

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-512144

(P2018-512144A)

(43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 Z N A | 2 G O 4 5 |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | 4 B O 6 3 |
| G O 1 N 33/48 (2006.01) | G O 1 N 33/48 M | 4 B O 6 5 |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 Y | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/09 A | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2017-551253 (P2017-551253)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月31日 (2016. 3. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月28日 (2017. 11. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/056994
 (87) 国際公開番号 W02016/156449
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016. 10. 6)
 (31) 優先権主張番号 1562452
 (32) 優先日 平成27年12月16日 (2015. 12. 16)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 1552757
 (32) 優先日 平成27年3月31日 (2015. 3. 31)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 506129544
 ラボラトワール・フランセ・デュ・フラク
 シオンマン・エ・デ・ビヨテクノロジー
 LABORATOIRE FRANCAI
 S DU FRACTIONNEMENT
 ET DES BIOTECHNOLO
 GIES
 フランス国、91940レ・ユリ、アブニ
 ユー・デ・トロピク、3、ゾーン・ダクテ
 イビテ・ドゥ・クールタベ
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトCD303抗原を過剰発現する細胞株

(57) 【要約】

本発明は、Fc RI受容体のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株であって、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定な方法でトランスフェクトされており、その表面上でヒトCD303を強く発現する、例えば細胞1個当たり少なくとも10000個のヒトCD303分子を発現することを特徴とする、細胞株、並びにFc RI受容体のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を共発現するのに使用できるベクター又はベクターキット、及び本発明の細胞株の様々な使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Fc 受容体 I (Fc RI) のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株であって、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でヒトCD303を高度に発現することを特徴とする、細胞株。

【請求項 2】

細胞1個当たり少なくとも10,000個のヒトCD303分子を有することを特徴とする、請求項1に記載の細胞株。

【請求項 3】

ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされたヒト形質細胞様樹状細胞(pDC)の細胞株であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の細胞株。

10

【請求項 4】

ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含むベクターで安定してトランスフェクトされたCAL-1細胞株又は等価体に由来する細胞株であることを特徴とする、請求項3に記載の細胞株。

【請求項 5】

ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、又はヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで安定してトランスフェクトされたヒトリンパ球細胞株であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の細胞株。

20

【請求項 6】

ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、又はヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで安定してトランスフェクトされたJurkat細胞株であることを特徴とする、請求項5に記載の細胞株。

【請求項 7】

その表面上に、細胞1個当たり、20,000から60,000個の間、好ましくは25,000から50,000個の間のヒトCD303分子を有することを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株。

30

【請求項 8】

ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 9】

ヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターを含むキット。

【請求項 10】

ヒトCD303抗原に対する抗体の機能的な活性、好ましくはADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス若しくは貪食タイプの活性を特徴付けるための、又はヒトCD303抗原若しくは複数の抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原のエピトープに対する複数の抗CD303抗体の結合親和性を比較するための、請求項1から7のいずれか一項に記載の細胞株の使用。

40

【請求項 11】

ヒト対象、詳細にはBPDCN又は自己免疫疾患に罹ったヒト対象からのエフェクター細胞の機能的な性能、とりわけADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス及び貪食タイプの性能を特徴付けるための、請求項1から7のいずれか一項に記載の細胞株の使用。

【請求項 12】

ヒトCD303抗原に対する抗体のADCC活性を試験するための方法であって、
a) 請求項1から7のいずれか一項に記載の細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及びエフェクター細胞と接触させる工程、

50

b) 工程a)の請求項1から7のいずれか一項に記載の細胞株の細胞の溶解を可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び

c) 工程a)の請求項1から7のいずれか一項に記載の細胞株の細胞の溶解の程度を測定する工程を含む、方法。

【請求項13】

抗CD303抗体を特徴付けるためのキットであって、請求項1から7のいずれか一項に記載の細胞株、並びに有利にはエフェクター細胞、多価IgG、及び参照抗CD303抗体から選択される少なくとも1つの試薬を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、形質細胞様樹状細胞(pDC)に由来する造血器腫瘍又はpDCが関与する炎症性若しくは自己免疫疾患の処置又は予防に使用可能な、ヒトCD303抗原に対する抗体のインビトロ又はインビボでの活性を特徴付けるための細胞ツールの分野に関する。本発明は、詳細には、Fc 受容体1(Fc RI)のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株であって、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でヒトCD303を高度に発現する、細胞株に関する。

【背景技術】

【0002】

樹状細胞(本明細書を通して「DC」と称される)は、免疫系の抗原提示細胞(APC)である。特定の条件下で、DCは、ニューロンの樹状突起に類似した細胞質の突起を有する。

【0003】

樹状細胞は、2つの主要な機能:

- ・「非自己」(外来の)抗原をTリンパ球に提示することによって、これらの外来抗原に対する適応免疫応答を誘発する機能、及び
- ・いわゆる「負の選択」プロセスにより胸腺中のTリンパ球を教育することによって、「自己」に対する中枢性寛容を維持する機能を有する。

【0004】

DCは、それらが受ける刺激に従って様々な部分集団に分化することが可能である。DCには、3つの主要なタイプ:従来型DC、形質細胞様DC(「pDC」と称される)及び炎症性DCがある。

【0005】

従来型DCは、リンパ系器官又は末梢中で自己又は非自己抗原を提示する。炎症性DCは、血中単球に由来する可能性があり、炎症又は感染後の刺激の場合にのみ出現する。

【0006】

形質細胞様DC(pDC)は、循環しており、丸く、基底状態では樹状突起を有さないが、活性化の後、一般的にウイルス抗原によって樹状突起を獲得する。刺激後、それらは大量のI型インターフェロン(IFN)を産生し、主として抗ウイルス応答又は自己免疫疾患に関与する。表現型では、それらは、とりわけ以下のマーカー:CD4+、CD11c-、Lin-、CD303+、CD304+を特徴とする。

【0007】

pDCは、それが追加のマーカー(CD56)を獲得する造血器腫瘍の原因であり得る。これらは、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)と称される。これらはまた、CD4+CD56+造血器腫瘍とも称される。これらの造血器腫瘍はまれであり(急性白血病の1%)、リンパ節症又は脾臓の腫脹及び頻発する血球減少症に関連する皮膚結節として出現する。皮膚の症状発現は非常に迅速であり、それに続いて骨髄の浸潤が起こる。これらの腫瘍の起源における造血細胞はpDCであることが現在認められている。

【0008】

10

20

30

40

50

WO2012/080642において、抗BDCA-2(すなわち、抗CD303)抗体を使用して、腫瘍細胞の枯渇によってこれらの新生物を処置することが提唱されている。

【0009】

pDCはまた、詳細にはそれらのI型IFN分泌を介して、特定の炎症性疾患、とりわけ特定の自己免疫疾患にも関与する。

【0010】

しかしながら、これらの疾患を効果的に処置するために、ヒトにおいて最も効率的なできる限りのpDC除去を可能にする好適なモノクローナル抗体を有することが必要である。この目的を達成するために、CD303抗原に対する高親和性及びエフェクター性能(ADCC、CD C、貪食、Fc受容体、詳細にはFc 受容体IIIa(Fc RIIIa、CD16aとも称される)によるCD3 03の交差を介したシグナル伝達、及び/又はアポトーシス)を有することにより、生理学的条件においてpDCを除去することを可能にする、キメラ又はヒト化抗体への必要性がある。

10

【0011】

現在のところ、患者の細胞へのアクセスが限られていることから、更に試験の再現性を保証するために、インビトロ及びインビボにおける抗CD303抗体の効能の特徴付けは、一般的に、CAL-1等の細胞株又はヒトBPDCN患者からの細胞に由来する等価体で行われている。

【0012】

しかしながら、本発明者らは、利用可能な細胞株が、それらの表面上に存在するCD303分子を、BPDCN患者からのほとんどの腫瘍細胞より少ないわずかな数で発現するだけであり、結果としてこれらの細胞株は、抗CD303抗体に関して低い識別力しか有さないことに着目した。実際に、抗原密度が低すぎると、抗体の機能的な活性が、異なる抗体間における効能の差の実証を可能にするには低くなりすぎる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】WO2012/080642

【特許文献2】JP5011520

【特許文献3】WO01/77181

30

【特許文献4】EP1176195A1

【特許文献5】WO2012/041768

【特許文献6】WO2008/028686

【特許文献7】WO00/42072

【特許文献8】WO2004/029207

【特許文献9】WO2004/063351

【特許文献10】WO2004/074455

【特許文献11】WO02/060919

【特許文献12】WO2010/045193

【特許文献13】WO2010/106180

40

【特許文献14】WO99/51642

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Maeda Tら、Int J Hematol. 2005年2月;81(2):148~54

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、その表面上でヒトCD303抗原を安定して発現する新しい細胞株、とりわけ最も高い活性を有する抗CD303抗体を選択できるように識別力が増加した細胞株を利用可能にする真の必要がある。

50

【課題を解決するための手段】

【0016】

第1の態様によれば、本発明は、Fc 受容体I(Fc RI)のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株であって、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でCD303を高度に発現することを特徴とする、細胞株に関する。

【0017】

第2の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターからなる。

【0018】

第3の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターを含むキットである。

【0019】

第4の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体の機能的な活性、好ましくはADCC、サイトカイン分泌、CDC、アポトーシス又は貪食タイプの活性を特徴付けるための、又は数々の抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原又はヒトCD303抗原のエピトープに対する数々の抗CD303抗体の結合親和性を比較するための、本発明に係る細胞株の使用に関する。

【0020】

第5の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のADCC活性を試験するための方法であって、

- a)本発明に係る細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及びエフェクター細胞と接触させる工程、
- b)工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の溶解を可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び
- c)工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の溶解の程度を測定する工程を含む、方法に関する。

【0021】

第6の態様によれば、本発明は、抗CD303抗体を特徴付けるためのキットであって、本発明に係る細胞株、並びに有利にはエフェクター細胞、多価IgG、及び参照抗CD303抗体から選択される少なくとも1つの試薬を含む、キットからなる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】ベクター-pcDNA3.1(-)のマップを示す図である。

【図2】43日目におけるプール008-1の細胞でのCD303発現を示す図である。ヒストグラムは、PEコンジュゲート抗CD303抗体(塗り潰された領域)及びPEコンジュゲート対照アイソタイプ抗体(実線)で標識された細胞を示す。

【図3】第3のセルソーティング後のプール008-1の細胞でのCD303発現を示す図である。ヒストグラムは、PEコンジュゲート抗CD303抗体(塗り潰された領域)及びPEコンジュゲート対照アイソタイプ抗体(点線)で染色された細胞を示す。

【図4】第3のセルソーティング及び2カ月の培養後のプール008-1の細胞でのCD303発現を示す図である。ヒストグラムは、PEコンジュゲート抗CD303抗体(塗り潰された領域)及びPEコンジュゲート対照アイソタイプ抗体(実線)で染色された細胞を示す。

【図5】限界希釈クローニング後に得られたクローンによるCD303発現を示す図である。ヒストグラムは、PEコンジュゲート抗CD303抗体(右側)及びPEコンジュゲート対照アイソタイプ抗体(左側)で標識された細胞を示す。

【図6】トランスフェクション後の22日目に、CD303発現ベクターでトランスフェクトされたCAL-1細胞のプールを、PE対照アイソタイプ抗体又は抗CD303-PE抗体で標識することを示す図である。

【図7】トランスフェクション後の50日目に、クローニング後に得られたクローンNF-3C8

10

20

30

40

50

及びNF-5G9を、PE対照アイソタイプ抗体又は抗CD303-PE抗体で標識することを示す図である。

【図8】CD303発現ベクターでのCAL-1細胞のトランスフェクションにより得られたクローンNF-3C8及びNF-5G9による高いCD303発現の安定性を示す図である。G418の存在又は非存在における再度の植え付け後の2から12週間の間におけるクローンNF-3C8及びNF-5G9のPE抗CD303抗体による標識付けの進化。

【図9A】CAL-1細胞のCD303発現ベクターでのトランスフェクションにより得られたクローンNF-3C8による高いCD303発現の安定性を示す図である。G418の存在又は非存在における再度の植え付け後の2及び12週間におけるクローンNF-3C8のPE抗CD303抗体の標識付け。

【図9B】CAL-1細胞のCD303発現ベクターでのトランスフェクションにより得られたクローンNF-5G9による高いCD303発現の安定性を示す図である。G418の存在又は非存在における再度の植え付け後の2及び12週間におけるクローンNF-5G9のPE抗CD303抗体の標識付け。

【図10】NF-3C8又はNF-5G9上で発現されたヒトCD303抗原への抗体の結合を示す図である。

【図11】ヒトCD303抗原のための発現ベクターでトランスフェクトされていないCAL-1細胞株(A)又はヒトCD303抗原のための発現ベクターでのCAL-1細胞株のトランスフェクション、選択及びクローニングの後に得られたクローンNF-3C8(B)の存在下で、キメラ抗CD303抗体122A2、114D1、又は102E9によって、対照キメラ抗体によって、又はヒト化抗CD303抗体B11B059によって誘導されたCD16aを介したADCC活性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でCD303を高度に発現するFc受容体I(FcRI)のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株

本発明は、FcRIのガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株であって、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でCD303を高度に発現することを特徴とする、細胞株に関する。

【0024】

ヒトCD303抗原は、C型レクチンドメインファミリー4、メンバーC(CLEC4)であり、DLEC、HECL、BDCA2、CLECSF7、CLECSF11、又はPRO34150とも称される(CLEC4遺伝子に関するEntrez Geneウェブサイトを参照)。これは、明確なシグナル伝達モチーフを有さない短い細胞質内ドメイン(アミノ酸1~21)、膜貫通領域(アミノ酸22~41)、ネックドメイン(アミノ酸42~82)、及び炭水化物認識細胞外ドメイン(CRD、アミノ酸83~213)を含む213アミノ酸のII型膜貫通糖タンパク質である(Dzionicら、2001)。このタンパク質をコードするmRNA配列は、GenBankデータベースの2002年2月14日のバージョンにおいて受託番号AF293615.1(配列番号1)で見出すことができ、一方でアミノ酸配列は、GenBankデータベースの2002年2月14日のバージョンにおいて受託番号AAL37036.1(配列番号2)で入手可能である。

【0025】

本発明者らは、その表面上でヒトCD303抗原を安定して発現する細胞株を得るために、細胞株がヒトFcRIのガンマ鎖を発現することが必須であったことに留意した。したがって、このヒトFcRIのガンマ鎖を元々発現しない細胞株にとって、細胞株を、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターと、ヒトFcRIのガンマ鎖をコードする核酸分子を含む別の発現ベクターとでコトランスフェクトすること、又は一方がヒトFcRIのガンマ鎖をコードし、他方がヒトCD303抗原をコードする2つの核酸分子を含むベクターでトランスフェクトすることが、その表面上でヒトCD303抗原を安定して発現する細胞株を得るのに必要である。逆に言えば、元の細胞株がすでにヒトFcRIのガンマ鎖を発現する場合、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む単一の発現ベクターでのトランスフェクションでも十分である。

【0026】

ヒトFcRIのガンマ鎖をコードする配列は、当業者公知である。とりわけ、このタンバ

ク質をコードするmRNA配列は、GenBankデータベースの2014年5月3日のバージョンにおいて受託番号NM_004106.1(配列番号3)で見出すことができ、一方でアミノ酸配列は、GenBankデータベースの2014年5月3日のバージョンにおいて受託番号NP_004097.1(配列番号4)で入手可能である。これに基づき、当業者は、どのように細胞株のトランスフェクションに好適な発現ベクターに挿入することが可能なヒトFc RIのガンマ鎖をコードする核酸配列を設計するかを理解すると予想される。

【0027】

細胞株の起源

本発明に係る細胞株は、あらゆる好適な細胞株に由来するものでもよい。このような細胞株は、好ましくは哺乳類細胞株であり、より一層好ましくはヒト細胞株である。

【0028】

本発明に係る細胞株を生成するのに使用できる細胞株のなかでも、とりわけ、以下の一般的な細胞株:SP2/0;YB2/0;IR983F;ヒト骨髓腫Namalwa;PERC6;CHO細胞株、とりわけCHO-K-1、CHO Pro-5、CHO dhfr-、Wil-2;Jurkat;Vero;Molt-4;COS-7;293-HEK;BHK;K6H6;NSO;SP2/0-Ag14、及びP3X63Ag8.653を列挙し得る。

【0029】

細胞株がヒトFc RIのガンマ鎖を発現する場合、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む単一の発現ベクターのトランスフェクションでも、本発明に係る細胞株を生成するのに十分である。それ以外の方法で、細胞株を、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む第1の発現ベクターと、ヒトFc RIのガンマ鎖をコードする核酸分子を含む別の発現ベクターとでコトランスフェクトすること、又は一方がヒトFc RIのガンマ鎖をコードし、他方がヒトCD303抗原をコードする2つの核酸分子を含むベクターでトランスフェクトすることが、細胞株を得るのに必要である。当業者は、慣例的な実験(とりわけ定量PCR又は抗体標識)を用いて細胞株がヒトFc RIのガンマ鎖を発現するか又は発現しないかを決定することができる。

【0030】

本発明の第1の有利な実施形態によれば、本発明に係る細胞株は、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされたヒト形質細胞様樹状細胞(pDC)株であり得る。通常、pDCは天然にFc RIのガンマ鎖を発現することから、ヒトpDC株は、ヒトFc RIのガンマ鎖をコードする核酸分子を含む発現ベクターでトランスフェクトされなくてもよい。Fc RIのガンマ鎖の発現が確認されれば、単純なヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターでのトランスフェクションでも十分である。

【0031】

有利には、本発明に係る細胞株は、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含むベクターで安定してトランスフェクトされたCAL-1細胞株又は等価な細胞株である。実際に、CAL-1細胞株(Maeda Tら、Int J Hematol. 2005年2月;81(2):148~54)は、Fc RIのガンマ鎖を天然に発現する細胞株であるため、ヒトFc RIのガンマ鎖をコードする核酸分子を含む発現ベクターでトランスフェクトされなくてもよい。

【0032】

CAL-1細胞株は、ヒトBPDCN患者からの細胞に由来する(Maeda Tら、Int J Hematol. 2005年2月;81(2):148~54及びJP5011520)。CAL-1細胞は、表現型Lin⁻HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺CD4⁺CD56⁺のpDCと定義される。CAL-1細胞株は、ブダペスト条約に基づき、長崎大学(日本国852-8521長崎県文教町1-14)によって、国立研究開発法人産業技術総合研究所、国際特許生物寄託センター、NITEに寄託され(日本国FERM P-20595茨城県つくば市東1-1-1中央第6、2005年7月15日にCAL-1という名称で)、特許JP5011520で詳細に特徴付けられた。

【0033】

他のあらゆるヒトpDC細胞株、例えば、Maeda Tら、Int J Hematol. 2005年2月;81(2):148~54に記載されるCAL-1細胞株を得るために使用されるプロトコールに従ってヒト患者からのBPDCN細胞から誘導された別の細胞株も、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子の安

10

20

30

40

50

定なトランスフェクション及び好適なクローンの選択によって本発明に係る細胞株を得るのに使用することができる。ヒト患者からのBPDCN細胞からヒトpDC細胞株を得るためのプロトコールは、とりわけ、以下の工程を含む：

- ・ 原発性悪性BPDCN細胞を、WHO分類に従ってBPDCNと診断された患者の末梢血から得る。詳細には、BPDCN患者からの末梢血単核細胞(PBMC)を、10%ウシ胎児血清(FCS)及び2mMのL-グルタミンを含有し、組換えIL-2非含有の培地中で培養し、培地を週2回交換し、長期の培養(数週間又は数カ月)に供する。

- ・ 次いで長期の培養後の生存細胞をクローニングして(例えば限界希釈によって)、培養中に長持ちする細胞株を得ることができる。

【0034】

このような上述したプロトコールに従って得られた細胞株は、本発明の意味内でCAL-1細胞株の「等価体」とみなされる。

【0035】

本発明の第2の有利な実施形態において、本発明に係る細胞株は、ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、又はヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで安定してトランスフェクトされたヒトTリンパ球細胞株である。実際に、Fc RIのガンマ鎖を天然に発現しない細胞株にとって、その表面上でCD303抗原を安定して発現する細胞株を得ることができるように、前記細胞株をヒトFc RIのガンマ鎖をコードする核酸分子でトランスフェクトすることが必須と考えられる。

【0036】

このケースにおいて、本発明に係る細胞株は、とりわけ、ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、又はヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで安定してトランスフェクトされた、Jurkat細胞株(クローンE6-1:ATCC(登録商標)TIB-152(商標)、ECACC 88042803;Neo Jurkat:ネオマイシン耐性遺伝子を発現するATCC(登録商標)CRL-2898(商標))であり得る。当業者が入手可能な他の等価な細胞株も使用が可能である。

【0037】

細胞株を得ること

選択された細胞株における発現に好適なあらゆる発現ベクターが使用可能であり、とりわけ哺乳類細胞株若しくはヒト細胞株、例えばJurkat細胞株若しくはヒトpDC細胞株CAL-1又は等価な細胞株のケースにおいて、ベクター又はベクターキットに関する章で後述するような哺乳類細胞における発現を可能にするあらゆる発現ベクターが使用可能である。

【0038】

次いで発現ベクターは、当業者公知のあらゆる好適な技術によって、とりわけ実施例1に記載されるようなヌクレオフェクションによって、又は他のあらゆる好適な技術によって、例えばリポソーム、カチオン性ポリマー、カチオン脂質を使用することによって、又は遺伝子銃によって、目的の細胞株(とりわけ哺乳類細胞株又はヒト細胞株、例えばJurkat細胞株又はヒトpDC細胞株)にトランスフェクトされてもよい。

【0039】

細胞のプールのトランスフェクションの後、実際にそれらの表面上でCD303抗原を発現する細胞は、フローサイトメトリーによってソートすることができる。有利には、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターは、選択マーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)をコードする核酸分子も含み、それにより、選択マーカーを発現する細胞について選択する培地(抗生物質耐性遺伝子のケースでは抗生物質を含む培地)中で培養することによって、長期にわたり細胞株によるヒトCD303抗原の発現の維持を保証することを可能にする。選択マーカーを発現する細胞について選択する培地中での1つ又は複数の選択期間と、1つ又は複数のセルソーティング手順の後、ヒトCD303抗原及びヒトFc RIのガンマ鎖を発現するクローンは、限界希釈クローニングにより得ることができる。前述の記載

10

20

30

40

50

において、選択は、ヒトCD303抗原の発現にのみ基づく。これは、ヒトFc RIのガンマ鎖は、細胞表面上でのヒトCD303抗原の発現の維持に必要なものであるという事実に関する。しかしながら、トランスフェクトされた細胞株における両方のタンパク質の共発現を保証するために、ヒトFc RIのガンマ鎖をコードする核酸分子中に存在する別の選択マーカーに基づく選択が追加されてもよい。

【0040】

有利には、選択された形質移入体は、正常なpDC及び/又は自己免疫疾患又は芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)を有する患者からのpDC上で発現されたCD303に典型的な方式でCD303を発現する。

【0041】

「Fc 鎖」細胞株と称される、ヒトFc RIのガンマ鎖のための発現ベクター(例えばpcDNA4/TO)ですでに安定してトランスフェクトされた細胞株を使用して、それをヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む別の発現ベクターでトランスフェクトすることが可能である。これは明らかにJurkat細胞株にも当てはまり、そのFc RI 鎖でトランスフェクトされた形態は「Fc 鎖Jurkat」と称される。

【0042】

細胞1個当たりのCD303分子の数

本発明に係る細胞株は、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でヒトCD303抗原を高度に発現する。

【0043】

「ヒトCD303抗原の高度な発現」は、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされている本発明に係る細胞株が、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトする前の細胞株の発現レベルより高いヒトCD303抗原の発現レベルを有することを意味する。元の細胞株がCD303を発現しない場合、本発明に係るトランスフェクトされた細胞株がその表面上でCD303を発現するならば、その細胞株は必然的にこの基準を満たす。元の細胞株がすでにCD303を発現する場合(好ましくは低いレベルで)、本発明に係るトランスフェクトされた細胞株のヒトCD303抗原の発現レベルは、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトする前の細胞株の発現レベルより、有利には少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%(増幅倍数2)、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも175%、少なくとも200%(増幅倍数3)、少なくとも250%、少なくとも300%(増幅倍数4)、少なくとも350%、少なくとも400%(増幅倍数5)、少なくとも450%、少なくとも500%(増幅倍数6)、少なくとも600%(増幅倍数7)、少なくとも700%(増幅倍数8)、少なくとも800%(増幅倍数9)、少なくとも900%(増幅倍数10)、実際に少なくとも1000%(増幅倍数11)高い。発現レベルは、とりわけ細胞1個当たりのヒトCD303抗原分子の数として表すことができる。

【0044】

細胞1個当たりのヒトCD303抗原分子の数は、フローサイトメトリー、とりわけ1,000から1,000,000個の範囲の細胞1個当たりの抗原性部位数の決定を可能にするQIFIKIT(Dako社)を使用するフローサイトメトリー、及びマウス抗(ヒトCD303)抗体によって決定し得る。試験の原理は、以下の通りである:

- 細胞をヒトCD303抗原に対する一次マウスモノクローナル抗体で標識する。別の試験管で、細胞を関連のない一次マウスモノクローナル抗体(対照)で標識する。次いで、細胞並びにキットのセットアップビーズ及び校正ビーズを、フルオレセインコンジュゲート抗マウス二次抗体で平行して標識する。

- 細胞の標識付けに使用される一次抗体を飽和濃度で使用する。飽和条件は、フルオレセインコンジュゲート抗マウス二次抗体を使用して各一次マウスモノクローナル抗体の滴定研究を実行することによって決定される。一次抗体は、あらゆるマウスIgGアイソタイプであり得る。これらの条件下において、結合した一次抗体分子の数は、細胞表面上に存在

10

20

30

40

50

する抗原性部位の数に対応する。

・二次抗体も飽和濃度で使用する。その結果として、蛍光は、細胞上及びビーズ上に結合した一次抗体分子の数と相関する。次いでサンプルを以下の順番で分析する：

試験管1(セットアップビーズ):このサンプルは、分析のウィンドウを確立するために使用される。セットアップビーズは、ブランクビーズ(抗原性部位なし)及び高いレベルの抗原性部位を発現するビーズの混合物を含む。

試験管2(校正ビーズ):このサンプルを、抗体結合能力(ABC)に対する検量線(平均蛍光強度(MFI))の構築のために使用する。

次いで細胞をフローサイトメーターで分析し、検量線の方程式に基づいて細胞上の抗原密度(ABC値)を計算する。

【 0 0 4 5 】

有利には、細胞株は、その表面上に、細胞1個当たり少なくとも10,000個のヒトCD303分子、好ましくは、細胞1個当たり10,000から500,000個の間、10,000から480,000個の間、10,000から460,000個の間、10,000から440,000個の間、10,000から420,000個の間、10,000から400,000個の間、10,000から380,000個の間、10,000から360,000個の間、10,000から340,000個の間、10,000から320,000個の間、10,000から300,000個の間、10,000から280,000個の間、10,000から260,000個の間、10,000から240,000個の間、10,000から220,000個の間、10,000から200,000個の間、10,000から180,000個の間、10,000から160,000個の間、10,000から140,000個の間、10,000から120,000個の間、10,000から100,000個の間、10,000から90,000個の間、10,000から80,000個の間、10,000から70,000個の間、10,000から60,000個の間、10,000から50,000個の間、10,000から40,000個の間、10,000から30,000個の間、10,000から20,000個の間、20,000から500,000個の間、20,000から480,000個の間、20,000から460,000個の間、20,000から440,000個の間、20,000から420,000個の間、20,000から400,000個の間、20,000から380,000個の間、20,000から360,000個の間、20,000から340,000個の間、20,000から320,000個の間、20,000から300,000個の間、20,000から280,000個の間、20,000から260,000個の間、20,000から240,000個の間、20,000から220,000個の間、20,000から200,000個の間、20,000から180,000個の間、20,000から160,000個の間、20,000から140,000個の間、20,000から120,000個の間、20,000から100,000個の間、20,000から90,000個の間、20,000から80,000個の間、20,000から70,000個の間、20,000から60,000個の間、20,000から50,000個の間、20,000から40,000個の間、20,000から30,000個の間、25,000から500,000個の間、25,000から480,000個の間、25,000から460,000個の間、25,000から440,000個の間、25,000から420,000個の間、25,000から400,000個の間、25,000から380,000個の間、25,000から360,000個の間、25,000から340,000個の間、25,000から320,000個の間、25,000から300,000個の間、25,000から280,000個の間、25,000から260,000個の間、25,000から240,000個の間、25,000から220,000個の間、25,000から200,000個の間、25,000から180,000個の間、25,000から160,000個の間、25,000から140,000個の間、25,000から120,000個の間、25,000から100,000個の間、25,000から90,000個の間、25,000から80,000個の間、25,000から70,000個の間、25,000から60,000個の間、25,000から50,000個の間、25,000から40,000個の間、25,000から30,000個の間、30,000から500,000個の間、30,000から480,000個の間、30,000から460,000個の間、30,000から440,000個の間、30,000から420,000個の間、30,000から400,000個の間、30,000から

10

20

30

40

50

個の間、260,000から300,000個の間、260,000から280,000個の間、280,000から500,000個の間、280,000から480,000個の間、280,000から460,000個の間、280,000から440,000個の間、280,000から420,000個の間、280,000から400,000個の間、280,000から380,000個の間、280,000から360,000個の間、280,000から340,000個の間、280,000から320,000個の間、280,000から300,000個の間、300,000から500,000個の間、300,000から480,000個の間、300,000から460,000個の間、300,000から440,000個の間、300,000から420,000個の間、300,000から400,000個の間、300,000から380,000個の間、300,000から360,000個の間、300,000から340,000個の間、300,000から320,000個の間、320,000から500,000個の間、320,000から480,000個の間、320,000から460,000個の間、320,000から440,000個の間、320,000から420,000個の間、320,000から400,000個の間、320,000から380,000個の間、320,000から360,000個の間、320,000から340,000個の間、340,000から500,000個の間、340,000から480,000個の間、340,000から460,000個の間、340,000から440,000個の間、340,000から420,000個の間、340,000から400,000個の間、340,000から380,000個の間、340,000から360,000個の間、360,000から500,000個の間、360,000から480,000個の間、360,000から460,000個の間、360,000から440,000個の間、360,000から420,000個の間、360,000から400,000個の間、360,000から380,000個の間、380,000から500,000個の間、380,000から480,000個の間、380,000から460,000個の間、380,000から440,000個の間、380,000から420,000個の間、380,000から400,000個の間、400,000から500,000個の間、400,000から480,000個の間、400,000から460,000個の間、400,000から440,000個の間、400,000から420,000個の間、420,000から500,000個の間、420,000から480,000個の間、420,000から460,000個の間、420,000から440,000個の間、440,000から500,000個の間、440,000から480,000個の間、440,000から460,000個の間、460,000から500,000個の間、460,000から480,000個の間、又は480,000から500,000個の間のヒトCD303分子を有する。

10

20

【0046】

好ましい実施形態によれば、本発明に係る細胞株は、その表面上に、細胞1個当たり、20,000から60,000個の間、好ましくは25,000から50,000個の間のヒトCD303分子を有する。実際に、細胞1個当たりこのような数のヒトCD303分子は、ヒトCD303抗原に対する抗体を効果的及び再生可能に識別することを可能にする。

30

【0047】

2つのベクターを有する二重のベクター又はキット

第2の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFcRIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターからなる。代替として、ヒトCD303抗原及びヒトFcRIのガンマ鎖をそれぞれコードする核酸分子は、2つの独立した発現ベクター上に存在する。

【0048】

第3の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFcRIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、又はヒトCD303抗原とヒトFcRIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターを含むトランスフェクションキットである。

40

【0049】

本発明に係る、又は本発明に係るトランスフェクションキット中に包含される各ベクターは、前記核酸分子の発現に必要なエレメント、とりわけプロモーター、転写開始コドン、終結配列、及び好適な転写調節配列を含む。これらのエレメントは、発現に使用される宿主に従って様々であり、それらの一般知識に基づき当業者によって容易に選択される。ベクターは、とりわけプラスミドベクター又はウイルスベクターであり得る。

【0050】

哺乳類細胞株、ヒト細胞株、例えばJurkat細胞株、又はCAL-1等のヒトpDC細胞株のケースにおいて、哺乳類細胞における発現を可能にするあらゆる発現ベクターが使用され得る。

50

【0051】

このようなベクターの例としては、Jurkat E6-1細胞株(ATCC(登録商標)TIB-152(商標)、ECACC88042803)でヒトFc RIのガンマ鎖を発現させるのに使用されるベクター-pcDNA4/TO(Invitrogen社)、又は実施例1でヒトCD303抗原を発現させるのに使用されるベクター-pcDNA3.1(-)が挙げられる。

【0052】

使用

第4の態様によれば、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体の機能的な活性、好ましくはADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス又は貪食タイプの活性を特徴付けるための、又は数々の抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原又はヒトCD303抗原のエピトープに対する数々の抗CD303抗体の結合親和性を比較するための、本発明に係る細胞株の使用に関する。

10

【0053】

第5の態様によれば、本発明は、ヒト対象、詳細にはBPDCN又は自己免疫疾患に罹ったヒト対象からのエフェクター細胞の機能的な性能(とりわけADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス及び貪食タイプの性能)を特徴付けるための、本発明に係る細胞株の使用に関する。

【0054】

抗CD303抗体の特徴付け

本発明に係る細胞を使用して特徴付けることができる抗CD303抗体

20

「抗体」は、所与の抗原のための少なくとも1つの結合ドメイン及びFc受容体(FcR)に結合することが可能なFcフラグメントを含む定常ドメインを含む分子を意味する。ヒト及びマウス等のほとんどの哺乳動物において、抗体は、4つのポリペプチド鎖、すなわち分子にフレキシビリティを付与する様々な数のジスルフィド架橋によって一緒に結合した2つの重鎖及び2つの軽鎖で構成される。各軽鎖は、定常ドメイン(CL)及び可変ドメイン(VL)からなり、重鎖は、抗体のアイソタイプに従って、可変ドメイン(VH)及び3つ又は4つの定常ドメイン(CH1からCH3又はCH1からCH4)からなる。可変ドメインは、抗原認識に関与し、一方で定常ドメインは、抗体の生物学的、薬物動態学的及びエフェクター特性に関与する。

【0055】

30

可変領域は、それぞれの抗体ごとに異なる。実際に、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子はそれぞれ、重鎖の場合はVH、DH及びJH-CH並びに軽鎖の場合はVL及びJL-CLと称される3つ及び2つの別個の遺伝子セグメントの組換えによって生成される。CH及びCLセグメントは組換えに参加せず、それぞれ重鎖及び軽鎖の定常領域を形成する。VH-DH-JH及びVL-JLセグメントの組換えは、それぞれ重鎖及び軽鎖の可変領域を形成する。VH及びVL領域はそれぞれ、3つの高度可変ゾーン、又はCDR1、CDR2及びCDR3と称される相補性決定領域(CDR)を有し、CDR3は、組換えゾーン中に配置されているため最も可変である。これらの3つのCDR、特にCDR3は、抗原と接触する抗体の部分に見出され、したがって抗原認識にとって非常に重要である。したがって、3つのCDR並びに抗体の重鎖及び軽鎖のそれぞれを保持する抗体はほとんど、元の抗体の抗原特異性を保持する。一定数のケースにおいて、CDRの1つのみ、とりわけCDR3のみを保持する抗体も元の抗体の特異性を保持する。CDR1、CDR2及びCDR3はそれぞれ、少なくともそれぞれのVH又はVLセグメントごとに異なるフレームワーク領域(FR)にそれぞれ対応するFR1、FR2及びFR3を前に有する。またCDR3の後に、フレームワーク領域、FR4があってもよい。

40

【0056】

本発明の状況において、あらゆるヒトCD303抗原に対する抗体は、その重鎖及び軽鎖の一次配列に関わりなく、とりわけ重鎖及び軽鎖のCDR1、CDR2及びCDR3配列に関わりなく、本発明に係る細胞を使用して特徴付けることができる。

【0057】

配列が抗体ごとに強く変化する可変ドメインとは異なり、定常ドメインは、種及びアイ

50

ソタイプに典型的な抗体間で非常に類似したアミノ酸配列を特徴とし、任意選択で少数の体細胞変異を有することもある。Fcフラグメントは天然に、CH1ドメインを除いた重鎖定常領域からなり、すなわち、下部のヒンジ領域並びに定常ドメインCH2及びCH3又はCH2からCH4(アイソタイプに応じて)からなる。ヒトIgG1において、完全なFcフラグメントは、226位のシステイン残基(C226)から始まる重鎖のC末端部分からなり、Fcフラグメントにおけるアミノ酸残基の番号付けは、本明細書を通して、Edelmanら-1969及びKabatら-1991に記載されるEUインデックスの番号付けである。対応する他のタイプの免疫グロブリンのFcフラグメントは、当業者によって配列アライメントから容易に同定することができる。

【 0 0 5 8 】

Fcフラグメントは、CH2ドメインでグリコシル化され、2つの重鎖のそれぞれに297位のアスパラギン残基(Asn297)に結合したN-グリカンの存在を伴う。

【 0 0 5 9 】

糖付加は、抗体のエフェクター機能、例えばそのADCC及びCDC活性に影響を与えることが公知である。とりわけ、抗体組成物のフコース含量が、Fc RIIIを介して強いADCC応答を誘導する前記組成物の能力において重要な役割を果たすことが今のところ公知である(W001/77181、Shieldsら-2002;Shinkawaら-2003)。本発明の状況において機能的なレベルで特徴付けようとする抗体は、低いフコース含量、とりわけ65%未満か又はそれに等しいフコース含量を有していてもよい。「フコース含量」は、各抗体の各重鎖のFcフラグメントのAsn297残基に付着したN-グリカン内のフコシル化形態のパーセンテージを意味する。「低いフコース含量」は、65%未満か又はそれに等しい、又はそれより一層低いが必ずしもゼロではないフコース含量を意味する。フコース含量は、例えば5%から65%の間、5%から50%の間、又は10%から50%の間であり得る。本発明に係る抗体、それらの機能的なフラグメント又は誘導体は更に、異なるタイプの糖付加(オリゴマンノースのN-グリカン又は2分岐のコンプレックス型であり、パイセクティングN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の、又は2分岐のコンプレックス型のN-グリカンのケースではガラクトース残基の比率は様々である)を有していてもよく、ただしそれらは低いフコース含量を有する。わずかにフコシル化されたN-グリカンを持つ抗体はとりわけ、以下により得られた：

- ・ YB2/0(EP1176195A1、W001/77181、Shinkawaら-2003を参照)、CHO Lec13(Shieldsら-2002を参照)、EB66(登録商標)(Olivierら-2010)、ラット肝癌細胞株H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)(W02012/041768を参照)及びヒト細胞株NM-H9D8(DSM ACC2806)、NM-H9D8-E6(DSM ACC 2807)及びNM H9D8-E6Q12(DSM ACC 2856)(W02008/028686を参照)における産生。

- ・ FUT8(Moriら-2004、Suzukiら-2007、Cardarelliら-2009、Cardarelliら-2010、Herbstら-2010)又はGMD(ゴルジ装置におけるGDP-フコース輸送体をコードする遺伝子、Imai-Nishiyaraら-2007を参照)に対する短鎖干渉RNAの存在下における野生型CHO細胞株における産生。

- ・ 1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子の両方の対立遺伝子が欠失した(Yamane-Ohnukiら-2004)、又はゴルジ装置におけるGDP-フコース輸送体をコードするGMD遺伝子の両方の対立遺伝子が欠失した(Kandaraら-2007)CHO細胞株における産生。

- ・ GnTIII((1,4)-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII)酵素をコードする遺伝子を遺伝子導入により過剰発現させたCHO細胞株における産生(Umanaら-1999)。得られたN-グリカンは、低いフコシル化に加えて、高いパイセクティングGlcNAc含量を特徴とする。

- ・ 短鎖干渉RNAの使用によって 1,2-キシロース及び 1,3-フコース残基の含量を強く低減させたトランスジェニック植物(ベンサミアナタバコ(N.benthamiana))における産生(Forthalら-2010)。

【 0 0 6 0 】

低いフコース含量に加えて、又はその代替として、本発明の状況において機能的なレベルで特徴付けようとする抗体は、高いガラクトース含量を有していてもよい。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

抗体の「ガラクトース含量」又は「ガラクトシル化の程度」は、以下の式：

【 0 0 6 2 】

【 数 1 】

ガラクトース含量 =

$$\frac{\sum_{i=1}^n (\text{Galの数}) \times (\% \text{相対面積})}{\sum_{i=1}^n (\text{Aの数}) \times (\% \text{相対面積})} \times 100$$

【 0 0 6 3 】

10

に従って抗体から放出されたN-グリカンの分析的クロマトグラムから計算されたパーセンテージを意味し、式中：

- 「n」は、クロマトグラム、例えば順相高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) スペクトルで分析されたN-グリカンのピークの数であり、
- 「Galの数」は、ピークに対応するグリカンのアンテナ上のガラクトースの数であり、
- 「Aの数」は、ピークに対応するグリカン型のN-アセチル-グルコサミンのアンテナの数であり、
- 「%相対面積」は、対応するピーク下面積のパーセンテージである。

【 0 0 6 4 】

「高いガラクトース含量」は、30%より大きいか又はそれに等しいガラクトース含量を意味する。

20

【 0 0 6 5 】

以下の結合ドメインは、Fcに配置されており、抗体の生物学的特性にとって重要である：

- 抗体の薬物動態学的特性(インビボにおける半減期)に關与する、新生児型Fc受容体(FcRn)結合ドメイン：

様々なデータから、CH2及びCH3ドメインの境界に配置された特定の残基がFcRn結合に關与することが示唆されている、

- 補体依存性細胞傷害(CDC)応答に關与する、補体C1qタンパク質結合ドメイン:CH2ドメインに配置されている、
- 貪食又は抗体依存性細胞傷害(ADCC)タイプの応答に關与する、Fc受容体(FcR)結合ドメイン:CH2ドメインに配置されている。

30

【 0 0 6 6 】

本発明の意味の範囲内で、抗体のFcフラグメントは、上記で定義されたように天然であってもよいし、そうでなければ、機能的なFcR(IgGの場合はFc R)結合ドメイン、好ましくは機能的なFcRn結合ドメインを含むという条件で、様々な方法で改変されていてもよい。改変としては、Fcフラグメントの特定の部分の欠失を挙げることができ、ただしFcフラグメントが機能的なFcR(IgGの場合はFc R)結合ドメイン、好ましくは機能的なFcRn結合ドメインを含有することを条件とする。改変としては更に、抗体の生物学的特性に影響を与えることができる様々なアミノ酸置換を挙げることができ、ただしFcフラグメントが機能的なFcR結合ドメイン、好ましくは機能的なFcRn結合ドメインを含有することを条件とする。詳細には、抗体がIgGである場合、抗体は、WO00/42072、Shieldsら-2001、Lazarら-2006、WO2004/029207、WO2004/063351、WO2004/074455に記載されるような、Fc RIIIa(CD16a)結合を増加させることを意図した突然変異を含んでいてもよい。例えばShieldsら-2001、Dall'Acquaら-2002、Hintonら-2004、Dall'Acquaら-2006(a)、WO00/42072、WO02/060919、WO2010/045193、又はWO2010/106180に記載されるように、FcRn結合、したがってインビボにおける半減期を増加させるための突然変異も存在していてもよい。他の突然変異、例えば相補タンパク質への結合、したがってCDC応答を減少又は増加させるための突然変異が、任意選択で存在していてもよい(WO99/51642、WO2004/074455、Idusogieら-2001、Dall'Acquaら-2006(b)、及びMooreら-2010を参照)。

40

50

【0067】

本発明の状況において、特徴付けようとする抗体は、あらゆるタイプの動物からの抗体(とりわけマウス、キメラ、ヒト化又はヒト抗体)であり得る。とりわけ、抗原に関する親和性の特徴付けのために、あらゆるタイプの抗体(マウス又は他の動物、キメラ、ヒト化又はヒト)を使用することができる。機能的な活性の特徴付けのために、特徴付けようとする抗体は、好ましくはキメラ、ヒト化又はヒト抗体であり、そのためヒトの環境(ヒトエフェクター細胞、ヒト血清等)における抗体の機能を試験することが可能になる。

【0068】

「キメラ」抗体は、所与の種の抗体に由来する天然の可変領域(軽鎖及び重鎖)を、前記所与の種にとって異種の種の抗体の軽鎖及び重鎖定常領域と組み合わせて含有する抗体を意味する。有利には、本発明に従って医薬品として使用するためのモノクローナル抗体組成物がキメラモノクローナル抗体を含む場合、そのモノクローナル抗体は、ヒト定常領域を含む。キメラ抗体は、非ヒト抗体から、当業者周知の遺伝子組換え技術を使用することによって調製することができる。例えば、キメラ抗体は、プロモーター及び非ヒト抗体の可変領域をコードする配列、並びにヒト抗体の定常領域をコードする配列を含む組換えDNAの重鎖及び軽鎖をクローニングすることによって調製することができる。キメラ抗体を調製するための方法について、例えば、Verhoeyenら-1988による文書を参照し得る。

10

【0069】

「ヒト化」抗体は、非ヒト起源の抗体に由来するCDRを含有する抗体であって、抗体分子の他の部分が1種(又は数種)のヒト抗体に由来するものを意味する。更に、フレームワーク領域(FR)の特定の残基は、結合親和性を保持するように改変されていてもよい(Jonesら-1986;Verhoeyenら、1988;Riechmannら-1988)。本発明に係るヒト化抗体は、当業者公知の技術、例えば、Almagroら-2008による総論で要約されているような、CDRグラフィティング、リサーフェイシング、超ヒト化(superhumanization)、ヒト鎖の含量、FRライブラリー、誘導選択(guided selection)、FRシャッフリング及びヒト化学(humanengineering)技術によって調製し得る。

20

【0070】

本発明の状況において、特徴付けようとする抗体は、有利にはモノクローナル抗体である。「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、同一で固有な抗原特異性を有する抗体分子を含む組成物を意味する。組成物中に存在する抗体分子は、それらの翻訳後修飾に関して、とりわけそれらの糖付加構造又はそれらの等電点に関して異なっている可能性があるが、全て同じ重鎖及び軽鎖配列によってコードされており、したがってあらゆる翻訳後修飾の前では同じタンパク質配列を有する。それでも、翻訳後修飾に関するタンパク質配列における特定の差(例えば、重鎖C末端リシンの切断、アスパラギン残基の脱アミド及び/又はアスパラギン酸残基の異性化等)が、組成物中に存在する様々な抗体分子間に存在する場合がある。

30

【0071】

本発明の状況において、特徴付けようとする抗体は、数々のアイソタイプを有する場合がある。実際に、抗体は、それらの定常領域の性質に従って数々のアイソタイプを有する場合があり、 α 、 μ 、 δ 及び ϵ 定常領域は、それぞれ免疫グロブリンIgG、IgA、IgM、IgE及びIgDに対応する。有利には、本発明の状況において医薬品として使用される組成物中に存在するモノクローナル抗体は、アイソタイプIgGを有する。実際に、このアイソタイプは、最大数の個体(ヒト)において抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を生成する能力を示す。定常領域は、数々のサブタイプ: 1、2、3を含み、これら3つのタイプの定常領域は、ヒト相補体、及び4と結合する機構を有することから、サブタイプIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を作り出す。有利には、本発明の状況において機能的なレベルで特徴付けようとするモノクローナル抗体は、アイソタイプIgG1又はIgG3、好ましくはIgG1を有する。

40

【0072】

本発明の状況において機能的なレベルで特徴付けようとする抗体は、あらゆる好適な宿

50

主細胞、トランスジェニック非ヒト動物、又はトランスジェニック植物から産生してもよい。

【0073】

特徴付けようとする本発明に係る細胞株によって発現されたヒトCD303抗原に対する抗体は、CD303抗原を発現する造血器腫瘍を処置又は予防することを意図していてもよい。これらは、とりわけ表現型CD4+、CD11c-、Lin-、CD303+、CD304+、CD56+の芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)である。

【0074】

これらの抗体はまた、炎症性疾患、とりわけ自己免疫疾患、pDCが関与する疾患、より詳細にはpDCによるIFN- γ 分泌が関与する疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、乾癬、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、1b型糖尿病、自己免疫性血小板減少症(又は血小板減少症)(とりわけ特発性血小板減少性紫斑病、又はITP)、全身性強皮症(進行性全身性強皮症又は全身性硬化症とも称される)、リウマチ様関節炎を処置又は予防することを意図していてもよい。

10

【0075】

本発明の状況において、本発明に係る細胞株はこのようにして、ヒトCD303抗原に対する抗体の機能的な活性を評価するか、又は数々の抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原又はヒトCD303抗原のエピトープに対する数々の抗CD303抗体の親和性を比較することを可能にする。

【0076】

ADCC活性の特徴付け

第1の実施形態において、本発明に係る細胞株の使用は、抗ヒトCD303抗体のADCC活性を特徴付けることに向けられる。したがって、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のADC C活性を特徴付けるための、本発明に係る細胞株の使用に関する。

20

【0077】

「ADCC活性」(ADCCは、「抗体依存性細胞傷害」の略語である)は、標的細胞の表面上に配置された抗原に結合するその可変領域により標的細胞に結合することによって、更に、エフェクター細胞の表面上に配置されたFc受容体(FcR; IgGの場合はFc R)に結合するそのFcフラグメントによりエフェクター細胞に結合することによって、免疫系のエフェクター細胞の存在下で標的細胞(ここでは本発明に係る細胞株の細胞)の死を誘導する抗体の能力を意味する。

30

【0078】

抗体のADCC活性の測定は、従来技術によって実行される。とりわけ、実施形態において、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のADCC活性を試験するための方法であって、

a)本発明に係る細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及びエフェクター細胞と接触させる工程、

b)工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の溶解を可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び

c)工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の溶解の程度を測定する工程

を含む、方法に関する。

40

【0079】

工程a)において、本発明に係る細胞株(標的細胞)は、特徴付けようとするヒトCD303抗原に対する抗体(上述の通り)及びエフェクター細胞と接触させる。

【0080】

ADCC活性の特徴付けに関する状況で、エフェクター細胞は、標的細胞の溶解を誘導することが可能でなければならない。これらは、単球、マクロファージ、Tリンパ球又はNK細胞であり得る。全てのこれらの細胞は末梢血単核細胞(PBMC)中に存在しているため、PBMCを使用してもよい。使用されるエフェクター細胞は、特徴付けようとする抗体に適合するものであり、したがって特徴付けようとするヒト抗CD303抗体のFcフラグメントと同じ種からのものでもよい。

50

【0081】

IgGのケースにおいて、Fc R111aを介したADCCは、インビボにおける優れた活性必須であることが公知であり、したがって本発明に係るADCC試験は、有利なことにFc R111aを介したADCCを特異的に測定する。エフェクター細胞は、ADCC応答を誘導することが可能な、大部分の2つのFc R:IgGのFcフラグメントに対する高親和性を有する受容体、Fc RI、及びIgGのFcフラグメントに対する低い親和性を有する受容体、Fc R111aを発現する。NK細胞は例外であり、Fc R111aのみを発現する。したがって、Fc R111aを介してADCCを特異的に測定するために、エフェクター細胞として精製されたNK細胞を使用することが可能である。代替として、Fc RI及びFc R111aの両方を発現するエフェクター細胞(又は一部がFc RI及びFc R111aの両方を発現し、他のものがFc R111aのみを発現する細胞の混合物)を使用すること、及び反応媒体に多価IgG、すなわち血漿から精製された複数の抗原特異性を有するポリクローナルIgGを添加することによって、IgGのFcフラグメントに対して高親和性を有するFc RIを飽和させることも可能である。ヒトエフェクター細胞が使用される場合、とりわけ、IVIg、又は正常なヒト免疫グロブリン、又は多価IgG、特定の自己免疫疾患の処置で使用される医薬品を使用することができる。

10

【0082】

標的細胞(それらの表面上で試験しようとする抗体によって認識されるヒトCD303抗原を発現する細胞、ここでは本発明に係る細胞株の細胞)は、工程c)で実際に溶解した標的細胞の数を測定することを可能にするマーカーで、事前に細胞内で標識されていてもよい。あらゆる好適なマーカー、例えば放射性、蛍光性、発光又はクロモジェニックマーカーが使用され得る。代替として、標的細胞は、事前に標識されていなくてもよい。このケースにおいて、標的細胞に存在するタンパク質(例えば全ての細胞型に存在するLDH酵素)のアッセイを使用して、工程c)で溶解した細胞の数を測定し得る。

20

【0083】

標的細胞(それらの表面上で試験しようとする抗体によって認識されるヒトCD303抗原を発現する細胞、ここでは本発明に係る細胞株の細胞)及びエフェクター細胞は、インビボにおける生理学的条件に近いエフェクター/標的(E:T)の比率で存在する。

【0084】

ADCC用量-応答曲線が一般的に構築される。この目的を達成するために、増加する量の抗体を、別々のウェルで標的細胞及びエフェクター細胞と接触させ、ADCCを様々な抗体濃度で測定する。各ポイントは、一般的に複数回評価される(とりわけ2連又は3連で)。

30

【0085】

陰性対照も調製され、一般的に以下の通りである:

- ・ 標的細胞を抗体のみと接触させること(エフェクター細胞なし)により得られた自発的な溶解又は放出(SR)、
- ・ 標的細胞をエフェクター細胞のみと接触させること(抗体なし)により得られたエフェクター細胞の天然の細胞傷害(NC)。

【0086】

標的細胞を化学物質で溶解させることにより得られた最大の溶解を示す陽性対照も使用が可能である。

40

【0087】

工程b)において、インキュベーション(一般的に37 °C)は、標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞)の溶解を可能にするのに好適な時間で行われる。インキュベーションの持続時間は、数時間から約1日の間、とりわけ1時間から24時間の間、詳細には4時間から24時間の間で変更され得る。当業者であれば、特定の試験条件に従って最適な時間を決定することができる。

【0088】

最終的に、工程c)において、標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞)の溶解の程度を測定する。これは、一般的に、接触及びインキュベーションに使用されたプレートを遠心分離し、上清を収集して、培地に放出された事前に標識された標的細胞の細胞内マーカーの量

50

、又は最初は標的細胞中に存在しており、標的細胞の溶解後に培地に放出されるタンパク質の量若しくは活性のいずれかを測定することによって行われる。

【0089】

上述の対照が使用される場合、溶解のパーセンテージは、以下の式：

$\%溶解 = [(ER - SR) / (100 - SR)] - [(NC - SR) / (100 - SR)]$ 又は

$\%溶解 = ER - NC - SR$

の1つに従って計算することができ、式中SR及びNCは上記で定義した通りであり、ERは、試験サンプルで達成された溶解に対応する。

【0090】

結果(%溶解)は、抗体の希釈係数の関数として表される。各抗体につき、「50%活性」又は「EC50」値を計算してもよく、この値は、この抗体で得られたプラトー値の50%を誘導するのに必要な抗体の希釈係数に対応する。

10

【0091】

本発明に係るFc R11aを介したADCCのための試験の正確な例は、以下の通りである：ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされたFc 鎖-CD303 Jurkat細胞(細胞35,000個/ウェル)又はCAL-1細胞を、96ウェルの平底プレート中、NK細胞及び増加する濃度の抗CD303抗体と共に37℃で4時間インキュベートする。インキュベーション後、上清を収集する。抗CD303抗体により誘導された標的細胞の溶解を、溶解した標的細胞により上清に放出された細胞内の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)酵素を定量することによって、発色により測定する(細胞傷害検出キット(LDH)、Roche Diagnostics社)。

20

【0092】

溶解のパーセンテージは、以下の式：

$\%溶解 = [(ER - SR) / (100 - SR)] - [(NC - SR) / (100 - SR)]$

に従って計算され、式中、ER及びSRは、それぞれLDHの実験上の放出(ER)及び自発的な放出(SR)を表し、NCは、NK細胞の天然の細胞傷害を表す。

【0093】

結果(%溶解)は、抗体の希釈係数の関数として表される。各抗体につき、「50%活性」値は、この抗体で得られたプラトー値の50%を誘導するのに必要な抗体の希釈係数に対応する。この値は、PRISMソフトウェアで計算することができる。

30

【0094】

サイトカイン分泌を誘導する活性の特徴付け

別の実施形態において、本発明に係る細胞株の使用は、ヒト抗CD303抗体のサイトカイン分泌を誘導する活性を特徴付けることに向けられる。したがって、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のサイトカイン分泌を誘導する活性を特徴付けるための、請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株の使用に関する。

【0095】

「サイトカイン分泌を誘導する活性」は、免疫系のエフェクター細胞による様々なサイトカインの分泌を誘導する抗体の能力を意味する。

【0096】

抗体のサイトカイン分泌を誘導する活性の測定は、従来技術によって実行される。とりわけ、実施形態において、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のサイトカイン分泌を誘導する活性を試験するための方法であって、

40

a)本発明に係る細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及びエフェクター細胞と接触させる工程、

b)エフェクター細胞が少なくとも1つのサイトカインを分泌することを可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び

c)少なくとも1つのサイトカインの分泌速度を測定する工程を含む、方法に関する。

【0097】

50

工程a)において、本発明に係る細胞株(標的細胞)は、特徴付けようとするヒトCD303抗原に対する抗体(上述の通り)及びエフェクター細胞と接触させる。使用され得るエフェクター細胞及び接触条件は、ADCCの特徴付けに関するものと同じである(上記参照)。

【0098】

工程b)において、インキュベーション(一般的に37℃)では、エフェクター細胞が少なくとも1つのサイトカインを分泌することを可能にするのに好適な時間で行われる。インキュベーション時間は、数時間から約1日の間、とりわけ1時間から24時間の間、詳細には4時間から24時間の間で変更され得る。当業者であれば、特定の試験条件に従って最適な時間を決定することができる。

【0099】

最終的に、工程c)において、少なくとも1つのサイトカインの分泌速度は、培養上清のフローサイトメトリーアッセイ等の当業者周知の従来技術によって測定される。試験されるサイトカインとしては、とりわけ、IL-2、IL-10、IFN- γ 及びTNF- α を挙げることができる。

【0100】

補体依存性細胞傷害(CDC)活性の特徴付け

別の実施形態において、本発明に係る細胞株の使用は、ヒト抗CD303抗体のCDC活性を特徴付けることに向けられる。したがって、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のCDC活性を特徴付けるための、請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株の使用に関する。

【0101】

「CDC活性」(CDCは、「補体依存性細胞傷害」の略語である)は、標的細胞の表面上に配置された抗原に結合するその可変部分により標的細胞に結合することによって、一方で補体タンパク質に結合することによって、補体タンパク質の存在下で標的細胞(ここでは本発明に係る細胞株の細胞)の死を誘導する抗体の能力を意味する。

【0102】

抗体のCDC活性の測定は、従来技術によって実行される。とりわけ、実施形態において、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のCDC活性を試験するための方法であって、

a)本発明に係る細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及び補体タンパク質の源と接触させる工程、

b)工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の溶解を可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び

c)工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の溶解の程度を測定する工程を含む、方法に関する。

【0103】

工程a)において、本発明に係る細胞株(標的細胞)を、特徴付けようとするヒトCD303抗原に対する抗体(上述の通り)及び補体タンパク質の源、一般的に血清と接触させる。

【0104】

ここでも再度、標的細胞(それらの表面上で試験しようとする抗体によって認識されるヒトCD303抗原を発現する細胞、ここでは本発明に係る細胞株の細胞)は、工程c)で実際に溶解した標的細胞の数を測定することを可能にするマーカーで、事前に細胞内で標識されていてもよい。あらゆる好適なマーカー、例えば放射性、蛍光性、発光又はクロモジェニックマーカーが使用され得る。代替として、標的細胞は、事前に標識されていなくてもよい。このケースにおいて、標的細胞に存在するタンパク質(例えば全ての細胞型に存在するLDH酵素)のアッセイを使用して、工程c)で溶解した細胞の数を測定することができる。

【0105】

ここでも再度、ADCC用量-応答曲線が一般的に構築される。この目的を達成するために、増加する量の抗体を、別々のウェルで標的細胞及びエフェクター細胞と接触させ、ADCCを様々な抗体濃度で測定する。各ポイントは、一般的に複数回評価される(とりわけ2連又は3連で)。

【0106】

10

20

30

40

50

ここでも再度、工程c)において試験された抗体の各濃度で得られた溶解のパーセンテージを推測するのに、一般的に対照が行われる。この目的を達成するために、それぞれ様々な溶解のパーセンテージ(例えば100%、50%、25%及び0%溶解)に対応する洗浄剤(例えば2% Triton X-100)等の化学物質と共に溶解させた標的細胞の様々な希釈により得られた較正範囲を作製する。対照は、自発的な放出(標的細胞単独)も包含する。

【0107】

工程b)において、インキュベーション(一般的に37℃)は、標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞)の溶解を可能にするのに好適な時間で行われる。インキュベーション時間は、数時間から約1日の間、とりわけ1時間から24時間の間、詳細には1時間から2時間の間で変更され得る。当業者であれば、特定の試験条件に従って最適な時間を決定することができる。

10

【0108】

最終的に、工程c)において、標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞)の溶解の程度を測定する。結果は、以下の式:

$$\% \text{溶解} = (\text{抗体及び相補体を用いた}\% \text{溶解}) - (\text{抗体を用い相補体を用いない}\% \text{溶解})$$

に従って計算される。

【0109】

本発明に係るCDC試験の正確な例は、以下の通りである:

ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされたFc 鎖-CD303 Jurkat細胞又はCAL-1細胞を、増加する濃度の抗CD303抗体(0から5,000ng/mL)と共に、源として乳児ウサギ血清(1:10希釈)の存在下でインキュベートする。

20

【0110】

37℃で2時間インキュベートした後、溶解した標的細胞により上清に放出された細胞内の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)酵素の量を、細胞傷害検出キット(LDH)(Roche Diagnostics社、商品番号11644793001)で測定する。

【0111】

抗体によって誘導されたアポトーシスの特徴付け

別の実施形態において、本発明に係る細胞株の使用は、ヒト抗CD303抗体のアポトーシス活性を特徴付けることに向けられる。したがって、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のアポトーシスを誘導する活性を特徴付けるための、請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株の使用に関する。

30

【0112】

「アポトーシス活性」は、抗体によって認識される抗原を発現する細胞においてアポトーシスを誘導する、特徴付けようとする抗体の能力を意味する。

【0113】

抗体のアポトーシス活性の測定は、ヨウ化プロピジウム及びアネキシンVを使用するアポトーシスのための従来フローサイトメトリー試験等の従来技術によって実行される。とりわけ、実施形態において、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のアポトーシス活性を試験するための方法であって、

40

a)本発明に係る細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体と接触させる工程、

b)抗体が工程a)の本発明に係る細胞株の細胞においてアポトーシスを誘導することを可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び

c)工程a)の本発明に係る細胞株のアポトーシス細胞のパーセンテージを測定する工程を含む、方法に関する。

【0114】

工程a)において、本発明に係る細胞株(標的細胞)は、架橋剤(例えば、Fcフラグメントに対する抗体又は抗体フラグメント)の存在又は非存在で、特徴付けようとするヒトCD303抗原に対する抗体(上述の通り)と接触させる。

【0115】

工程b)において、インキュベーション(一般的に37℃)は、標的細胞(本発明に係る細

50

胞株の細胞)の溶解を可能にするのに好適な時間で行われる。インキュベーション時間は、数時間から約1日の間、とりわけ1時間から24時間の間で変更が可能であり、詳細には16時間である。当業者であれば、特定の試験条件に従って最適な時間を決定することができる。

【0116】

最終的に、工程c)において、アポトーシス細胞のパーセンテージが測定される。この測定は、ヨウ化プロピジウム(PI)及びアネキシンVで細胞を標識することによるフローサイトメトリーによって実行することができる。これらの2つの標識を組み合わせることにより、生きた細胞(アネキシンV及びPI陰性)を、アポトーシス初期の細胞(アネキシンV陽性、PI陰性)又はアポトーシス後期の細胞(アネキシンV陽性、PI陽性)から区別することができる。 10

【0117】

本発明に係るアポトーシス活性試験の正確な例は、以下の通りである：

標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞、 2.5×10^5)を、P24プレートで、1mLのRPMI 10%FCS中、特徴付けようとする抗CD303抗体($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)と共に、架橋剤(例えば $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヤギ抗ヒトIgGFc F(ab')₂)あり又はなしで37 °Cで24時間インキュベートする。次いで細胞を遠心分離し、PBS中で2回洗浄し、キットによって提供される緩衝液中に入れて、BD Biosciences社の推奨に従ってアネキシンV-FITC及びヨウ化プロピジウム(PI)と共にインキュベートする。フローサイトメーターを用いて細胞を分析する；アポトーシス細胞のパーセンテージは、アネキシンV(アネキシンV及びアネキシンV+PI)で標識された細胞に対応する。 20

【0118】

貪食活性の特徴付け

別の実施形態において、本発明に係る細胞株の使用は、ヒト抗CD303抗体の貪食活性を特徴付けることに向けられる。したがって、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体の貪食を誘導する活性を特徴付けるための、請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株の使用に関する。

【0119】

「貪食活性」は、標的細胞の表面上に配置された抗原に結合するその可変部分により標的細胞に結合することによって、更に、エフェクター細胞の表面上に配置されたFc受容体(FcR; IgGの場合はFc R1、Fc R1IA、Fc R1IB2)に結合するそのFcフラグメントによりエフェクター細胞に結合することによって、貪食することができる免疫系のエフェクター細胞(単球、マクロファージ、好中球及び樹状細胞)によって、抗体によって認識される抗原を発現する標的細胞の貪食を誘導する抗体の能力を意味する。 30

【0120】

抗体のADCC活性の測定は、従来技術によって実行される。とりわけ、実施形態において、本発明は、ヒトCD303抗原に対する抗体のADCC活性を試験するための方法であって、

- a) 本発明に係る細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及び貪食することができるエフェクター細胞と接触させる工程、
- b) 工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の貪食を可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び 40
- c) 工程a)の本発明に係る細胞株の細胞の貪食の速度を測定する工程を含む、方法に関する。

【0121】

工程a)において、本発明に係る細胞株(標的細胞)は、特徴付けようとするヒトCD303抗原に対する抗体(上述の通り)及び貪食することができるエフェクター細胞と接触させる。貪食活性の特徴付けに関する状況で、エフェクター細胞は、貪食することができなければならない。これらは、単球、マクロファージ又は好中球であり得る。

【0122】

IgGのケースにおいて、貪食は、貪食することができるエフェクター細胞の表面上に存在する受容体Fc R1、Fc R1IA及びFc R1IB2の1つを介して起こる。Fc R1は、Fc R1IA 50

及びFc R11B2とは異なり高親和性を有することから、Fc R11A及びFc R11B2を介した貪食活性は、ADCCに関して上述したような多価IgGを使用して測定することができる。

【0123】

標的細胞(それらの表面上で試験しようとする抗体によって認識されるヒトCD303抗原を発現する細胞、ここでは本発明に係る細胞株の細胞)は、工程c)で実際に貪食された標的細胞の数を測定することを可能にするマーカーで、事前に細胞内で標識されていてもよい。あらゆる好適なマーカー、例えば放射性、蛍光性、発光又はクロモジェニックマーカーが使用され得る。

【0124】

標的細胞(それらの表面上で試験しようとする抗体によって認識されるヒトCD303抗原を発現する細胞、ここでは本発明に係る細胞株の細胞)及びエフェクター細胞は、インピボにおける生理学的条件に近いエフェクター/標的(E:T)の比率で存在する。

10

【0125】

貪食活性用量-応答曲線が一般的に構築される。この目的を達成するために、増加する量の抗体を、別々のウェルで標的細胞及びエフェクター細胞と接触させ、貪食活性を様々な抗体濃度で測定する。各ポイントは、一般的に複数回評価される(とりわけ2連又は3連で)。

【0126】

陽性対照も調製される:天然の貪食(NP)は、標的細胞をエフェクター細胞のみと接触させること(抗体とは接触させない)により得る。

20

【0127】

工程b)において、インキュベーション(一般的に37 °C)は、標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞)の貪食を可能にするのに好適な時間で行われる。インキュベーション時間は、数時間から約1日の間、とりわけ1時間から24時間の間、詳細には4時間から24時間の間で変更され得る。当業者であれば、特定の試験条件に従って最適な時間を決定することができる。

【0128】

最終的に、工程c)において、標的細胞(本発明に係る細胞株の細胞)の貪食の速度を測定する。これは、一般的に、洗浄することによって貪食されなかった標的細胞を除去し(貪食することができるエフェクター細胞は、一般的に接着性である)、食細胞中に存在する事前に標識された標的細胞の数を測定することによって実行される。

30

【0129】

次いで貪食のパーセンテージ又は貪食の指標は、以下の式:

$\% \text{貪食} = (\text{少なくとも1つの標的細胞を含有するエフェクター細胞の}\%) \times (\text{標的細胞を含有するエフェクター細胞1個当たりの標的細胞の平均数})$

に従って計算することができる。

【0130】

結果(%貪食)は、抗体の希釈係数の関数として表される。各抗体につき、「50%活性」又は「EC50」値を計算することができ、この値は、この抗体で得られたプラトー値の50%を誘導するのに必要な抗体の希釈係数に対応する。

40

【0131】

数々の抗CD303抗体のヒトCD303抗原に対する親和性の比較

別の実施形態において、本発明は、ヒトCD303抗原に対する数々の抗CD303抗体の結合親和性を比較するための、本発明に係る細胞株の使用に関する。

【0132】

ヒトCD303抗原に対する抗CD303抗体の結合親和性は、本発明に係る細胞株を使用することによって当業者公知のあらゆる技術により測定することができる。

【0133】

とりわけ、本発明に係る細胞株によって発現されたヒトCD303への試験しようとする抗CD303抗体の結合は、フローサイトメトリーによって研究することができる。この目的を達

50

成するために、本発明に係る細胞株の細胞をまず、抗体(抗CD303又は陰性対照)と共に、様々な濃度(0~40 µg/mL、最終濃度)で4 で30分インキュベートする。希釈剤で洗浄した後、4 で45分、フィコエリトリン(PE)をカップリングしたヤギ抗マウスIgG F(ab')₂フラグメント(希釈剤で1:100に希釈した100 µL)を添加することによって抗体を可視化する。次いで細胞を洗浄して、フローサイトメトリー(FC500、Beckman Coulter社)によって分析する。

【0134】

結果を用量-応答曲線として表し、X軸に濃度、Y軸に平均蛍光強度(MFI)を示す。

【0135】

プラトー時の値(Bmax、平均最大蛍光強度)を、例えばGraphPad PRISM(登録商標)ソフトウェアを使用して曲線をモデリングした後に推測して、試験しようとする様々な抗CD303抗体間で比較することができる。EC50を表した値は、Bmax値の50%に到達するのに必要な抗体の量を示しており、これも計算することができる。試験しようとする様々な抗体のEC50値は、比較することができる。

10

【0136】

2つの抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原のエピトープの比較

別の実施形態において、本発明は、数々の抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原のエピトープを比較するための、本発明に係る細胞株の使用に関する。

【0137】

2つの抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原のエピトープを比較するために、本発明に係る細胞株への結合に関して、エピトープが公知の様々な抗CD303抗体と競合するように、試験しようとする抗体を設置することができる。とりわけ、好ましくは、試験しようとする2つの抗体の一方が検出マーカーを有しており、増加する濃度の他方の非標識抗CD303抗体の非存在又は存在下で本発明に係る細胞株と接触させる。次いで本発明に係る細胞株の細胞の標識強度が測定される。2つの抗体によって認識されるエピトープが同一であるか又はオーバーラップする場合、本発明に係る細胞株への結合に関する2つの抗体間の競合が観察され、すなわち、非標識抗体の濃度が増加すると、本発明に係る細胞株の細胞の標識強度は減少する。

20

【0138】

2つの抗CD303抗体の一方によって認識されるヒトCD303抗原のエピトープが公知である場合、他方の抗CD303抗体によって認識されるエピトープを特徴付けることが可能な場合がある。

30

【0139】

ヒト対象からのエフェクター細胞の機能的な性能の特徴付け

本発明に係る細胞株はまた、ヒト対象、詳細にはBPDCN又は自己免疫疾患に罹ったヒト対象からのエフェクター細胞の機能的な性能(とりわけADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス及び貪食タイプの性能)を特徴付けるのにも使用することができる。

【0140】

特徴付けようとする機能的な性能

特徴付けることができる機能的な性能は、上述したのと同じであり、とりわけADCC、CD C、サイトカイン分泌、アポトーシス及び貪食タイプの性能である。

40

【0141】

試験方法は、同じ抗体が使用されることと、使用される対照が機能的な性能が公知の対照エフェクター細胞であることを除いて、抗CD303抗体の特徴付けについて上述したのと同じである。

【0142】

特徴付けようとするエフェクター細胞

特徴付けようとするエフェクター細胞は、とりわけBPDCN又は自己免疫疾患に罹っているヒト対象から事前に得ることが可能である。

【0143】

50

末梢血からのエフェクター細胞は、PBMC、又は精製されたエフェクター細胞、例えば単球、マクロファージ、Tリンパ球若しくはNK細胞の形態で、特徴付けに使用することができる。

【0144】

抗CD303抗体を特徴付けるためのキット

第6の態様によれば、本発明は、抗CD303抗体を特徴付けるためのキットであって、本発明に係る細胞株、並びに有利にはエフェクター細胞、多価IgG、及び参照抗CD303抗体から選択される少なくとも1つの試薬を含む、キットからなる。

【実施例】

【0145】

(実施例1)

ヒトCD303及びヒトFc RIのガンマ鎖を安定して発現するJurkat細胞株の調製及び特徴付け

材料及び方法

細胞及び培養条件

Fc 鎖Jurkat細胞株(JurkatクローンE6-1細胞株(ヒトFc RIのガンマ鎖のための発現ベクター(pcDNA4/TO)で安定してトランスフェクトされたATCC(登録商標)TIB-152(商標)))を、10%ウシ胎児血清(FCS)が補充されたグルタミン含有RPMI1640培地中で、37℃、空气中7%CO₂下で培養した。ヌクレオフェクション(登録商標)の3日前に細胞0.5×10⁵個/mLで細胞を植え付けた。

【0146】

ベクターの構築

ヒトCD303抗原をコードする全長cDNA(GenBank/EMBL/DDBL、AF293615.1)を、ベクターpcDNA3.1(-)(図1におけるこのベクターのマップを参照)にサブクローニングした。

【0147】

BamHI及びHindIII制限部位を付加した後、コザック配列、及び第2の終止コドン、コード配列をMWGによって合成する。

【0148】

これらの2つのベクターでクローニング部位が異なるため、ベクターが(+)であるか又は(-)であるかを決定するために、研究を開始する前にpcDNA3.1ベクターをプライマーBGHpA PERC6-3'を用いたMWGによって配列決定した。シーケンシングから、ベクターがpcDNA3.1(-)であることが示された。

【0149】

CD303コード配列及びプライマーCD303-5'及びCD303-3'をMWGによって合成する。BamHI及びHindIIIでの二重の消化を、CD303コード配列を含むMWGベクター及びベクターpcDNA3.1(-)で実行する。ゲル上で消化を確認して、ヌクレオスピネクストラクト(NucleoSpin Extract)IIで配列を精製する。CD303をライゲーションによってベクターpcDNA3.1(-)に挿入し、次いで大腸菌(E. coli)に形質転換する。7つの細菌コロニーを、センスプライマーCD303-5':5'-ACATTCAGTGCATGTACCTCAGAAGTC-3'、及びアンチセンスプライマーBGHpA PERC6-3':5'-CATGCCTGCTATTGTCTTCCCA-3'を使用してPCRでスクリーニングする。使用されるPCRプログラムは、とりわけハイブリダイゼーション(52℃)、伸長(72℃で30秒)及び変性(95℃)工程からなる30サイクルを含む。7つのコロニーのうち6つのコロニーが、CD303挿入物(295bpのPCR産物)を含有する。これらの6つのコロニーから、4つのストックグリセロールを調製し、CD303挿入物を有するpcDNA3.1(-)ベクターを回収するために4つの細菌培養物を精製する。CD303挿入物の存在を確認するために、BamHI及びHindIII酵素での対照消化を実行する。

【0150】

ミニプレップによって精製されたpcDNA3.1(-)ベクターに存在するCD303挿入物の配列は、プライマーCD303-5'及びCD303-3'(5'-AGACCTTCAACTGGAACCCAGAG-3')を使用したシーケンシングによって確認される。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 1 】

次いでベクターをエンドフリーマキシプレップ(EndoFree Maxiprep)によって精製し、プライマーCD303-5'及びCD303-3'を用いたシーケンシングによって確認する。

【 0 1 5 2 】

次いでベクターをScaIで線形化し、沈殿させて、その後、1 µg/mLのTE緩衝液に溶解させる。

【 0 1 5 3 】

Fc 鎖Jurkat細胞のトランスフェクション

Amaxa社のトランスフェクションシステム(Amaxa Biosystems社、Cologne、Germany)に関して確立された手順に従ってトランスフェクションを実行した。ヌクレオフェクションに関して、 2×10^6 個の細胞及び3 µgの線形化したCD303pcDNA3.1(-)ベクターを、X-001プログラムに従って100 µLのNucleofector溶液(Jurkat用のNucleofector(商標)キット、Amxa社)に懸濁した。対照として、1 µgの強化緑色蛍光タンパク質(EGFP)プラスミドDNA(pmaxGFP、Amxa社)を同じヌクレオフェクションプロトコールで使用した。

10

【 0 1 5 4 】

トランスフェクションの後、細胞を、抗生物質を含まず培養培地を含む6ウェルのプレートに塗り広げた。3~4日のインターバルで週2回、選択培地を部分的に交換した(約半分の体積)。

【 0 1 5 5 】

24時間後、pmaxGFPでトランスフェクトした細胞を測定のために収集した。pMax-GFP(Lo nza社、Allendale、NJ、USA)のトランスフェクションの後に、トランスフェクション効率をFACSによって決定した。

20

【 0 1 5 6 】

48時間培養した後、トランスフェクトされた細胞をフローサイトメトリーによって分析し、それらの表面上にCD303を発現する細胞を、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によって精製した。

【 0 1 5 7 】

蛍光活性化セルソーティング

簡単に言えば、トランスフェクトされた細胞のプールをPE標識抗CD303抗体(Miltenyi Biotec社)で標識した。対照として、同じPE(フィコエリトリン)アイソタイプのマウスモノクローナル抗体を使用した。蛍光標識された細胞を、EPICS ALTRA蛍光活性化セルソーター(Beckman社)で分析した。

30

【 0 1 5 8 】

培養培地に1mg/mLのG418(Sigma社)を適用することによって、ゲネチシン選択をセルソーティングの24時間後に始めた。

【 0 1 5 9 】

限界希釈クローニング

次いでクローニングの48時間前に細胞を細胞 1×10^5 個/mLで植え付けた。クローニングの日に、細胞を計数した;継続するには、生存率が80%より高くなければならない。細胞をRPMI+10%FCS(細胞2個/mL)に再懸濁し、96ウェルプレート上に植え付けた(200 µL/ウェルは細胞0.4個/ウェルに対応する)。37 °C、7%CO₂で10から12日間、細胞をインキュベートした。

40

【 0 1 6 0 】

3~4日のインターバルで週2回、培地を部分的に交換した(約半分の体積)。

【 0 1 6 1 】

細胞1個当たりのCD303分子の数の決定

Fc 鎖-CD303 Jurkatクローンのうち1種の細胞1個当たりのCD303分子の数の決定は、Q1 FIKIT(Dako社)、及びマウス抗CD303抗体AC144を使用したフローサイトメトリーによって実行される。

【 0 1 6 2 】

50

Fc 鎖-CD303 Jurkatクローンのうち1種の細胞及び抗体は、希釈剤(PBS+1%FCS)中で調製される。

【0163】

1×10^5 個の細胞を、100 μ Lの抗体(抗CD303又は陰性対照)と共に、様々な濃度(0~40 μ g/mL、最終濃度)で4で30分インキュベートする。

【0164】

希釈剤で洗浄した後、4で45分、フィコエリトリン(PE)をカップリングしたヤギ抗マウスIgG F(ab')₂フラグメント(希釈剤で1:100に希釈した100 μ L)を添加することによって抗体を可視化する。次いで細胞を洗浄して、フローサイトメトリー(FC500、Beckman Coulter社)によって分析する。

10

【0165】

結果

CD303でトランスフェクトされたFc 鎖Jurkat細胞のFACS選択

セルソーティング前は、ほぼ0.4%の細胞がCD303を発現した(データは示されない)。

【0166】

CD303陽性細胞をFACS(細胞20,767個、プール008-2)によって単離し、RPMI培地+10%FCS中に植え付けた。残念なことに、これらの細胞はこれらの培養条件で成長しない。

【0167】

CD303陰性細胞をゲネチシン選択下(3日目)で植え付けた。25日目に、これらの細胞の35%がCD303を発現した。第2のセルソーティング後、細胞のほぼ73%がCD303に関して陽性であり、ゲネチシン選択下で追加で18日後、細胞の88%より多くがCD303を発現した(図2)。

20

【0168】

44日目に、第3のセルソーティング後、細胞のほぼ93%がCD303を発現した(図3)。

【0169】

CD303発現の安定性:ゲネチシン選択下での培養の2カ月後、細胞の77%より多くがそれでもなおCD303を発現した(図4)。

【0170】

CD303+細胞の限界希釈クローニング

更に、本発明者らは、CD303を発現する安定なFc 鎖Jurkat形質移入体の限界希釈クローニングを実行した。

30

【0171】

27個のクローンを単離し、抗CD303-PE抗体で染色することによって試験した。4つのクローンのみを選択し、融解させた;細胞の80%より多くがCD303を発現した(図5)。

【0172】

細胞1個当たりのCD303分子の数の決定

次いでクローンの1つを細胞1個当たりのCD303分子の数に関して特徴付けた。結果は、細胞1個当たりのCD303分子の数が $28,325 \pm 5,405$ 個であることを示す。

【0173】

結論

CD303 pcDNA3.1(-)ベクターでのトランスフェクション、ゲネチシン選択、及び蛍光活性化セルソーティングの後、Fc 鎖CD303+Jurkat細胞の安定なプール(80%より多くが陽性細胞)が現在利用可能であり、インビトロでの抗CD303抗体の特徴付けのための有用なツールの代表である。

40

【0174】

(実施例2)

CD303の過剰発現のためのpDCのトランスフェクション

CD303を過剰発現させるためのCAL-1細胞(pDC)のトランスフェクションを、Amaya社のヒト樹状細胞Nucleofectorキットを用いて実行する。

【0175】

トランスフェクションの前日に、細胞 2×10^5 個/mLで細胞を植え付ける。トランスフ

50

エクシジョンの日、CAL-1細胞は、細胞 4.6×10^5 個/mLの細胞密度及び85%の生存率を有する。

【0176】

トランスフェクションの日:

・EMS培地+10%FCS(ウシ胎児血清)を37℃で1時間予熱し(7.5mLを含有する1F25フラスコ及び1.5mLを含有するP6プレートの2ウェル)、

・キット中の利用可能な「サプリメント」(135 μ L)を、「Nucleofector」溶液(615 μ L)に添加する。

・ 7×10^6 個の細胞を200gで10分遠心分離する(細胞 1×10^6 個/キュベット)。

・次いでペレットを700 μ LのNucleofector溶液に溶解させ、エッペンドルフチューブ1つ当たり100 μ Lで分配する。

・3 μ L(3 μ g)のCD303 pcDNA3.1(-)ベクター、及び4 μ L(2 μ g)のpmax-GFPベクター又はベクターなし(パイロット陰性)をエッペンドルフチューブごとに添加する。

・細胞懸濁液をキュベットに移し、U-002プログラムを適用する。

・500 μ Lの予熱した培地をキュベットに添加し、細胞懸濁液を、以下の通りに培地を含有するF25フラスコ又はP6プレートに穏やかに移す:

- CD303 pcDNA3.1(-)を含む5つのキュベットを、F25フラスコ中の10mLの培地に入れる

、

- Pmax-GFPを含む1つのキュベットを、P6プレート上で2mLの培地に入れる、

- T-を含む1つのキュベットを、P6プレート上で2mLの培地に入れる。

・次いでキュベットを37℃で7%CO₂と共にインキュベートする。

【0177】

1日目から51日目:

・1日目:サイトメトリー及び蛍光顕微鏡検査法によるGFPの測定を実行して、トランスフェクション効率を推測する。サイトメトリーによる測定から、49%のトランスフェクトされた細胞が明らかになり、顕微鏡による測定から、43%のトランスフェクトされた細胞が明らかになる。

・3日目:細胞を計数し、ペレットを、選択培地(EMS+10%FCS+1g/LのG418)中、細胞 5×10^5 個/mLで溶解させる。

・6日目:細胞を計数し、ペレットを選択培地(EMS+10%FCS+1g/LのG418)中、細胞 4×10^5 個/mLで溶解させる。

CD303でトランスフェクトされたCAL-1:細胞 8.1×10^5 個/mL及び49%の生存率。

陰性対照CAL-1:細胞 2.6×10^5 個/mL及び42.6%の生存率。

・8日目:細胞を計数し、細胞の一部をP24プレート(1mL/ウェル)に移し、残りをF150フラスコ(56mL)に移す。

CD303でトランスフェクトされたCAL-1:細胞 0.22×10^5 個/mL及び3%の生存率。

陰性対照CAL-1:細胞 0.1×10^5 個/mL及び1.5%の生存率。

・10日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。

F150:細胞 0.08×10^5 個/mL及び1.3%の生存率。細胞を遠心分離し、ペレットを、死細胞 5×10^5 個/mLを超えないように、65mL中に溶解させる。

P24:培地の半分を交換する。

陰性対照:細胞 0.0×10^5 個/mL及び0%の生存率、その場合、止める。

・13日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。

F150:細胞 0.04×10^5 個/mL及び0.7%の生存率。細胞を遠心分離し、ペレットを、死細胞 5×10^5 個/mLを超えないように、70mL中に溶解させる。

P24:培地の半分を交換する。

・17日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。

F150:細胞 0.04×10^5 個/mL及び1.0%の生存率。細胞を遠心分離し、ペレットを、死細胞 5×10^5 個/mLを超えないように、56mL中に溶解させる。

P24:培地の半分を交換する。

10

20

30

40

50

- ・ 20日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。
 F150:細胞 0.002×10^5 個/mL及び0.5%の生存率。その場合、止める。
 P24:1つのウェルを計数する: 16.4×10^5 細胞/mL及び53.8%の生存率。
 P24を3つのF75フラスコ(8つのP24ウェル/F75、最終的に30mL)に移した。
- ・ 22日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。
 F75:細胞 12.8×10^5 個/mL及び85%の生存率。
 プールを抗CD303-PEで標識する。細胞集団のうちごく一部が、CD303を高いレベルで発現する(図6を参照)。
 8つのクライオチューブを液体窒素中で凍結する。
 F75フラスコ中、細胞 3×10^5 個/mLで再度植え付ける。 10
- ・ 24日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。
 F75:細胞 19.9×10^5 個/mL及び95%の生存率。F75フラスコ中、細胞 2×10^5 個/mLで再度植え付ける。
 EMS+10%FCS+0.5g/LのG418中の細胞40個/P96でクローニングし、5つのクローニングプレート調製する。
- ・ 28日目から37日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。
 F75:F75フラスコ中、細胞 2×10^5 個/mLで週3回再度植え付ける。
 クローニング:培地の半分を週1回交換する。
- ・ 38日目から50日目:CD303でトランスフェクトされたCAL-1細胞を計数する。 20
 F75:F75フラスコ中、細胞 2×10^5 個/mLで週3回再度植え付ける。
 クローニング:クローンをP24プレートに移し、次いでサイトメトリーでCD303発現をスクリーニングするためにP6プレートに移す。
 30種のクローンをスクリーニングし、2つの陽性クローン、NF-3C8及びNF-5G9を保持する(図7を参照)。
- ・ 51日目:クローンNF-3C8及びNF-5G9の8つのクライオチューブを凍結し、培養物中のクローンを細胞 0.5×10^5 個/mLで維持する;週2回再度植え付ける。
 【0178】
 次いで、CAL-1細胞及び2つのクローン、NF-3C8及びNF-5G9を、実施例1に記載されるプロトコールに従って、QIFIKIT(Dako社)、及びマウス抗CD303抗体AC144を使用したフローサイトメトリーにより細胞1個当たりのCD303分子の数に関して特徴付けた。 30
 【0179】
 結果から、細胞1個当たりのCD303分子の数が、CAL-1細胞の場合、3,000~6,000個(又は平均して約4,500個)であり、2つのクローンの場合、細胞1個当たり40,000から50,000個(又は約平均して45,000個)のCD303分子であることが示される。したがって2つのクローン、NF-3C8及びNF-5G9は、元のCAL-1細胞株と比較してCD303の高い表面発現を有し、増幅倍数は約10であった(又は元のCAL-1細胞株に対して約900%の増加であった)。
 【0180】
 (実施例3)
 G418の存在及び非存在下におけるクローンNF-3C8及びNF-5G9の3カ月の安定性研究
 材料及び方法 40
- F25フラスコ(10mL)、EMS培地+10%FCS+0.5g/LのG418中、細胞 0.5×10^5 個/mLで週2回、細胞を再度植え付ける。
 【0181】
 2週間毎にサイトメトリーによってCD303発現を評価する。
 【0182】
 PBS+1%FCSで1:10に希釈した抗CD303-PE(AC144)(Miltenyi Biotec社、商品番号130-090-511)を使用して氷上で標識付けを実行する。
 【0183】
 結果
- 図8及び9に、サイトメトリーによる標識付けの結果を示す。 50

【 0 1 8 4 】

MF1値は、試験によってわずかに変動するが、G418の非存在下で12週間培養した後にCD303発現の損失は観察されない。したがってCD303発現は、試験された2つのクローンに関して安定である。

【 0 1 8 5 】

(実施例4)

CD303-Jurkat細胞又はクローンNF-3C8及びNF-5G9を使用したキメラ抗CD303抗体の特徴付け

材料及び方法

抗体

122A2、102E9、114D11、104C12及び104E10と名付けられた5つのキメラ抗(ヒトCD303)抗体を試験した。別の抗原に対する対照抗体及びB11B059と称されるヒト化抗(ヒトCD303)抗体も使用した。

【 0 1 8 6 】

CD303-結合試験

一方ではFc鎖-CD303 Jurkat細胞又はNF-3C8及びNF-5G9細胞、他方では抗体を希釈剤(PBS+1%FCS)中で調製する。

【 0 1 8 7 】

1×10^5 個の細胞を、100 μ Lの抗体(抗CD303又は陰性対照)と共に、様々な濃度(0~40 μ g/mL、最終濃度)で4で30分インキュベートする。

【 0 1 8 8 】

希釈剤で洗浄した後、4で45分、フィコエリトリン(PE)をカップリングしたヤギ抗マウスIgG F(ab')₂フラグメント(希釈剤で1:100に希釈した100 μ L)を添加することによって抗体を可視化する。次いで細胞を洗浄して、フローサイトメトリー(FC500、Beckman Coulter社)によって分析する。

【 0 1 8 9 】

CD16aを介したADCCのための試験

Fc鎖-CD303 Jurkat細胞(細胞35,000個/ウェル)を、96ウェルの平底プレート中、NK細胞及び増加する濃度の抗CD303抗体と共に37で4時間インキュベートする。インキュベーション後、上清を収集する。抗CD303抗体により誘導された標的細胞の溶解を、溶解した標的細胞により上清に放出された細胞内の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)酵素を定量することによって、発色により測定する(細胞傷害検出キット(LDH)、Roche Diagnostics社)。

【 0 1 9 0 】

溶解のパーセンテージは、以下の式:

$$\%溶解 = [(ER-SR)/(100-SR)] - [(NC-SR)/(100-SR)]$$

に従って計算され、式中、ER及びSRは、それぞれLDHの実験上の放出(ER)及び自発的な放出(SR)を表し、NCは、NK細胞の天然の細胞傷害を表す。結果(%溶解)は、抗体の希釈係数の関数として表される。各抗体につき、「50%活性」値は、この抗体で得られたプラトー値の50%を誘導するのに必要な抗体の希釈係数に対応する。この値は、PRISMソフトウェアを用いて計算された。

【 0 1 9 1 】

結果

CD303結合試験

図10に結果を示す。それによれば、クローンNF-3C8又は代替としてNF-5G9を使用することによって、ヒトCD303抗原への結合における差を区別することが可能であることが示される。

【 0 1 9 2 】

ADCC試験

図11Aに、ヒトCD303抗原のための発現ベクターでトランスフェクトされていないCAL-1細胞株の存在下における、キメラ抗CD303抗体122A2及び114D1又は対照抗体により得られ

10

20

30

40

50

たCD16aを介したADCC活性を示す。CAL-1細胞株により観察された低い特異性のADCC活性(約10%)は、CD303部位の数が少ないこと(3,000から6,000の間の部位)に起因する可能性がある。

【0193】

図11B及び以下のTable 1(表1)に、その表面上で40,000から50,000個のヒトCD303抗原分子を発現するヒトCD303抗原のための発現ベクターでトランスフェクトされたCAL-1細胞株(クローンNF-3C8)の存在下における、キメラ抗CD303抗体122A2及びch.102E9、ヒト化抗CD303抗体BIIB059、又は対照抗体により得られたCD16aを介したADCC活性を示す。

【0194】

【表1】

10

| | 対照 | ch.122A2 | ch.102E9 | BIIB059 |
|--------------|-----|----------|----------|---------|
| Emax (%溶解) | n/a | 39.94 | 40.19 | 29.30 |
| EC50 (ng/mL) | n/a | 0.04 | 0.05 | 1.68 |

Table 1.キメラ抗CD303抗体122A2及びch.102E9、ヒト化抗CD303抗体BIIB059、又は対照抗体により得られたCD16aを介したADCC活性。Emax:高濃度の抗体でのプラトーで得られた最大溶解%。EC50:最大の溶解の50%を達成する抗体濃度。

【0195】

明らかに、クローンNF-3C8は、様々な抗CD303抗体により誘導されたCD16aを介したADCC 20
応答を、トランスフェクトされていないCAL-1細胞株に比べて極めて優れて検出することを可能にする。

【0196】

キメラ抗CD303抗体122A2及び114D1により誘導されたCD16aを介したADCC活性は、ヒト化抗CD303抗体BIIB059により誘導された活性より約40倍高い。

【0197】

結論

上記に示したデータは明らかに、治療用途のために抗CD303抗体を特徴付け、識別することに関する本発明に係る細胞株の実用性を示す。

【0198】

30

(参考文献)

- Almagro *et al.* *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, January 1, 2008.
- Cardarelli *et al.* *Cancer Immunol Immunother.* 2010. 59. 257-265,
- Cardarelli *et al.* *Clin Cancer Res* 2009 April 28;15:3376-3383.
- Dall'Acqua *et al.* 2002, *J Immunol.*; 169:5171-80.
- Dall'Acqua *et al.* 2006, *J. Biol. Chem.*;281:23514-24. (a).
- Dall'Acqua *et al.* *J Immunol* 2006;177:1129-1138. (b).
- Edelman, G.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969). 10
- EP1176195A1
- Forthal *et al.*, *J Immunol* 2010;185;6876-6882.
- Herbst R. *et al.* *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct;335(1):213-22.
- Hinton *et al.* 2004, *J Biol Chem.*;279:6213-6.
- Idusogie EE *et al.* *J Immunol.* 2001;166:2571-5.
- Imai-Nishiya *et al.*, *BMC Biotechnology* 2007, 7:84.
- Jones *et al.* *Nature*, 321:522-525, 1986.
- JP 5011520 20
- Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).
- Kanda Y *et al.*, *Journal of Biotechnology* 130 (2007) 300-310.
- Lazar, G. A., *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11):4005-10.
- Maeda T *et al.*, *Int J Hematol.* 2005 Feb;81(2):148-54
- Moore GL. *Et al.* *mAbs* 2:2, 181-189; March/April, 2010.
- Mori K, *et al.* *Biotechnol Bioeng.* 2004 Dec 30;88(7):901-8.
- Olivier S. *et al.* *MABs.* 2010 Jul-Aug;2(4):405-415. 30
- Riechmann *et al.* *Nature*, 332:323-327, 1988.
- Shields RL, *et al.* *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6591-604.
- Shields RL, *et al.* *J Biol Chem.* 2002 Jul 26;277(30):26733-40.
- Shinkawa T, *et al.* *J Biol Chem.* 2003 Jan 31;278(5):3466-73.
- Suzuki *et al.* *Clin Cancer Res* 2007 March 15;13:1875-1882.
- Umana *et al.* *Nat Biotechnol.* 1999 Feb;17(2):176-80.
- Verhoeyen *et al.* *Science*, 239:1534-1536, 1988.
- WO00/42072, 40
- WO00/42072,
- WO01/77181
- WO02/060919,
- WO2004/029207,
- WO2004/063351,

WO2004/074455,
WO2008/028686
WO2010/045193,
WO2010/106180
WO2012/041768
WO2012/080642,
WO99/51642,

Yamane-Ohnuki N. *et al.* Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22.

【 図 1 】

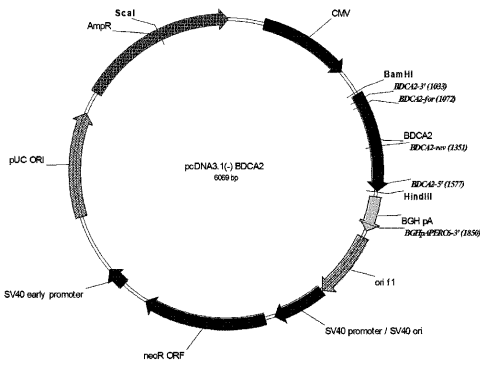


Figure 1

【 図 2 】

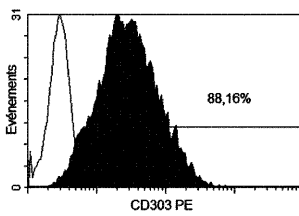


Figure 2

【 図 3 】

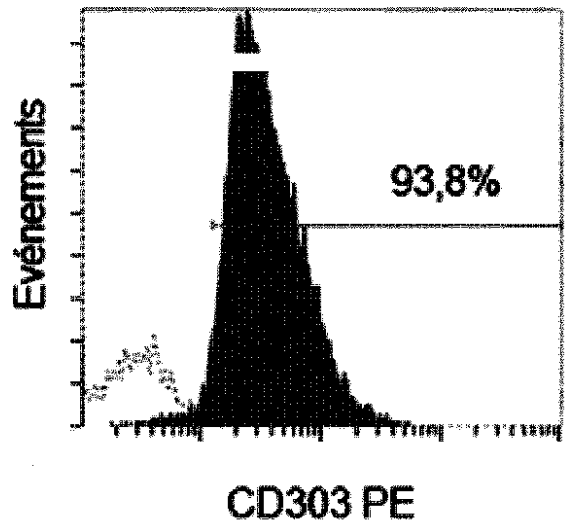


Figure 3

【 図 4 】

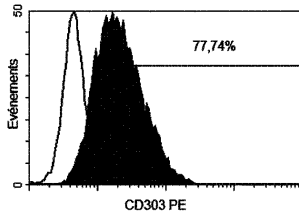


Figure 4

【 図 6 】

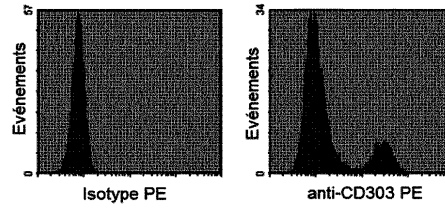


Figure 6

【 図 5 】

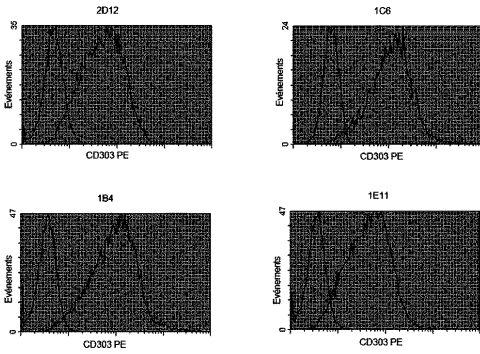


Figure 5

【 図 7 】

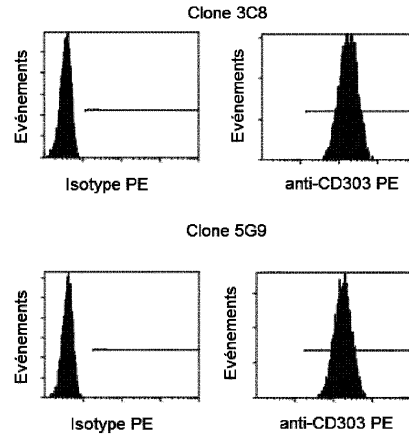


Figure 7

【 図 8 】

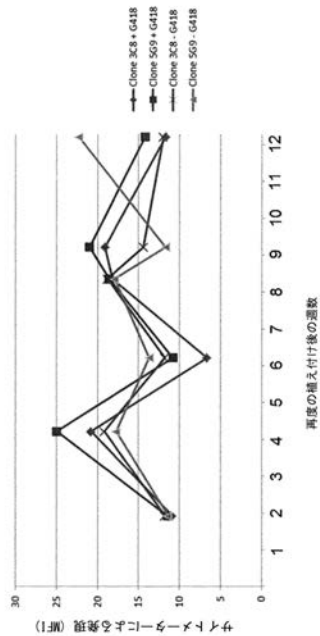


Figure 8

【 図 9 A 】

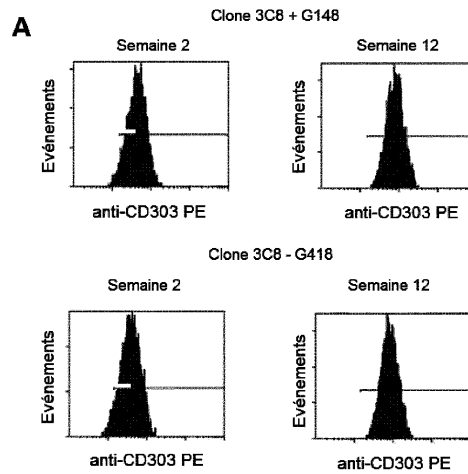


Figure 9A

【 図 9 B 】

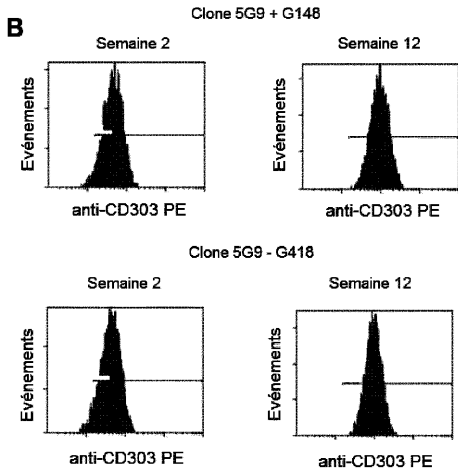


Figure 9B

【 図 1 0 】

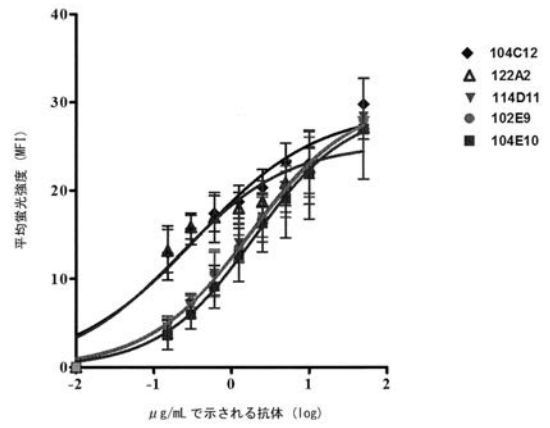
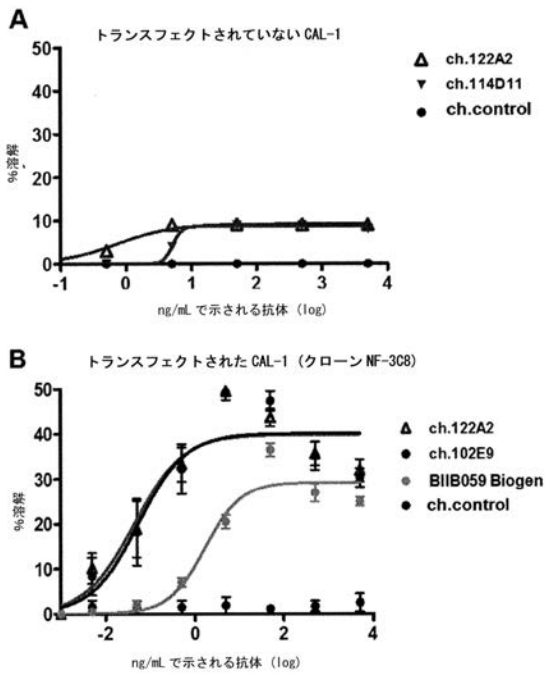


Figure 10

【 図 1 1 】



【配列表】

2018512144000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月11日(2017.5.11)

【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】

Fc 受容体I(Fc RI)のガンマ鎖及びヒトCD303抗原を発現する細胞株であって、ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされており、その表面上でヒトCD303を高度に発現することを特徴とし、細胞1個当たり少なくとも10,000個のヒトCD303分子を有し、

a)ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含む発現ベクターで安定してトランスフェクトされたヒト形質細胞様樹状細胞(pDC)の細胞株であること、又は

b)ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、若しくはヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで安定してトランスフェクトされたヒトリンパ球細胞株であること

を特徴とする、細胞株。

【請求項2】

ヒトCD303抗原をコードする核酸分子を含むベクターで安定してトランスフェクトされた細胞株であり、

・原発性悪性BPDCN細胞を、WHO分類に従ってBPDCNと診断された患者の末梢血から得る工程、及び

・長期の培養後の生存細胞をクローニングして、培養中に長持ちする細胞株を得る工程を含む方法によって、ヒト患者からの芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)細胞から得られたCAL-1細胞株又はヒトpDC細胞株から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の細胞株。

【請求項3】

ヒトCD303抗原をコードする第1の核酸分子及びヒトFc RIのガンマ鎖をコードする第2の核酸分子を含む発現ベクターで、又はヒトCD303抗原とヒトFc RIのガンマ鎖とを別々にコードする核酸分子をそれぞれ含む2つの発現ベクターで安定してトランスフェクトされたJurkat細胞株であることを特徴とする、請求項1に記載の細胞株。

【請求項4】

その表面上に、細胞1個当たり、20,000から60,000個の間、好ましくは25,000から50,000個の間のヒトCD303分子を有することを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の細胞株。

【請求項5】

ヒトCD303抗原に対する抗体の機能的な活性、好ましくはADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス若しくは貪食タイプの活性を特徴付けるための、又はヒトCD303抗原若しくは複数の抗CD303抗体によって認識されるヒトCD303抗原のエピトープに対する複数の抗CD303抗体の結合親和性を比較するための、請求項1から4のいずれか一項に記載の細胞株の使用。

【請求項6】

ヒト対象、詳細にはBPDCN又は自己免疫疾患に罹ったヒト対象からのエフェクター細胞の機能的な能力、とりわけADCC、CDC、サイトカイン分泌、アポトーシス及び貪食タイプの性能を特徴付けるための、請求項1から4のいずれか一項に記載の細胞株の使用。

【請求項 7】

ヒトCD303抗原に対する抗体のADCC活性を試験するための方法であって、

- a) 請求項1から4のいずれか一項に記載の細胞株を、ヒトCD303抗原に対する抗体及びエフェクター細胞と接触させる工程、
 - b) 工程a)の請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株の細胞の溶解を可能にするのに好適な時間でインキュベートする工程、及び
 - c) 工程a)の請求項1から6のいずれか一項に記載の細胞株の細胞の溶解の程度を測定する工程
- を含む、方法。

【請求項 8】

抗CD303抗体を特徴付けるためのキットであって、請求項1から4のいずれか一項に記載の細胞株、並びに有利にはエフェクター細胞、多価IgG、及び参照抗CD303抗体から選択される少なくとも1つの試薬を含む、キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2016/056994 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C12N15/79 ADD. | | |
|---|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | CAO WEI ET AL: "BDCA2/Fc epsilon R1 gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells", PLOS BIOLOGY, vol. 5, no. 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 2190-2200, XP055105679, DOI: DOI:10.1371/JOURNAL.PBIO.0050248 page 2198 page 2191, right-hand column figures 1b,2,6 page 2194 ----- -/-- | 1,2,5-13 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 19 May 2016 | | Date of mailing of the international search report 07/06/2016 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Perez, Franck |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/056994

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|--------------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>J. RÖCK ET AL: "CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCc2", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 37, no. 12, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 3564-3575, XP055225344, DOI: 10.1002/eji.200737711 page 3565, right-hand column page 3567 figure 2e page 3572, right-hand column -----</p> | <p>1,2,7-9, 11-13</p> |
| A | <p>DZIOANEK A ET AL: "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 194, no. 12, 17 December 2001 (2001-12-17), pages 1823-1834, XP002277387, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.194.12.1823 the whole document -----</p> | <p>1-13</p> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/056994

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/056994

| | | |
|--|---|---|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K16/28 C12N15/79 ADD. | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K C12N | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | CAO WEI ET AL: "BDCA2/Fc epsilon R1 gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells", PLOS BIOLOGY, vol. 5, no. 10, 1 octobre 2007 (2007-10-01), pages 2190-2200, XP055105679, DOI: DOI:10.1371/JOURNAL.PB10.0050248 page 2198 page 2191, colonne de droite figures 1b,2,6 page 2194 ----- -/-- | 1,2,5-13 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents | | <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe |
| * Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée | | "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 19 mai 2016 | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 07/06/2016 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé Perez, Franck |

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/056994

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | <p>J. RÖCK ET AL: "CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCc2", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 37, no. 12, 1 décembre 2007 (2007-12-01), pages 3564-3575, XP055225344, DOI: 10.1002/eji.200737711 page 3565, colonne de droite page 3567 figure 2e page 3572, colonne de droite -----</p> | 1,2,7-9, 11-13 |
| A | <p>DZIOŃEK A ET AL: "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 194, no. 12, 17 décembre 2001 (2001-12-17), pages 1823-1834, XP002277387, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.194.12.1823 le document en entier -----</p> | 1-13 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/056994

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
- a. faisant partie de la demande internationale telle que déposée :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- sur papier ou sous forme d'un fichier image.
- b. remis avec la demande internationale, exclusivement aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter.1.a), sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- c. remis postérieurement à la date de dépôt international exclusivement aux fins de la recherche internationale :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25 (règle 13ter.1.a)).
- sur papier ou sous forme d'un fichier image (règle 13ter.1.b) et instruction administrative 713).
2. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences a été déposée ou remise, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles faisant partie de la demande telle que déposée et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

フロントページの続き

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

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ナタリー・フルニエ

フランス・59193・エルカンエム・リス・アンパッス・デュ・シャトー・ドー・20・ラ・ポルト・デ・ザングル

(72)発明者 クリストフ・ドゥ・ロムフ

フランス・59130・ランブルサール・アヴニュ・ドゥ・アミラル・クルベ・14

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA25 AA40 BA13 BB20 CA12 CA20 CB01 DA13 DA36
 DA37 FA37 FB01 FB02 FB03 FB08 FB12 FB13 FB15 GC12
 GC15 JA01
 4B063 QA01 QA05 QQ79 QQ96 QR48 QS33 QS36
 4B065 AA93Y AA94X AB01 BA02 BD14 CA24 CA46

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 过表达人CD303抗原的细胞系 | | |
| 公开(公告)号 | JP2018512144A | 公开(公告)日 | 2018-05-17 |
| 申请号 | JP2017551253 | 申请日 | 2016-03-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 法国血液分割暨生化制品实验室 | | |
| 申请(专利权)人(译) | LABORATOIRES 捻法语社骨折锡安人等德BYO技术 | | |
| [标]发明人 | ナタリーフルニエ クリストフドゥロムフ | | |
| 发明人 | ナタリーフルニエ クリストフドゥロムフ | | |
| IPC分类号 | C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/53 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | C07K16/2851 C07K2317/24 C07K2317/567 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C12N15/79 C12N2510/00 C07K2317/14 C07K2317/52 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 | | |
| FI分类号 | C12N5/10.ZNA C12Q1/02 G01N33/48.M G01N33/53.Y C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA12 2G045/CA20 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS36 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA46 | | |
| 代理人(译) | 村山彦 安倍晋三龙彦 | | |
| 优先权 | 2015062452 2015-12-16 FR 2015052757 2015-03-31 FR | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)
 本发明是表达FcεRI受体和人CD303抗原的γ链的细胞系，其细胞表面被含有编码人CD303抗原的核酸分子的表达载体稳定转染。可用于强烈表达人CD303，例如细胞系，其特征在于每个细胞表达至少10,000个人CD303分子，并共表达FcεRI受体和人CD303抗原的γ链。载体或载体试剂盒，以及本发明细胞系的各种用途。

| | | |
|--|---|--|
| (19) 日本国特許庁 (JP) | (12) 公表特許公報 (A) | (11) 特許出願公表番号 特表2018-512144 (P2018-512144A) (43) 公表日 平成30年5月17日 (2018.5.17) |
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 5 / 1 0 (2006.01) | C 1 2 N 5 / 1 0 Z N A | 2 G 0 4 5 |
| C 1 2 Q 1 / 0 2 (2006.01) | C 1 2 Q 1 / 0 2 M | 4 B 0 6 3 |
| G 0 1 N 3 3 / 4 8 (2006.01) | G 0 1 N 3 3 / 4 8 Y | 4 B 0 6 5 |
| G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006.01) | G 0 1 N 3 3 / 5 3 A | |
| C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006.01) | C 1 2 N 1 5 / 0 0 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) | | |
| (21) 出願番号 特願2017-551253 (P2017-551253) | (71) 出願人 506128544 | |
| (86) (22) 出願日 平成28年3月31日 (2016.3.31) | ラボラトワール・フランセ・デュ・フラクシオンマン・エ・デ・ビヨテクノロジール | |
| (86) 翻訳文提出日 平成29年11月28日 (2017.11.28) | LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES | |
| (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/056994 | フランス国、91940レ・ユリ、アブニユー・デ・トロビク、3、ゾーン・ダクティビテ・ドゥ・クールタベ | |
| (87) 国際公開番号 W02016/156449 | | |
| (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016.10.6) | | |
| (31) 優先権主張番号 1562452 | (74) 代理人 100108453 | |
| (32) 優先日 平成27年12月16日 (2015.12.16) | 弁理士 村山 清彦 | |
| (33) 優先権主張国 フランス (FR) | 100110364 | |
| (31) 優先権主張番号 1552757 | 弁理士 実広 信哉 | |
| (32) 優先日 平成27年3月31日 (2015.3.31) | | |
| (33) 優先権主張国 フランス (FR) | | |

(54) 【発明の名称】 ヒトCD303抗原を過剰発現する細胞株

最終頁に続く