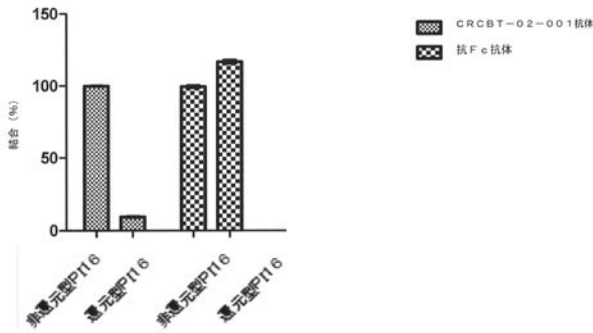
【 図 3 3 A 】



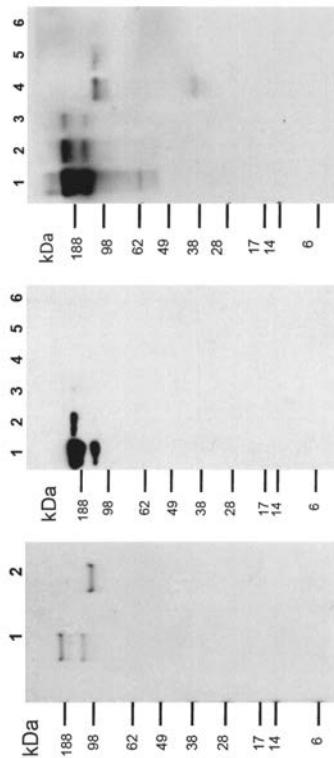
【 図 3 3 B 】



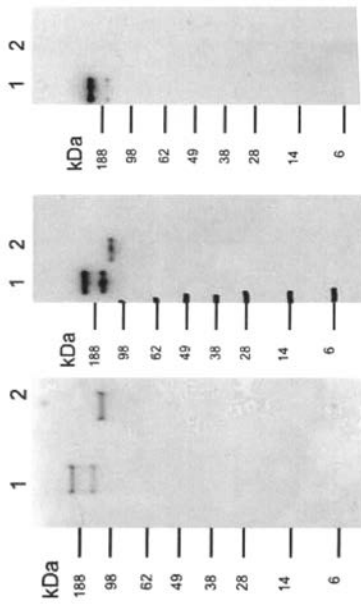
【 図 3 4 A 】



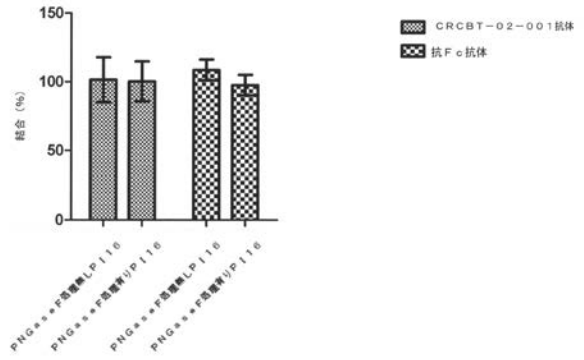
【 図 3 4 B 】



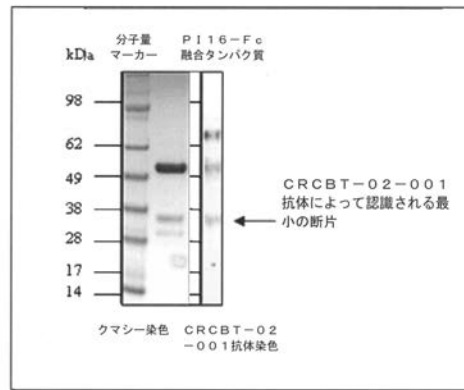
【 図 3 4 C 】



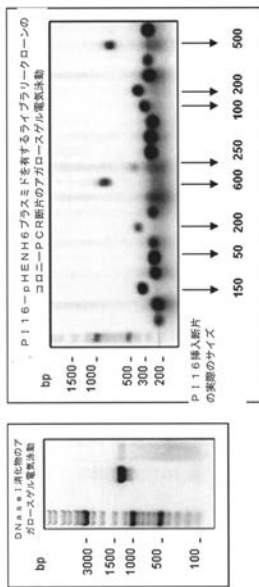
【 図 3 5 】



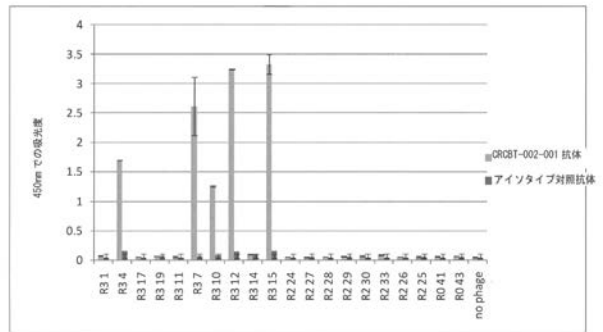
【 図 3 6 】



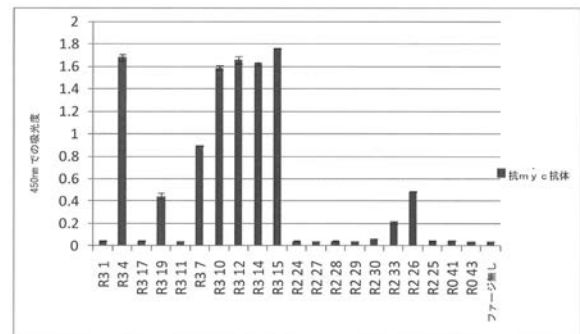
【 図 3 7 】



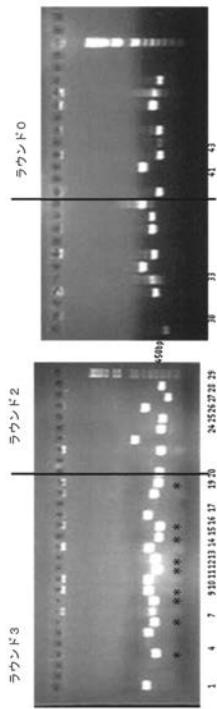
【 図 3 8 A 】



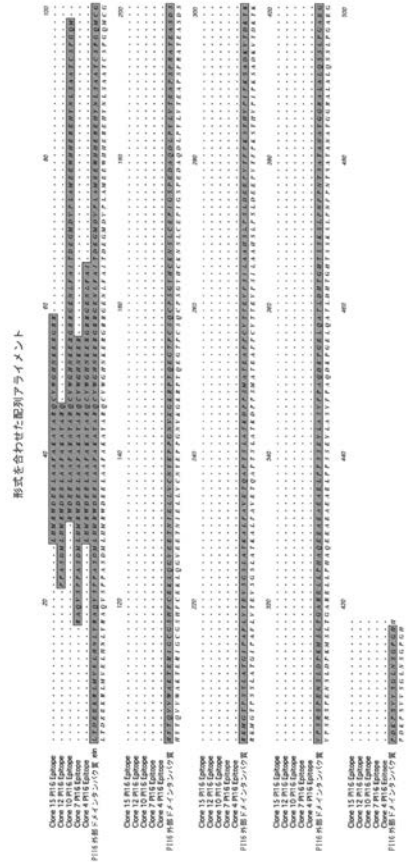
【 図 3 8 B 】



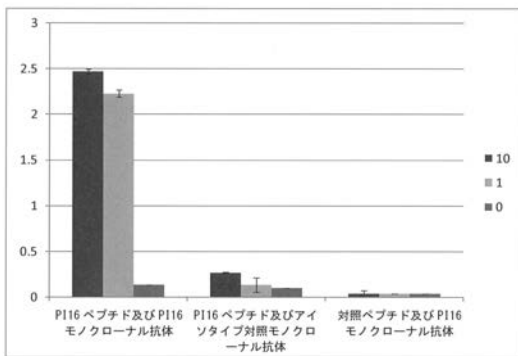
【 図 3 9 】



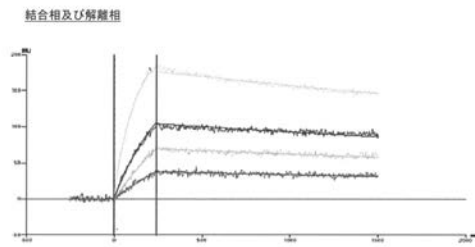
【 図 4 0 A 】



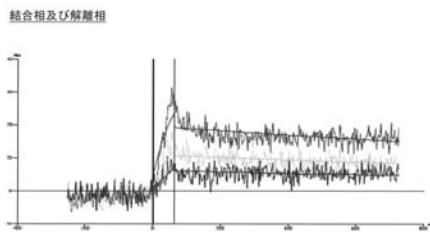
【 図 4 1 】



【 図 4 3 】



【 図 4 2 】



## 【配列表】

2016222708000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年8月18日(2016.8.18)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ペプチダーゼインヒビター16 (PI16) と結合することができる少なくとも1つのモノクローナル抗体可変領域を含む単離タンパク質であって、前記タンパク質がまた、PTA-10685の受託番号でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマにより産生された抗体のPI16への結合を競合的に阻害することができる単離タンパク質。

## 【請求項2】

(i) CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマにより産生される抗体と結合するエピトープと重複するエピトープに結合する；または

(ii) CRCBT-02-001という名称のハイブリドーマにより産生される抗体と同じエピトープに結合する；または

(iii) 配列番号32または38に記載された配列を含むエピトープに特異的に結合する；または

(iv) 配列番号33~37、39、およびその混合体からなる群から選択される配列内に含まれるエピトープに特異的に結合する；または

(v) PI16の立体構造エピトープに結合する、例えば前記立体構造エピトープがPI16中でのジスルフィド結合形成に依存する；または

(vi) 還元型であるPI16には実質的に結合しない、請求項1に記載のタンパク質。

## 【請求項3】

(i) 前記可変領域が抗体重鎖可変領域( $V_H$ )または抗体軽鎖可変領域( $V_L$ )である；または

(ii) 前記タンパク質が少なくとも2つの可変領域を含み、該可変領域のうちの1つが抗体重鎖可変領域( $V_H$ )でありもう一つが抗体軽鎖可変領域( $V_L$ )である；または

(iii) 前記タンパク質がモノクローナル抗体である；または

(iv) 前記可変領域(1つまたは複数)がヒト可変領域である；または

(v) 前記可変領域(1つまたは複数)が非ヒト可変領域である；または

(vi) 前記可変領域(1つまたは複数)が非ヒト可変領域の3つの相補性決定領域(CDR)を有する、請求項1または2に記載のタンパク質。

## 【請求項4】

(i) 前記非ヒト可変領域がPTA-10685の受託番号でATCCに寄託されたCRCBT-02-001という名称のハイブリドーマにより産生された抗体に由来する；または

(ii) 前記可変領域が配列番号8に記載された配列を有する重鎖可変領域のCDRおよび/または配列番号10に記載された配列を有する軽鎖可変領域のCDRを有する；または

(iii) 配列番号8に記載された配列を含む重鎖可変領域のCDRと配列番号10に記載された配列を含む軽鎖可変領域のCDRとを有する重鎖可変領域を含む、請求項1から3のいずれか1項に記載のタンパク質。

## 【請求項5】

キメラ抗体、脱免疫化抗体、またはヒト化抗体である、請求項3または4に記載のタン

パク質。

【請求項 6】

P T A - 1 0 6 8 5 の受託番号で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマにより産生された抗体である、単離タンパク質。

【請求項 7】

前記タンパク質と複合体化する化合物を有する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質と薬剂的に許容可能な担体とを含む組成物。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をその上に固定化する固形担体または半固形担体。

【請求項 10】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を発現する単離細胞。

【請求項 11】

P T A - 1 0 6 8 5 の受託番号で A T C C に寄託された C R C B T - 0 2 - 0 0 1 という名称のハイブリドーマである請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 12】

試料中のペプチダーゼインヒビター 16 ( P I 1 6 ) または P I 1 6 発現細胞を検出する方法であって、前記方法は、試料を請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 8 に記載の組成物または請求項 9 に記載の固形担体もしくは半固形担体に接触させて、タンパク質が試料中の、もし存在するならば、P I 1 6 に結合するようにすること、および、結合タンパク質を検出することを含み、前記細胞が制御性 T ( T r e g ) 細胞であるか、または前記細胞が内在性 T r e g 細胞である T r e g 細胞である、方法。

【請求項 13】

内在性制御性 T ( n T r e g ) 細胞を誘導性 T r e g ( i T r e g ) 細胞と区別する方法であって、前記方法が T r e g 細胞を含む試料を請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 8 に記載の組成物または請求項 9 に記載の固形担体もしくは半固形担体に接触させて、タンパク質が試料中の P I 1 6 発現 T r e g 細胞に結合するようにすること、および、P I 1 6 発現 T r e g 細胞を検出することを含み、前記 P I 1 6 発現 T r e g 細胞が n T r e g 細胞である方法。

【請求項 14】

細胞を単離する方法であって、前記方法が、請求項 12 に記載の方法を実施することにより細胞を検出すること、および、検出した細胞を単離することまたは請求項 13 に記載の方法を実施することにより n T r e g 細胞を区別して、前記区別した n T r e g 細胞を単離することを含む方法。

【請求項 15】

P I 1 6 発現細胞が濃縮されている細胞集団を産生する方法であって、前記方法が P I 1 6 発現細胞を含む細胞集団を請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 8 に記載の組成物または請求項 9 に記載の固形担体もしくは半固形担体に接触させて、タンパク質が試料中の P I 1 6 発現細胞に結合するようにすること、および、前記タンパク質と結合する細胞を選択することを含む方法。

【請求項 16】

前記濃縮細胞が制御性 T ( T r e g ) 細胞である、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

P I 1 6、ならびに C L A、H L A D R および C C R 4 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質を発現する制御性 T ( T r e g ) 細胞が濃縮されている細胞集団。

【請求項 18】

細胞が対象の炎症部位または皮膚に移動することができる、請求項 1 4 または 1 6 に記載の方法により単離された細胞または請求項 1 5 もしくは 1 6 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 1 7 に記載の細胞集団。

【請求項 1 9】

医薬における使用のための、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 8 に記載の組成物または請求項 9 に記載の固形担体もしくは半固形担体または請求項 1 4 もしくは 1 6 に記載の方法により単離された細胞または請求項 1 5 もしくは 1 6 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 1 7 に記載の細胞集団を含む組成物。

【請求項 2 0】

制御性 T ( T r e g ) 細胞関連症状の治療における使用のための、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または請求項 8 に記載の組成物または請求項 9 に記載の固形担体もしくは半固形担体または請求項 1 4 もしくは 1 6 に記載の方法により単離された細胞または請求項 1 5 もしくは 1 6 に記載の方法により産生された細胞集団または請求項 1 7 に記載の細胞集団を含む組成物。

【請求項 2 1】

T<sub>H</sub> 1 7 介在性症状の治療における使用のための、P I 1 6 を発現する制御性 T ( T r e g ) 細胞であって、前記 T r e g 細胞が全身投与され、T<sub>H</sub> 1 7 介在性症状の部位に移動する、細胞。

【請求項 2 2】

炎症部位に対する炎症の治療における使用のための、P I 1 6 を発現する制御性 T ( T r e g ) 細胞であって、前記炎症部位はインターロイキン ( I L ) 1 および / または I L 6 の発現を特徴とする、細胞。

## 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 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	P
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
		G 0 1 N	33/531	A
		C 1 2 P	21/08	

- (72)発明者 サイモン・バリー  
オーストラリア・サウス・オーストラリア・5 1 5 3・ロングウッド・ロングウッド・ロード・ロ  
ット・2
- (72)発明者 ドリーン・クルムビーゲル  
オーストラリア・サウス・オーストラリア・5 0 3 9・エドワーズタウン・リンドフィールド・ア  
ヴェニュー・3 0 エー
- (72)発明者 ニコラ・ガ・リング・イースタッフ・レウン  
オーストラリア・サウス・オーストラリア・5 0 5 1・ブラックウッド・プレイフォード・アヴェ  
ニュー・3
- (72)発明者 イアン・キャメロン・ニコールソン  
オーストラリア・サウス・オーストラリア・5 0 8 9・ハイバリー・キネアード・クレセント・8
- (72)発明者 ヘディー・ゾラ  
オーストラリア・サウス・オーストラリア・5 0 6 9・エヴァンデール・ベイクウェル・ロード・  
1 6 ビー

F ターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02  
4B064 AG27 CA20  
4B065 AA94X CA44 CA46  
4C085 AA14 AA15 AA16 CC23 DD62 EE01  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA22 FA74

专利名称(译)	结合pi16的蛋白质及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016222708A</a>	公开(公告)日	2016-12-28
申请号	JP2016152697	申请日	2016-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	梅德福已经津市科技私人有限公司		
申请(专利权)人(译)	Medovetto科技私人有限公司		
[标]发明人	サイモンバリー ドリーンクウムビーゲル ニコラガリングイースタッフレウン イアンキャメロンニコールソン ヘディーゾラ		
发明人	サイモン・バリー ドリーン・クウムビーゲル ニコラ・ガリング・イースタッフ・レウン イアン・キャメロン・ニコールソン ヘディー・ゾラ		
IPC分类号	C07K16/38 C07K16/46 C07K17/02 C12N5/0783 C12N5/12 C12Q1/68 A61K39/395 A61P17/00 A61P29/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/531 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00 C07K16/28 C07K16/38 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 C12N5/0637 G01N33/56972		
FI分类号	C07K16/38.ZNA C07K16/46 C07K17/02 C12N5/0783 C12N5/12 C12Q1/68.A A61K39/395.P A61P17/00 A61P29/00 A61P43/00.111 A61K39/395.N G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/531.A C12P21/08 C12Q1/6809.Z C12Q1/6851.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B065/AA94X 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	61/426019 2010-12-22 US 61/325093 2010-04-16 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种新的标记物，可以检测和分离Treg细胞用于诊断目的，用于预后目的，用于治疗目的和/或用于预防目的，或用于去除和破坏Treg细胞，细胞表面标志物是本领域所必需的。本公开提供了分离的蛋白质，其包含至少一个能够结合肽酶抑制剂16 (PI 16) 的抗体可变区，所述蛋白质也保藏在ATCC，登记号为PTA-10685。可以竞争性地抑制由名为CRCBT-02-001的杂交瘤产生的抗体与PI 16的结合。本发明还提供蛋白质用于分离例如诊断，治疗或细胞，优选Treg细胞的用途。【选择图】无

マーカー	CD25陽性 PI16陰性	CD25陽性 PI16陽性	CD25陰性 PI16陰性	CD25陰性 PI16陽性
アイソタイプ	0	1	0	0
CD45RA	34	10	86	19
CD45RO	69	96	14	92
CD95	86	99	17	97
CD39	10	23	1	1
CD73	9	9	3	12
CD44	99	99	99	99
CD69	0	0	0	0
CCR6	17	42	2	37
HLADR	21	60	2	8