

(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2010-504739

(P2010-504739A)

(43) 公表日 平成22年2月18日(2010.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 A	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-529588 (P2009-529588)	(71) 出願人	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(86) (22) 出願日	平成19年9月25日 (2007. 9. 25)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成21年5月14日 (2009. 5. 14)	(74) 代理人	100113653 弁理士 東田 幸四郎
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/008312	(74) 代理人	100116919 弁理士 齋藤 房幸
(87) 国際公開番号	W02008/037419		
(87) 国際公開日	平成20年4月3日 (2008. 4. 3)		
(31) 優先権主張番号	06020646.3		
(32) 優先日	平成18年9月29日 (2006. 9. 29)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CCR5に対する抗体およびその使用

(57) 【要約】

重鎖可変ドメインが、配列番号1のアミノ酸配列を含み、免疫抑制疾患の処置に好都合な性質を有することを特徴とする、CCR5に結合する抗体。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

重鎖可変ドメインが、配列番号 1

## 【表 6】

Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-  
Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-  
His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-  
Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-  
Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-  
Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-  
Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser

10

(配列中、X01はLysまたはGlnであり、X02はGlnまたはGluであり、X03はArgまたはLysであり、X04はLeuまたはProであり、X05はMetまたはLysであり、X06はIleまたはThrであり、X07はSerまたはThrであり、X08はIleまたはThrである)のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、CCR5に結合する抗体。

## 【請求項 2】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 2

## 【表 7】

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-  
Thr-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-Ala-  
Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-  
Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-  
Gly-Thr-X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-  
X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-  
Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys

20

30

(配列中、X10はIleまたはAlaであり、X11はPheまたはTyrであり、X12はGlnまたはProであり、X13はSerまたはAlaであり、X14はGlnまたはLysであり、X15はValまたはIleであり、X16はGlnまたはAspであり、X17はSerまたはThrであり、X18はLeuまたはAlaであり、X19はLysまたはThrであり、X20はAsnまたはSerであり、X21はLeuまたはAlaであり、X22はGlyまたはAlaであり、X23はAsnまたはThrであり、X24はLeuまたはValである)のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 1 記載のCCR5に結合する抗体。

40

## 【請求項 3】

配列番号 6、7、もしくは 8、またはそのCCR5結合フラグメントの重鎖可変ドメインより選択される重鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項 1～2のいずれか一項記載のCCR5に結合する抗体。

## 【請求項 4】

配列番号 9もしくは 10、またはそのCCR5結合フラグメントの軽鎖可変ドメインより選択される軽鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項 1～3のいずれか一項記載のCCR5に結合する抗体。

## 【請求項 5】

抗体が、配列番号 6、7、もしくは 8、またはそのCCR5結合フラグメントより選択

50

される重鎖可変ドメインを含むこと、および配列番号 9 もしくは 10、またはその C C R 5 結合フラグメントより選択される軽鎖可変ドメインを含むことを特徴とし、該重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインが相互に独立して選択される、請求項 3 または 4 のいずれか一項記載の C C R 5 に結合する抗体。

【請求項 6】

ヒト起源の定常領域を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の C C R 5 に結合する抗体。

【請求項 7】

重鎖定常領域が、 $C_H1$  と  $C_H2$  との間のヒンジ領域のアミノ酸 216 ~ 240 位で、かつ/または  $C_H2$  と  $C_H3$  との間の第 2 ドメイン間領域のアミノ酸 327 ~ 331 位で改変されているヒト I g G 4 アイソタイプまたはヒト I g G 1 アイソタイプのものであることを特徴とする、請求項 6 記載の C C R 5 に結合する抗体。

10

【請求項 8】

配列番号 3 または 4 の重鎖定常領域を含み、かつ配列番号 5 の軽鎖定常領域を含むことを特徴とする、請求項 6 記載の C C R 5 に結合する抗体。

【請求項 9】

ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、突然変異 L 234 A および L 235 A を含むこと、または突然変異 S 228 P を含むヒト I g G 4 アイソタイプのものであることを特徴とする、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項記載の C C R 5 に結合する抗体。

【請求項 10】

請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体を薬学的有効量で含む薬学的組成物。

20

【請求項 11】

請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体の薬学的有効量を含む薬学的組成物を製造するための方法。

【請求項 12】

薬学的組成物を製造するための、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項 13】

薬として使用するための、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 14】

免疫抑制疾患の処置に使用するための、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体。

30

【請求項 15】

免疫抑制疾患を処置するための薬を製造するための、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項 16】

請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の抗体の治療有効量を、免疫抑制疾患を患う患者に投与することを特徴とする、該患者を処置するための方法。

【請求項 17】

第 2 のポリペプチドと共に集合することができるポリペプチドをコードする核酸であって、該第 2 のポリペプチドが、配列番号 2 および 5 のポリペプチドの群より選択されるポリペプチドを含み、該ポリペプチドが、配列番号 1、6、7、または 8 のアミノ酸配列を含む核酸。

40

【請求項 18】

C C R 5 に結合する抗体の鎖をコードする核酸であって、コードされる該鎖が、それぞれの他の抗体鎖と共に集合して、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の C C R 5 に結合する抗体分子を生じることができることを特徴とする核酸。

【請求項 19】

請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の C C R 5 に結合する抗体をコードする核酸。

【請求項 20】

請求項 19 記載の核酸を含む真核細胞。

【請求項 21】

50

請求項 1 または 2 のいずれか一項記載のリコンビナントヒト抗体またはリコンビナントヒト化抗体を産生させるための方法であって、請求項 19 記載の核酸が、原核または真核宿主細胞に発現され、該リコンビナント抗体が、該細胞または該細胞の培養上清から回収されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CCR5 に対する抗体、その産生方法、該抗体を含有する薬学的組成物、およびその使用に関するものである。

【0002】

過去数年間にわたって、HIV-1 がターゲット細胞に侵入するために利用する特異的メカニズムの理解がますます深まった。これにより、この過程の別個の段階を攻撃する薬物を開発する努力が促進された。この侵入をターゲティングする最初の薬物が、臨床的使用について最近承認された（エンフュービルタイド（T20）；Lazzarin, A., et al., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2186-2195）。エンフュービルタイドは、ケモカインレセプターの結合後の段階で融合を遮断するペプチド薬である。

【0003】

HIV-1 の感染は、ウイルスエンベローブ糖タンパク質（Env）と、CD4 およびケモカインレセプターから構成される細胞レセプター複合体との間の相互作用によって開始する（Pierson, T.C. and Doms, R. W., Immuno. Lett. 85 (2003) 113-118；Kilby, J. M. and Eron, J.J., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2228-2238）。Env は二つのサブユニットを有する。細胞性 CD4 レセプターと相互作用し、ウイルス膜貫通サブユニット gp41 と非共有結合的に会合する表面糖タンパク質 gp120 である。gp41 はウイルス膜に gp120 のアンカーを形成し、融合の原因ともなる。細胞上の CD4 への gp120 の結合により、gp120 が細胞表面のケモカインレセプターである「補助レセプター」と相互作用できるようにする結合部位を露出または創出するコンフォメーション変化がトリガーされる。ケモカインレセプターは、通常は走化機能、炎症機能、および他の機能を有する小型サイトカインであるケモカインに応答してシグナルを伝達する 7 回膜貫通 G タンパク質共役レセプター（7TM GPCR）である。

【0004】

臨床的に使用される大部分の薬物が他の 7TM GPCR に対するものであることから、ウイルスの侵入を遮断するためにこれらの分子をターゲティングすることは、最も成功した種類の過去の薬物開発プログラムを延長したものである。HIV-1 単離株は、細胞に侵入し感染するために CD4 および補助レセプターを必要とする。ヒトCCR5 は、マクロファージ指向性（R5）株についての補助レセプターであり、HIV-1 の性伝染に重要な役割を果たす（Berger, E.A., AIDS 11 (Suppl. A) (1997) 3-16；Bieniasz, P.D. and Cullen, B. R., Frontiers in Bioscience 3 (1998) d44-d58；Littman, D.R., Cell 93 (1998) 677-680）。

【0005】

ヒトCCR5（以後「CCR5」と呼ぶ）は、大部分の HIV-1 初代単離株に利用され、感染の樹立および維持に重要である。加えて、CCR5 の機能はヒトの健康に必須ではない。突然変異体 CCR5 アレルである「CCR5 $\Delta$ 32」は、切断型非機能性タンパク質をコードする（Samson, M., et al., Nature 382 (1996) 722-725；Dean, M., et al., Science 273 (1996) 1856-1862）。この突然変異についてホモ接合性の個体はCCR5 の発現を欠如し、HIV-1 感染から強く防御されている。この個体は、顕性の表現型事象を示さず、M 指向性 HIV 感染に高度に抵抗性である一方、ヘテロ接合性個体は疾患の進行遅延を示す（Schwarz, M. K. and Wells, T.N., Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002) 347-358）。CCR5 の欠如は、明白な有害事象を有さず、これは、おそらく CCR5 が、ケモカインである MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、および RANTES に対するレセプターとして高度に冗長なケモカインネットワークの一部であるからであり、これらの

10

20

30

40

50

ケモカインは多数の重複する機能を共有し、その大部分は代替レセプターを有する (Rossi, D. and Zlotnik, A., *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 217-242)。H I V - 1 の補助レセプターとしての C C R 5 の同定は、そのリガンドである M I P - 1、M I P - 1、および R A N T E S が R 5 X 4 単離株でも X 4 単離株でもなく、R 5 単離株による感染を遮断する能力に基づいた (Cocchi, F., et al., *Science* 270 (1995) 1811-1815)。

【 0 0 0 6 】

C C R 5 は「クラスター」ケモカインのレセプターでもあり、クラスターケモカインは、主に炎症応答の間に産生され、好中球、マクロファージおよび T 細胞サブセット ( T ヘルパー T h 1 および T h 2 細胞 ) の動員をコントロールする。T h 1 応答は、典型的には例えばウイルスおよび腫瘍に有効な細胞性免疫を伴う応答であるが、一方で T h 2 応答はアレルギーに中心的であると考えられる。したがって、これらのケモカインレセプターの阻害剤は、免疫モデュレーター ( immunomodulator ) として有用なことがある。T h 1 応答に関して、例えば慢性関節リウマチを含めた自己免疫における過剰活動性応答が減少し、T h 2 応答に関して、喘息発作またはアトピー性皮膚炎を含めたアレルギー応答が軽減する (例えば Schols, D., *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 883-893; Mueller, A. and Strange, P.G., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 35-38; Kazmierski, W.M., et al., *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2 (2002) 265-278; Lehner, T., *Trends Immunol.* 23 (2002) 347-351 を参照されたい)。

10

【 0 0 0 7 】

C C R 5 に対する抗体は、例えば、P R O 1 4 0 (Olson, W.C., et al., *J. Virol.* 73 (1999) 4145-4155) および 2 D 7 (Samson, M., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24934-24941) である。さらなる抗体は、

20

【 表 1 】

WO 2006/103100, US 2004/0043033,  
 US 6,610,834, US 2003/0228306, US 2003/0195348, US 2003/0166870,  
 US 2003/0166024, US 2003/0165988, US 2003/0152913, US 2003/0100058,  
 US 2003/0099645, US 2003/0049251, US 2003/0044411, US 2003/0003440,  
 US 6,528,625, US 2002/0147147, US 2002/0146415, US 2002/0106374,  
 US 2002/0061834, US 2002/0048786, US 2001/0000241, EP 1 322 332, EP 1 263 791,  
 EP 1 207 202, EP 1 161 456, EP 1 144 006, WO 2003/072766, WO 2003/066830,  
 WO 2003/033666, WO 2002/083172, WO 02/22077, WO 01/58916, WO 01/58915,  
 WO 01/43779, WO 01/42308

30

に記載されている。

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、主に A I D S のための治療薬として使用される、新規な C C R 5 に対する抗体を提供することである。

40

【 0 0 0 9 】

発明の概要

本発明は、重鎖可変ドメインが、式

## 【表 2】

Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser

10

(配列中、

X 0 1 は L y s または G l n であり、

X 0 2 は G l n または G l u であり、

X 0 3 は A r g または L y s であり、

X 0 4 は L e u または P r o であり、

X 0 5 は M e t または L y s であり、

X 0 6 は I l e または T h r であり、

X 0 7 は S e r または T h r であり、

X 0 8 は I l e または T h r である (配列番号 1 ) )

20

の アミノ酸配列を含むことを特徴とする、CCR5 に結合する抗体を含む。

【0010】

好ましくは、この抗体は、該抗体の軽鎖可変ドメインが、式

【表 3】

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-Ala-Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys

30

(配列中、

X 1 0 は I l e または A l a であり、

X 1 1 は P h e または T y r であり、

X 1 2 は G l n または P r o であり、

X 1 3 は S e r または A l a であり、

X 1 4 は G l n または L y s であり、

X 1 5 は V a l または I l e であり、

X 1 6 は G l n または A s p であり、

X 1 7 は S e r または T h r であり、

X 1 8 は L e u または A l a であり、

X 1 9 は L y s または T h r であり、

X 2 0 は A s n または S e r であり、

X 2 1 は L e u または A l a であり、

X 2 2 は G l y または A l a であり、

X 2 3 は A s n または T h r であり、

X 2 4 は L e u または V a l である (配列番号 2 ) )

40

の アミノ酸配列を含むことを特徴とする。

50

## 【0011】

好ましくは、この抗体は、ヒトIgG4アイソタイプまたはヒトIgG1アイソタイプであることを特徴とし、該IgG1アイソタイプは、所望により $C_H1$ と $C_H2$ との間のヒンジ領域のアミノ酸216～240位で、および/または $C_H2$ と $C_H3$ との間の第2ドメイン間領域のアミノ酸327～331位で改変されている。

## 【0012】

本発明の好ましい態様は、本発明に記載の抗体を含む薬学的組成物である。

## 【0013】

本発明の好ましい態様は、薬学的組成物を製造するための本発明に記載の抗体の使用である。

10

## 【0014】

本発明の好ましい態様は、本発明に記載の抗体を含む薬学的組成物を製造する方法である。

## 【0015】

本発明の好ましい態様は、第2のポリペプチドと共に集合することができるポリペプチドをコードする核酸であり、ここで、該第2のポリペプチドは、配列番号2および5のポリペプチドの群より選択されるポリペプチドを含み、一方で該ポリペプチドは、配列番号1、6、7、または8のアミノ酸配列を含む。

## 【0016】

本発明の好ましい態様は、免疫抑制疾患を患う患者を処置するための方法であり、この方法は、治療有効量の本発明に記載の抗体をその患者に投与することを特徴とする。

20

## 【0017】

本発明に記載の抗体は、好ましくは該抗体がCCR5に結合し、かつ配列番号6、7、もしくは8の重鎖可変ドメイン、配列番号9もしくは10の軽鎖可変ドメイン、またはそのCCR5結合フラグメントの群より選択される可変重鎖または軽鎖ドメインを含むことを特徴とする。

## 【0018】

本発明に記載の抗体は、好ましくは配列番号6、7、もしくは8の重鎖可変ドメイン、またはそのCCR5結合フラグメントの群より選択される重鎖可変ドメインを重鎖可変ドメインとして有すること、および配列番号9もしくは10の軽鎖可変ドメイン、またはそのCCR5結合フラグメントの群より選択される軽鎖可変ドメインを軽鎖可変ドメインとして有することを特徴とし、ここで、該重鎖および軽鎖可変ドメインは相互に独立して選択される。

30

## 【0019】

本発明に記載の抗体は、好ましくは重鎖可変ドメインが、配列番号6、7、または8の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むこと、さらに正確に言えば、この抗体が、配列番号6、7、もしくは8の重鎖可変ドメイン、またはそのCCR5結合フラグメントの重鎖可変ドメインより選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

## 【0020】

本発明に記載の抗体は、好ましくは軽鎖可変ドメインが、配列番号9または10の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むこと、さらに正確に言えば、この抗体が、配列番号9もしくは10、またはそのCCR5結合フラグメントの軽鎖可変ドメインより選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

40

## 【0021】

本発明に記載の抗体は、好ましくは定常領域（軽鎖および重鎖）がヒト起源であることを特徴とする。このような定常領域（鎖）は、当技術分野の現状において周知であり、例えばKabatにより記載されている（例えばJohnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218を参照されたい）。例えば、有用なヒト重鎖定常領域は、配列番号3および4からなる群から独立して選択されるアミノ酸配列を含む。例えば、有用なヒト

50

軽鎖定常領域は、配列番号5の軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。この抗体がマウス起源であって、Kabatによるマウス抗体の抗体可変配列フレームを含むことがさらに好ましい(例えばJohnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218を参照されたい)。

【0022】

この抗体は、CCR5へのリガンドの結合およびシグナル伝達活性(例えば哺乳動物Gタンパク質の活性化、サイトソル遊離Ca<sup>2+</sup>濃度の急速で一過性の増加の誘導、および/または細胞応答の刺激(例えば走化性、エキソサイトーシス、または白血球による炎症メディエーターの放出の刺激、インテグリンの活性化))などのヒトCCR5の一つまたは複数の機能を阻害する。この抗体は、ヒトCCR5へのRANTES、MIP-1、MIP-1、および/またはHIVの結合を阻害し、白血球の輸送、細胞へのHIV侵入、T細胞活性化、炎症メディエーターの放出、および/または白血球の脱顆粒のような、ヒトCCR5により仲介される機能を阻害する。

10

【0023】

本発明に記載の抗体は、ヒトCCR5に特異的に結合し、ウイルスの存在下で、4.0 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>値でウイルスとターゲット細胞との間の膜融合を阻害するために有効な抗体濃度で該ターゲット細胞を抗体と接触させることを含むアッセイにおいて、該細胞とのHIVの融合を阻害する。

【0024】

本発明に記載の抗体は、CCR5に特異的に結合し、1.5 μg/ml以下、好ましくは0.3 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>値でCCR5ポリペプチドおよびCD4ポリペプチドを同時発現している第1の細胞と、HIVのenvタンパク質を発現している第2の細胞との間の膜融合を阻害する。

20

【0025】

本発明に記載の抗体は、CCR5に特異的に結合し、RANTES、MIP-1、および/またはMIP-1の存在下で、1.5 μg/ml以下のIC<sub>50</sub>値でターゲット細胞を抗体と接触させることを含むアッセイにおいて、該ターゲット細胞における細胞応答の刺激を阻害し、好ましくは遊走を阻害する。

【0026】

本発明に記載の抗体は、好ましくはCCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR6、およびCXCR4への結合アッセイにおいて、最大100 μg/mlの抗体濃度でケモカインの結合を阻害しない。

30

【0027】

本発明に記載の抗体は、好ましくは最大50 μg/mlの抗体濃度で、CCR5およびGalpha16を発現しているCHO細胞において検出された細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加を刺激しない。

【0028】

本発明に記載の抗体は、好ましくはヒトアイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4であり、ここでIgG1またはIgG4が好ましい。

【0029】

本発明に記載の抗体は、好ましくはIgG4アイソタイプである。本発明に記載の抗体は、好ましくはIgG1アイソタイプである。本発明に記載の抗体は、好ましくは突然変異S228Pを有するIgG4アイソタイプである。本発明に記載の抗体、すなわち重鎖および軽鎖定常領域は、C<sub>H</sub>1とC<sub>H</sub>2との間のヒンジ領域のアミノ酸約216~240位で、好ましくはアミノ酸約220~240位で(Angal, S., et al., *Mol. Immunol.* 30 (1993) 105-108)、および/またはC<sub>H</sub>2とC<sub>H</sub>3との間の第2のドメイン間領域のアミノ酸約327~331位で改変されているIgG1またはIgG4アイソタイプである(Kabatによる付番、例えばJohnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218を参照されたい)。このような改変は、エフェクター機能(ADCCおよび/またはCDC)を低下または回避する。IgGのクラススイッチは、抗体の重鎖定常領域および

40

50

軽鎖定常ドメインをIgG1突然変異体またはIgG4のような所望のクラスの抗体からのものにより交換することにより行うことができる。このような方法は、当技術分野の現状において周知である。

【0030】

本発明に記載の抗体は、好ましくはL234（アミノ酸234位のロイシン）、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、および/またはP329（EUIンデックスによる付番）に少なくとも一つの突然変異を有するヒトサブクラスIgG1であることを特徴とする。好ましくは、この抗体は、突然変異L234A（アミノ酸234位にロイシンの代わりにアラニン）およびL235Aを含むヒトIgG1アイソタイプである。本発明に記載の抗体は、好ましくはS228位に突然変異を有するヒトIgG4アイソタイプであることを特徴とする。

10

【0031】

したがって本発明は、一局面では、抗体に関するものであり、この抗体は、該抗体がCCR5と結合し、ヒト起源のFc部を有し、ヒト補体C1q因子と結合せず、かつ/または補体C3因子を活性化することを特徴とする。好ましくは、この抗体は、ヒトFcレセプターへの結合低下を示すか、またはヒトFcレセプターに結合しない。

【0032】

本発明は、さらに本発明に記載の抗体鎖、可変ドメイン、またはそのCDRをコードする核酸分子を含む。コードされているポリペプチドは、それぞれの他の抗体鎖と共に集合して、本発明に記載のCCR5に対する抗体分子を生じることができる。

20

【0033】

本発明は、さらに原核または真核宿主細胞において該核酸を発現することができる、本発明に記載の該核酸を有する発現ベクター、およびそのような抗体をリコンビナント産生させるためにそのようなベクターを有する宿主細胞を提供する。

【0034】

本発明は、さらに本発明に記載のベクターを含む原核または真核宿主細胞を含む。

【0035】

本発明は、さらに本発明に記載のリコンビナントヒト抗体またはヒト化抗体を産生させるための方法を含み、この方法は、原核または真核宿主細胞に本発明に記載の核酸を発現させることおよび該細胞または細胞培養上清から該抗体を回収することを特徴とする。本発明は、さらにこのようなりコンビナント法により得ることができる抗体を含む。

30

【0036】

本発明に記載の抗体は、CCR5ターゲティング療法を必要とする患者に利益を生む。本発明に記載の抗体は、そのような疾患を患う、特に免疫抑制を患う、特にHIV感染を患う患者に利益をもたらす新しい発明的な性質を有する。

【0037】

本発明は、さらに免疫抑制を患う患者、特にHIV感染を患う患者を処置するための方法を提供し、この方法は、そのような疾患を有する（したがって、そのような治療が必要である）と診断された患者に、本発明によるCCR5に結合する抗体の有効量を投与することを含む。この抗体は、好ましくは薬学的組成物に入れて投与される。

40

【0038】

本発明は、さらに免疫抑制疾患の処置のため、好ましくはHIV感染の処置のため、免疫抑制を患う患者の処置のため、および本発明による薬学的組成物を製造するための薬として本発明に記載の抗体を使用することを含む。加えて、本発明は、本発明による薬学的組成物を製造するための方法を含む。

【0039】

本発明は、さらに本発明に記載の抗体を含有する薬学的組成物を薬学的有効量で、所望により薬学的な目的のために抗体を製剤するために有用な緩衝剤および/または佐剤と共に含む。

【0040】

50

本発明は、さらに薬学的に許容される担体中にそのような抗体を含む薬学的組成物を提供する。一態様では、薬学的組成物は、製品またはキットに包含されていてもよい。

【0041】

したがって、本発明の一局面は、薬として使用するための本発明に記載の抗体である。本発明の別の局面は、免疫抑制疾患の処置に使用するための本発明に記載の抗体である。また、一局面は、免疫抑制疾患の処置のための薬を製造するための本発明に記載の抗体の使用である。

【0042】

発明の詳細な説明

用語「抗体」は、抗体全体および抗体フラグメントを含むが、それに限定されるわけではない抗体構造の様々な形態を包含する。本発明に記載の抗体は、好ましくはヒト化抗体、キメラ抗体、または本発明に記載の特徴的性質が保たれる限りにおいてさらに遺伝子操作された抗体である。

【0043】

「抗体フラグメント」は、抗体全長の部分、好ましくはその可変ドメインまたは少なくともその抗原結合部位を含む。抗体フラグメントの例には、二重特異性抗体 (diabody)、一本鎖抗体分子、免疫毒素、および抗体フラグメントから形成された多特異性抗体が挙げられる。s c F v 抗体は、例えばHuston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88に記載されている。加えて、抗体フラグメントは、V<sub>H</sub>ドメインの特徴を有する、すなわちV<sub>L</sub>ドメインと共に集合することができる一本鎖ポリペプチド、またはCCR5に結合するV<sub>L</sub>ドメインの特徴を有する、すなわちV<sub>H</sub>ドメインと共に機能性抗原結合部位に集合することができる一本鎖ポリペプチドを含み、それによって、ターゲット細胞との膜融合またはHIVの融合を阻害する性質を提供することができる。

【0044】

本明細書に使用される用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一アミノ酸組成の抗体分子の調製物を表す。用語「キメラ抗体」は、マウス由来の可変ドメイン、すなわち結合領域、および異なる供給源または種から得られた定常領域の少なくとも部分を含む、通常はリコンビナントDNA技法により調製されたモノクローナル抗体を表す。マウス可変ドメインおよびヒト定常領域を含むキメラ抗体が特に好ましい。そのようなマウス/ヒトキメラ抗体は、マウス免疫グロブリン可変ドメインをコードするDNAセグメントおよびヒト免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む、発現された免疫グロブリン遺伝子の産物である。本発明により包含される他の形態の「キメラ抗体」は、本来の抗体からクラスまたはサブクラスが改変または変更された抗体である。そのような「キメラ」抗体は、「クラススイッチされた抗体」とも呼ばれる。キメラ抗体を産生させるための方法は、当技術分野で周知の通常のリコンビナントDNA技法および遺伝子トランスフェクション技法を伴う。例えば、Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; 米国特許第5,202,238号、および第5,204,244号を参照されたい。

【0045】

用語「ヒト化抗体」は、フレームワーク領域および/または「相補性決定領域」(CDR)が、親免疫グロブリンのCDRに比べて異なる種の免疫グロブリンのCDRを含むように改変された抗体を表す。好ましい態様では、マウスCDRをヒト抗体のフレームワーク領域に接ぎ合わせて「ヒト化抗体」が調製される。例えば、Riechmann, L, et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; およびNeuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270を参照されたい。特に好ましいCDRは、キメラ抗体および二機能性抗体についての、上に言及された抗原を認識する配列を表すCDRに相当する。

【0046】

本明細書に使用する用語「CCR5への結合」は、細胞に基づく*in vitro* ELISAアッセイ(CCR5発現細胞は、例えばトランスフォーメーションされたCHO細胞、L1.2細胞)におけるCCR5への抗体の結合を意味する。抗体濃度100ng/m

10

20

30

40

50

1でその抗体が5以上、好ましくは10以上のS/N(シグナル/ノイズ)比を起す場合に結合が見出される。

【0047】

本明細書に使用する用語「7回膜貫通ケモカイン分子構造」は、CCR5が細胞膜二重層中に位置する場合にCCR5が示す天然構造を表す(例えばOppermann, M., Cell. Sig. 16 (2004) 1201-1210を参照されたい)。他のGタンパク質共役レセプター(例えばGタンパク質共役レセプター1b)のように、CCR5は、細胞外N末端ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質C末端ドメインから構成される。膜貫通ドメインは、3個の細胞質セグメントおよび3個の細胞外セグメントにより連結された7個の疎水性膜貫通セグメントからなる。本発明に記載の抗体は、CCR5の7回膜貫通ケモカイン分子構造をとるCCR5に結合する。

10

【0048】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。エピトープは、通常はアミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基(surface grouping)からなり、通常エピトープは特異的三次元構造特徴および特異的な電荷の特徴を有する。コンフォメーションエピトープおよび非コンフォメーションエピトープは、後者ではなく前者への結合が、変性溶媒の存在下で失われることで区別される。好ましくは、本発明に記載の抗体は、変性したCCR5ではなく、ネイティブなCCR5に特異的に結合する。

【0049】

用語「膜融合」は、CCR5ポリペプチドおよびCD4ポリペプチドを同時発現している第1の細胞と、HIVのenvタンパク質を発現している第2の細胞との間の融合を表す。膜融合は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより判定される。

20

【0050】

用語「ターゲット細胞とのHIVの融合を阻害する」は、該ウイルスの存在下で、ウイルスと該細胞との間の膜融合を阻害するために有効な抗体濃度で、ターゲット細胞を抗体と接触させること、およびルシフェラーゼレポーター遺伝子活性を測定することを含むアッセイにおいて測定された、ターゲット細胞とのHIVの融合を阻害することを表す。

【0051】

本明細書に使用する「可変ドメイン」(軽鎖(V<sub>L</sub>)可変ドメイン、重鎖(V<sub>H</sub>)可変ドメイン)は、抗原への抗体の結合に直接関与する軽鎖ドメインおよび重鎖ドメインの対のそれぞれを意味する。可変軽鎖および可変重鎖ドメインは、同じ一般構造を有し、各ドメインは、3個の「超可変領域」(または相補性決定領域、CDR)により繋がった4個のフレームワーク領域(FR)を含み、そのフレームワーク領域の配列は、広く保存されている。フレームワーク領域は、シートコンフォメーションを採り、CDRはシート構造を繋ぐループを形成することがある。各鎖におけるCDRは、フレームワーク領域によりその三次元構造を保持し、もう一方の鎖由来のCDRと共に抗原結合部位を形成する。抗体の重鎖および軽鎖CDR3領域は、本発明に記載の抗体の結合特異性/親和性に特に重要な役割を果たすことから、本発明のさらなる目的を提供する。

30

【0052】

本発明に記載の抗体は、好ましくは該抗体が、

- a) 配列番号6のアミノ酸配列により定義される重鎖可変ドメインおよび配列番号9のアミノ酸配列により定義される軽鎖可変ドメイン;
- b) 配列番号6のアミノ酸配列により定義される重鎖可変ドメインおよび配列番号10のアミノ酸配列により定義される軽鎖可変ドメイン;
- c) 配列番号7のアミノ酸配列により定義される重鎖可変ドメインおよび配列番号9のアミノ酸配列により定義される軽鎖可変ドメイン;
- d) 配列番号7のアミノ酸配列により定義される重鎖可変ドメインおよび配列番号10のアミノ酸配列により定義される軽鎖可変ドメイン;
- e) 配列番号8のアミノ酸配列により定義される重鎖可変ドメインおよび配列番号9のア

40

50

ミノ酸配列により定義される軽鎖可変ドメイン；

f) 配列番号 8 のアミノ酸配列により定義される重鎖可変ドメインおよび配列番号 10 のアミノ酸配列により定義される軽鎖可変ドメイン

からなる組合せの群より選択される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含むことを特徴とする。

【0053】

本明細書に使用する場合の用語「抗体の抗原結合部分」は、抗原の結合の原因となる抗体のアミノ酸残基を表す。抗体の抗原結合部分は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」または「FR」領域は、本明細書に定義される超可変領域の残基以外の可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインは、N末端からC末端方向にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4というドメインを含む。特に、重鎖のCDR3は、抗原の結合に最も寄与する領域であり、抗体の性質を定義する。CDRおよびFR領域は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991)の標準的な定義および/または「超可変ループ」由来の残基にしたがって決定される。

10

【0054】

本明細書に使用する用語「核酸」または「核酸分子」は、DNA分子およびRNA分子を含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

20

【0055】

本出願の中で使用する用語「アミノ酸」は、アラニン(三文字表記: ala、一文字表記: A)、アルギニン(arg, R)、アスパラギン(asn, N)、アスパラギン酸(asp, D)、システイン(cys, C)、グルタミン(gln, D)、グルタミン酸(glu, E)、グリシン(gly, G)、ヒスチジン(his, H)、イソロイシン(ile, I)、ロイシン(leu, L)、リシン(lys, K)、メチオニン(met, M)、フェニルアラニン(phe, F)、プロリン(pro, P)、セリン(ser, S)、トレオニン(thr, T)、トリプトファン(trp, W)、チロシン(tyr, Y)、およびバリン(val, V)を含む天然カルボキシ - アミノ酸の群を意味する。

30

【0056】

核酸は、別の核酸との機能的関係に置かれている場合に「作動可能に連結」している。例えば、プレ配列または分泌リーダーについてのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合に、そのポリペプチドについてのDNAに作動可能に連結しており、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響する場合にコード配列に作動可能に連結しており、またリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置する場合に、コード配列に作動可能に連結している。一般に、「作動可能に連結している」は、連結されているDNA配列が同一鎖上にあり、分泌リーダーの場合には隣接してリーディングフレーム内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合には、通常の慣例により合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

40

【0057】

本明細書に使用する表現「細胞」、「細胞系」、および「細胞培養物」は、相互交換可能に使用され、そのような全ての名称には子孫が含まれる。したがって、「トランスフォーマント」および「トランスフォーメーションされた細胞」という語には、初代対象細胞、およびそれから得られた培養物が、継代回数を考慮せずに含まれる。全ての子孫は、計画的または偶発的な突然変異が原因で、DNA含量が正確には同一ではない可能性があることもまた了解されている。当初トランスフォーメーションされた細胞においてスクリーニングされたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異型子孫が含まれる。

50



t al., Immunology 86 (1995) 319-324 ; およびEP0307434により記載されている。そのようなFc部の結合部位は、例えばアミノ酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、およびP329 (KabatのEUインデックスに準じて付番) を特徴とする。サブクラスIgG1、IgG2、およびIgG3の抗体は、通常はC1qおよびC3の結合を含めた補体活性化を示し、一方でIgG4は補体系を活性化せず、C1qおよびC3と結合しない。

#### 【0062】

すなわち、ADCCおよび/またはCDCが必要な場合には、IgG1サブクラスのFc部が好ましく、ADCCおよび/またはCDCの低下または不在が必要な場合には、IgG4サブクラスまたは改変/突然変異IgG1サブクラスのFc部が好ましい。本発明は、一局面ではCCR5と結合する抗体を表し、Fcレセプターおよび/または補体C1q因子との結合低下または無結合を示す。Fcレセプターおよび/または補体C1q因子と結合しない抗CCR5抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)を誘発しないが、一方で、Fcレセプターおよび/または補体C1q因子に対する結合低下を示す抗CCR5抗体は、ADCCおよび/またはCDCの低下を示す。好ましくは、そのような抗体は、CCR5と結合し、ヒト起源から得られたFc部を有し、Fcレセプターおよび/または補体C1q因子と結合しないか、またはその結合低下を示す。さらに好ましくは、この抗体は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体またはT細胞抗原を枯渇された抗体である。C1qの結合は、Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184に準じて測定することができる。そのようなアッセイにおいて、8 μg/mlの抗体濃度で被験抗体についての492 ~ 405 nmにおける吸光度(OD)が、未改変野生型抗体のFc部のヒトC1q結合についての値の15%未満である場合には、「C1qの結合」は見出されない。「C1qの結合」低下は、同条件で未改変野生型抗体のFc部のヒトC1q結合についての値の15% ~ 30%の範囲にある。ADCCは、ヒトNK細胞上のヒトFcRIIIaへの抗体の結合として測定することができる。結合は、抗体濃度20 μg/mlで決定される。「Fcレセプターの無結合」または「ADCCなし」は、20 μg/mlの抗体濃度で、ヒトIgG1(配列番号3)と同じ抗体の結合に比べて、ヒトNK細胞上のヒトFcRIIIaへの最大30%の結合を意味する。「Fcレセプターの結合低下」または「ADCC低下」は、ヒトIgG1(配列番号3)と同じ抗体の結合に比べて、ヒトNK細胞上のヒトFcRIIIaに30% ~ 最大60%の結合を意味する。

#### 【0063】

本発明の別の局面は、CCR5と結合し、かつFcレセプターおよび/または補体C1q因子ともまた実際に結合する抗体である。Fcレセプターおよび/または補体C1q因子と実際に結合する抗CCR5抗体は、実際に抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)を誘発する。好ましくは、この抗体は、CCR5と結合し、ヒト起源由来のFc部を有し、実際にFcレセプターおよび/または補体C1q因子ともまた結合することを特徴とする。さらに好ましくは、この抗体は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体またはT細胞抗原を枯渇された抗体である。C1qの結合は、Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184により測定することができる。ADCCは、ヒトNK細胞上のヒトFcRIIIaへの抗体の結合として測定することができる。結合は、20 μg/mlの抗体濃度で決定される。

#### 【0064】

加えて、本発明に記載の抗体には、「保存的配列改変」(変異型抗体)、ヌクレオチド配列改変およびアミノ酸配列改変を有する抗体が含まれるが、これらの改変は、本発明に記載の抗体の上記特徴に影響せず、この特徴を変化させもしない。改変は、部位特異的突然変異誘発およびPCR介在性突然変異誘発などの、当技術分野で公知の標準的な技法により導入することができる。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられているものが含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基

10

20

30

40

50

性側鎖を有するアミノ酸（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、無極性側鎖を有するアミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、 $\beta$ -分枝側鎖を有するアミノ酸（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、ヒト抗CCR5抗体における予測される可欠アミノ酸残基は、好ましくは同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基によって置き換えることができる。したがって、「変異体」抗CCR5抗体は、本明細書においてアミノ酸配列が、親抗体の一つまたは複数の可変領域における最大10個、好ましくは約2～約5個の付加、欠失および/または置換により「親」抗CCR5抗体のアミノ酸配列と異なる分子を表す。アミノ酸置換は、Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327およびQueen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033に記載されたような分子モデリングに基づく突然変異誘発により行うことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0065】

本発明のさらなる態様は、Fcレセプターおよび/またはC1qに結合しないかまたは結合低下を示す、CCR5に対する抗体を産生させるための方法であり、この方法は、CCR5に結合するヒトIgG1型抗体の重鎖をコードする核酸配列が改変されていることにより、該改変された抗体がC1qおよび/またはFcレセプターに結合しないか、または結合低下を示し、該改変された核酸および該抗体の軽鎖をコードする核酸が、発現ベクターに挿入され、該ベクターが真核宿主細胞に挿入され、コードされるタンパク質が発現され、宿主細胞または上清から回収されることを特徴とする。好ましくは、抗体は「クラススイッチ」、すなわち好ましくはIgG1v1 (PVA-236; GLPSS331)、IgG1v2 (L234A; L235A)、IgG1v3 (S228P; L235E)、IgG1x (S228P)、IgG4v1 (PVA-236)として定義されるFc部の変更または突然変異（例えばIgG1からIgG4、および/またはIgG1/IgG4の突然変異）により改変されている。GLPSS331は、突然変異E233P、L234V、L235A、G236、A327G、A330S、P331Sを意味する。

#### 【0066】

配列に関する同一性または相同性は、本明細書において最大の配列同一率を達成するために配列をアライメントし、必要ならばギャップを導入した後で親配列と同一な、候補配列におけるアミノ酸残基の率として定義される。抗体配列へのN末端、C末端、もしくは内部の伸長、欠失、または挿入のどれも、配列同一性または相同性に影響するとみなしてはならない。変異体は、ヒトCCR5と結合する能力を保持し、好ましくは親抗体よりも優れた性質を有する。例えば、変異体は、処置の間の副作用が軽減することがある。

#### 【0067】

本明細書における「親」抗体は、変異体の調製に使用されるアミノ酸配列によってコードされる抗体である。好ましくは、親抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、存在する場合には、ヒト抗体定常領域またはヒト抗体定常ドメインを有する。例えば、親抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体であってもよい。

#### 【0068】

本発明に記載の抗体は、リコンビナント手段により好ましくは産生される。そのような方法は、当技術分野の現状において広く公知であり、抗体ポリペプチドのその後の単離および通常は薬学的に許容される純度への精製を伴う、原核細胞および真核細胞におけるタンパク質の発現を含む。タンパク質の発現のために、軽鎖および重鎖またはそのフラグメントをコードする核酸は、標準的な方法により発現ベクターに挿入される。発現は、CHO細胞、BHK細胞、PER.C6（登録商標）細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母、またはイー・コリ（E. coli）細胞などの適切な原

核または真核宿主細胞において行われ、抗体は、その細胞から回収される(上清から、または細胞溶解後に)。

【0069】

抗体のリコンビナント産生は、当技術分野の現状において周知であり、例えばMakrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., Arzneimittelforschung-Drug Res. 48 (1998) 870-880の総説に記載されている。

【0070】

抗体は、細胞全体、細胞溶解物、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態の中に存在してもよい。精製は、他の細胞構成要素または他の混入物、例えば他の細胞の核酸またはタンパク質を除去するために、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、および当技術分野で周知の他の技法を含む標準的な技法により行われる。Ausubel, F., et al., (ed.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

10

【0071】

NS0細胞における発現は、例えばBarnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270により記載されている。一過性発現は、例えばDurocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9により記載されている。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87により記載されている。好ましい一過性発現系(HEK293)は、Schlaeger, E.-J.およびChristensen, K. (Cytotechnology 30 (1999) 71-83)により、そしてSchlaeger, E.-J. (J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199)により記載されている。

20

【0072】

モノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの通常の免疫グロブリン精製手順により培養液から適切に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNAおよびRNAは、通常の手順を使用して容易に単離および配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAおよびRNAの起源として役立つことができる。いったん単離されれば、DNAを発現ベクターに挿入し、次いでそれをHEK293細胞、CHO細胞、または骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクションして、この宿主細胞におけるリコンビナントモノクローナル抗体の合成を達成することができ、この宿主細胞は、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない。

30

【0073】

ヒトCCR5抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするDNAに適切なヌクレオチドの変更を導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。しかし、そのような改変は、例えば上記のように非常に限られた範囲内でのみ行うことができる。例えば、改変は、IgGアイソタイプおよびエピトープの結合などの上記の抗体の特徴を変化させるのではなく、リコンビナント産生の収率またはタンパク質の安定性を改善することがあるし、精製を容易にすることもある。

40

【0074】

抗CCR5抗体の適正なコンフォメーションを維持することに関与しない任意のシステイン残基もまた、分子の酸化安定性を改善するために、そして異常な架橋を防止するために、一般にセリンに置換されることがある。逆に、抗体の安定性を改善するために(特にその抗体がFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合に)システイン結合をその抗体に付加してもよい。

【0075】

50

抗体の別種のアミノ酸変異体は、その抗体の本来のグリコシル化パターンを変化させたものである。「変化させる」によって、抗体に見出された一つもしくは複数の糖質部分を除去すること、および/または抗体に存在しない一つもしくは複数のグリコシル化部位を付加することを意味する。抗体のグリコシル化は、典型的にはN-結合型である。用語「N-結合型」は、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の結合を表す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン(ここで、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖に糖質部分を酵素的に結合させるための認識配列である。したがって、ポリペプチドにこれらトリペプチド配列のいずれかが存在することで、潜在的グリコシル化部位が創出される。抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列が(N-結合型グリコシル化部位について)一つまたは複数の上記トリペプチド配列を有するようにそのアミノ酸配列を変化させることによって好都合に実現される。

10

**【0076】**

抗CCR5抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で公知の多様な方法により調製される。これらの方法には、天然起源からの単離(天然アミノ酸配列変異体の場合)、またはヒト化抗CCR5抗体の初期調製された変異体もしくは非変異体版のオリゴヌクレオチド介在性(または部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、およびカセット突然変異誘発による調製が含まれるが、それに限定されるわけではない。

20

**【0077】**

別種の共有結合性改変は、抗体にグリコシドを化学的または酵素的に共役させることを伴う。これらの手順は、N-またはO-結合型グリコシル化を行うことができる宿主細胞で抗体を産生させる必要がない点で有利である。使用するカップリング様式に応じて、糖は、(a)アルギニンおよび/もしくはヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)(システインなどの)遊離スルフヒドリル基、(d)(セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンなどの)遊離ヒドロキシル基、(e)(フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンなどの)芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は、W087/05330およびAplin, J.D. and Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. 10 (1981) 259-306に記載されている。

30

**【0078】**

抗体上に存在する任意の糖質部分の除去は、化学的または酵素的に成し遂げてよい。化学的脱グリコシル化は、化合物であるトリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物に抗体を曝露する必要がある。この処置の結果として、連結糖(N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)を除く大部分または全ての糖の切断が生じるが、抗体はインタクトなまま残る。化学的脱グリコシル化は、Sojar, H.T. and Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57; Edge, A.S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137により記載されている。抗体上の糖質部分の酵素的切断は、Thotakura, N.R. and Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359により記載されているように多様なエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用により達成することができる。

40

**【0079】**

抗体の別種の共有結合的改変は、米国特許第4,640,835号、第4,496,689号、第4,301,144号、第4,670,417号、第4,791,192号、第4,179,337号に示される方法で、多様な非タンパク質性ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンに抗体を連結することを含む。

**【0080】**

本発明に記載の重鎖および軽鎖可変ドメインは、プロモーター配列、翻訳開始配列、定常領域の配列、3'非翻訳領域の配列、ポリアデニル化配列、および転写終結配列と組合されて、発現ベクター構築物を形成する。重鎖および軽鎖発現構築物を単一のベクターに

50

組合せ、宿主細胞に共トランスフェクション、連続トランスフェクション、または別々にトランスフェクションし、次いでその宿主細胞を融合させて、両方の鎖を発現する単一の宿主細胞を形成させることができる。

【0081】

本発明は、好ましくはヒト血漿試料の可溶性CCR5 (Tsimanis, T., Immunology Letters 96 (2005) 55-61) と本発明に記載の抗体との間の結合を測定する免疫学的アッセイによって、AIDSの感受性を*in vitro*で診断するために本発明に記載の抗体を使用することをさらに含む。CCR5の発現は、疾患の進行と相関を有するため、AIDSの感受性について低リスクまたは高リスクな個体を同定するために使用することができる。診断目的のために、抗体または抗原結合性フラグメントは、ラベルされていることがあるし、ラベルされていないこともある。典型的には、診断アッセイは、CCR5への抗体または抗体フラグメントの結合に起因する複合体の形成を検出することを伴う。

10

【0082】

別の局面では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体の一つもしくは組合せ、またはその抗原結合性部分が薬学的に許容される担体と共に製剤されたものを含有する組成物、例えば薬学的組成物を提供する。

【0083】

本明細書に使用する「薬学的に許容され得る担体」には、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収/再吸収遅延剤、ならびに生理学的に適合性の類似物が挙げられる。好ましくは、担体は注射または点滴に適する。

20

【0084】

本発明の組成物は、当技術分野で公知の多様な方法により投与することができる。当業者により認識されているように、投与経路および/または投与様式は、所望の結果に応じて変動するものである。

【0085】

薬学的に許容され得る担体には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液を調製するための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためにそのような媒質および薬剤を使用することは、当技術分野において公知である。担体は、水に加えて例えば等張緩衝食塩水でありうる。

30

【0086】

選択された投与経路にかかわらず、適切な水和形態で使用することができる本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物は、当業者に公知の通常の方法により、薬学的に許容され得る剤形に製剤される。

【0087】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬レベルは、特定の患者に対して毒性を示さず、その患者、組成物、および投与様式について所望の治療応答を実現するために有効な活性成分の量(有効量)を得るように変動させることができる。選択された投薬レベルは、採用された本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、採用される特定の化合物の投与経路、投与時間、および排泄速度、採用された特定の組成物と共に使用された他の薬剤、化合物、および/または物質、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態、および病歴、ならびに医学の分野で周知の類似の要因を含む多様な薬物動態学的要因に依存するものである。

40

【0088】

本発明は、AIDSなどの免疫不全症候群を有する患者、免疫抑制を起こす放射線療法、化学療法、自己免疫疾患のための治療法もしくは他の薬物療法(例えばコルチコステロイド療法)を受けている患者における免疫抑制などの免疫抑制を患う患者を処置するために、またはGvHDもしくはHvGD(例えば移植後)を患う患者を処置するために、本発明に記載の抗体を使用することを含む。本発明は、そのような免疫抑制を患う患者を処置するための方法もまた含む。

50

【 0 0 8 9 】

本発明は、さらに本発明に記載の抗体の有効量を、薬学的に許容され得る担体と共に含む薬学的組成物を製造するための方法、およびそのような方法のために本発明に記載の抗体を使用することを提供する。本発明は、薬として使用するための本発明に記載の抗体もまた提供する。免疫抑制疾患を処置するための本発明に記載の抗体もまた提供する。

【 0 0 9 0 】

本発明は、さらに免疫抑制を患う患者を処置するための医薬品を製造するために、本発明に記載の抗体を有効量で、好ましくは薬学的に許容される担体と共に使用することを提供する。

【 0 0 9 1 】

本発明は、CCR5により仲介される炎症メディエーターの放出を患う患者を処置するための医薬品を製造するために、本発明に記載の抗体を有効量で、好ましくは薬学的に許容され得る担体と共に使用することもまた提供する。

10

【 0 0 9 2 】

以下の実施例および配列リストは、本発明の理解を助けるために提供されるが、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。本発明の精神から逸脱することなしに、示された手順に改変を加えることができることが了解されている。

【 0 0 9 3 】

配列の説明

- 配列番号 1            式 I、重鎖可変ドメイン
- 配列番号 2            式 II、軽鎖可変ドメイン
- 配列番号 3            1 重鎖定常領域
- 配列番号 4            4 重鎖定常領域
- 配列番号 5            軽鎖定常領域
- 配列番号 6            重鎖可変ドメイン
- 配列番号 7            重鎖可変ドメイン
- 配列番号 8            重鎖可変ドメイン
- 配列番号 9            軽鎖可変ドメイン
- 配列番号 10          軽鎖可変ドメイン

20

【 0 0 9 4 】

実施例 1

抗体のリコンビナント産生

本発明に記載の抗体を発現させるためのベクターを、以下のように構築した。重鎖発現ベクターは、発現ベクター pSVgp<sub>1</sub>中でヒト IgG1 (配列番号 3) 定常領域に重鎖可変ドメインを連結することによって構築した。軽鎖発現ベクターは、発現ベクター pSVhyg<sub>1</sub>中でヒト 軽鎖定常領域 (配列番号 5) に軽鎖可変ドメインを連結することによって構築した。リーダーシグナルペプチド、リーダーイントロンおよびマウス免疫グロブリンプロモーターを含めた 5' フランキング配列ならびにスプライス部位およびイントロン配列を含めた 3' フランキング配列を、テンプレートとしてベクター V<sub>H</sub>-PCR1 および V<sub>K</sub>-PCR1 を使用して導入した。重鎖および軽鎖発現ベクターは、NS0 細胞 (E<sub>C</sub>A<sub>C</sub>C 番号 85110503、免疫グロブリン無産生マウス骨髓腫) に共トランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞クローンは、ヒト IgG についての ELISA によりヒト抗体の産生についてスクリーニングした。

30

40

【 0 0 9 5 】

実施例 2

突然変異 (変異) 型抗 CCR5 抗体のための発現プラスミドの構築

突然変異型抗 CCR5 抗体の重鎖および軽鎖をコードする発現プラスミドは、QuickChange (商標) 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene) を使用した発現プラスミドの部位特異的突然変異誘発によって創出したが、これを表 1 に説明する。アミノ酸は、EU 付番に準じて付番した (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969)

50

78-85 ; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991) ) )。

【 0 0 9 6 】

表 1 に定常鎖 ( F c ) の突然変異体を示す。

【 0 0 9 7 】

【 表 4 】

表 1 :

アイソタイプ	略語	突然変異	説明
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	ヒト $\gamma 1$ 重鎖のアミノ酸配列 Leu <sub>234</sub> Leu <sub>235</sub> がアミノ酸配列 Ala <sub>234</sub> Ala <sub>235</sub> によって置き換えられている

10

【 0 0 9 8 】

突然変異の説明 : L 2 3 4 A は K a b a t のアミノ酸 2 3 4 位のロイシンがアラニンに変更されていることを意味する。

【 0 0 9 9 】

### 実施例 3

20

#### 細胞 - 細胞融合アッセイ

1 日目に、g p 1 6 0 を発現している H e L a 細胞 (  $2 \times 10^4$  個 /  $50 \mu\text{l}$  / ウェル ) を 1 0 % ( v / v ) F C S および  $2 \mu\text{g/ml}$  ドキシサイクリンを補充した D M E M 培地に入れて白色 9 6 マイクロタイタープレート中に蒔いた。2 日目に、ウェル 1 個あたり  $100 \mu\text{l}$  の上清試料または抗体対照を透明の 9 6 マイクロタイタープレートに加えた。次いで、培地に懸濁した  $8 \times 10^4$  個の C E M - N K R - L u c 細胞  $100 \mu\text{l}$  を添加し、3 7 ° C で 3 0 分間インキュベーションした。H e L a 細胞の培養液を 9 6 ウェルプレートから吸引し、 $200 \mu\text{l}$  から  $100 \mu\text{l}$  の抗体 / C E M - N K R - L u c 混合液を添加し、3 7 ° C で一晩インキュベーションした。3 日目に  $100 \mu\text{l}$  / ウェルの Bright-Glo ( 商標 ) ルシフェラーゼアッセイ基質 ( 1 , 4 - ジチオトレイトールおよび亜ジチオン酸ナトリウム ; Promega Corp., USA ) を添加し、室温で最低 1 5 分間インキュベーションした後に発光を測定した。

30

【 0 1 0 0 】

材料 :

H e L a - R 5 - 1 6 細胞 ( ドキシサイクリンの誘導に応答して H I V の g p 1 6 0 を発現する細胞系 ) は、栄養素および 1 0 % ( v / v ) F C S を含有する D M E M 培地中で  $400 \mu\text{g/ml}$  の G 4 1 8 および  $200 \mu\text{g/ml}$  のハイグロマイシン B と共に培養する。

【 0 1 0 1 】

C E M . N K R - C C R 5 - L u c ( カタログ番号 : 5 1 9 8 ) は、NIH AIDS Research & Reference Reagent Program McKesson BioServices Corporation Germantown, MD 20874, USA から入手することができる T 細胞系である。細胞型 : C E M . N K R - C C R 5 ( カタログ番号 4 3 7 6 ) をトランスフェクション ( エレクトロポレーション ) して、H I V - 2 L T R の転写コントロール下でルシフェラーゼ遺伝子を発現させ、1 0 % ウシ胎仔血清、4 mM グルタミン、ペニシリン / ストレプトマイシンおよび  $0.8 \text{ mg/ml}$  硫酸ジェネテシン ( G 4 1 8 ) を含有する R P M I 1 6 8 0 中で増殖させた。成長の特徴 : 円形リンパ球、変化に乏しい形態。細胞は単細胞として懸濁状態で成長し、小さな凝集塊を形成することもある。1 週間に 2 回、1 : 1 0 に分割する。特別な特徴 : H I V - 2 L T R のトランス活性化後にルシフェラーゼ活性を発現する。中和アッセイおよび薬物感受性アッセイのために、初代 H I V 単離株を感染させるために適する ( Spenlehauer, C., et al., Virology 280 (2001) 292-300 ; Trkola, A., et al., J. Virol. 73 (1999) 8966-8

40

50

974)。細胞系は、John MooreおよびCatherine Spenlehauer博士からNIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIHにより得た。

Bright-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイ緩衝液 (Promega Corp., USA、品番 E 2 2 6 4 B)

Bright-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイ基質 (Promega Corp., USA、品番 E E 2 6 B)

【0102】

結果：

結果を表2に示す。IC<sub>50</sub>値は、46 ~ 399 ng/mlの間である。抗体の定常領域は、突然変異 IgG1 (IgG1v2) である。

【0103】

【表5】

表2：

重鎖可変ドメイン	軽鎖可変ドメイン	IC <sub>50</sub> [ng/ml]
配列番号 6	配列番号 9	108
配列番号 6	配列番号 10	399
配列番号 7	配列番号 9	46
配列番号 7	配列番号 10	152
配列番号 8	配列番号 9	132
配列番号 8	配列番号 10	76

【0104】

実施例 4

生きたウイルスを用いた抗ウイルスアッセイ

P B M C は、Lymphoprep (商標) (Nycomed Pharma AG, Oslo, Norway) を使用した密度勾配遠心分離によって単離したパフィーコートから調製した。4人の異なるドナーからの細胞を混合し、P H A と1日間刺激した後、1% (w/v) ペニシリン/ストレプトマイシン、1% GlutaMAX (商標) (Invitrogen Corp., USA、カタログ番号 3 5 0 5 0 - 0 3 8)、1% ビルビン酸ナトリウム、1% (w/v) 可欠アミノ酸および10% F B S を含有する R P M I 培地中で、5 U/ml の I L - 2 (インターロイキン2) の存在下で2日間培養した。

【0105】

50 μl 中の P B M C (末梢血単核細胞) 100,000 個を 100 μl の抗体溶液 (補充された R P M I 培地に 0.006 ~ 17.5 μg/ml の範囲で系列希釈) に添加し、250 TCID<sub>50</sub> (組織培養感染量の中央値) の N L B a l (B a L の e n v (g p 1 2 0) を有する N L 4.3 株 (Adachi, A., et al., J. Virol. 59 (1986) 284-291) または体積 50 μl の J R C S F (O'Brien, W.A., et al., Nature 348 (1990) 69-73) に感染させた。この混合物を 37 °C で6日間、C O 2 インキュベーター中でインキュベーションした。上清を採集した後で、5 U/ml の I L - 2 を補充した R P M I 培地で 1 : 50 に希釈した。

【0106】

p 2 4 の測定は、H I V - 1 の p 2 4 の E L I S A (Perkin-Elmer, USA) により行った。次いで、試料を中和し、H I V - 1 p 2 4 に高度に特異的なマウスモノクローナル抗体をコーティングしたマイクロプレートのウェルに移した。この固定化されたモノクローナル抗体は H I V - 1 p 2 4 を捕捉する。細胞培養試料は破壊する必要がなく、モノクローナル抗体をコーティングしたマイクロプレートのウェルに試料を直接添加した。捕捉された抗原を、H I V - 1 p 2 4 に対するビオチン化ポリクローナル抗体に続いてストレプトアビジン - H R P (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) コンジュゲートと共に複合体にした。結果として得られた複合体は、o - フェニレンジアミン H C l (O P D

）と共にインキュベーションし、捕捉されたHIV-1 p24の量に直接比例する黄色を産生させることによって検出した。マイクロプレートの各ウェルの吸光度は、マイクロプレートリーダーを用いて測定し、HIV-1 p24抗原標準の吸光度または標準曲線に対して校正した。

【0107】

結果：

ヒトPBMCにおけるHIVの成長阻害については、異なる組合せの重鎖可変ドメイン（配列番号6、7、8）および軽鎖可変ドメイン（配列番号9、10）を含み、IgG1アイソタイプである抗CCR5抗体について2.27ng/ml～14.21ng/mlの範囲のIC50値が決定された。これらの組合せについて、IC90値は、9.77ng/ml～74.06ng/mlである。

10

【0108】

突然変異IgG1定常領域（IgG1v2）を含む抗CCR5抗体について、異なる組合せの重鎖および軽鎖可変ドメインのIC50値が8.22ng/ml～43.11ng/mlの範囲に入ると決定されたが、IC90値は、51.95ng/ml～311.38ng/mlの範囲に入ると決定された。

【0109】

#### 実施例 5

##### CCR5の細胞ELISA

CCR5を組換え発現しているCHO細胞20,000個を96ウェルプレートに蒔き、37℃で一晩インキュベーションした。その後、培地を吸引し、新鮮培地40μlを添加した。培地で希釈した第1抗体10μlを添加し、4℃で2時間インキュベーションした。培地を吸引し、グルタルジアルデヒド（c=0.05%、リン酸緩衝食塩水（PBS）溶液）100μlを添加し、室温で10分間インキュベーションした。200μlのPBSで3回洗浄後に、検出用抗体50μl（ELISAブロッキング緩衝液に1:1000～1:2000希釈）を添加し、室温で2時間インキュベーションした。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）50μlを添加し、反応を7分後に停止させる。吸光度を（620nmに対して）450nmで測定した。

20

【0110】

第1抗体：被験抗体

30

第2（検出）抗体：ペルオキシダーゼとコンジュゲーションした特異的ヒツジ抗ヒトIgG抗体（The Binding siteカタログ番号AP004）をブロッキング緩衝液10%のPBSに1:2000（6μl/12ml）希釈したもの

培地：GlutaMAX（商標）、10% FCS、200μg/mlハイグロマイシン（Roche Diagnostics GmbH, Germany）を加えたHAMのF-12またはGIBCO

ELISA - ブロッキング：Roche Diagnostics GmbH, Germany, #1112589、10%（v/v）水溶液、PBSで1:10希釈

TMB：Roche Diagnostics GmbH, Germany, #1432559、使用するための溶液

【0111】

結果：

40

CCR5の細胞ELISAの結果は、異なる組合せの重鎖可変ドメイン（配列番号6、7、8）および軽鎖可変ドメイン（配列番号9、10）を含む抗CCR5抗体のヒトCCR5に対する結合が濃度1000ng/mlで2.71～3.13（OD450/620）の範囲にあることを示す。

【0112】

#### 実施例 6

CCR5MAbがNK細胞上のFcγRIIIaに結合する潜在性

本発明の抗体がナチュラルキラー（NK）細胞上のFcγRIIIa（CD16）に結合する能力を決定するために、末梢血単核細胞（PBMC）を単離し、FcγRIIIaに対する20μg/mlのマウスブロッキング抗体（抗CD16抗体、クローン3G8、RDI、

50

Flanders, NJ) の存在下または不在下で 20  $\mu\text{g/ml}$  の抗体および対照抗体と共にインキュベーションして Fc R I I I a を介した結合を実証する。陰性対照として、Fc R I I I a と結合しないヒト I g G 2 および I g G 4 (The Binding Site) を使用する。ヒト I g G 1 および I g G 3 (The Binding Site) を、Fc R I I I a の結合についての陽性対照として含める。NK 細胞上に結合した抗体は、PE ラベルしたマウス抗ヒト CD 5 6 (NK 細胞表面マーカー) 抗体 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) を、FITC ラベルしたヤギ F ( a b )<sub>2</sub> 抗ヒト I g G ( F c ) 抗体 (Protos Immunoresearch, Burlingame, USA) と共に使用した F A C S 分析により検出する。最大結合 ( $B_{max}$ ) は、抗体濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  で決定する。ヒト I g G 1 についての 100% の  $B_{max}$  に比べて、対照抗体 (ヒト I g G 4) は最大 30% の  $B_{max}$  を示す。したがって、「Fc R I I I a の無結合または A D C C なし」は、抗体濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  でヒト I g G 1 に比べて最大 30% の  $B_{max}$  値を意味する。

10

【0113】

#### 実施例 7

##### CCR5 ケモタキシスアッセイ

L1.2 h CCR5 細胞を、10% ウシ胎仔血清、1x ペニシリン/ストレプトマイシン、1x グルタミン、1x ビルビン酸ナトリウム、1x  $\beta$ -メルカプトエタノール、および 250  $\mu\text{g/ml}$  G418 を含有する RPMI 1640 (全て Invitrogen Inc., USA 製) 中で培養した。ケモタキシスアッセイの設定直前に、細胞を沈降させ、走化性緩衝液 (0.1% BSA および 10mM HEPES を含有するハクス平衡塩類溶液 HBSS (Invitrogen)) に再懸濁した。走化性アッセイに使用した細胞は、終濃度  $5 \times 10^6$  個/ml であった。CCR5 リガンドであるヒト MIP1、ヒト MIP1 またはヒト RANTES (R&D Systems, USA) を走化性緩衝液に希釈し、終濃度 20nM で使用した。被験抗体または適切なアイソタイプ対照抗体を HBSS に希釈した。走化性アッセイは、口径 0.5  $\mu\text{m}$  の 96 ウェル ChemoTx (登録商標) システム (Neuroprobe Inc., USA) で設定した。各抗体を CCR5 リガンドの一つと混合し、この混合物の 30  $\mu\text{l}$  を ChemoTx (登録商標) システムの下のウェルに入れた。フィルタースクリーンは下のウェルの上部に載せた。各抗体を L1.2 h CCR5 細胞と混合し、この混合物の 20  $\mu\text{l}$  をフィルターに載せた。次いで、プレートを加湿チャンパーに入れ、37°C および 5% CO<sub>2</sub> で 3 時間インキュベーションした。インキュベーション後に細胞をフィルターから剥がし、プレートを卓上型遠心分離器に入れ 2000 rpm で 10 分間回転させた。次いで、フィルターを除去し、下のウェルに移動した細胞の密度を CyQUANT (登録商標) 細胞増殖アッセイキット (Invitrogen) および Spectra MAX GeminiXS プレートリーダー (Molecular Devices, Wokingham, UK) を使用して製造業者の説明書に準じて検出した。Prism4 (GraphPad Inc., USA) を使用して IC<sub>50</sub> 値を計算した。

20

30

【0114】

IgG1 アイソタイプの定常領域を有する、異なる組合せの重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインについてのヒト MIP-1、ヒト MIP-1、およびヒト RANTES に対する IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 0.80nM ~ 0.91nM、0.72nM ~ 1.08nM および 0.85nM ~ 2.69nM である。

40

【0115】

突然変異 IgG1 アイソタイプ (IgG1 v2) の場合に、ヒト MIP-1、ヒト MIP-1、およびヒト RANTES に対する IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 2.21nM ~ 6.28nM、2.16nM ~ 6.87nM、および 3.59nM ~ 5.03nM の範囲である。

【配列表】

[2010504739000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2007/008312

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/28	C12N15/13	A61K39/395 A61P37/00
ADD. A61P31/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K C12N A61K A61P		
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 practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OLSON W C ET AL: "Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 4145-4155, XP002290005 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	1-21
X	US 6 528 625 B1 (WU LIJUN [US] ET AL) 4 March 2003 (2003-03-04) cited in the application the whole document	1-21
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 February 2008	04/03/2008	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Luyten, Kattie	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2007/008312

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/105841 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC [US]; ROSCHKE VICTOR [US]; ROSEN CRAIG A [US]) 10 November 2005 (2005-11-10) page 147 - page 148; examples 54,55,60-63,67-69; tables 2,7,8	1-21
X	STEINBERGER P ET AL: "GENERATION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT HUMAN CCR5-SPECIFIC ANTIBODY A PHAGE DISPLAY APPROACH FOR RABBIT ANTIBODY HUMANIZATION" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 275, no. 46, 17 November 2000 (2000-11-17), pages 36073-36078, XP000999141 ISSN: 0021-9258 the whole document & DATABASE EMBL [Online] 11 November 2000 (2000-11-11), "Oryctolagus cuniculus anti-human CCR5 immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds." retrieved from EBI accession no. EMBL:AF281659 Database accession no. AF281659	1-21
X	"Human Genome Sciences will start clinical trials with anti-CCR5 monoclonal antibody." IAVI REPORT : NEWSLETTER ON INTERNATIONAL AIDS VACCINE RESEARCH 2004 DEC-2005 MAR, vol. 9, no. 1, December 2004 (2004-12), page 15, XP008075310 ISSN: 1816-6253 the whole document	1-21
X	FOR THE PEDIATRIC AIDS CLINICAL TRIALS GROUP PROTOCOL 351 STUDY GROUP SHEARER ET AL: "Susceptibility of pediatric HIV-1 isolates to recombinant CD4-IgG2 (PRO 542) and humanized mAb to the chemokine receptor CCR5 (PRO 140)" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 118, no. 2, August 2006 (2006-08), pages 518-521, XP005587373 ISSN: 0091-6749 the whole document	1-21
P,X	WO 2006/103100 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BRANDT MICHAEL [DE]; SANKURATRI SURYANARAYANA) 5 October 2006 (2006-10-05) the whole document	1-21
	----- -/--	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2007/008312

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 88/07089 A (MEDICAL RES COUNCIL [GB]) 22 September 1988 (1988-09-22) the whole document -----	7-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2007/008312**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claim 16 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/008312

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6528625	B1	04-03-2003	NONE
WO 2005105841	A	10-11-2005	CA 2559809 A1 EP 1723178 A2
WO 2006103100	A	05-10-2006	AR 052959 A1 AU 2006228663 A1 CA 2603692 A1 US 2007036796 A1
WO 8807089	A	22-09-1988	AU 600575 B2 AU 1480388 A DE 3883899 D1 DE 3883899 T2 EP 0307434 A1 GB 2209757 A JP 1502875 T JP 3101690 B2

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	D
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	U
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 P 31/18	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アウアー, ヨハネス  
 ドイツ国、 8 2 4 4 5 シュヴァイゲン、 アンガーシュトラッセ 7

(72) 発明者 ベーナー, モニカ  
 ドイツ国、 8 1 3 7 9 ミュンヘン、 スレーフォクトシュトラッセ 2 4

(72) 発明者 ブラント, ミヒャエル  
 ドイツ国、 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ、 ファルターガッター 2 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 DA02 EA04 GA11  
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA03  
 4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44  
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB17 BB18 BB36 CC21 DD62 EE01  
 4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74