

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6792552号
(P6792552)

(45) 発行日 令和2年11月25日(2020.11.25)

(24) 登録日 令和2年11月10日(2020.11.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 12 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-520318 (P2017-520318)	(73) 特許権者	510168852
(86) (22) 出願日	平成27年10月19日(2015.10.19)		イクノス サイエンス エスエー
(65) 公表番号	特表2017-536101 (P2017-536101A)		スイス国 ツェーハー 2300 ラシ
(43) 公表日	平成29年12月7日(2017.12.7)		ョーードフォン, シュマン ドラ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/074178		コンベタ 5
(87) 国際公開番号	W02016/059253	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開日	平成28年4月21日(2016.4.21)		弁護士 大野 聖二
審査請求日	平成30年3月28日(2018.3.28)	(74) 代理人	100119183
(31) 優先権主張番号	14189374.3		弁理士 松任谷 優子
(32) 優先日	平成26年10月17日(2014.10.17)	(74) 代理人	100114465
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 北野 健
		(74) 代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		(74) 代理人	100173185
			弁理士 森田 裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CCR6と結合する抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号31のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および配列番号32、配列番号190、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号254または配列番号255のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および配列番号33のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに

配列番号34、配列番号191、配列番号244、配列番号245、配列番号246または配列番号256のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および配列番号35、配列番号247、配列番号248または配列番号257のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および配列番号36または配列番号192または配列番号193のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3

を含む、CCR6と結合する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

(i) 配列番号37もしくは配列番号249のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列、または(ii)前記(i)の重鎖可変領域配列のいずれかの非CDR領域と少なくとも90%同一の配列からなるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含み、かつ

(iii) 配列番号38、配列番号251もしくは配列番号253のアミノ酸配列を含む

軽鎖可変領域配列、または (iv) 前記 (iii) の軽鎖可変領域配列のいずれか 1 つの非 CDR 領域と少なくとも 90% 同一の配列からなるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

ヒト重鎖および/または軽鎖定常領域を含み、ヒト重鎖定常領域が、IGHG1、非フコシル化 IGHG1 および IGHG4 からなるヒト免疫グロブリンの群から選択される、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

抗体が、全長抗体、または Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、2重特異性単鎖 Fv 2 量体、ダイアボディ、トリアボディおよび同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合した scFv からなる群より選択される抗体断片である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離核酸。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の単離核酸を含む宿主細胞。

【請求項 8】

核酸が発現され、抗体が生成されるように、請求項 7 に記載の宿主細胞を培養することを含む、ヒトCCR6 と結合する抗体またはその抗原結合断片を生成する方法。

20

【請求項 9】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

【請求項 10】

治療剤に連結した請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 11】

医薬品として用いるための、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 12】

関節リウマチ、多発性硬化症 (MS)、乾癬、移植片対宿主病 (GVHD)、ループス、COPD、視神経炎、加齢黄斑変性、SLE、シェーグレン症候群、強皮症、全身性強皮症、慢性腎臓疾患、肝線維症、結核、特発性肺線維症、結核誘発性肺線維症、後腹膜線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、心内膜心筋線維症、心房性線維症、縦隔線維症、骨髄線維症 (骨髄)、後腹膜線維症、進行性塊状線維症、腎原性全身性線維症、関節線維症、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、アテローム動脈硬化症、移植片拒絶、中枢神経系損傷、乾癬、白血病またはリンパ腫、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、アテローム動脈硬化症、肺および結腸癌からなる群から選択される疾患を処置する医薬品として用いるための、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CCR6 と結合する改善された抗体またはその断片に関する。より具体的には、本発明は、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、および/または配列番号 32、配列番号 190、配列番号 239、配列番号 240、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 254 または配列番号 255 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、および/または配列番号 33 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3、ならびに/あるいは配列番号 34、配列番号 191、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246 または配列番号 256 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、および/または配列番号 35、配列番号

50

247、配列番号248または配列番号257のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号36または配列番号192または配列番号193のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片に関する。本発明は、特定する抗CCR6抗体を含む医薬品および関連する物質ならびに疾患を処置するためのそれらの使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

ケモカインは、免疫系の恒常性および活性化に必須の化学誘引性で炎症誘発性のサイトカインのファミリーである。ケモカインは、炎症および感染の部位への免疫細胞の遊走を導く。ケモカインは、7回膜貫通型ドメインのファミリーに属する特定の細胞表面受容体である、Gタンパク質共役受容体(GPCR)と結合する。

10

【0003】

CCR6は、GPCRスーパーファミリーのクラスAに属するケモカイン受容体であり、ヒト樹状細胞、メモリーT細胞およびB細胞上に発現される(Zaballosら、(1996) Biochem & Biophys Res Com, 227: 846~853; Greavesら、(1997) J Exp Med, 186: 837~844; Powerら、(1997) J Exp Med 186: 825~835; Liaoら、(1999) J Immunol 162: 186~194)。CCR6に対する唯一知られているリガンドは、MIP-3、LARCまたはexodusとしても知られるケモカインCCL20である(Rossioら、(1997) J Immunol 158: 1033~1036)。CCR6受容体は、最初にヒトゲノムDNAからオーファン受容体としてクローニングされた(Zaballosら、既出)。ノーザンブロット分析により、CCR6が、様々なヒト組織のうちで脾臓、リンパ節、胸腺、虫垂およびPBMCにおいて主に発現されることが明らかになっている(Babaraら、(1997) J Biol Chem, 272: 14893~14898)。様々な白血球サブセットのうち、CCR6 mRNAは、リンパ球(CD4⁺およびCD8⁺ T細胞およびB細胞)において検出されているが、ナチュラルキラー細胞、単球または顆粒球では検出されていない(Babaraら、既出)。ケモカインリガンド/受容体のペア、CCL20/CCR6は興味深い。なぜなら、これらの分子は、恒常性および活性化の両方の機能の特徴を示し、これらの二重の特徴は、免疫応答の予備刺激およびエフェクター段階におけるCCR6の役割を示唆するからである。

20

30

【0004】

Th17細胞上で発現されるので(Romagnani Sら、(2009) Mol Immunol 47: 3~7)、CCR6は、自己免疫性および炎症性疾患の過多、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、菌状息肉症、乾癬、慢性肝炎、歯周病、HPV、IBD、関節リウマチ、アレルギー性喘息、COPD、遅延型過敏症、B細胞悪性腫瘍、乳腺癌、肝細胞癌、膵臓腺癌、甲状腺乳頭癌および膠芽腫に關与する。

【0005】

研究者は、様々な方法、例えばファージディスプレイを用いて、CCR6に対する抗体を作製しているWO2013184218(MSM PROTEIN TECHNOLOGIES)。抗CCR6抗体は、慣習的な免疫化方法を用いても作製されているWO201017558A3(SCHERING CORPORATION)。このような従来技術の抗体は全て、治療用抗体として適切になり得るために必要な特性を有していない。つまり、これらの抗体のいくつかまたは全ては、ヒトCCR6に対する結合親和性を有するが、ヒトCCR6受容体の活性を調節する能力、例えばCCR6依存性細胞遊走を防止する能力を有さないかまたは有することが示されていない。そのような従来技術の抗体は、CCR6特異的でないので、診断用抗体として用いるために適切であることも示されていない。

40

【0006】

よって、多様な免疫性および炎症性疾患および障害の処置および診断において用いるこ

50

とができる組成物に対して当技術分野において必要性がまだ存在する。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、全般的に、CCR6と結合する抗体またはその断片、それらの調製のための方法、およびCCR6媒介性障害を処置するための方法を含む使用に関する。CCR6と結合する本発明の抗体またはその断片は、多数の望ましい特性を示し、それらに限定されないが、炎症性疾患および/または自己免疫疾患を含む様々な疾患の処置に有用であり得る。

【0008】

一態様では、本開示は、配列番号31のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および/または配列番号32、配列番号190、配列番号239、配列番号240、配列番号241または配列番号242のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および/または配列番号33のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに/あるいは配列番号34、配列番号191、配列番号244、配列番号245または配列番号246のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および/または配列番号35、配列番号247、配列番号248または配列番号257のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号36または配列番号192または配列番号193のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。

10

【0009】

本開示の別の態様によると、配列番号31のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および/または配列番号241のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および/または配列番号33のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに/あるいは配列番号245のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および/または配列番号191のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号192のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片が提供される。

20

【0010】

さらなる態様では、本発明は、配列番号7、37、39、40、41、42、75、177、178、179、249のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。

【0011】

好ましくは、配列番号7、37、75、177、178および179、最も好ましくは配列番号7、37または249のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片である。

30

【0012】

さらなる態様では、本発明は、IGHV3-11*04(配列番号77)、IGHV3-11*01(配列番号78)、IGHV3-48*03(配列番号79)、IGHV3-23*04(配列番号80)およびIGHV3-66*04(配列番号81)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。最も好ましくは、ヒト遺伝子はIGHV3-23*04(配列番号80)であり、重鎖可変フレームワーク領域は、対応するマウスまたは中間抗体配列の重鎖可変領域の、対応するフレームワーク領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。

40

【0013】

本発明によると、中間抗体は、少なくとも1残基が元の抗体と異なる、任意のバージョンの出発抗体を意味し、特に、マウス抗体のヒト化または改善により本発明に従って作製される抗体の1または複数のことをいう。

【0014】

さらなる態様では、本発明は、配列番号8、38、43、44、45、46、181、182、250、251、252または253のアミノ酸配列を含む軽鎖可変配列を含む抗体またはその断片を提供する。

50

【0015】

好ましくは、配列番号8、38、181、182、250、251、252または253、最も好ましくは配列番号8、38、251または253のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片である。

【0016】

さらなる態様では、本発明は、生殖系列FW領域IGKV2-30*02(配列番号82)、IGKV2-30*01(配列番号83)、IGKV2D-30*01(配列番号84)、IGKV2-29*02(配列番号85)およびIGKV2-29*03(配列番号86)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。

10

【0017】

さらなる態様では、本発明は、ヒト遺伝子IGKV2-30*02(配列番号82)の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む抗体またはその断片であって、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体または中間抗体配列の軽鎖可変領域の、対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む抗体またはその断片を提供する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、配列番号10、19、20、21、22、23、24、173、175、183、184、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、221、224、227、230、233および235からなる群より選択される重鎖配列を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、配列番号25、26、27、28、29、30、176、186、187、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、222、225、228、231および236からなる群より選択される軽鎖配列を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。

20

【0019】

さらなる態様では、本発明は、
(a) 配列番号19、24、214または216のアミノ酸配列を含む重鎖配列と、
(b) 配列番号25、30、215または217のアミノ酸配列を含む軽鎖配列とを含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。

30

【0020】

さらなる態様では、本発明は、CCR6と結合する抗体またはその断片であって、前記抗体が、ヒトIgG4Fc領域を含み、前記抗体が、Fc媒介性細胞傷害活性を有さない、抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、CCR6と結合する抗体またはその断片であって、前記抗体が、ヒトIGHG1Fc領域を含み、前記抗体が、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)などの細胞傷害作用機序について必要な能力を有する、抗体またはその断片を提供する。好ましい態様では、CCR6と結合する抗体またはその断片は、非フコシル化IGHG1Fc領域を有し、ADCCなどのFc媒介性細胞傷害作用機序が増進している。

40

【0021】

別の態様では、本発明は、ヒトCCR6と結合し、カニクイザルCCR6とも結合する交差反応性抗体またはその断片を提供する。「交差反応性抗体」は、1種、例えばヒトからの抗原と結合し、異なる種、例えばアカゲザル(Macacca Mulata)およびカニクイザル(Macacca fascicularis)の対応する抗原とも結合する抗体を意味する。

【0022】

別の態様では、本発明の開示は、対応するキメラ抗体と同様の親和性でCCR6と結合する、例えば対応するキメラ抗体のCCR6結合親和性(K_D)の少なくとも85%を保

50

持するか、または対応するキメラ抗体と比較した場合に少なくとも等しいかもしくはより高いCCR6結合親和性(K_D)を有する、ヒト化抗体またはその断片についても記載する。

【0023】

別の態様では、本発明は、CCR6を発現する細胞集団のCCL20媒介性遊走を阻害できる、抗CCR6抗体またはその断片にも関する。本発明者らは、驚くべきことに、本発明による抗体が、CCR6を発現する細胞のCCL20により媒介される走化性を阻害し、いくつかの場合では完全に抑止する、予期せぬ特性を有することを見出した。

【0024】

別の態様では、本発明は、*in vivo*でのCCR6へのCCL20結合に影響する、抗CCR6抗体またはその断片にも関する。本発明者らは、驚くべきことに、本発明による抗体が、CCR6とそのリガンドであるCCL20との結合に相互作用して、リガンド受容体結合を低減し、いくつかの場合では完全に防止することを見出した。

【0025】

別の態様では、本発明は、*in vivo*でCCR6に対してアンタゴニストとして作用する、抗CCR6抗体またはその断片にも関する。

【0026】

別の態様では、本発明は、熱安定性が増進している、抗CCR6抗体またはその断片にも関する。

【0027】

本発明の開示は、CCR6と結合する抗体およびその断片をコードする単離核酸、ベクターならびに前記核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。抗CCR6抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む組成物、および治療剤に連結した抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートも提供される。

【0028】

本開示は、CCR6媒介性障害を処置するための方法も提供する。一態様では、CCL20誘導細胞遊走の*in vitro*モデルにおいて、抗CCR6抗体またはその断片は、CCL20に反応する、CCR6を発現する細胞の遊走を効率的に抑制した。

【0029】

本開示は、抗CCR6抗体またはその断片と、希釈剤または賦形剤などの担体とを含む医薬組成物も提供する。

【0030】

本開示は、抗体もしくはその断片、組成物またはイムノコンジュゲートを含む、CCR6媒介性障害の処置のためのキットおよび製造品も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】ハイブリドーマ候補のフローサイトメトリー分析。ヒストグラムプロットは、蛍光強度の幾何平均(Y軸)およびクローンID(X軸)を示す。ハイブリドーマ候補の結合は、ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞(図1A)または無関係のタンパク質を発現するBAF(図1B)で評価した。

【図2】CCR6-バイオアッセイにおけるキメラ4H11の阻止効果の試験。(A) Discoverxバイオアッセイにおけるキメラ4H11の阻止能力の試験。この図は、キメラ4H11を用いる機能性Discoverx CCR6-バイオアッセイからの結果を示す。このアッセイでは、5つの異なる濃度(20、6.7、2、0.7および0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)にて用いたキメラ4H11の存在下で、PathHunter成分を含有する細胞上でCCL20誘導化学発光活性を測定した。相対発光単位(RLU)のパーセンテージは、キメラIgG1アイソタイプ対照を用いる条件下での化学発光シグナルを100%の発光活性とみなして算出した。(B) CCL20誘導走化性アッセイにおけるキメラ4H11の阻止能力の試験。この図は、キメラ4H11を用いる機能性CCR6依存性遊走アッセイからの結果を示す。組換えヒトCCL20に反応する、全長ヒトCC

10

20

30

40

50

R6をトランスフェクトしたBAF細胞の遊走を、3つの異なる濃度(10、2および0.4 μg/ml)にて用いたキメラ4H11の存在下で評価した、6.5mm Transwellプレートを用いる遊走アッセイである。陽性対照として、市販の抗CCL20抗体を10 μg/mlにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Transwellの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【図3】キメラ4H11抗体のフローサイトメトリー分析。(A)ヒト活性化末梢血単核細胞(PBMC)での染色。ヒストグラムプロットは、それぞれの試験した抗体(X軸)に対応する幾何平均蛍光強度(Y軸における幾何平均)を示す。ヒトCCR6とのキメラ4H11の結合は、抗ヒトIgG-PEを用いて検出した。ヒトCCR6への市販の抗体の結合を検出するために、抗マウス-PE 2次抗体を用いた。(B)カニクイザル末梢血単核細胞(PBMC)での染色。カニクイザルCCR6へのキメラ4H11抗体の結合は、フローサイトメトリーにより評価した。末梢血単核細胞(PBMC)は、カニクイザルから回収した全血から単離し、 2×10^5 細胞を、10 μg/mlの対照抗体またはキメラ4H11抗体のいずれかとインキュベートした。カニクイザルCCR6への4H11の結合は、抗ヒトIgG-PEを用いて検出した。カニクイザルCCR6への市販の抗体の結合を検出するために、抗マウス-PE 2次抗体を用いた。

【図4】ヒト/マウスCCR6ハイブリッドトランスフェクタントを用いたキメラ4H11抗体の結合領域の評価。ヒト/マウスCCR6ハイブリッド構築物へのキメラ4H11抗体の結合は、フローサイトメトリーにより評価した。ヒト/マウスCCR6トランスフェクタントを計数し、 2×10^5 細胞を、10 μg/mlのキメラ4H11抗体とインキュベートした。4H11の結合活性は、抗ヒトIgG-PEを用いて検出した。細胞上でのヒト/マウスキメラの良好な発現を評価するために、ヒトおよびマウスCCR6を指向する2つの市販の抗体を用いた。ヒストグラムプロットは、フローサイトメトリーにより測定した蛍光強度の幾何平均(Y軸)を示す。

【図5】CCR6のN末端領域内のキメラ4H11抗体のエピトープの評価。CCR6のN末端領域のヒト/マウスハイブリッドへのキメラ4H11抗体の結合は、図4に示すように、フローサイトメトリーにより評価した。

【図6】細胞ELISAによるヒト化抗ヒトCCR6候補の試験。ヒト化4H11候補の結合は、ヒトCCR6をトランスフェクトしたCHO細胞を用いて評価した。この実験では、PBSで1 μg/mlに希釈した100 μlのポリ-Dで96ウェルプレートを予め被覆した。次の日に、細胞を洗浄し、 1×10^6 細胞/ウェルにて播種し、様々な濃度(10~0.0137 μg/mlの範囲)のヒト化4H11候補とインキュベートし、4% PFA中で固定した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗ヒトIgG断片特異的-HRPを2次抗体として用いた。TMB基質を用いて抗体結合活性を明らかにし、H₂SO₄を加えることにより反応を停止し、光学密度を450nm(OD450nm)にて読み取った。

【図7】機能性Ab Hunter CCR6バイオアッセイにおけるヒト化4H11抗ヒトCCR6候補の試験。PathHunter成分を含有する細胞を、様々な濃度(10、3、1および0.3 μg/ml)の、2つの異なるヒトIgG主鎖でのヒト化4H11候補とインキュベートした。CCL20での細胞活性化およびPathHunter検出試薬の添加の後に、化学発光活性を測定した。ヒト化4H11候補の中和活性を、最大相対発光単位(RLU)(最大RLUは、最大刺激における光放射である)のパーセンテージを算出することにより評価した。

【図8】固定化された組換えヒトN末端CCR6 Fcに対する直接結合ELISA。CCR6のヒトN末端断片に対するヒト化4H11 H5L1抗体の結合を、直接ELISAにより測定した。様々な濃度(10~0.00006 μg/mlの範囲)のIgG1およびIgG4HS主鎖でのヒト化4H11 H5L1を、96ウェルプレートにおいて4で一晩被覆した、2 μg/mlの組換えヒトNterCCR6-Fcタグ付加タンパク質(図8A)または組換えカニクイザルN末端ペプチドFc(図8B)のいずれかとインキュベートした。Nter CCR6-Fcタンパク質へのヒト化4H11 H5L1抗

10

20

30

40

50

体の結合は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート抗ヒト (Fab)' 2 特異的抗体により検出した。

【図9】4H11 VH5/VL1 IgG4HS抗体の表面プラスモン共鳴測定。この図は、Fc融合したヒト(図9A)およびカニクイザル(図9B)CCR6 N末端ペプチド上で、分析物としてヒト化4H11(VH5/VL1)Fab抗体を用いて測定した動的結合親和性定数(KD)を示す。データは、時間(X軸)に対する応答回数(RUと省略する; Y軸)として表す。

【図10】ヒト-マウスハイブリッドCCR6トランスフェクタントを用いる遊走アッセイにおける4H11 VH5/VL1 IgG4HS抗体の試験。この図は、10µg/mlにて用いた4H11 VH5/VL1 IgG4HSの存在下で、組換えヒトCCL20(グラフの左部分)またはマウスCCL20(グラフの右部分)のいずれかに応答するヒト-マウスキメラCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞の遊走を評価した、6.5mm Transwellプレートを用いる遊走アッセイからの結果を示す。対照抗体として、市販の抗マウスCCL20抗体を10µg/mlにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Transwellの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【図11】CCR6をトランスフェクトした細胞を用いるフローサイトメトリーによる4H11 VH5/VL1 IgG4HS抗体の中和能力の試験。CCR6をトランスフェクトした細胞を、0.1%のアジ化物を含有するFACS緩衝液で系列希釈(100~0.00001µg/ml)したヒト化4H11-VH5/VL1と4にて20分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、0.5µg/mlの組換えヒトCCL20と4にて20分間インキュベートした。CCR6と結合したCCL20を検出するために、細胞をビオチン化ヤギ抗ヒトCCL20とインキュベートした後に、0.1%のアジ化物を含有するFACS緩衝液で1/100に希釈したアロフィコシアニン(APC)標識ストレプトアビジンとインキュベートした。ヒト化4H11 VH5/VL1 IgG4HSの阻止能力を評価するために、抗体の各濃度にてCCL20のパーセンテージを測定した。CCR6へのCCL20の最大結合活性を、アイソタイプ対照について観察されるもののパーセンテージとして算出した。

【図12】ヒトCCR6をトランスフェクトした細胞を用いるフローサイトメトリーによる1価および2価フォーマットでの4H11 VH5/VL1抗体の試験。ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞への1価および2価4H11 VH5/VL1抗体の結合活性を、フローサイトメトリーにより評価した。ヒトCCR6を発現するBAF細胞を計数し、 2×10^5 細胞を、様々な濃度(3~0.01µg/mlの範囲)の1価または2価いずれかの4H11 VH5/VL1抗体とインキュベートした。両方の抗体の結合活性は、抗ヒトIgG-PEを用いて検出した。対照として、無関係のヒトIgG抗体を3µg/mlにて用いた。ヒストグラムプロットは、フローサイトメトリーにより測定した蛍光強度の幾何平均(Y軸)を示す。

【図13】ヒトCCR6をトランスフェクトした細胞を用いる遊走アッセイにおける1価および2価フォーマットでの4H11 VH5/VL1抗体の試験。2価および1価4H11 VH5/VL1抗体の阻止能力を、6.5mm Transwellプレートを用いる遊走アッセイにおいて評価した。このアッセイでは、ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞を計数し、 1×10^5 細胞を、様々な濃度(50~0.4µg/mlの範囲)の1価または2価いずれかの4H11 VH5/VL1抗体の存在下で組換えヒトCCL20とインキュベートした。対照抗体として、無関係のヒトIgG抗体を50µg/mlにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Transwellの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【図14】ファージディスプレイライブラリーからのVH5/VL1 scFvバリエーションのオフレート解析。 図14A: CDR-H2ライブラリーから単離したscFv断片。 図14B: CDR-L3ライブラリーから単離したscFv断片。

【図15】CDR-L1 28および29位でのVH5/VL1 FABバリエーションの表

10

20

30

40

50

面プラスモン共鳴測定。この図は、分析物としてF A Bバリエーションを用いて、F c融合したヒトCCR6 N末端ペプチド上で測定したSPRデータを示す。データは、時間(X軸)に対する応答回数(RUと省略する; Y軸)として表す。

【図16】示差走査熱量測定を用いるV H 5 / V L 1 L 1 - G 2 9 A F A Bの熱安定性測定。データは、温度(; X軸)に対する過剰モル熱容量(C p [k c a l / m o l /]と省略する; Y軸)として表す。

【図17】工学改変V H 5 / V L 1 F A B断片の配列の詳細ならびに親和性および機能性試験のために用いた抗体フォーマット。

【図18】SPRにより工学改変V H 5 / V L 1 F A B断片について測定した結合定数。 図18A: ヒトおよびカニクイザルCCR6融合タンパク質に対する結合定数のまとめ。 図18B: 4つの異なる工学改変V H 5 / V L 1 F A B断片の間のオフセットの比較。

【図19】C C L 2 0誘導走化性アッセイにおける親和性成熟2価および1価4 H 1 1 - V H 5 / V L 1候補の阻止能力の試験。この図は、4つの異なる濃度(20、6.67、2.2および0.75 μg/ml)にて試験した様々な親和性成熟V H 5 / V L 1バリエーションを用いる遊走アッセイからの結果を示す。このアッセイでは、下部のチャンバに加えたC C L 2 0に対して応答する、H T S T r a n s w e l l (登録商標) - 96透過性支持体を通しての全長ヒトCCR6をトランスフェクトしたB A F細胞の遊走を、2価I g Gまたは1価F a b親和性成熟V H 5 / V L 1候補のいずれかの存在下で評価した。対照として、非親和性成熟4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 1 m A bを20 μg/mlにて用いた。ヒトI g G 1アイソタイプ対照は、アッセイにおいて20 μg/mlにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、T r a n s w e l lの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本開示は、治療剤または診断試薬の一部として用いるために適切な、CCR6と結合する新規な抗体およびその断片に関する。

【0033】

用語「CCR6」は、本明細書で用いる場合、CCR6のバリエーション、アイソフォームおよび種ホモログを含む。したがって、本開示の抗体は、ヒトCCR6と結合することがあり、ヒト以外の種、例えばマウス、ラットまたはカニクイザルからのCCR6と交差反応することがある。あるいくつかの実施形態では、抗体は、1または複数のヒトCCR6タンパク質に完全に特異的であってよく、種またはその他の型の非ヒト交差反応性を示さないことがある。例示的なヒトCCR6の完全アミノ酸配列は、Swiss-Prot受託番号P51684(CCR6__HUMAN; 配列番号71)を有する。CCR6は、C - C C K R - 6、C C - C K R - 6、C C R - 6、L A R C受容体、G P R - C Y 4、G P R C Y 4、ケモカイン受容体類似体3、C K R - L 3、D R Y 6またはG P C R 2 9としても知られる。CCR6には、最近、C D 1 9 6 (表面抗原分類196)が割り当てられた。ヒトCCR6には、Entrez GeneによりGene ID: 1235、およびHGNCによりHGNC: 1607が割り当てられている。CCR6は、CCR6と表される遺伝子によりコードされ得る。例示的なマウスCCR6の完全アミノ酸配列は、Swiss-Prot受託番号O54689(CCR6__MOUSE; 配列番号72)を有する。マウスCCR6には、Entrez GeneによりGene ID: 12458が割り当てられている。例示的なラットCCR6の完全アミノ酸配列は、Swiss-Prot受託番号Q5BK58(Q5BK58__RAT; 配列番号73)を有する。ラットCCR6には、Entrez GeneによりGene ID: 308163が割り当てられている。例示的なアカゲザルCCR6(macaca mulatta)の完全アミノ酸配列は、Swiss-Prot受託番号Q8HZR7(Q8HZR7__MACMU; 配列番号74)を有する。アカゲザルCCR6には、Entrez GeneによりGene ID: 574335が割り当てられている。Swiss-Protデータベースは、

<http://swissmodel.expasy.org>、Arnold Kら、(2006) *Bioinformatics*、22(2):195~201にて入手可能である。

【0034】

本明細書における「CCR6」の使用は、CCR6、好ましくはヒトCCR6の全ての既知またはまだ見出されていない対立遺伝子および多型を包含する。用語「ヒトCCR6」または「CCR6」は、本明細書において等価に用いられ、そうでないと具体的に示さないならば、「ヒトCCR6」を意味する。

【0035】

用語「CCR6リガンド」または「CCL20」は、本明細書において等価に用いられ、ヒトCCR6に対するリガンドを具体的に含む。CCL20は、CCケモカインファミリーに属する小サイトカインであり、MIP-3、LARCまたはExodusとしても知られる。CCL20は、Swiss-Prot受託番号P78556(CCL20_HUMAN; 配列番号76)を有し、Entrez GeneによりGene ID: 6364が割り当てられている。CCL20は、いくつかの組織で発現され、最高の発現が末梢血リンパ球、リンパ節、肝臓、虫垂および胎生期肺で観察され、より低いレベルが胸腺、精巣、前立腺および腸で観察される。

10

【0036】

用語「CCR6と結合する抗体またはその断片」は、本明細書で用いる場合、850 pM以下、好ましくは700 nM以下、より好ましくは300 nM以下、より好ましくは260 nM以下、さらにより好ましくは250 nM以下の親和性(K_D)でCCR6、例えば単離形のヒトCCR6と結合する抗体またはその断片を含む。

20

【0037】

用語「CCR6と結合する抗体またはその断片」は、抗体またはその抗原結合断片を含む。用語「拮抗性抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、本明細書において等価に用いられ、例えば、CCR6とそのリガンドとの結合を阻止するもしくは結合を実質的に低減し、よって、CCR6により引き起こされるシグナル伝達経路を阻害または低減し、かつ/あるいはB系列成熟、抗原駆動型B細胞分化ならびに/または炎症および免疫応答中の樹状およびT細胞の遊走および動員の調節のようなCCR6媒介性細胞応答を阻害または低減することにより、CCR6の生物学的シグナル伝達活性を阻害および/または中和

30

【0038】

用語「抗体」は、本明細書で言及する場合、抗体全体およびその任意の抗原結合断片または単鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合で相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖と2つの軽(L)鎖とを含む糖タンパク質またはその抗原結合断片のことをいう。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてVHと略記する)と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてVLと略記する)と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLで構成される。VHおよびVL領域は、相補性決定領域(CDR)とよばれる超可変性の領域にさらに細分化でき、CDRは、配列が超可変性であり、かつ/または抗原認識に関与し、かつ/またはより保存されたフレームワーク領域(FRまたはFW)とよばれる領域に散在している、構造が規定されたループを通常形成する。それぞれのVHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置される3つのCDRおよび4つのFWで構成される: FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。FW1、FW2、FW3およびFW4のアミノ酸配列は全て一緒に、本明細書で言及する場合、VHまたはVLの「非CDR領域」または「非拡張CDR領域」を構成する。

40

【0039】

用語「重鎖可変フレームワーク領域」は、本明細書で言及する場合、1または複数(例えば1、2、3および/または4つ)の重鎖フレームワーク領域配列(例えばフレームワ

50

ーク1 (FW1)、フレームワーク2 (FW2)、フレームワーク3 (FW3) および/またはフレームワーク4 (FW4) を含み得る。好ましくは、重鎖可変領域フレームワークは、FW1、FW2 および/またはFW3、より好ましくはFW1、FW2 およびFW3 を含む。用語「軽鎖可変フレームワーク領域」は、本明細書で言及する場合、1または複数(例えば1、2、3 および/または4つ)の軽鎖フレームワーク領域配列(例えばフレームワーク1 (FW1)、フレームワーク2 (FW2)、フレームワーク3 (FW3) および/またはフレームワーク4 (FW4)) を含み得る。好ましくは、軽鎖可変領域フレームワークは、FW1、FW2 および/またはFW3、より好ましくはFW1、FW2 およびFW3 を含む。

【0040】

重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞) および古典的な補体系の第1成分(C1q) を含む宿主組織または因子との結合を媒介できる。

【0041】

抗体は、定常領域により遺伝子的に決定される、アイソタイプともよばれるクラスに群分けされる。ヒト定常軽鎖は、カッパ(C) およびラムダ(C) 軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー(μ)、デルタ(δ)、ガンマ(γ)、アルファ(α) またはイプシロン(ϵ) として分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA およびIgEとして抗体のアイソタイプを定義する。よって、「アイソタイプ」は、本明細書で用いる場合、それらの定常領域の化学的および抗原的特徴により定義される免疫グロブリンのクラスおよび/またはサブクラスのいずれかを意味する。既知のヒト免疫グロブリンアイソタイプは、IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD) およびIgE (IGHE) である。いわゆるヒト免疫グロブリン偽ガンマIGHGP遺伝子は、配列決定されているが、スイッチ領域の変更によりタンパク質をコードしないさらなるヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子を表す(Bensmana Mら、(1988) *Nucleic Acids Res.* 16(7): 3108)。スイッチ領域が変更されているにもかかわらず、ヒト免疫グロブリン偽ガンマIGHGP遺伝子は、全ての重鎖定常ドメイン(CH1~CH3) およびヒンジについてのオープンリーディングフレームを有する。その重鎖定常ドメインについての全てのオープンリーディングフレームは、予測される構造特徴を有する全てのヒト免疫グロブリン定常ドメインと良好に整列されるタンパク質ドメインをコードする。このさらなる偽ガンマアイソタイプは、本明細書において、IgGPまたはIGHGPという。ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインイプシロンP1 およびP2 偽遺伝子(IGHEP1 およびIGHEP2) などの他の偽免疫グロブリン遺伝子が、報告されている。IgGクラスは、治療目的のために最も一般的に用いられている。ヒトにおいて、このクラスは、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3 およびIgG4 を含む。マウスにおいて、このクラスは、サブクラスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c およびIgG3 を含む。

【0042】

用語「マウス抗体」は、本明細書で用いる場合、可変領域配列および定常領域配列がマウスに由来する抗体を含む。

【0043】

用語「キメラ抗体」は、本明細書で用いる場合、可変領域配列がある種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を含む。

【0044】

用語「ヒト化抗体」または「ヒト化抗CCR6抗体」は、本明細書で用いる場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体を含む。さらなるフレームワーク領域改変を、ヒトフレームワーク配列内および別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列内で作製してよい。

10

20

30

40

50

【0045】

用語「Fab」または「Fab領域」は、本明細書で用いる場合、VH、CH1、VLおよびCL免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドを含む。Fabは、単離されたこの領域または全長抗体もしくは抗体断片の関係におけるこの領域のことをいうことがある。

【0046】

用語「Fc」または「Fc領域」は、本明細書で用いる場合、第1定常領域免疫グロブリンドメインを除外した抗体の定常領域を含むポリペプチドを含む。よって、Fcは、IgA、IgDおよびIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメインと、IgEおよびIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメインと、これらのドメインからN末端側にあるフレキシブルヒンジとをいう。IgAおよびIgMについて、Fcは、J鎖を含むことがある。IgGについて、Fcは、免疫グロブリンドメインであるCガンマ2およびCガンマ3(C₂およびC₃)と、Cガンマ1(C₁)とCガンマ2(C₂)との間のヒンジとを含む。Fc領域の境界は変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、残基C226またはP230をそのカルボキシル末端に含むと通常定義される(番号付けはEU番号付けシステムに従う)。ヒトIgG1について、Fc領域は、本明細書において、残基P232をそのカルボキシル末端に含むと定義される(番号付けはEU番号付けシステムに従う)(Edelman GMら、(1969)Proc Natl Acad Sci USA、63(1):78~85)。Fcは、単離されたこの領域またはFcポリペプチド、例えば抗体の関係におけるこの領域のことをいうことがある。

【0047】

用語「ヒンジ」または「ヒンジ領域」または「抗体ヒンジ領域」は、本明細書において、抗体の第1定常ドメインと第2定常ドメインとの間のアミノ酸を含むフレキシブルポリペプチドを含む。「ヒンジ領域」は、本明細書で言及する場合、6~62アミノ酸長で、IgA、IgDおよびIgGのみに存在し、2つの重鎖を橋かけするシステイン残基を包含する配列領域である。構造的には、IgG CH1ドメインは、EU位220にて終了し、IgG CH2ドメインは、EU位237の残基にて開始する。よって、IgGについて、抗体ヒンジは、本明細書において、221位(IgG1におけるD221)~231位(IgG1におけるA231)を含むと定義される(番号付けはEU番号付けシステムに従う)(Edelman GMら、既出)。

【0048】

用語「親抗体」または「親免疫グロブリン」は、本明細書で用いる場合、バリエントを作製するために後で改変される、未改変の抗体を含む。前記親抗体は、自然に存在する抗体、または自然に存在する抗体のバリエントもしくは工学改変バージョンであり得る。親抗体は、抗体自体、親抗体を含む組成物または親抗体をコードするアミノ酸配列のことをいうことがある。「親抗CCR6抗体」は、本明細書で用いる場合、リガンドCCL20と結合し、バリエントを作製するために改変される抗体または免疫グロブリンを意味する。「対応するマウス抗体」は、本明細書で用いる場合、CCR6と結合し、バリエントを作製するために改変できるマウス抗体または免疫グロブリン、具体的には本明細書で開示するマウス抗体4H11を意味する。「対応するキメラ抗体」は、本明細書で用いる場合、CCR6と結合し、バリエントを作製するために改変できるキメラ抗体または免疫グロブリンを意味する。

【0049】

用語「バリエント抗体」または「抗体バリエント」は、本明細書で用いる場合、親と比較して少なくとも1つのアミノ酸改変により親抗体配列のものと異なる抗体配列を含む。バリエント抗体配列は、本明細書において、親抗体配列と好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。抗体バリエントは、抗体自体、抗体バリエントを含む組成物または抗体バリエントをコードするアミノ酸配列のことをいうことがある。

【 0 0 5 0 】

核酸またはその断片に言及する場合の用語「同一性」または「実質的同一性」または「実質的に同一」は、別の核酸（またはその相補鎖）と適当なヌクレオチド挿入または欠失を有して最適に整列させた場合に、以下に論じるように、FASTA、BLASTまたはGAPなどの配列同一性の任意のよく知られているアルゴリズムにより測定される、ヌクレオチド塩基の少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%または99%においてヌクレオチド配列同一性があることを示す。

【 0 0 5 1 】

ポリペプチドに当てはめる場合、用語「実質的類似性」または「実質的に類似」は、2つのペプチド配列が、例えばデフォルトギャップ重みを用いるプログラムGAPまたはBESTFITにより最適に整列させた場合に、少なくとも80%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも90%、95%、98%または99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基の位置は、保存アミノ酸置換により異なる。

【 0 0 5 2 】

用語「アミノ酸改変」は、本明細書において、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入および/または欠失を含む。「アミノ酸置換」または「置換」は、本明細書において、親ポリペプチド配列中の特定の位置での別のアミノ酸へのアミノ酸の置き換えを意味する。例えば、置換R94Kは、バリエーションポリペプチド、この場合、94位のアルギニンがリシンで置き換えられた重鎖可変フレームワーク領域バリエーションのことをいう。前出の例について、94Kは、94位でのリシンへの置換を示す。本明細書における目的のために、複数の置換は、斜線により典型的に分けられる。例えば、R94K/L78Vは、置換R94KおよびL78Vを含む2重バリエーションのことをいう。「アミノ酸挿入」または「挿入」は、本明細書で用いる場合、親ポリペプチド配列中の特定の位置でのアミノ酸の付加を意味する。例えば、挿入-94は、94位での挿入を示す。「アミノ酸欠失」または「欠失」は、本明細書で用いる場合、親ポリペプチド配列中の特定の位置でのアミノ酸の除去を意味する。例えば、R94-は、94位でのアルギニンの欠失を示す。

【 0 0 5 3 】

本明細書で用いる場合、用語「保存改変」または「保存配列改変」は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に著しく影響しないかまたは前記特徴を著しく改変しないアミノ酸改変のことをいうことを意図する。このような保存改変は、アミノ酸置換、挿入および欠失を含む。改変は、本発明の抗体に、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発などの当技術分野において知られる標準的な技術により導入できる。保存アミノ酸置換は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基でアミノ酸残基を置き換えるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。よって、本発明の抗体のCDR領域内またはフレームワーク領域内の1または複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変化した抗体（バリエーション抗体）を、保持された機能について試験できる。

【 0 0 5 4 】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原の領域のことをいう。エピトープは、構造的または機能的に定義できる。機能的エピトープは、一般的に、構造的エピトープの部分集合であり、相互作用の親和性に直接貢献する残基を有する。エピトープは、立体的であってもよく、つまり、非直鎖状アミノ酸で構成されてもよい。あるいくつかの実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基またはスルホニル基などの分子の化

10

20

30

40

50

学的に活性な表面基である決定基を有してもよく、あるいはいくつかの実施形態では、特異的3次元構造特性および/または特異的電荷特性を有してよい。

【0055】

全てのヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインについて、番号付けは、「EU番号付けシステム」に従う(Edelman GMら、(1969) Proc Natl Acad Sci USA、63(1):78~85)。

【0056】

ヒトカッパ免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(IGKC)について、番号付けは、「EU番号付けシステム」に従う(Edelman GMら、既出)。

【0057】

ヒトラムダ免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6およびIGLC7)について、番号付けは、Dariavach Pら、(1987) Proc Natl Acad Sci USA、84(24):9074~8およびFrangione Bら、(1985) Proc Natl Acad Sci USA、82(10):3415~9により記載されるように、「Kabats番号付けシステム」に従う(Kabat EAら、(1991) Sequences of proteins of immunological interest、第5版-US Department of Health and Human Services、NIH出版第91-3242号)。

【0058】

用語「可変ドメイン」は、抗原結合を媒介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義するドメインのことをいう。自然に存在する抗体では、抗原結合部位は、特異性を定義する2つの可変ドメイン(一方は重鎖(VH)中にあり、他方は軽鎖(VL)中にある)からなる。いくつかの場合では、特異性は、ラクダにおいて見出される重鎖抗体からの単一ドメイン抗体のように、2つのドメインの一方のみにもっぱら帰することがある。V領域は、通常、約110アミノ酸長であり、9~12アミノ酸長の「超可変領域」とよばれる非常に可変性のより短い領域で分けられた、15~30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)とよばれる比較的不变のアミノ酸配列の連続からなる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、ループを形成する3つの超可変領域により接続されたベータシート構造を一般的に採用する4つのFRを含む。各鎖中の超可変領域は、FRにより接近して一緒にされ、他の鎖からの超可変領域と一緒に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat EAら、既出を参照されたい)。用語「超可変領域」は、本明細書で用いる場合、抗原結合を担う、抗体のアミノ酸残基のことをいう。超可変領域は、配列可変性が最高であり、かつ/または抗原認識に関与する「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基を一般的に含む。全ての可変ドメインについて、番号付けは、Kabatsに従う(Kabat EAら、既出)。

【0059】

いくつかのCDR定義を本明細書において用い、包含する。Kabats定義は、配列可変性に基づき、最も一般的に用いられる(Kabat EAら、既出)。Chothiaは、代わりに、構造ループの場所に言及する(Chothia CおよびLesk AM(1987) J. Mol. Biol. 196:901~917)。AbM定義は、KabatsとChothia定義との間の折衷案であり、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより用いられている(Martin ACRら、(1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA、86:9268~72; Martin ACRら、(1991) Methods Enzymol. 203:121~153; Pedersen JTら、(1992) Immunomethods、1:126~136; Sternberg M. J. E. (編)、Protein Structure Prediction. Oxford University Press、Oxford、141~172中のRees ARら、(1996))。接触による定義は最近導入され(MacCallum RMら、(1996) J. Mol. Biol.

10

20

30

40

50

262:732~745)、Protein Databankにおいて入手可能な、入手可能な複合体構造の分析に基づく。IMGT(登録商標)、すなわちthe international Immunogenetics information system(登録商標)(<http://www.imgt.org>)によるCDRの定義は、全ての免疫グロブリンおよび全ての種のT細胞受容体V領域についてIMGT番号付けに基づく(IMGT(登録商標)、the international Immunogenetics information system(登録商標); Lefranc MPら、(1991)Nucleic Acids Res. 27(1):209~12; Ruiz Mら、(2000)Nucleic Acids Res. 28(1):219~21; Lefranc MP(2001)Nucleic Acids Res. 29(1):207~9; Lefranc MP(2003)Nucleic Acids Res. 31(1):307~10; Lefranc MPら、(2005)Dev. Comp. Immunol. 29(3):185~203; Kaas Qら、(2007)Briefings in Functional Genomics & Proteomics、6(4):253~64)。

10

【0060】

本発明において論じる全ての相補性決定領域(CDR)は、好ましくはIMGT(登録商標)に従って定義される。これらのCDRのそれぞれについての可変ドメイン残基は、以下のとおりである(番号付けは、Kabata EAら、既出に従う):LCDR1:27~32、LCDR2:50~52、LCDR3:89~97、HCDR1:26~35、HCDR2:51~57およびHCDR3:93~102。VL領域の「非CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列:1~26(FR1)、33~49(FR2)、53~88(FR3)および98~およそ107(FR4)を含む。VH領域の「非CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列:1~25(FR1)、36~50(FR2)、58~92(FR3)および103~およそ113(FR4)を含む。

20

【0061】

本発明のCDRは、上記の定義に基づき、以下の可変ドメイン残基を有する「拡張CDR」を含むことがある:LCDR1:24~36、LCDR2:46~56、LCDR3:89~97、HCDR1:26~36、HCDR2:47~65、HCDR3:93~102。これらの拡張CDRも、Kabataら、既出に従って番号付けされる。VL領域の「非拡張CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列:1~23(FR1)、37~45(FR2)、57~88(FR3)および98~およそ107(FR4)を含む。VH領域の「非拡張CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列:1~25(FR1)、37~46(FR2)、66~92(FR3)および103~およそ113(FR4)を含む。

30

【0062】

用語「全長抗体」は、本明細書で用いる場合、可変および定常領域を含む抗体の自然の生物学的な形を構成する構造を含む。例えば、ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳動物では、IgGクラスの全長抗体は、4量体であり、2つの免疫グロブリン鎖の2つの同一の対からなり、各対は、1つの軽鎖および1つの重鎖を有し、各軽鎖は、免疫グロブリンドメインVLおよびCLを含み、各重鎖は、免疫グロブリンドメインVH、CH1(C1)、CH2(C2)およびCH3(C3)を含む。いくつかの哺乳動物、例えばラクダおよびラマでは、IgG抗体は、2つの重鎖のみからなることがあり、各重鎖は、Fc領域に付いた可変ドメインを含む。

40

【0063】

抗体断片は、それらに限定されないが、(i)Fab'およびFab'-SHを含む、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなるFab断片、(ii)VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iii)単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFv断片;(iv)単一可変領域からなるdAb断片(Ward ESら、(1989)Nature、341:544~546)、(v)2つの連結されたFab断片を含む2価断

50

片であるF(ab')₂断片、(vi)VHドメインとVLドメインとが、2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成できるようにするペプチドリナーで連結された単鎖Fv分子(scFv)(Bird REら、(1988)Science 242:423~426; Huston JSら、(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:5879~83)、(vii)2重特異性単鎖Fv2量体(PCT/US92/09965)、(viii)遺伝子融合により構築された多価または多重特異性断片である「ダイアボディ」または「トリアボディ」(Tomlinson IおよびHollinger P(2000)Methods Enzymol. 326:461~79; WO94/13804; Hollinger Pら、(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~48)および(ix)同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合されたscFv(Coloma MJおよびMorrisson SL(1997)Nature Biotechnology、15(2):159~163)を含む。

10

【0064】

用語「エフェクター機能」は、本明細書で用いる場合、抗体Fc領域とFc受容体またはリガンドとの相互作用に起因する生化学的事象を含む。エフェクター機能は、ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用)およびADCP(抗体依存性細胞媒介性食作用)などのFcR媒介性エフェクター機能、ならびにCDC(補体依存性細胞傷害作用)などの補体媒介性エフェクター機能を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc受容体または補体成分などのエフェクター分子についての抗体の親和性を変更、すなわち増進または低減、好ましくは増進することにより変更できる。エフェクター機能は、1または複数の細胞ベースまたはin vivoアッセイを用いて決定できる。このようなアッセイは、抗体に対する細胞の応答、例えば細胞生存、細胞死、細胞形態の変化または天然遺伝子もしくはレポーター遺伝子の細胞発現などの転写活性化をモニタリングすることを頻繁に含む。例えば、このようなアッセイは、ADCC、ADCPまたはCDCを誘発する抗体の能力を測定してよい。いくつかのアッセイについて、標的細胞に加えて追加の細胞または構成要素、例えば血清補体または末梢血単球(PBMC)、NK細胞、マクロファージなどのようなエフェクター細胞を加えることが必要になることがある。エフェクター機能の増強は、変更された抗体のエフェクター機能を対照抗体と比較し、例えば、1または複数の上記のアッセイにより測定されるADCC、ADCPまたはCDCの増加を検出することにより決定できる。

20

30

【0065】

結合親和性は、エフェクター分子結合部位を改変することにより一般的に変動され、この場合、対象の部位を置き、前記部位の少なくとも一部を適切な方法で改変することが適当である。エフェクター分子についての抗体の結合部位における変更は、全体的な結合親和性を著しく変更する必要はないが、相互作用の幾何学的配置を変更して、非生産的結合におけるようにエフェクター機序を無効にすることも構想される。エフェクター分子結合に直接関与しないがエフェクター機能の性能に関与する部位を改変することにより、エフェクター機能を変更することもさらに構想される。抗体のエフェクター機能を変更することにより、免疫応答の様々な態様を制御すること、例えば免疫系の様々な反応を増進または抑制することが可能になり、診断および治療において有益な効果を有する可能性がある。

40

【0066】

本明細書で用いる場合、用語「CCR6媒介性障害」は、なかでも関節リウマチ、多発性硬化症(MS)、乾癬、移植片対宿主病(GVHD)、ループス、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、視神経炎、加齢黄斑変性、SLE、シェーグレン症候群、強皮症、全身性強皮症、慢性腎臓疾患、肝線維症、結核、特発性肺線維症、結核誘発性肺線維症、後腹膜線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、心内膜心筋線維症、心房性線維症、縦隔線維症、骨髄線維症(骨髄)、後腹膜線維症、進行性塊状線維症、腎原性全身性線維症、関節線維症、炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病)、アテローム動脈硬化症、移植片拒

50

絶、中枢神経系損傷、乾癬、白血病またはリンパ腫（例えば慢性リンパ球性白血病（CLL））、アテローム動脈硬化症ならびに肺および結腸癌を含むがんならびに炎症性疾患および/または自己免疫疾患のような状態を含む。

【0067】

本明細書で用いる場合、用語「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。好ましくは、対象はヒトである。

【0068】

抗CCR6抗体

第1の態様では、本発明は、配列番号31のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および/または配列番号32、配列番号190、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号254または配列番号255のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および/または配列番号33のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに/あるいは配列番号34、配列番号191、配列番号244、配列番号245、配列番号246または配列番号256のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および/または配列番号35、配列番号247、配列番号248または配列番号257のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号36または配列番号192または配列番号193のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。

【0069】

本発明の第1の態様に従って、配列番号31のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号241のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および配列番号33のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに/あるいは配列番号245のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号248のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および配列番号192または配列番号193のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片が提供される。

【0070】

本発明のこの態様に従って、本発明は、本開示の様々な態様において詳細に説明する重鎖および軽鎖CDRを含む抗CCR6抗体にも関する。

【0071】

好ましくは、抗体またはその断片は、ヒトCCR6と結合し、マウスまたはラットまたはカニクイザルCCR6と交差反応性である。

【0072】

CDR1および/またはCDR2ドメイン（複数可）とは独立してCDR3ドメイン単独で同族抗原についての抗体の結合特異性を決定できること、および同じ結合特異性を有する複数の抗体を、共通のCDR3配列に基づいて予想通りに作製できることが当技術分野においてよく知られている。例えばKlimka Aら、(2000) Br. J. Cancer、83(2):252~260（マウス抗CD30抗体Ki-4の重鎖可変ドメインCDR3のみを用いるヒト化抗CD30抗体の生成について記載している）；Beiboer SHら、(2000) J. Mol. Biol. 296:833~849（親マウスMOC-31抗EGP-2抗体の重鎖CDR3配列のみを用いる組換え上皮糖タンパク質-2（EGP-2）抗体について記載している）；Rader Cら、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:8910~8915（マウス抗インテグリン α 3抗体LM609の重鎖および軽鎖可変CDR3ドメインを用いる一連のヒト化抗インテグリン α 3抗体であって、それぞれのメンバー抗体が、CDR3ドメインの外側に異なる配列を含み、親マウス抗体と同じエピトープに、親マウス抗体と同等以上の親和性で結合できる抗体について記載している）；Barbas Cら、(1994) J. Am. Chem. Soc. 116:2161~62（CDR3ドメインが抗原結合に最も著しく寄与することを開示する）を参照されたい。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

したがって、本発明は、1または複数の重鎖および/または軽鎖 C D R 3 ドメインを含む、特に配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 および/または配列番号 3 6、1 9 2 または 1 9 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む、C C R 6 と結合する抗体およびその断片であって、抗体が C C R 6 と結合できる、抗体およびその断片を提供する。いくつかの実施形態では、非ヒト抗体からの1または複数の重鎖および/または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むこのような発明の抗体は、対応する親非ヒト抗体、例えばマウス抗体と (a) 結合について競合でき、(b) 前記抗体の機能的特徴を保持し、(c) 前記抗体と同じエピトープと結合し、かつ/または (d) 前記抗体と同様の結合親和性を有する。

10

【 0 0 7 4 】

さらなる態様では、本発明は、配列番号 7、3 7、3 9、4 0、4 1、4 2、7 5、1 7 7、1 7 8、1 7 9 および 2 4 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む C C R 6 と結合する抗体またはその断片を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 8、3 8、4 3、4 4、4 5、4 6、1 8 1、1 8 2、2 5 0、2 5 1、2 5 2 または 2 5 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、C C R 6 と結合する抗体またはその断片を提供する。いくつかの実施形態では、C C R 6 と結合する抗体またはその断片は、配列番号 3 7 または 2 4 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列と、配列番号 3 8 または 2 5 0、2 5 1、2 5 2 または 2 5 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列とを含む。好ましくは、抗体またはその断片は、ヒト C C R 6 と結合し、カニクイザル C C R 6 と交差反応性である。

20

【 0 0 7 5 】

別の態様では、本発明は、C C R 6 と結合する抗体またはその断片のバリエーションを提供する。よって、本発明は、重鎖または軽鎖のいずれかの親抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域配列の、例えばそれぞれ配列番号 7、3 7、3 9、4 0、4 1、4 2、7 5、1 7 7、1 7 8、1 7 9、2 4 9 または配列番号 8、3 8、4 3、4 4、4 5、4 6、1 8 1、1 8 2、2 5 0、2 5 1、2 5 2 または 2 5 3 におけるような重鎖および軽鎖可変領域配列のいずれかの、非 C D R 領域のアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 % 同一である (少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有する) 重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非 C D R 領域のアミノ酸配列を有する、抗体またはその断片を提供する。重鎖または軽鎖のいずれかの親抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非拡張 C D R 領域のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一である重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非拡張 C D R 領域のアミノ酸配列を有する抗体またはその断片も、本発明により提供される。重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非 C D R 領域または非拡張 C D R 領域のアミノ酸配列同一性は、好ましくは少なくとも 8 5 %、より好ましくは少なくとも 9 0 %、最も好ましくは少なくとも 9 5 %、特に 9 6 %、より特には 9 7 %、さらにより特には 9 8 %、最も特には 9 9 % であり、例えば 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % および 1 0 0 % を含む。アミノ酸配列に関する同一性または相同性は、本明細書において、配列を整列させ、必要であればギャップを導入して最大限のパーセント配列同一性を達成した後の、C C R 6 と結合する抗体またはその断片と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。よって、配列同一性は、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置の類似性を比較するために一般的に用いられる標準的な方法により決定できる。B L A S T または F A S T A などのコンピュータプログラムを用いて、2つのポリペプチドを、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な一致のために整列させる (一方もしくは両方の配列の全長にわたって、または一方もしくは両方の配列の予め決定された部分にわたって)。これらのプログラムは、デフォルトのオープニングペナルティおよびデフォルトのギャップペナルティを提供し、P A M 2 5 0 (標準的スコア行列 ; A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e、第 5 巻、補遺 3 号中の D a y h o f f M O ら、(1 9 7 8) を参照されたい) など

30

40

50

のスコア行列をコンピュータプログラムとともに用いることができる。例えば、パーセント同一性は、同一の一致の総数に100を乗じ、一致したひと続き内の長いほうの配列の長さ、2つの配列を整列させるために長いほうの配列に導入したギャップの数との和で除することにより算出できる。

【0076】

いくつかの実施形態では、本開示は、よって、配列番号77、78、79、80、81のフレームワーク領域配列と少なくとも65%同一である重鎖可変フレームワーク領域配列ならびに/または配列番号82、83、84、85、86のフレームワーク領域配列と少なくとも75%同一である軽鎖可変フレームワーク領域配列を含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号80の

10

【0077】

別の態様では、本発明は、上記の重鎖および軽鎖CDRを含み、IGHV3-11^{*}04(配列番号77)、IGHV3-11^{*}01(配列番号78)、IGHV3-48^{*}03(配列番号79)、IGHV3-23^{*}04(配列番号80)およびIGHV3-66^{*}04(配列番号81)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子IGHV3-23^{*}04(配列番号80)の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域をさらに含む、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。重鎖可変フレームワーク領域は、これらのヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する1または複数(例えば1、2、3および/または4つ)の重鎖フレームワーク領域配列(例えばフレームワーク1(FW1)、フレームワーク2(FW2)、フレームワーク3(FW3)および/またはフレームワーク4(FW4))を含むことがある。好ましくは、重鎖可変領域フレームワークは、IGHV3-11^{*}04(配列番号77)、IGHV3-11^{*}01(配列番号78)、IGHV3-48^{*}03(配列番号79)、IGHV3-23^{*}04(配列番号80)およびIGHV3-66^{*}04(配列番号81)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来するFW1、FW2および/またはFW3、より好ましくはFW1、FW2およびFW3を含む。重鎖フレームワーク領域配列は、本明細書で用いる場合、FW1(1位~25位)、FW2(36位~49位)、FW3(66位~94位)およびFW4(103位~113位)(ここで、アミノ酸の位置は、Kabatに規定されている番号付けシステムを利用して示されている)を含む。

20

30

【0078】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号10、173、175、183、184、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、221、224、227、230、233および235のアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む抗体またはその断片であって、その重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

40

【0079】

好ましくは、アミノ酸改変は、24位、49位および62位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含む(ここで、各群メンバーのアミノ酸位置は、Kabat番号付けに従って示されている)。

【0080】

別の態様では、本発明は、IGKV2-30^{*}02(配列番号82)、IGKV2-30^{*}01(配列番号83)、IGKV2D-30^{*}01(配列番号84)、IGKV2-29^{*}02(配列番号85)、IGKV2-29^{*}03(配列番号86)からなる群より選択

50

されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 8 2) の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、C C R 6 と結合する抗体またはその断片を提供する。軽鎖可変領域フレームワーク領域は、これらのヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する 1 または複数 (例えば 1、2、3 および / または 4 つ) の軽鎖フレームワーク領域配列 (例えばフレームワーク 1 (F W 1)、フレームワーク 2 (F W 2)、フレームワーク 3 (F W 3) および / またはフレームワーク 4 (F W 4)) を含むことがある。好ましくは、軽鎖可変領域フレームワークは、I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 8 2)、I G K V 2 - 3 0 * 0 1 (配列番号 8 3)、I G K V 2 D - 3 0 * 0 1 (配列番号 8 4)、I G K V 2 - 2 9 * 0 2 (配列番号 8 5)、I G K V 2 - 2 9 * 0 3 (配列番号 8 6) からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する F W 1、F W 2 および / または F W 3、より好ましくは F W 1、F W 2 および F W 3 を含む。軽鎖フレームワーク領域配列は、本明細書で用いる場合、F W 1 (1 位 ~ 2 3 位)、F W 2 (3 5 位 ~ 4 9 位)、F W 3 (5 7 位 ~ 8 8 位) および F W 4 (9 8 位 ~ 1 0 8 位) (ここで、アミノ酸の位置は、K a b a t に規定されている番号付けシステムを利用して示されている) を含む。

10

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 8 2) の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む抗体またはその断片であって、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも 1 つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

20

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号 3 0、1 7 6、1 8 6、1 8 7、1 9 5、1 9 7、1 9 9、2 0 1、2 0 3、2 0 5、2 0 7、2 0 9、2 1 1、2 1 3、2 1 5、2 1 7、2 1 9、2 2 2、2 2 5、2 2 8、2 3 1 および 2 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む抗体またはその断片を提供する。あるいはその代わりに、軽鎖配列の軽鎖可変フレームワーク領域は、対応するマウス抗体の対応する軽鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも 1 つのアミノ酸改変を含む。

【 0 0 8 3 】

アミノ酸改変は、3 6 位および 4 6 位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含んでよい (ここで、各群メンバーのアミノ酸位置は、K a b a t 番号付けに従って示されている)。

30

【 0 0 8 4 】

特に好ましくは、いずれのアミノ酸改変も有さない配列番号 3 0、2 1 1 または 2 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列である。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、C C R 6 と結合する抗体またはその断片は、I G H V 3 - 1 1 * 0 4 (配列番号 7 7)、I G H V 3 - 1 1 * 0 1 (配列番号 7 8)、I G H V 3 - 4 8 * 0 3 (配列番号 7 9)、I G H V 3 - 2 3 * 0 4 (配列番号 8 0) および I G H V 3 - 6 6 * 0 4 (配列番号 8 1) からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域と、I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 8 2)、I G K V 2 - 3 0 * 0 1 (配列番号 8 3)、I G K V 2 D - 3 0 * 0 1 (配列番号 8 4)、I G K V 2 - 2 9 * 0 2 (配列番号 8 5)、I G K V 2 - 2 9 * 0 3 (配列番号 8 6) からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子 I G H V 3 - 2 3 * 0 4 (配列番号 8 0) の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域と、ヒト遺伝子 I G K V 2 - 3 0 * 0 2 (配列番号 8 2) の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域とを含む。上記の異なるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域、および / または上記の異なる

40

50

ヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変領域フレームワーク領域の組み合わせも、本発明に包含される。

【0086】

ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース (www.mrccep.cam.ac.uk/vbaseにてインターネットで利用可能)、ならびにKabata EAら、既出; Tomlinson IMら、(1992) *J. Mol. Biol.* 227: 776~798およびCox JPLら、(1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 827~836で見出すことができる。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖系列DNA配列は、Genbankデータベースで見出すことができる。

10

【0087】

別の態様では、本開示は、CCR6と結合する抗体またはその断片であって、重鎖CDRの少なくとも1つおよび/または軽鎖CDRの少なくとも1つが少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発を行って、改変(複数可)を導入でき、抗体結合またはその他の対象の機能的特性に対する影響を、*in vitro*または*in vivo*アッセイにおいて評価できる。好ましくは、保存改変を導入する。改変(複数可)は、アミノ酸置換、付加または欠失であり得るが、好ましくは置換である。典型的に、5以下、好ましくは4以下、より好ましくは3以下、さらにより好ましくは2以下、最も好ましくは1以下のアミノ酸改変をCDR領域内で行う。

20

【0088】

あるいくつかの実施形態では、フレームワーク配列を用いて可変領域を工学改変して、バリエーション抗体を生成できる。本発明のバリエーション抗体は、VHおよび/またはVK内のフレームワーク残基に対して改変を行って、例えば抗体の特性を改良するものを含む。典型的に、このようなフレームワーク改変を行って、抗体の免疫原性を低減する。例えば、あるアプローチは、1もしくは複数のフレームワーク残基を対応するマウス配列に「逆変異」させるか、または1もしくは複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「逆変異」させることである。本発明の文脈において、用語逆変異は、これらの操作のいずれかを意味するように交換可能に用いられ、より一般的には、免疫原性のようなその特性を変更するような抗体のアミノ酸配列における1または複数の残基の連続的な改変のことをいう。

30

【0089】

よって、さらなる態様では、本開示は、CCR6と結合する抗体またはその断片であって、抗体またはその断片の重鎖可変領域のフレームワーク領域配列の少なくとも1つが、対応するマウス抗体の重鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。好ましくは、アミノ酸改変は、アミノ酸置換である。典型的に、7以下、好ましくは6以下、好ましくは5以下、好ましくは4以下、より好ましくは3以下、さらにより好ましくは2以下、最も好ましくは1以下のアミノ酸改変をフレームワーク領域内で行う。

【0090】

本開示は、また、CCR6と結合する抗体またはその断片であって、抗体またはその断片の軽鎖可変領域のフレームワーク領域配列の少なくとも1つが、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含み得る、抗体およびその断片を提供する。好ましくは、アミノ酸改変は、アミノ酸置換である。典型的に、2以下、より好ましくは1以下および最も好ましくは0のアミノ酸改変をフレームワーク領域内で行う。

40

【0091】

これらの重鎖および軽鎖可変領域配列のそれぞれがCCR6と結合できることに鑑みて、重鎖および軽鎖可変領域配列を「様々に組み合わせる」[mixed and matched]、本発明の抗CCR6結合分子を創出できる。このような「様々に組み合わせる」抗体のCCR

50

6 結合は、例えば実施例に記載する結合アッセイを用いて試験できる。

【0092】

本開示の一実施形態では、抗体またはその断片はヒト化抗体である。好ましくは、抗体またはその断片は、ヒト化モノクローナル抗体である。

【0093】

本開示は、CCR6と結合する1価抗体またはその断片、すなわち単一抗原結合腕からなる抗体も提供する。本開示は、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、2重特異性単鎖Fv₂量体、ダイアボディ、トリアボディおよび同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合したscFvからなる群より選択される、CCR6と結合する抗体の断片も提供する。好ましい断片は、scFv、2重特異性単鎖Fv₂量体およびダイアボディである。本開示は、CCR6と結合する全長抗体も提供する。

10

【0094】

本開示は、重鎖および/または軽鎖定常領域、特にヒト重鎖および/またはヒト軽鎖定常領域をさらに含む、CCR6と結合する抗体またはその断片も提供する。ヒト重鎖定常領域は、IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD)またはIgE (IGHE)からなるヒト免疫グロブリンの群より選択でき、ヒト重鎖定常領域IgG、特にIgG1 (IGHG1)が好ましい。ヒト軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域からなるヒト免疫グロブリンの群より選択でき、ヒトカッパ定常領域が好ましい。好ましい実施形態では、CCR6と結合する抗体またはその断片は、ヒトIgG1 (IGHG1)重鎖定常ドメインとヒト軽鎖カッパ定常ドメインを含む。

20

【0095】

フレームワーク領域またはCDR領域内に作製する改変に加えてまたは前記改変の代わりに、本発明の抗体を、Fc領域内に改変を含むように工学的に改変して、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合および/または抗原依存性細胞傷害作用のような抗体の1または複数の機能特性を典型的に変更してよい。さらに、本発明の抗体を化学的に改変(例えば1または複数の化学的部分を抗体に付けることができる)またはそのグリコシル化を変更するように改変してよい。これらの実施形態のそれぞれは、以下にさらに詳細に記載する。以下に概説するFc領域内の改変は、Fc領域中の残基のEU番号付けに従う。一実施形態では、CH1のヒンジ領域を、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変更、例えば増加または減少されるように改変する。このアプローチは、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変更して、例えば軽鎖と重鎖の集合を容易にするか、または抗体の安定性を増加もしくは減少させる。別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、抗体のブドウ球菌プロテインA(SpA)結合が天然のFc-ヒンジドメインSpA結合と比べて損なわれるようにFc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域中に1または複数のアミノ酸変異を導入する。このアプローチは、Wardらによる米国特許第6,165,745号にさらに詳細に記載されている。別の実施形態では、抗体を改変して、その生物学的半減期を増加させる。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardへの米国特許第6,277,375号に記載されるように、以下の変異の1または複数を導入できる:T252L、T254S、T256F。代わりに、生物学的半減期を増加させるために、Prestarらによる米国特許第5,869,046号および第6,121,022号に記載されるように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得たサルベージ受容体結合エピートープを含有するようにCH1またはCL領域内で抗体を変更できる。さらなる実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えて、抗体のエフェクター機能(複数可)を変更することによりFc領域を変更する。例えば、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変更されるが、親抗体の抗原結合能力を抗体が保持するように、

30

40

50

アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 および 322 から選択される 1 または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性が変更されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc 受容体または補体の C1 成分であり得る。このアプローチは、ともに Winter らによる米国特許第 5,624,821 号および第 5,648,260 号にさらに詳細に記載されている。別の例では、抗体の C1q 結合が変更され、かつ/または補体依存性細胞傷害作用 (CDC) が低減もしくは廃止されるようにアミノ酸残基 329、331 および 322 から選択される 1 または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。このアプローチは、Idusogie らによる米国特許第 6,194,551 号にさらに詳細に記載されている。別の例では、CH2 ドメインの N 末端領域中の 231 位 ~ 238 位のアミノ酸内の 1 または複数のアミノ酸残基を変更し、そのことにより、補体と結合する抗体の能力を変更する。このアプローチは、Bodmer らによる PCT パンフレット WO 1994/29351 にさらに記載されている。なお別の例では、以下の位置での 1 もしくは複数のアミノ酸を改変することにより Fc 領域を改変して、抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC) を媒介する抗体の能力を増加させ、かつ/または Fc 受容体に対する抗体の親和性を増加させる：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 または 439。このアプローチは、Presta による PCT パンフレット WO 2000/42072 にさらに記載されている。

10

20

【0096】

本開示は、ヒト重鎖および/または軽鎖定常領域を含む CCR6 と結合する抗体またはその断片であって、ヒト重鎖定常領域が、ヒト IgG4 (IGHG4) からの CH1 領域、ヒンジ領域、CH2 領域および CH3 領域を含むアイソタイプバリエーションを含み、ヒンジ領域が、228 位のセリンからプロリンへの置換を含む、抗体またはその断片も提供する。好ましくは、アイソタイプバリエーションを含む抗体は、全長抗体である。ヒト IgG4 (IGHG4) からの CH1 と、S228P 置換を有するヒト IgG4 (IGHG4) からのヒンジと、ヒト IgG4 (IGHG4) からの CH2 および CH3 とを含むアイソタイプバリエーションを含む、CCR6 と結合する特に好ましい抗体またはその断片。アイソタイプバリエーションは、ヒト IgG1 (IGHG1) (これは、通常、天然のヒト IgG1 である) からのヒト重鎖定常領域を含む、CCR6 と結合する抗体またはその断片と比較して、すなわち改変された重鎖定常領域に関してアイソタイプバリエーションから異なるだけである、CCR6 と結合する抗体またはその断片と比較して、ADCC のような Fc 媒介性細胞傷害作用機序を示さないことが見出されている。

30

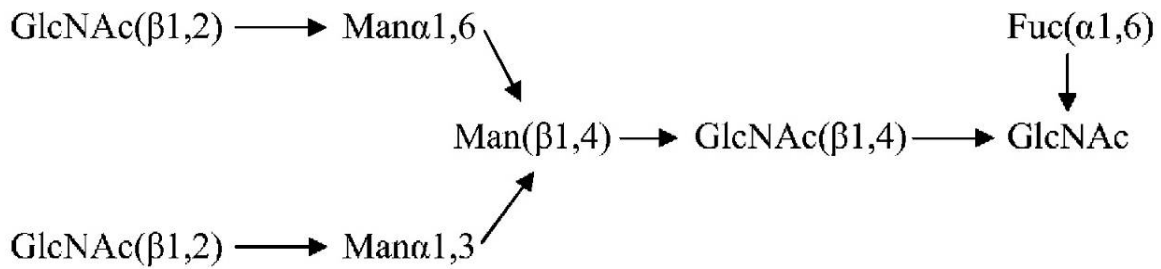
【0097】

本開示は、ヒト IgG Fc 領域を含む CCR6 と結合する抗体またはその断片であって、ヒト IgG Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造がフコスを欠く (本明細書において、代わりに「非フコシル化」という)、抗体またはその断片も提供する。用語「成熟コア炭水化物構造」は、本明細書で用いる場合、以下に模式的に示す二分岐オリゴ糖に典型的な炭水化物構造 GlcNAc (フコス) - GlcNAc - Man - (Man - GlcNAc)₂ から全般的になる Fc 領域に付いた加工コア炭水化物構造を含む：

40

【0098】

【化1】



10

【0099】

この用語は、1, 2 GlcNAc 残基を欠くコア成熟炭水化物構造の G-1 形を含む。しかし、好ましくは、コア炭水化物構造は、両方の 1, 2 GlcNAc 残基を含む。本明細書における成熟コア炭水化物構造は、一般的に、過剰マンノース化されていない。成熟コア炭水化物構造を、糖タンパク質の Fc 領域に、通常は Fc 領域の CH2 ドメインの Asn297 への N 結合を介して付ける。

【0100】

本発明の一実施形態では、抗体は、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域を含み、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造は、フコースを欠く。より好ましくは、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造がフコースを欠く、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域を含む全長抗体である。WO03/035835 から、ヒト IgG Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造中のフコースの欠如は、ADCC を増進し得ることが知られている。よって、さらなる実施形態では、本開示の抗体またはその断片は、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域を含み、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造は、フコースを欠き、フコースを欠く抗体は、フコースを欠かない親抗体またはその断片と比較して、ADCC の増進を示す。フコースを欠く抗体を作製する方法は、例えば (a) 細胞内で発現されるタンパク質をフコース化する能力が低減される (またはフコース化できない) ようにフコース代謝が欠損している工学改変または変異宿主細胞の使用; (b) フコース化を防止もしくは低減する条件下での細胞の培養; (c) フコースの翻訳後除去 (例えばフコシダーゼ酵素を用いて); (d) 例えば非グリコシル化糖タンパク質の組換え発現後の所望の炭水化物の翻訳後付加; または (e) フコース化されていない産物を選択するような糖タンパク質の精製である。好ましく用いられるものは、WO2010/095031 の実施例 14 に記載される方法、例えば Longmore ら、(1982) Carbohydr. Res. 365~92 または Imai-Nishiyama、(2007)、BMC Biotechnol. 7: 84 に記載される方法である。

20

30

【0101】

本発明は、配列番号 7、37、39、40、41、42、75、177、178、179、249 のアミノ酸配列を含む重鎖可変配列および配列番号 8、38、43、44、45、46、181、182、250、251、252 または 253 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変配列を含む抗体と同じエピトープと結合する、CCR6 と結合する抗体またはその断片も提供する。CCR6 ポリペプチドのこの特定の領域またはエピトープは、本発明が提供する抗体のいずれか 1 つと組み合わせ、当技術分野において知られる任意の適切なエピトープマッピング方法により同定できる。このような方法の例は、CCR6 に由来する様々な長さのペプチドを、本発明の抗体との結合について、抗体により認識されるエピトープの配列を含有する抗体と特異的に結合できる最小の断片を用いてスクリーニングすることを含む。CCR6 ペプチドは、合成により、または CCR6 ポリペプチドのタンパク質分解消化により生成できる。抗体と結合するペプチドは、例えば質量分析により同定できる。別の例では、NMR 分光法または X 線結晶学を用いて、本発明の抗体と結合す

40

50

るエピトープを同定できる。一端同定されると、本発明の抗体と結合するエピトープ断片を、所望により、免疫原として用いて、同じエピトープと結合するさらなる抗体を得ることができる。

【0102】

抗CCR6抗体特性

例えばELISA、BIAcore（登録商標）、ウェスタンブロット、RIAおよびフローサイトメトリー分析を含む、例えばCCR6に対する抗体の結合能力を評価するための標準的なアッセイは、当技術分野において知られている。適切なアッセイは、実施例に詳細に記載する。抗体の結合動態（例えばKDのような結合親和性）も、スキッチャードまたはBIAcore（登録商標）システム分析によるなどの当技術分野において知られる標準的なアッセイにより評価できる。相対的結合親和性 K_i は、当技術分野において知られる標準的な競合アッセイにより評価できる。

10

【0103】

さらなる態様では、本発明は、ELISAまたはBIAcore（登録商標）法により視覚化されるように、ヒト、マウス、ラットおよびカニクイザルCCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。結合ELISAを、実施例3に従って行って測定できる。

【0104】

さらなる態様では、本発明は、組換えまたは自然に生成されるヒトCCR6と結合し、CD4⁺ Tリンパ球による活性化およびサイトカイン分泌を防止する抗体またはその断片を提供する。

20

【0105】

さらなる態様では、本発明は、実施例5に詳細に記載するように、分析物として用いるヒト可溶性CCR6ポリペプチド（配列番号101によりコードされる）を有するプロテインA結合CM5研究グレードセンサチップ（GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland; BR-1000-14）上に抗体を捕捉することにより、BIAcore（登録商標）装置（GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland）で表面プラズモン共鳴（SPR）により測定される、850 pM以下、好ましくは700 nM以下、より好ましくは300 nM以下、より好ましくは260 nM以下、さらにより好ましくは250 nM以下の親和性（ K_D ）でCCR6、特に単離形のCCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。好ましい態様では、本発明は、対応するキメラ抗体のCCR6結合親和性（ K_D ）の少なくとも85%を保持するヒト化抗体またはその断片を提供する。好ましくは、ヒト化抗体またはその断片は、対応するキメラ抗体のCCR6結合親和性（ K_D ）の少なくとも90%、より好ましくは対応するキメラ抗体の結合親和性（ K_D ）の少なくとも95%を保持する。好ましくは、ヒト化抗体またはその断片は、対応するキメラ抗体と等価な親和性でヒトCCR6と結合する。「等価な親和性」は、対応するキメラ抗体のCCR6結合親和性の $\pm 10\%$ の範囲内である親和性の値を意味する。より好ましくは、本発明は、対応するキメラ抗体より高い親和性でヒトCCR6と結合するヒト化抗体またはその断片を提供する。好ましくは、ヒト化抗体またはその断片は、対応するキメラ抗体より2倍高い親和性、より好ましくは対応するキメラ抗体より3倍高い親和性でヒトCCR6と結合する。本発明の好ましい態様では、実施例7に詳細に記載するように、分析物として用いるヒト可溶性CCR6ポリペプチド（配列番号101によりコードされる）を有するプロテインA結合CM5研究グレードセンサチップ（GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland; BR-1000-14）上に抗体を捕捉することにより、BIAcore（登録商標）装置（GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland）で表面プラズモン共鳴（SPR）により測定される、500 nM以下、好ましくは250 nM以下、より好ましくは100 nM以下、より好ましくは50 nM以下、さらにより好ましくは48 nM以下の結合親和性（ K_D ）を有する、ヒトCCR6と結合するヒト化抗体またはその断片が提供される。

30

40

50

【0106】

本発明のさらなる態様は、良好な熱安定性を有する、CCR6と結合する抗体またはその断片を提供する。好ましい実施形態では、CCR6と結合する抗体またはその断片は、70を超え、好ましくは75を超え、さらにより好ましくは80を超えるFAB断片耐熱温度を有する。FAB断片耐熱性の分析のために示差走査熱量分析測定を用い、前記測定では、全長IgGの関係におけるFAB断片の中間融解温度が同定される。これらの種類の熱量測定は、当業者に知られており、実施例5にさらに記載するように、例えばGarber EおよびDemarest SJ(2007)、Biochem Biophys Res Commun、355:751~7に従って行うことができる。

【0107】

核酸、ベクターおよび宿主細胞

本開示は、CCR6と結合する抗体およびその断片をコードする単離核酸、ベクターおよび核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。核酸は、細胞全体、細胞溶解物または部分的に精製もしくは実質的に精製された形で存在することがある。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド分け、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においてよく知られている他のものを含む標準的な技法により、他の細胞構成成分または他の混入物、例えば他の細胞性核酸またはタンパク質から精製分離された場合に、「単離」または「実質的に純粋に」されている。例えばF.Ausubelら編(1987)Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing and Wiley Inter-science、New Yorkを参照されたい。本発明の核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含んでも含まなくてもよい。好ましい実施形態では、核酸は、cDNA分子である。

【0108】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学技法を用いて得ることができ、例えば抗体の軽鎖および重鎖をコードするかまたはVHおよびVLセグメントをコードするcDNAは、標準的PCR増幅またはcDNAクローニング技法により得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリー(例えばファージディスプレイ技法を用いて)から得られる抗体について、抗体をコードする1または複数の核酸をライブラリーから回収できる。外因性核酸を宿主細胞に導入する方法は、当技術分野においてよく知られており、用いる宿主により変動する。技法は、それらに限定されないが、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、塩化カルシウム処理、ポリエチレンイミン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルスまたはファージ感染、リポソームへのポリヌクレオチド(複数可)の封入、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションを含む。哺乳動物細胞の場合、トランスフェクションは一過性または安定性のいずれかであってよい。

【0109】

本発明の好ましい核酸分子は、配列番号88、90、92、94、96、98からなる群より選択される重鎖配列、ならびに/または配列番号87、89、91、93、95、97からなる群より選択される軽鎖配列をコードするものである。

【0110】

本発明の好ましい核酸分子は、配列番号7、37または249の重鎖可変領域、ならびに/または配列番号8、38、250、251、252または253の軽鎖可変領域をコードするものである。

【0111】

VHおよびVLセグメントをコードするDNA断片が一旦得られると、これらのDNA断片を、標準的な組換えDNA技法によりさらに操作して、例えば可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子またはFab断片遺伝子もしくはscFv遺伝子のような上記の断片に対応する断片遺伝子に変換できる。これらの操作では、VLまたはVHをコードするDNA断片は、抗体定常領域またはフレキシブルリンカーのようななどの別のタンパク質をコード

10

20

30

40

50

する別のDNA断片に作動可能に連結している。用語「作動可能に連結する」は、この文脈で用いる場合、2つのDNA断片によりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2つのDNA断片をつなぐことを意味する。VH領域をコードする単離DNAは、重鎖定常領域(CH1、CH2およびCH3)をコードする別のDNA分子にVHをコードするDNAを作動可能に連結することにより、全長重鎖遺伝子に変換できる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野において知られており(例えばKabata Eら、既出を参照されたい)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1(IGHG1)、IgG2(IGHG2)、IgG3(IGHG3)、IgG4(IGHG4)、IgA1(IGHA1)、IgA2(IGHA2)、IgM(IGHM)、IgD(IGHD)またはIgE(IGH E)定常領域であり得るが、最も好ましくはIgG1(IGHG1)定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子について、VHをコードするDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結できる。VL領域をコードする単離DNAは、軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子にVLをコードするDNAを作動可能に連結することにより、全長軽鎖遺伝子(およびFab軽鎖遺伝子)に変換できる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において知られており(例えばKabata Eら、既出を参照されたい)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅により得ることができる。好ましい実施形態では、軽鎖定常領域は、カップまたはラムダ定常領域、好ましくはカップ定常領域であり得る。scFv遺伝子を創出するために、VHおよびVLをコードするDNA断片を、フレキシブルリンカーをコードする、例えばアミノ酸配列(Gly4-Ser)3をコードする別の断片に作動可能に連結して、VLおよびVH領域がフレキシブルリンカーによりつながれた連続単鎖タンパク質としてVHおよびVL配列が発現できるようにする(例えばBird REら、(1988)Science、242:423~426;Huston JSら、(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA、85:5879~83;McCafferty Jら、(1990)Nature、348:552~554を参照されたい)。抗体の抗体断片生成のために様々な技法が開発されている。伝統的に、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク質分解消化により導かれた(例えばMorimoto Kら、(1992)J.Biochem.&Biophysical Methods、24:107~117およびBrennan Mら、(1985)Science、229:81~3を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞により直接生成できる。例えば、抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離できる。あるいはその代わりに、Fab'-SH断片は、E.coliから直接回収でき、化学的にカップリングさせてF(ab')₂断片を形成できる(Carter Pら、(1992)Bio/Technology、10:163~167)。別のアプローチによると、F(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養から直接単離できる。抗体断片の生成のための他の技法は、当業者にとって明らかである。別の実施形態では、選択される抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。例えばWO1993/16185;米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号を参照されたい。抗体断片は、例えば米国特許第5,641,870号に例えば記載される「直鎖抗体」であってもよい。

【0112】

本発明の抗体をコードする核酸は、タンパク質を発現するためにベクター、好ましくは発現ベクターに組み込むことができる。様々な発現ベクターをタンパク質発現のために利用できる。発現ベクターは、自己複製染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターを含み得る。発現ベクターは、宿主細胞型と適合するように構築される。よって、本発明において用いることができるベクター、好ましくは発現ベクターは、それらに限定されないが、哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞、酵母においておよび*in vitro*系においてタンパク質発現を可能にするものを含む。当技術分野において知られるように、抗体を発現するために本発明において用いることができる様々な発現ベクターが市販または他の方法で入手可能である。

10

20

30

40

50

【0113】

発現ベクターは、典型的に、制御もしくは調節配列、選択マーカー、任意の融合パートナーおよび/またはさらなるエレメントに作動可能に連結したタンパク質を含む。本明細書において「作動可能に連結」とは、核酸が別の核酸配列と機能的関係にあることを意味する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する他の発現制御エレメント（例えばポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えばGoeddel (*Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)*)に記載される。一般的に、これらの発現ベクターは、抗体をコードする核酸に作動可能に連結した転写および翻訳調節核酸を含み、タンパク質を発現するために用いる宿主細胞にとって典型的に適当である。一般に、転写および翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含み得る。これもまた当技術分野において知られるように、発現ベクターは、選択遺伝子またはマーカーを典型的に含有して、発現ベクターを含有する形質転換宿主細胞の選択を可能にする。選択遺伝子は当技術分野において知られており、用いる宿主細胞により変動する。例えば、典型的に、選択マーカー遺伝子は、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に与える。好ましい選択可能マーカーは、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子 (メトトレキセート選択/増幅を用いる dhfr - 宿主細胞において用いるため) および neo 遺伝子 (G418 選択のため) を含む。

10

20

【0114】

クローニングまたは本明細書におけるベクター中でのDNAの発現のために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的のために適切な原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物を含む真正細菌、例えばEnterobacteriaceae、例えばEscherichia、例えばE. coli、Enterobacter、Klebsiella、Proteus、Salmonella、例えばSalmonella typhimurium、Serratia、例えばSerratia marcescansおよびShigella、ならびにBacilli、例えばB. subtilisおよびB. licheniformis、Pseudomonas、例えばP. aeruginosa、ならびにStreptomycesを含む。適切なE. coliクローニング宿主は、E. coli 294 (ATCC 31, 446)、E. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31, 537) およびE. coli W3110 (ATCC 27, 325) を含む。原核生物に加えて、糸状菌または酵母のような真核微生物は、適切なクローニングまたは発現宿主である。Saccharomyces cerevisiaeまたは一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物のうちで最も一般的に用いられる。しかし、Schizosaccharomyces pombe; K. lactis、K. fragilis (ATCC 12, 424)、K. bulgaricus (ATCC 16, 045)、K. wickerhamii (ATCC 24, 178)、K. WaiTH (AJCC 56, 500)、K. drosopmarum (ATCC 36, 906)、K. thermotoleransまたはK. marxianus yarrowia (EP 40 22 26) を含むKluyveromyces宿主; Pichia pastoris (EP 18 30 70); Candida; Trichoderma reesia (EP 24 42 34); Neurospora crassa; Schwanniomyces、例えばSchwanniomyces occidentalis; およびNeurospora、Penicillium、TolypocladiumまたはA. nidulansもしくはA. nigerのようなAspergillus宿主を含む糸状菌のなどのいくつかの他の属、種および株が一般的に利用可能であり、有用である。

30

40

【0115】

50

本発明の抗体の発現のために適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例は、プラリル〔plaril〕および昆虫細胞を含む。多数のパキキュロウイルス株およびバリエーション、ならびに *Spodoptera frugiperda* (イモムシ)、*Aedes aegypti* (カ)、*Aedes albopictus* (カ)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ) および *Bombyx mori* など宿主からの対応する許容される昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための様々なウイルス株、例えば *Autographa californica* NPV の L-1 バリエーションおよび *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株が公共で利用可能であり、このようなウイルスは、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために用いることができる。ワタ、トウモロコシ、バレイショ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物も宿主として利用できる。

10

【0116】

本発明の組換え抗体の発現のための宿主細胞は、好ましくは哺乳動物宿主細胞であり、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO 細胞) (Urlaub G および Chasin L A (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77: 4216~4220 に記載される dhfr^r CHO 細胞を含む、例えば Kaufman R J および Sharp P A (1982) J. Mol. Biol., 159: 601~621 に記載されるように DHFR 選択可能マーカーとともに用いられる)、NSO 骨髄腫細胞、COS 細胞および SP2 細胞を含む。特に、NSO 骨髄腫細胞とともに用いるために、別の好ましい発現系は、WO 87/04462 (Wilson)、WO 89/01036 (Bebbington) および EP 338841 (Bebbington) に開示される GS 遺伝子発現系である。組換え抗体遺伝子を哺乳動物宿主細胞に導入した場合、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現を可能にするためまたはより好ましくは宿主細胞が成長する培養培地への抗体の分泌を可能にするために十分な期間、宿主細胞を培養することにより生成される。CCR6 と結合する抗体を生成するために有用な宿主細胞は、様々な培地で培養できる。ハム F10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、最少必須培地 (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basel, Switzerland) およびダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) など市販で入手可能な培地は、宿主細胞の培養のために適切である。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培養培地から回収できる。

20

30

【0117】

抗体は、融合パートナーに作動可能に連結して、発現されたタンパク質の標的化、精製、スクリーニング、ディスプレイなどができるようにしてよい。融合パートナーは、リンカー配列により抗体配列に連結してよい。リンカー配列は、少数、典型的に 10 未満のアミノ酸を一般的に含むが、より長いリンカーも用いてよい。典型的に、リンカー配列は、フレキシブルで分解に対して耐性であるように選択される。当業者により認識されるように、多様な配列のいずれもリンカーとして用いることができる。例えば、一般的なリンカー配列は、アミノ酸配列 G₄S を含む。融合パートナーは、抗体および任意の付随する融合パートナーを所望の細胞の場所または細胞外培地に向ける標的化またはシグナル配列であってよい。当技術分野において知られるように、あるいくつかのシグナル配列は、タンパク質を成長培地または細胞の内膜と外膜との間にある細胞膜周辺腔に分泌されるように標的化させることがある。融合パートナーは、精製および/またはスクリーニングを可能にするペプチドまたはタンパク質をコードする配列であってもよい。このような融合パートナーは、それらに限定されないが、ポリヒスチジンタグ (ヒスタグ) (例えば H6 および H10 または固定化金属親和性クロマトグラフィー (IMAC) 系 (例えば Ni⁺² 親和性カラム) とともに用いるための他のタグ)、GST 融合、MBP 融合、Streptag、細菌酵素 BirA の B5P ビオチン化標的配列、および抗体が標的にするエピトープ

40

50

タグ（例えば c - m y c タグ、 f l a g タグなど）を含む。当業者により認識されるように、このようなタグは、精製、スクリーニングまたはその両方のために有用であり得る。

【 0 1 1 8 】

抗体の構築および生成

C C R 6 ポリペプチドに対して作製された抗体は、よく知られており日常的なプロトコールを用いて、動物の免疫化、すなわち動物、好ましくは非ヒト動物へのポリペプチドの投与によりより得ることができる。例えば Handbook of Experimental Immunology (Weir DM (編)、第4巻、Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986) を参照されたい。ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ラクダまたはブタなどの多くの温血動物を免疫できる。しかし、マウス、ウサギ、ブタおよびラット、特にマウスは、一般的に最も適切である。抗体は、当業者に知られる組換え DNA 技法によっても生成できる。さらに、抗体は、自然に存在する抗体の酵素または化学的切断により生成できる。本発明のヒト化抗体は、非ヒト動物（例えばマウス）からの V H および / または V L 領域からの 1 もしくは複数の C D R またはその一部を、ヒト V H および / または V L 領域からの 1 または複数のフレームワーク領域に移行することにより構築できる。場合によっては、このように V H および / または V L 領域中に存在するヒトフレームワーク残基は、抗体の免疫原性を減少させ、かつ / または結合親和性を維持するために必要または所望される場合に、対応する非ヒト（例えばマウス）残基で置き換えることができる。場合によっては、C D R 中に存在する非ヒトアミノ酸残基は、ヒト残基で置き換えてよい。本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のようにして調製した非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製できる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする DNA は、対象の非ヒトハイブリドーマから得て、非マウス（例えばヒト）免疫グロブリン配列を含有するように、標準的な分子生物学的技法を用いて工学改変できる。例えば、キメラ抗体を創出するために、当技術分野において知られる方法を用いて、マウス可変領域をヒト定常領域に連結できる（例えば C a b i l l y らへの米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号を参照されたい）。ヒト化抗体を創出するために、当技術分野において知られる方法を用いて、マウス C D R 領域をヒトフレームワークに挿入できる（例えば W i n t e r への米国特許第 5, 2 2 5, 5 3 9 号、Q u e e n らへの米国特許第 5, 5 3 0, 1 0 1 号；第 5, 5 8 5, 0 8 9 号；第 5, 6 9 3, 7 6 2 号および第 6, 1 8 0, 3 7 0 号を参照されたい）。 10
20
30

【 0 1 1 9 】

重鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子を、可能性のあるアクセプター分子可変領域とマウス抗体の重鎖可変領域との間の相同性を考慮して選択して、本発明のヒト化抗体を構築してよい。生殖系列候補ヒトアクセプター分子は、可能性のある免疫原性を低減するので好ましい。生殖系列データベースは、重鎖 F W 3 領域の端および部分的に C D R 3 配列内まで通して読んだ抗体配列でつくられている。F W 4 領域の選択のために、選択された生殖系列分子に由来する成熟抗体配列のデータベースを検索できるか、またはヒトドナーからの選択された生殖系列分子に由来する抗体配列を用いることができる。ヒトアクセプター分子は、マウスドナー分子と同じ重鎖クラスから好ましく選択され、マウスドナー分子の可変領域と同じ基準構造クラスのものである。重鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子の選択のための 2 次的な考慮は、マウスドナー分子とヒトアクセプター分子との間の C D R 長における相同性を逃れる。ヒトアクセプター抗体分子は、V - B A S E データベースでの相同性検索により選択されることが好ましいが、K a b a t および公共 N C B I データベースなどの他のデータベースも用いてよい。 40

【 0 1 2 0 】

軽鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子を、可能性のあるアクセプター分子可変領域とマウス抗体の軽鎖可変領域との間の相同性を考慮して選択して、本発明のヒト化抗体を構築してよい。生殖系列候補ヒトアクセプター分子は、可能性のある免疫原性を低減するので好ましい。生殖系列データベースは、重鎖 F W 3 領域の端および部分的に C D R 3 配列内まで通して読んだ抗体配列でつくられている。F W 4 領域の選択のために、選択 50

された生殖系列分子に由来する成熟抗体配列のデータベースを検索できるか、またはヒトドナーからの選択された生殖系列分子に由来する抗体配列を用いることができる。ヒトアクセプター分子は、マウスドナー分子と同じ軽鎖クラスから好ましく選択され、マウスドナー分子の変領域と同じ基準構造クラスのものである。軽鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子の選択のための二次的な考慮は、マウスドナー分子とヒトアクセプター分子との間のCDR長における相同性を含む。ヒトアクセプター抗体分子は、V-BASEデータベースでの相同性検索により選択されることが好ましいが、Kabatおよび公共NCBIデータベースなどの他のデータベースも用いてよい。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、以下の実施例6を含んで本明細書に記載する。

【0121】

本発明は、CCR6と結合する抗体またはその断片を生成する方法であって、核酸が発現され、抗体が生成されるように、CCR6と結合する抗体もしくはその断片をコードする単離核酸またはCCR6と結合する抗体もしくはその断片をコードする単離核酸を含むベクターを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法を提供する。好ましくは、抗体は、単離される。宿主細胞、核酸およびベクターについて、上記のものを用いることができる。核酸の発現は、例えば、当技術分野においてよく知られ（例えばMorrisson S (1985) Science 229:1202）、上でさらに概説する組換えDNA技法と遺伝子トランスフェクション方法との組み合わせにより得ることができる。例えば抗体またはその抗体断片を発現するために、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学的技法を用いて得（例えばPCR増幅または対象の抗体を発現するハイブリドーマを用いるcDNAクローニング）、DNAを発現ベクターのようなベクターに挿入できる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入できるか、またはより典型的には、両方の遺伝子と同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子が発現ベクターに、標準的な方法により挿入する（例えば抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しないならば平滑端ライゲーション）。本明細書に記載する抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用いて任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を創出でき、このことは、VHセグメントがベクター内のCH1セグメント（複数可）に作動可能に連結し、VKセグメントがベクター内のCKセグメントに作動可能に連結するように、所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域を予めコードする発現ベクターに本明細書に記載する抗体の軽鎖および重鎖可変領域を挿入することによる。

【0122】

抗CCR6抗体の特徴決定および精製

抗体についてのスクリーニングを、ヒトCCR6との結合を測定するためのアッセイおよび/またはCCR6とそのリガンドとの結合を阻止する能力を測定するためのアッセイを用いて行うことができる。結合アッセイの例は、特に、プレート上に固定化されたヒトCCR6とヒトFcとの融合タンパク質を用い、融合タンパク質と結合した抗CCR6抗体を検出するためのコンジュゲート2次抗体を採用するELISAである。阻止アッセイの例は、BAFをトランスフェクトした細胞上のCCR6へのリガンドタンパク質の結合の阻止を測定する、CCL20媒介性遊走アッセイである。このアッセイは、上清中の抗体が、CCL20に反応してCCR6発現細胞の遊走を阻止するにつれてのシグナルの低減を求める。阻止アッセイのさらなる例は、CCR6活性化の阻止を化学発光により測定するアッセイである。

【0123】

本発明の抗体は、当業者に知られる様々な方法で単離または精製できる。標準的な精製方法は、大気圧またはFPLCおよびHPLCのようなシステムを用いて高圧で行う、イオン交換、疎水性相互作用、親和性、サイズ分けまたはゲルろ過および逆相を含むクロマトグラフィー技法を含む。精製方法は、電気泳動、免疫学的、沈降、透析および等電点電気泳動の技法も含む。タンパク質濃縮とともに限外ろ過およびダイアフィルトレーション

10

20

30

40

50

技法も有用である。CCR6抗体を精製するために、選択された宿主細胞を、例えばモノクローナル抗体精製のためにスピナーフラスコ中で成長させることができる。上清をろ過し、濃縮した後に、プロテインA-セファロース(Pharmacia、Piscataway、NJ)を用いて親和性クロマトグラフィーを行う。溶出された抗体をゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーにより確認して、純度を確認できる。本発明の好ましい抗体は、よって、CCR6と結合する単離および/または精製抗体である。

【0124】

イムノコンジュゲート

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物(例えば免疫抑制剤)または放射性毒素のような治療剤に連結した、ヒトCCR6と結合するCCR6抗体またはその断片を提供する。このようなコンジュゲートは、本明細書において、「イムノコンジュゲート」という。1または複数の細胞毒を含むイムノコンジュゲートは、「免疫毒素」という。細胞毒または細胞傷害性薬剤は、細胞に有害な(例えば死滅させる)任意の薬剤を含む。例は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログを含む。治療剤は、例えば、代謝拮抗薬(例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCならびにシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(旧名ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(旧名アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))および有糸分裂阻害剤(例えばピンクリスチンおよびピンブラスチン)も含む。本発明の抗体と連結できる治療用細胞毒の他の例は、デュオカルマイシン、カリチアマイシン、マイタンシンおよびオーリスタチン、ならびにそれらの誘導体を含む。カリチアマイシン抗体コンジュゲートの例は、市販で入手可能である(Mylotarg(登録商標); American Home Products)。細胞毒は、本発明の抗体と、当技術分野において利用可能なリンカー技法を用いて連結できる。細胞毒と抗体とをコンジュゲートするために用いられているリンカーの型の例は、それらに限定されないが、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィドおよびペプチド含有リンカーを含む。例えばリソソーム区画内の低pHによる切断に感受性またはカテプシン(例えばカテプシンB、C、D)のような腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼのようなプロテアーゼによる切断に感受性であるリンカーを選択できる。細胞毒の型、リンカーおよび治療剤と抗体をコンジュゲートする方法についてのさらなる議論について、Saito Gら、(2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199~215; Trail PAら、(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328~337; Payne G(2003) Cancer Cell, 3: 207~212; Allen TM(2002) Nat. Rev. Cancer, 2: 750~763; Pastan IおよびKreitman RJ(2002) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3: 1089~1091; Senter PDおよびSpringer CJ、(2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247~264も参照されたい。本発明の抗体は、放射活性同位体に連結して、ラジオイムノコンジュゲートともよばれる細胞傷害性放射性医薬品を作製することもできる。診断または治療用に用いるために抗体とコンジュゲートできる放射活性同位体の例は、それらに限定されないが、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰およびルテニウム¹⁷⁷を含む。ラジオイムノコンジュゲートを調製するための

10

20

30

40

50

方法は、当技術分野において確立されている。ラジオイムノコンジュゲートの例は、Zevalin（登録商標）（EDEC Pharmaceuticals）およびBexxar（登録商標）（Corixa Pharmaceuticals）を含んで市販で入手可能であり、同様の方法を用いて、本発明の抗体を用いてラジオイムノコンジュゲートを調製できる。本発明の抗体イムノコンジュゲートを用いて所定の生物学的応答を改変でき、薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってよい。このようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素もしくはジフテリア毒素のような酵素活性毒素またはその活性断片；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン- γ のようなタンパク質；あるいは例えばリンホカイン、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-6（IL-6）、顆粒球マクrophageコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）もしくは他の増殖因子のような生物学的応答改変物質を含むことがある。

10

【0125】

このような治療剤を抗体に連結する技法はよく知られており、例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら（編）、243～56（Alan R. Liss, Inc. 1985）中のArnoldら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」；Controlled Drug Delivery（第2版）、Robinsonら（編）、623～53（Marcel Dekker, Inc. 1987）中のHellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」；Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら（編）、475～506（1985）中のThorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」；Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、Baldwinら（編）、303～16（Academic Press 1985）中の「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」ならびにThorpe PEおよびRoss WC（1982）Immunol. Rev. 62: 119～58を参照されたい。

20

30

【0126】

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）または放射性毒素のような治療剤と一緒に投与される、CCR6と結合するCCR6抗体またはその断片を提供する。

【0127】

医薬組成物

別の態様では、本発明は、本発明の抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む組成物、例えば医薬組成物を提供する。このような組成物は、1もしくは組み合わせ（例えば2以上の異なる）抗体、および/または本発明のイムノコンジュゲート、および/または上記のような細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）もしくは放射性毒素のような治療剤を含むことがある。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープと結合するか、または相補的な活性を有する抗体の組み合わせ（またはイムノコンジュゲート）を含み得る。本発明の医薬組成物は、併用治療において投与することもでき、すなわち他の薬剤と組み合わせることができる。例えば、併用治療は、少なくとも1つの他の抗炎症剤または免疫抑制剤と組み合わせた本発明のCCR6抗体を含み得る。

40

【0128】

本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される担体」は、任意のそして全ての生理的に

50

適合する溶剤、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張化および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば注射または注入による）のために適切である。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち抗体またはイムノコンジュゲートのある材料中にコーティングして、化合物を不活性化できる酸およびその他の自然の状態から化合物を保護してよい。薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射用液または分散液の即時調製用の滅菌粉末を含む。医薬活性物質のためのこのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において知られている。任意の従来の媒体または作用物質が活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるこれらの使用が構想される。補助的活性化合物も組成物に組み込むことができる。

10

【0129】

別の態様では、本発明は、治療剤に連結したCCR6と結合する抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。用いることができるイムノコンジュゲートおよび治療剤については、上で記載している。

【0130】

別の態様では、本発明は、別の医薬活性薬剤をさらに含む本発明の抗体またはその断片を含む組成物を提供する。好ましくは、別の医薬活性薬剤は、a) CCR6に対する別のアンタゴニスト、b) 抗炎症剤、c) 免疫抑制剤、例えばTNFアンタゴニスト、コルチゾンもしくはステロイドなど) および/またはd) 抗アレルギー剤の1または複数である。

20

【0131】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤も含んでよい。薬学的に許容される抗酸化剤の例は、(1) アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどのような水溶性抗酸化剤；(2) パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアルコール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなどのような脂溶性抗酸化剤；および(3) クエン酸、エチレンジアミン4酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などのような金属キレート化剤を含む。本発明の医薬組成物において採用できる適切な水性および非水性担体の例は、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど) およびそれらの適切な混合物、オリーブ油のような植物油ならびにオレイン酸エチルのような注射用有機エステルを含む。適当な流動性は、例えばレシチンのようなコーティング材料の使用、分散液の場合に、要求される粒径の維持および界面活性剤の使用により維持できる。これらの組成物は、保存剤、湿潤化剤、乳化剤および分散剤のような補助剤も含有してよい。微生物の存在は、上記の滅菌化手順および様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの添加の両方により確実に防止できる。糖、塩化ナトリウムなどのような等張化剤を組成物に含めることが望ましいこともある。さらに、注射用医薬形の吸収の延長を、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる作用物質を含めることによりもたらしてもよい。

30

【0132】

治療用およびその他の使用

本発明の抗体は、CCR6媒介性障害の診断および処置を含む、多数の*in vitro* および*in vivo* の診断および治療用の利用性がある。例えば、これらの分子は、*in vitro* もしくは*ex vivo* で培養中の細胞に、または例えば*in vivo* でヒト対象に投与して、様々なCCR6媒介性障害を処置、防止および診断できる。好ましい対象はヒトであり、CCR6活性により媒介される障害(CCR6媒介性障害)を有する患者を含む。本発明の中和抗体は、天然のT細胞集団と比較したときの、活性化されたT細胞集団におけるCCR6発現の増加またはメモリーT細胞集団上でのCCR6発現の増加またはTh17 T細胞集団上でのCCR6発現の増加のような、異常CCR6状態を患者が有するかとは独立して、患者を処置するために効果的であり得る。より好ま

40

50

しい対象はヒトであり、高レベルのCCR6を発現する患者を含む。

【0133】

本発明の目的のための「患者」は、ヒトおよびその他の動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを含む。よって、本発明の抗体は、ヒト治療および獣医学的用途の両方を有する。本発明における用語「処置」または「処置する」は、疾患または障害についての治療的処置および予防的または抑制的措置を含むことを意味する。よって、例えば疾患の発症前の抗体投与の成功は、疾患の処置をもたらす。別の例として、疾患の症状と闘うための疾患の臨床的顕性化の後の抗体の投与の成功は、疾患の処置を構成する。「処置」および「処置する」は、疾患を根絶するための疾患の出現の後の抗体の投与も包含する。起こり得る臨床症状の低減と、おそらく疾患の改善とを伴う、発症後および臨床症状が生じた後の抗体の投与の成功は、疾患の処置を構成する。「処置を必要とする」者としては、疾患または障害を既に有する哺乳動物が挙げられ、また疾患または障害を有しやすい哺乳動物もであり、疾患または障害を防止しようとする哺乳動物も挙げられる。

10

【0134】

特定の実施形態では、抗体を *in vivo* で用いて、様々なCCR6媒介性障害を処置、防止または診断する。よって、本発明は、対象におけるCCR6媒介性障害を処置するための方法であって、対象に治療上有効量の抗体またはその断片を投与するステップを含む方法を提供する。例示的なCCR6媒介性障害は、それらに限定されないが、炎症性疾患および/または自己免疫疾患、例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患 (IBD)、関節リウマチ、MS、1型および2型糖尿病、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、アトピー性皮膚炎；例えば喘息およびアレルギー性肺炎を含むアレルギー反応または状態；がん、アテローム動脈硬化症、感染、神経変性疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病 (GVHD) および循環器障害/疾患を含む。好ましくは、CCR6媒介性障害は、なかでも炎症性腸疾患 (例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病)、関節リウマチ、MSおよびアテローム動脈硬化症、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、視神経炎、加齢黄斑変性、SLE、シェーグレン症候群、強皮症、全身性強皮症、慢性腎臓疾患、肝線維症、結核、特発性肺線維症、結核誘発性肺線維症、後腹膜線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、心内膜心筋線維症、心房性線維症、縦隔線維症、骨髄線維症 (骨髄)、後腹膜線維症、進行性塊状線維症、腎原性全身性線維症、関節線維症を含む、炎症性疾患および/または自己免疫疾患を含む。

20

30

【0135】

本発明の抗体を用いて処置される好ましいCCR6媒介性障害は、炎症性腸疾患、多発性硬化症、関節リウマチおよび喘息からなる群より選択される。本発明の抗体を用いて処置される特に好ましいCCR6媒介性障害は、炎症性腸疾患である。

【0136】

一実施形態では、本発明の抗体は、CCR6のレベル、または細胞膜表面上にCCR6を含有する細胞のレベルを検出するために使用することができ、前記レベルは、よって、ある疾患症状につながる可能性がある。あるいはその代わりに、抗体は、CCR6機能を阻害または阻止するために使用することができ、そのことは今度は、ある疾患症状の防止または改善につながる可能性がある。それによってCCR6を疾患のメディエーターとして関係づけることができる。このことは、試料および対照試料を、CCR6抗体と、抗体とCCR6との間の複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより達成できる。抗体とCCR6との間で形成された任意の複合体を検出し、試料および対照において比較する。本発明の抗体とCCR6との特異的結合に鑑みて、本発明の抗体は、細胞の表面上のCCR6発現を特異的に検出するために使用することができ、例えば前記抗体はCCR6の発現レベルが低いまたは高い患者を検出するために使用することができる。本発明の抗体は、免疫親和性精製によりCCR6を精製するために使用することもできる。

40

【0137】

別の実施形態では、本発明の抗体は、*in vitro*での治療用または診断用の使用に付随する結合活性について初期に試験できる。例えば、本発明の組成物は、フローサイ

50

トメトリ分析を用いて試験できる。

【0138】

本開示は、医薬品としての抗体またはその断片の使用、およびCCR6媒介性障害の処置のための医薬品の調製における抗体またはその断片の使用をさらに提供する。さらなる実施形態では、本開示は、医薬品として使用するための抗体またはその断片を提供する。本開示は、CCR6媒介性障害を処置するための方法において使用するための抗体またはその断片も提供する。CCR6媒介性障害は、上記のものである。本発明の抗体またはその断片は、患者の共刺激状態とは独立して、CCR6媒介性障害を処置するために特に有用であり得る。好ましい実施形態では、抗体またはその断片は、例えば患者が高レベルのCCR6を発現するCCR6媒介性障害を処置するために使用することができる。

10

【0139】

以前に記載するように、本発明の抗CCR6抗体は、1または複数の他の治療剤、例えば細胞傷害性薬剤、放射毒性薬剤または免疫抑制剤と共投与できる。抗体は、薬剤と連結できる（上記のようなイムノコンジュゲートとして）か、または薬剤と分けて投与できる。後者（分けた投与）の場合、抗体は、薬剤の前、後もしくは薬剤と同時に投与できるか、または他の既知の治療、例えば抗がん治療、例えば放射線照射と共投与できる。

【0140】

抗体の投与のために、投与量は、約0.0001から100mg/kg宿主体重まで、より通常は0.01から10mg/kg宿主体重までの範囲である。例示的な処置計画は、週1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、4週間ごとに1回、1カ月に1回、3カ月ごとに1回または3～6カ月ごとに1回の投与を必要とする。抗体は、複数の機会に通常投与される。単独投与間の間隔は、例えば、毎週、毎月、3カ月ごと、または毎年であり得る。間隔は、患者において標的抗原に対する抗体の血中レベルを測定することにより示されるように不規則的でもあり得る。いくつかの方法では、投与量は、約1～1000µg/ml、いくつかの方法では約25～300µg/mlの血漿抗体濃度を達成するように調整される。あるいはその代わりに、抗体は、持続放出製剤として投与でき、この場合、要求される投与頻度がより低い。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変動する。投与の投与量および頻度は、処置が予防的または治療的であるかに依存して変動できる。予防的用途では、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的頻繁でない間隔で投与される。残りの寿命にわたって処置を受け続ける患者もいる。治療的用途では、疾患の進行が低減または終結するまで、比較的短い間隔での比較的高い用量が時折要求される。

20

30

【0141】

本発明の医薬組成物中の活性成分、すなわち抗体の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性にならずに、特定の患者、組成物および投与方法について所望の治療応答を達成するために効果的な活性成分の量を得るように変動できる。選択された投与量レベルは、採用される本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、採用される特定の抗体の排出速度、処置持続期間、採用される特定の組成物と組み合わせる他の薬物、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、全身の健康および以前の医療履歴などの、医療の分野においてよく知られている因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。

40

【0142】

「治療上有効量の」本発明のCCR6抗体は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、無疾患症状期間の頻度および持続期間の増加、ならびに/または疾患の苦痛による障害もしくは機能障害の防止をもたらす。CCR6媒介性障害の処置についての化合物の能力は、ヒトにおける効力を予測できる動物モデル系において評価できる。代わりに、組成物のこの特性は、細胞成長を阻害する化合物の能力を調べることにより評価でき、このような阻害は、当業者に知られるアッセイにより*in vitro*で測定できる。当業者は、このような量を、対象のサイズ、対象の症状の重症度および選択される特定の組成物または投与経路のような因子に基づいて決定できる。

50

【0143】

本発明の抗体または組成物は、1または複数の投与経路により、当技術分野において知られる様々な方法の1または複数を用いて投与できる。当業者により認識されるように、投与の経路および/または方法は、所望の結果に依存して変動する。好ましい投与経路は、静脈内、筋内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば注射もしくは注入による他の非経口投与経路を含む。より好ましい投与経路は、静脈内または皮下である。「非経口投与」との句は、本明細書で用いる場合、通常注射による、経腸および局所投与以外の投与の方法を意味し、限定することなく、静脈内、筋内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、真皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入を含む。代わりに、本発明の抗体は、局所、表皮または粘膜投与経路、例えば鼻内、口腔、膣、直腸、舌下または局所によるような非経口でない経路により投与できる。

10

【0144】

製造品およびキット

本開示の別の実施形態では、CCR6 媒介性障害の処置のための、本発明の抗体もしくはその断片、組成物またはイムノコンジュゲートを含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含むことがある。適切な容器は、例えば瓶、バイアルまたはシリンジを含む。容器は、ガラスまたはプラスチックのような様々な材料から形成してよい。容器は、状態を処置するために効果的であり得る組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有することがある(例えば容器は、皮下注射針が突き刺すことができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、本明細書に記載する抗体であってよい。ラベルまたは添付文書は、組成物を、がんのような所望の状態を処置するために用いることができることを示してよい。一実施形態では、ラベルまたは添付文書は、抗体を含む組成物を用いてCCR6 媒介性障害を処置できることを示してよい。

20

【0145】

さらに、製造品は、(a) 組成物を含有する第1容器であって、組成物が、本明細書の抗体を含む第1容器と、(b) 組成物を含有する第2容器であって、組成物が、抗体以外の治療剤を含む第2容器とを含むことがある。本開示の本実施形態の製造品は、第1および第2組成物を組み合わせて用いて、CCR6 媒介性疾患または障害を処置できることを示す添付文書をさらに含んでよい。このような治療剤は、先行する項において記載する任意の補助治療であってよい(例えば血栓溶解剤、血小板凝集抑制薬、化学療法剤、血管新生抑制薬、抗ホルモン化合物、心臓保護剤および/またはサイトカインを含む、哺乳動物における免疫機能の調節物質)。代わりにまたはさらに、製造品は、注射用の静菌水(BWFI)、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液およびブドウ糖液のような薬学的に許容される緩衝液を含む第2(または第3)容器をさらに含んでよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針およびシリンジを含む、商業的および使用者の視点から望まれる他の物質をさらに含んでよい。

30

【0146】

本発明の抗体、組成物またはイムノコンジュゲートと使用説明書とを含むキットも本発明の範囲内である。キットは、免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤もしくは放射毒性剤、または1もしくは複数の本発明のさらなる抗体(例えば、第1抗体とは異なるCCR6上のエピトープと結合する、相補的活性を有する抗体)のような1または複数のさらなる試薬をさらに含有できる。

40

【0147】

さらなる記載なしで、当業者は、先行する記載および以下の説明的な実施例を用いて、本開示の薬剤を利用して、特許請求の範囲に記載される方法を実施できると考えられる。以下の実行実施例は、本開示の実施を容易にするために与えられ、残りの本開示をいずれの様式でも限定すると解釈されない。

【実施例】

50

【0148】

[実施例1]

安定ヒトCCR6発現CHOおよびBAF/3細胞の樹立
構築物のクローニング:

ヒトCCR6についての遺伝子は、Imagenes(現Source Biosciences Life Sciences, Nottingham, UK)に注文した。Imagenesにより構築物に付された名称は、IRATp970E0757Dであった。クローニングのための標的ベクターは、マウスCMVプロモーターの制御下の発現カセットを有する、Glenmarkが所有権を持つベクターであるpGLEX33[IRES-REP]であった。マルチクローニングサイト(MCS)により、対象の遺伝子であるCCR6のクローニングが可能になった。MCS(よって、最終構築物では、CCR6のオープンリーディングフレーム)の後に、IRESと、レポータータンパク質(REP)をコードする第2オープンリーディングフレームとが続いた。

10

【0149】

CCR6のオープンリーディングフレーム(配列番号101)をpGLEX33[IRES-REP]にクローニングするために、IRATp970E0757Dの構築物を、オープンリーディングフレームの5'および3'に簡便な制限部位(NheI/ClaI)を付加する特異的プライマー対(GlnPr863およびGlnPr864)を用いるPCRのための鋳型として用いた。NheI/ClaIを用いてアンプリコンを切断し、同じ酵素を用いてMCSで切断しかつ再閉環を防ぐためにCIP処理したpGLEX33[IRES-REP]の主鎖にクローニングした。得られた構築物をpGLEX33[CCR6-IRES-REP]と命名し、配列決定(Fasteris, Geneva, Switzerland)により確認した。

20

【0150】

CHO[hscCR6]

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-S, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を、4mM L-グルタミン(Applichem, Germany)を補ったPowerCHO-2 CD培地(Lonza, Verviers, Belgium)中で懸濁培養し、振とうインキュベータ(2.5cmの環状往復運動で200rpm)中で37℃、5%CO₂および湿度80%にてインキュベートした。

30

【0151】

CHO-S細胞の継代培養は、新鮮な培地中で0.5*10⁶生存細胞/mlの播種密度を用いて3~4日ごとに定期的に行った。ガス交換を可能にする透過性フィルタを含有する50mlバイオリアクタチューブ(Tubespin Bioreactor 50; TPP, Trasadingen, Switzerland)中で、10mlの培地を用いて細胞を培養した。細胞生存および濃度は、トリパンブルー細胞色素排除法を用いるCountess自動化細胞計数器(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて決定した。細胞濃度は、CHO-S細胞について、PCVチューブ(TPP, Trasadingen, Switzerland)を用いる血中血球容積(PCV)法の決定により確認した。

40

【0152】

CHO-S細胞のトランスフェクションは、ポリエチレンイミン(PEI; JetPEI, Polyplus-transfection, Illkirch, France)を用いて行った。PEIは、DNAのような負に荷電した分子と複合体を形成できるカチオンポリマーである。正に荷電したDNA-PEI複合体は、負に荷電した細胞表面と結合し、エンドサイトーシスにより内部に取り込まれる。これは、リソソーム区画に達し、そこから溶解により核に放出される。DNA-PEI複合体を用いる高いトランスフェクション効率は、PEIがリソソーム分解からDNAを保護する能力による。細胞は、製造者により提供されるマニュアルに従ってトランスフェクトした。

【0153】

50

対象の遺伝子およびレポーター遺伝子を発現する pGLEX33 [CCR6 - IRES - REP]、および選択マーカーであるピューロマイシンに対する耐性をもたらす PAC 遺伝子を発現する第 2 ベクターの、2 つのプラスミドを同時にトランスフェクトした。これらのベクターはともに、安定的トランスフェクションの前に直鎖状にし、安定細胞集団の作製を可能にすることが知られている比率でトランスフェクトした。

【0154】

トランスフェクションの次の日に、選択培地で異なる濃度に細胞を希釈し、96 ウェルプレートに分配して、ミニプールとよばれる安定細胞集団を作製した。用いた選択培地は、安定株化細胞の選択を可能にすることが知られている特定の濃度でピューロマイシンを補った Power CHO - 2、4 mM グルタミンであった。

10

【0155】

トランスフェクションの 7 日後に、細胞に選択培地を加えることにより、選択の厳密さを更新した。96 ウェルプレート中のコロニーがコンフルエントになるとすぐに、蛍光リーダーを用いて、レポーター遺伝子発現についてプレートを分析した。48 個の最高の発現を示すものを、24 ウェルプレートの規模で増殖させた。この規模にて、FACS およびヒト CCR6 特異的抗体を用いてヒト CCR6 発現について細胞を試験した。5 つのクローン # 12、16、25、37 および 47 は、CCR6 の最も均質な発現かつ最高の発現を示した。これらの細胞を、それぞれ 10 個の凍結保存バイアルでの研究細胞バンク (research cell bank) 調製物のためにさらに増殖させた。タンパク質発現および株化細胞開発グループの細胞バンクにおいて - 80 °C にて RCB を維持した。

20

【0156】**BA / F3 [CCR6]**

BA / F3 は、おそらく C3H マウスに由来する、IL - 3 依存性マウスプロ B 株化細胞である。注文番号 ACC300 の細胞を DSMZ (Braunschweig, Germany) から購入した。BA / F3 成長培地 (80% RPMI (vol. / vol.))、10% 熱不活化 FCS (vol. / vol.)、WEHI - 3 B 株化細胞の 10% (vol. / vol.) 馴化培地 (DSMZ カタログ番号 ACC 26) を用いて T フラスコ中で定期的に細胞を培養し、静置インキュベータ (37 °C、5% CO₂ および湿度 80%) でインキュベートした。

【0157】

BA / F3 細胞の継代培養は、新鮮な培地中で 0.1×10^6 生存細胞 / ml の播種密度を用いて 3 ~ 4 日ごとに定期的に行った。T - 150 フラスコ (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中で 20 ml の培地を用いて細胞を培養した。細胞生存および濃度は、トリパンブルー細胞色素排除法を用いる Countess 自動化細胞計数器 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて決定した。

30

【0158】

BA / F3 細胞のトランスフェクションは、NEON 装置 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いるエレクトロポレーションを用いて行った。エレクトロポレーション条件 (パルス数、パルス長、電圧) は、NEON 装置のマニュアルで提供される指示を用いて最適化した。

40

【0159】

対象の遺伝子およびレポーター遺伝子を発現する pGLEX33 [CCR6 - IRES - REP]、および選択マーカーであるピューロマイシンに対する耐性をもたらす PAC 遺伝子を発現する第 2 ベクターの、2 つのプラスミドを同時にトランスフェクトした。これらのベクターはともに、安定的トランスフェクションの前に直鎖状にし、安定細胞集団の作製を可能にすることが知られている比率でトランスフェクトした。

【0160】

異なる濃度に成長培地で細胞を希釈し、96 ウェルプレートに分配した。次の日に、別の容量の選択培地を細胞に加えた。用いた選択培地は、ピューロマイシンを補った BA /

50

F3 成長培地であった。異なる濃度での BA/F3 細胞の希釈とピューロマイシン処置との組み合わせは、安定株化細胞の選択を可能にすることが知られていた。

【0161】

96 ウェルプレート中のコロニーがコンフルエントになるとすぐに、蛍光リーダーを用いて、レポーター遺伝子発現についてプレートを分析した。96 個の最高の発現を示すものを、24 ウェルプレートの規模で増殖させた。この規模にて、FACS およびヒトCCR6 特異的抗体を用いてヒトCCR6 発現について細胞を試験した。5つのクローン#7、17、21 および48は、CCR6 の最も均質な発現かつ最高の発現を示した。これらの細胞を、それぞれ10個の凍結保存バイアルでの研究細胞バンク調製物のためにさらに増殖させた。タンパク質発現および株化細胞開発グループの細胞バンクにおいて - 80

10

>Glnpr863 配列番号 99

GAGGCTAGCCACCATGAGCGGGGAATCAATGAA

>Glnpr864 配列番号 100

AGGGGCATCGATTCACATAGTGAAGGACGACGC

>hsCCR6 配列番号 101

ATGAGCGGGGAATCAATGAATTCAGCGATGTTTTCGACTCCAGTGAAGATTATTT
TGTGTCACTCAATACTTCATATTACTCAGTTGATTCTGAGATGTTACTGTGCTCCTT
GCAGGAGGTCAGGCAGTTCTCCAGGCTATTTGTACCGATTGCCTACTCCTTGATCT
GTGTCTTTGGCCTCCTGGGGAATATTCTGGTGGTGATCACCTTTGCTTTTTATAAG
AAGGCCAGGTCTATGACAGACGTCTATCTCTTGAACATGGCCATTGCAGACATCCT
CTTTGTTCTTACTCTCCATTCTGGGCAGTGAGTCATGCCACCGGTGCGTGGGTTT
TCAGCAATGCCACGTGCAAGTTGCTAAAAGGCATCTATGCCATCAACTTTAACTGC
GGGATGTGCTCCTGACTTGCATTAGCATGGACCGGTACATCGCCATTGTACAGGC
GACTAAGTCATTCCGGCTCCGATCCAGAACAACACTACCGCGCAGCAAAATCATCTGCC
TTGTTGTGTGGGGGCTGTCACTCATCTCCAGCTCAACTTTTGTCTTCAACCAA
AAATACAACACCCAAGGCAGCGATGTCTGTGAACCAAGTACCAGACTGTCTCGG
AGCCCATCAGGTGGAAGCTGCTGATGTTGGGGCTTGAGCTACTCTTTGGTTTCTTT
ATCCCTTTGATGTTTCATGATATTTTGTACACGTTTCATTGTCAAAACCTTGGTGCAA
GCTCAGAATTCTAAAAGGCACAAAGCCATCCGTGTAATCATAGCTGTGGTGCTTGT
GTTTCTGGCTTGTGAGATTCTCATAACATGGTCCTGCTTGTGACGGCTGCAAATT
TGGGTAATAAGTGAACCGATCCTGCCAGAGCGAAAAGCTAATTGGCTATACGAAAAC
TGTCACAGAAGTCTGGCTTTCCTGCACTGCTGCCTGAACCCTGTGCTCTACGCTT
TTATTGGGCAGAAGTTCAGAACTACTTTCTGAAGATCTTGAAGGACCTGTGGTGT
GTGAGAAGGAAGTACAAGTCTCAGGCTTCTCCTGTGCCGGGAGGTAAGTACAGAAA
ACATTTCTCGGCAGACAGTGAGACCGCAGATAACGACAATGCGTCGTCCTTCACT
ATGTGAA

20

30

【0162】

マウス抗ヒトCCR6 抗体の作製およびスクリーニング

ヒトCCR6 をトランスフェクトしたCHO およびBAF 細胞をPBS で洗浄し、PBS に再懸濁した。1 回目の免疫化のために、CCR6 をトランスフェクトしたCHO 細胞を0.5 mL インスリンシリンジ (BD Pharmingen、Allschwil、Switzerland) に移し、BALB/c 動物 (Harlan、Netherlands) を、 1.0×10^6 のトランスフェクトした細胞を用いて後肢の肉趾、尾の基部および首に皮下免疫した。免疫化は、CCR6 をトランスフェクトしたBAF を用いて同じ注射経路に従って2週間後に反復した。

40

【0163】

免疫化マウス血清中の循環抗ヒトCCR6 抗体の存在は、トランスフェクトしたBAF 細胞および陰性対照としての偽BAF を用いてフローサイトメトリーにより評価した。異なるマウス血清の系列希釈 (1:100 から1:109 まで) を細胞に加え、結合した抗

50

体を、PE標識ヤギ抗マウスIgG 2次抗体 (BD Biosciences、Allschwil、Switzerland) を用いて検出した。1 × 10⁶ のCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞を用いる最後の皮下ブースター注射を、最良の抗ヒトCCR6 IgG血清力価を示す動物において行い、3日後に屠殺した。

【0164】

動物を安楽死させ、鼠径、腋窩、上腕、膝窩および坐骨リンパ節を回収して、リンパ節の構造を、DNase (Roche Diagnostics (Schweiz) AG、Rotkreuz、Switzerland) およびコラゲナーゼ (Roche Diagnostics (Schweiz) AG、Rotkreuz、Switzerland) 溶液中で2本の25G針を用いて壊すことにより、単細胞懸濁液を調製した。単細胞懸濁液を、骨髓腫株化細胞X63AG8.653 (マウスBALB/c骨髓腫株化細胞; ATCC受託番号: CRL1580; Kearney JFら、(1979) J. Immunol. 123(4): 1548~1550) と、7:1の比率 (融合パートナー対採集されたリンパ節細胞) で、ポリエチレングリコール1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG、Rotkreuz、Switzerland) を用いて融合した。融合細胞を、10%胎仔ウシ血清 (FBS、PAA Laboratories、Pasching、Austria)、2mM L-グルタミン、100U/ml (Biochrom AG、Germany) ペニシリン、100μg/ml ストレプトマイシン (Biochrom AG、Germany)、10mM HEPES (Invitrogen AG、Basel、Switzerland)、50μM -メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland)、HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland) および1%増殖因子 (ハイブリドカイン、Interchim/Uptima、Montluçon、France) を補ったDMEM-10培地 (Invitrogen AG、Basel、Switzerland) 中にマウスマクロファージを含有する、96ウェル平底プレートに播種した。

【0165】

融合からのおよそ800のウェルを、ヒトCCR6を認識するマウスIgGの存在について、FACSによりスクリーニングした。陽性ウェルを増殖させ、2回のサブクロニングに供した。細胞を回収し、重鎖および軽鎖をクローニングして配列決定した。

【0166】

[実施例2]

ハイブリドーマ細胞からの抗CCR6抗体のVHおよびVL鎖のクローニングおよび配列決定

RNAをハイブリドーマから単離し、cDNAに逆転写し、VHおよびVL遺伝子をPCRにより増幅した。これらのPCR産物をレスキューベクターにライゲーションし、個別のPCR産物の配列決定およびハイブリドーマのモノクローン性またはポリクローン性の決定を可能にした。この目的のために用いたpDriveベクター (Qiagen、Germany) は、挿入断片が存在しない場合にLacZ - ペプチドをコードした。このことにより、IPTGおよびX-gal含有LB寒天プレート上で青色/白色選択が可能になった (挿入断片がないコロニーは、LacZ - ペプチドによるX-galの分解のために青色であった)。白色のコロニーを増幅し、ミニプレップを行ってプラスミドを単離し、そのプラスミドはベクターにアニールする標準的なプライマー (M13rev、M13fwd、T7またはSP6) を用いて配列決定した。配列は、3つの異なるソフトウェア、Geneious、Clone ManagerおよびBioEditを用いて分析した。得られた配列を、次いで、対象の抗体の組換え発現のための発現ベクターにサブクロニングした。

【0167】

1. RNA単離

ハイブリドーマからのトータルRNAを、2~10 × 10⁶細胞から、Machere

10

20

30

40

50

y - N a g e l からの N u c e l o s S p i n R N A I I キット (G e r m a n y 、
カタログ番号 7 4 0 9 5 5) を用いて、製造者のプロトコールに従って (6 0 0 μ l R
A 1 緩衝液、カラム均質化に加えてシリンジ均質化、および溶出のための 6 0 μ l R N
アーゼフリー-H₂O (キットとともに提供される) を用いて) 単離した。

【 0 1 6 8 】

R N A 調製物の収量は、N a n o D r o p N D - 1 0 0 0 分光光度計 (T h e r m o
F i s c h e r S c i e n t i f i c 、 U S A) を用いて定量した。

【 0 1 6 9 】

2 . ワンステップ R T - P C R

上記のトータル R N A 調製物を、c D N A にさらに逆転写し、V H および V L 断片を P
C R により、縮合プライマーの 2 つの異なる混合物を用いて増幅した。それぞれの混合物
は、マウス免疫グロブリン重鎖可変断片および可変重鎖接合領域の全ての異なるサブファ
ミリーの回収、または全てのマウス免疫グロブリン軽鎖 kappa 可変断片および可変軽鎖カ
ppa 接合領域の回収を可能にした。逆転写および P C R 増幅はともに、Q i a G e n ワン
ステップ R T - P C R キット (Q i a g e n 、ドイツ、カタログ番号 2 1 0 2 1 2) を用
いて同時に行った。この技法は特異的プライマーを用いたので、それぞれの m R N A 試料
を、次いで、二重に処理して、V H または V L 断片のいずれかの個別の逆転写および増幅
を可能にした。

【 0 1 7 0 】

R N アーゼフリーに 3 0 μ l の最終容量で溶解した 2 μ g のトータル R N A を、1 0 μ
l の Q i a G e n ワンステップ R T - P C R 緩衝液の 5 × ストック溶液、2 μ l の d N T
P ミックス (1 0 m M の濃度) 、3 μ l のプライマーミックス (1 0 μ M の濃度) および
2 μ l の Q i a G e n ワンステップ R T - P C R 酵素ミックスと混合した。最終溶液を P
C R チューブに入れ、以下の設定を用いて P C R サーマサイクラー (B i o R a d i c
y c l e r バージョン 4 . 0 0 6 、 B i o R a d 、 U S A) でサイクルにかけた :

5 0 にて 3 0 分

9 5 にて 1 5 分

4 0 サイクル : 9 4 にて 3 0 秒

5 5 にて 3 0 秒

7 2 にて 1 分

7 2 にて 1 0 分

4 にて保持

【 0 1 7 1 】

3 . p D r i v e クローニング

P C R 産物を 2 % アガロースゲルに載せ、M a c h e r e y - N a g e l N u c l o
S p i n ゲルおよび P C R クリーンアップキット (G e r m a n y 、カタログ番号 7 4 0
6 0 9) を用いて、対象の産物 (およそ 4 5 0 b p) をゲルから切り出した。D N A 配列
決定のために、抽出した P C R 産物をレスキューベクター (p D r i v e ベクター、Q i
a g e n 、 G e r m a n y 、カタログ番号 2 3 1 1 2 4) にクローニングし、E . c o l i
T O P 1 0 コンピテント細胞 (I n v i t r o g e n A G 、 B a s e l 、 S w i t
z e r l a n d 、番号 C 4 0 4 0 0 6) を形質転換した。

【 0 1 7 2 】

ミニプレップ抽出

陽性コロニーを、M N 方形ウェルブロック (M a c h e r e y - N a g e l 、 G e r m
a n y . 、カタログ番号 7 4 0 4 8 8) において 1 . 5 m l L B + 1 0 0 μ g / m l ア
ンピシリン中で増幅させ、ミニプレップ抽出を、N u c l e o S p i n 9 6 プラスミド
キット (M a c h e r e y - N a g e l 、 G e r m a n y . 、カタログ番号 7 4 0 6 2 5
) を用いて行った。

【 0 1 7 3 】

4 . 配列決定

10

20

30

40

50

試料を、DNA配列決定のために、標準的なプライマーM13 rev、M13 fwd、T7またはSP6を用いるDNA配列決定サービス業者であるFasteris (Plan-les-Ouates, Switzerland) に送った。

【0174】

5. 配列分析

配列の分析のために、Geneious クローンマネージャ9 プロフェッショナル版およびBioEdit 配列アラインメントエディタ (Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95~98) を用いた。

10

【0175】

6. 組換えキメラ抗体発現のための発現ベクターのクローニング

哺乳動物細胞での組換え発現のために、単離マウスVHおよびVL断片を、アセンブリベースのPCR法を用いて、キメラ免疫グロブリンとしてフォーマットした。これらのキメラ抗体は、マウス重可変ドメインがヒトIgG1重鎖定常ドメイン(1、ヒンジ、2および3領域)と融合した重鎖と、マウス軽可変ドメインがヒトカッパ定常ドメイン(C)と融合した軽鎖とからなる。全てのキメラ抗体を、発現のための自前の哺乳動物発現ベクターpGLE X18ベクターにクローニングし、HEK-293(ATCC番号: CRL-1573)を一過的にトランスフェクトした。

20

【0176】

最も初めのキメラ(HCおよびLCのため)は、オーバーラッピングPCRにより生成した。可変部分および定常部分はともにPCRにより増幅し、次いで2回目のPCR反応により一緒に融合した。これらを、次いで、BspEI制限部位の上流にリーダーペプチドを含有する1つの自前のベクターに、インフレームでBspEI/NotIを用いてクローニングした。得られたコード配列(リーダーペプチド、可変部分、定常部分)は、HindIII/XhoI(LCのため)またはHindIII/XbaI(HCのため)を用いてpGLE X18発現ベクターにサブクローニングした。RsrII(LCのため)およびBbvCI(HCのため)についての制限部位は、抗体の可変部分と定常部分との間に、オーバーラッピングPCR中に付加した。次のキメラのために、VLおよびVHをPCRにより増幅し、LCのためにBspEI/RsrIIおよびHCのためにBspEI/BbvCIを用いて、リーダーペプチドおよび対応する定常部分を含有するpGLE X18主鎖にインフレームで直接クローニングした。

30

【0177】

逆転写および増幅のために用いたプライマーは、Microsynth、(Balga ch, Switzerland)により合成して、HPLC精製した。プライマー配列は、表1に見出すことができる。

【0178】

【表 1 - 1】

表 1

プライマーミックス VH back 100uM (100uM ストックから) (配列番号 102~120)

GTGATC gcc atg gcg teg acC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC	2μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC	2μl	10
GTGATC gcc atg gcg teg acC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC	4μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC	2μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC	4μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC	2μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC	3μl	20
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC	2μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC	2μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC	3μl	
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC	2μl	30
GTGATC gcc atg gcg teg acC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC	2μl	

プライマーミックス VH for 100uM (100uM ストックから) (配列番号 121~124)

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT	9.5μl	
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	9.5μl	
CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	9.5μl	
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT	9.5μl	40

プライマーミックス VL back 100uM (100uM ストックから) (配列番号 125~144)

GGCGGTGGC get agc GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC	2μl
GGCGGTGGC get agc CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC	2μl
GGCGGTGGC get agc GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC	3μl

【表 1 - 2】

GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC	3 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC	3 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC	4 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC	4 μ l	
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC	2 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC	2 μ l	10
GGCGGTGGCgct agc GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC	3 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT STR ATG ACC CAR TC	4 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC	4 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC	4 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA	2 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT	2 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC	2 μ l	20
GGCGGTGGC gct agc GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC	2 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC	1 μ l	
GGCGGTGGC gct agc GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC	2 μ l	
GGCGGTGGC gct agc CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC	2.8 μ l	

プライマーミックス VL back 100uM (100uM ストックから) (配列番号 145~148)

ATGCTGAC gc ggc cgc ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG	1.9 μ l	
ATGCTGAC gc ggc cgc ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG	9.5 μ l	30
ATGCTGAC gc ggc cgc ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG	9.5 μ l	
ATGCTGAC gc ggc cgc ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG	2 μ l	

【 0 1 7 9 】

表 2 に示す以下の配列決定プライマーを用いた。

【 0 1 8 0 】

【表 2】

表 2:

M13-Fwd GTAAAACGACGGCCAGT (配列番号 149)

M13-Rev AACAGCTATGACCATG (配列番号 150)

T7 TAATACGACTCACTATAGG (配列番号 151)

SP6 GATTTAGGTGACACTATAG (配列番号 152)

【 0 1 8 1 】

[実施例 3]

抗ヒトCCR6抗体の生物学的特徴決定

40

50

フローサイトメトリーによるCCR6特異的抗体検出

ハイブリドーマおよび組換え抗体候補による抗体力価、特異性および生成を、フローサイトメトリーにより決定した。簡単に述べると、ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞（これらのトランスフェクトした細胞の作製は、実施例1で詳細に説明されている）を培養し、 2×10^5 細胞を96ウェルV底プレート（TPP、Trasadingen、Switzerland）に分配し、1300rpmにて3分間遠心分離した。上清を捨て、細胞を回収し、以下に記載するようにしてフローサイトメトリーにより分析した。細胞を、50 μ lのハイブリドーマ上清または50 μ lのFACS緩衝液（PBS、2%FBS、10%Versene（Invitrogen、USA））に、5 μ g/mLのアイソタイプ対照または市販のマウス抗ヒトCCR6抗体（クローン11A9、BD Biosciences、Allschwil、Switzerland）とともに再懸濁した。細胞を30分間氷上でインキュベートし、2回洗浄し、50 μ lのFACS緩衝液に再懸濁した。1/200に希釈した抗マウスIgG-フィコエリトリン-PE（BD Biosciences、Allschwil、Switzerland）を用いて、CCR6特異的マウスハイブリドーマおよびアイソタイプ対照抗体を検出した。細胞を15分間氷上でインキュベートし、1回洗浄し、400 μ lのFACS緩衝液に再懸濁し、FACS装置（Cyan、Beckman Coulter International S.A.、Nyon、Switzerland）で分析した。図1は、様々なクローンの親のハイブリドーマ上清が、トランスフェクトしたBAF細胞の表面上で発現されるヒトCCR6タンパク質を認識する（図1A）が、偽BAF細胞上では認識しない（図1B）ことを示す。

10

20

【0182】

4H11は、以下に詳細に説明する全ての選択された組換え候補（ $n = 5$ ）のなかでも、ハイブリドーマ安定性およびよりよい機能的特性の点で他の候補よりも優れた特性を示したので、選択した。

【0183】

4H11キメラ抗体は、DiscoverxバイオアッセイにおいてCCR6媒介性細胞活性化を中和する

CCR6受容体の活性化の際にキメラ4H11が - アレスチンの動員を中和するかを決定するために、Ab Hunter抗CCR6キット（Discoverx corporation、Birmingham、UK）を用いるバイオアッセイを、製造者の仕様書に従って評価した。化学発光活性は、マイクロプレートリーダー（Biotek、USA；流通業者：WITTEC AG、Littau、Switzerland）を用いて読み取った。アッセイでは、キメラ4H11を5つの異なる濃度（20、6.7、2、0.7および0.2 μ g/ml）にて用いた。キメラIgG1アイソタイプ対照および抗CCL20（R&D Systems、Minneapolis、USA）は、それぞれ陰性および陽性対照として20 μ g/mlにて用いた。相対発光単位（RLU）のパーセンテージは、キメラIgG1アイソタイプ対照を用いる条件での化学発光シグナルを100%の発光活性とみなして算出した。図2Aは、キメラ4H11が、アイソタイプ一致対照と比較して、用量依存的な様式でCCR6受容体シグナル伝達を著しく低減することを示す。さらに、キメラ4H11は、低濃度（0.2 μ g/ml）にてまだ活性である。

30

40

【0184】

CCR6発現BAF細胞のCCL20誘導遊走の阻害

ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞の作製は、実施例1で詳細に説明されている。ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞の、ヒトCCL20に応答しての遊走を中和するキメラ4H11の能力を試験した。簡単に述べると、 1×10^6 細胞/mlにて希釈した100 μ lのBAF-CCR6を、3つの用量のキメラ4H11（10、2および0.4 μ g/ml）とプレインキュベートし、8.0 μ m孔ポリカーボネートメンブレンインサート[Corning、Chemie Brunschwig AG、Switzerland]を有する6.5mm Transwell（登録商標）の上部

50

チャンバに加えた。Transwellの下部チャンバは、500 μ lのBAF培地(10%のFCS(Amimed、Biococoncept、Allschwil、Switzerlandにより流通)を含有するRPMI-1640(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Basel、Switzerland))で10ng/mlに希釈した、組換えヒトCCL20(R&D Systems)を含有した。インキュベーションの後に、下部および上部チャンバから細胞を採集し、Guava EasyCytte HT(Millipore AG、Zug、Switzerland)を用いて計数した。キメラIgG1アイソタイプおよび抗CCL20(R&D Systems)は、それぞれ陰性および陽性対照として10 μ g/mlにて用いた。遊走比は、下部チャンバ中の細胞の数を、上部および下部チャンバ中の細胞の総数で除することにより算出した。遊走の阻害のパーセンテージは、アイソタイプ対照について観察されたもののパーセンテージとして算出した。図2Bは、キメラ4H11が、ヒトCCL20により誘導されるBAFCCR6細胞の遊走を、アイソタイプ対照と比較して、0.4 μ g/mlでさえ低減したことを証明する。

10

【0185】

[実施例4]

フローサイトメトリーによる、ヒトおよび他の動物種の末梢血単核細胞(PBMC)に対する4H11候補の結合

ヒト細胞

ヒト白血球を含有するフィルタを、LaChaux-de-Fonds、Switzerlandの血液採取センター(Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Serologie、rue Sophie-Mairet 29、CH-2300)から回収した。細胞を、10U/mlのリケミン(Drossapharm AG、Lucern、Switzerland)を含有する60mlのPBSを逆に流すことにより、フィルタから取り出した。PBMCを、次いで、製造者の使用説明に従って50ml Blood-Sep-Filterチューブ(Brunschwig、Basel、Switzerland)を用いて精製した。細胞は、FBS(PAA Laboratories、Pasching、Austria)を含むロズウェルパーク記念研究所(RPMI、PAA Laboratories、Pasching、Austria)培地で3回洗浄した。細胞を計数し、2 \times 10⁵細胞を96ウェルV底プレート(TPP、Trasadingen、Switzerland)に分配し、1300rpmにて3分間遠心分離した。細胞を回収し、以下に記載するようにしてフローサイトメトリーにより分析した。

20

30

【0186】

上記のようにして調製したヒトPBMC細胞を、50 μ lのFACS緩衝液(PBS、2%FBS、10% Versene(Invitrogen、USA))に、10 μ g/mlのキメラ4H11抗体、10 μ g/mlもしくは適当なアイソタイプ対照または10 μ g/mlの市販の抗ヒトCCR6抗体(クローンR6H9、eBioscience、Vienna、Austria)とともに再懸濁した。細胞を30分間氷上でインキュベートし、1回洗浄し、50 μ lのFACS緩衝液に再懸濁した。1/200に希釈した抗ヒトIgG-フィコエリトリン-PEおよび抗マウスIgG-フィコエリトリン-PE(BD Biosciences、Allschwil、Switzerland)をそれぞれ用いて、キメラ4H11抗体および市販の抗ヒトCCR6抗体を検出した。細胞を15分間氷上でインキュベートし、1回洗浄し、400 μ lのFACS緩衝液に再懸濁し、FACS装置(Cyan、Beckman Coulter International S.A.、Nyon、Switzerland)で分析した。

40

【0187】

カニクイザル初代細胞

カニクイザルからの全血(Eric Rouiller教授、神経生理学研究室、University of Fribourg、Fribourg、Switzerland)

50

dから得た)をクエン酸塩チューブ(BD Biosciences、Allschwil、Switzerland)に回収した。2mLのPBSを3mLの血液と混合し、混合物を10mLの85:15Ficoll:PBS混合物(GE Healthcare Europe GmbH、Glattbrugg、Switzerland)の上に重層した。試料を20分間、室温にて中断なく遠心分離した。PBMC層を回収し、PBSで3回洗浄した。細胞をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、PAA Laboratories、Pasching、Austria)、10%FBS(PAA Laboratories、Pasching、Austria)、非必須アミノ酸(PAA Laboratories、Pasching、Austria)1mMピルビン酸ナトリウム(PAA Laboratories、Pasching、Austria)、2mMウルトラグルタミン(Lonza、Belgium)、100U/mlペニシリン(Biochrom AG、Germany)、100µg/mlストレプトマイシン(Biochrom AG、Germany)に再懸濁した。細胞を計数し、 2×10^5 細胞を96ウェルV底プレート(TPP、Trasadingen、Switzerland)に分配し、1300rpmにて3分間遠心分離した。キメラ4H11、アイソタイプ対照または市販の抗ヒトCCR6非ヒト霊長類交差反応性抗体(クローン11A9、BD Pharmingen、Allschwil、Switzerland)を10µg/mLにてウェルに加えた。細胞を洗浄し、FACS緩衝液中で1/200に希釈した抗ヒトIgG-フィコエリトリン-PEおよび抗マウスIgG-フィコエリトリン-PE(BD Biosciences、Allschwil、Switzerland)を用いて、それぞれキメラ4H11抗体および市販の抗ヒトCCR6抗体を検出した。細胞を15分間氷上でインキュベートし、1回洗浄し、400µLのFACS緩衝液に再懸濁し、FACS装置(Cyan、Beckman Coulter International S.A.、Nyon、Switzerland)で分析した。図3は、キメラ4H11がヒト(図3A)およびカニクイザル(図3B)リンパ球の表面で発現されるCCR6受容体を認識でき、よって、薬物開発のために高く所望される交差反応特性を提供することを示す。

【0188】

[実施例5]

CCR6エピトープマッピング研究

本研究は、キメラ4H11mAbの結合のために重要なヒトCCR6配列(hsCCR6)の小領域および個別のアミノ酸を同定するために評価した。キメラ4H11は、マウスCCR6受容体(mmCCR6)を認識しないので、ヒトCCR6受容体のN末端領域および細胞外ループが等価なマウス領域で置き換えられたヒト-マウスハイブリッドを用いる直鎖アプローチを用いて、このmAbのエピトープを決定した。

【0189】

マウス-ヒトハイブリッドCCR6変異体の作製

hsCCR6/mmECL1と称する第1変異体は、アミノ酸105~119(hsCCR6の細胞外ループ1)がmmCCR6配列のアミノ酸97~111(mmCCR6の細胞外ループ1)で置き換えられたhsCCR6の配列に相当する。hsCCR6/mmECL2と称する第2変異体は、アミノ酸181~211(hsCCR6の細胞外ループ2)がmmCCR6配列からのアミノ酸173~203(mmCCR6の細胞外ループ2)で置き換えられたhsCCR6の配列に相当する。hsCCR6/mmECL3と称する第3変異体は、アミノ酸280~303(hsCCR6の細胞外ループ3)がmmCCR6配列からのアミノ酸272~295(mmCCR6の細胞外ループ3)で置き換えられたhsCCR6の配列に相当する。

【0190】

第1変異体hsCCR6/mmECL1について、hsECL1配列は、融合PCR(3回のPCRを用いて)によりmmECL1配列で置き換えた。

【0191】

10

20

30

40

50

1回目のPCR (PCR1) は、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1778 (NheI制限部位およびhsCCR6配列の始まりを含有する) およびリバースプライマーGlnPr1947 (hsECL1の前の24bpのhsCCR6、およびmmECL1の最初の34bpを含有する) を用いて行った。
【0192】

2回目のPCR (PCR2) は、1回目のPCRと並行し、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1948 (mmECL1の最後の33bp、およびhsECL1の後の25bpのhsCCR6を含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1779 (hsCCR6配列の端部およびXhoI制限部位を含有する) を用いて行った。

10

【0193】

3回目のPCR (PCR3) は、鋳型としてのPCR1およびPCR2 (オーバーラップ22bp) ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのGlnPr1778およびGlnPr1779を用いて行った。

【0194】

第2変異体hsCCR6/mmECL2について、hsECL2配列は、融合PCR (3回のPCRを用いて) によりmmECL2配列で置き換えた。

【0195】

1回目のPCR (PCR1) は、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1778 (NheI制限部位およびhsCCR6配列の始まりを含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1949 (hsECL2の前の28bpのhsCCR6、およびmmECL2の最初の54bpを含有する) を用いて行った。

20

【0196】

2回目のPCR (PCR2) は、1回目のPCRと並行し、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1950 (mmECL2の最後の57bp、およびhsECL2の後の25bpのhsCCR6を含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1779 (hsCCR6配列の端部およびXhoI制限部位を含有する) を用いて行った。

【0197】

30

3回目のPCR (PCR3) は、鋳型としてのPCR1およびPCR2 (オーバーラップ18bp) ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのGlnPr1778およびGlnPr1779を用いて行った。

【0198】

第3変異体hsCCR6/mmECL3について、hsECL3配列は、融合PCR (3回のPCRを用いて) によりmmECL3配列で置き換えた。

【0199】

1回目のPCR (PCR1) は、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1778 (NheI制限部位およびhsCCR6配列の始まりを含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1951 (hsECL3の前の25bpのhsCCR6、およびmmECL3の最初の46bpを含有する) を用いて行った。

40

【0200】

2回目のPCR (PCR2) は、1回目のPCRと並行し、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1952 (mmECL3の最後の44bp、およびhsECL3の後の27bpのhsCCR6を含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1779 (hsCCR6配列の端部およびXhoI制限部位を含有する) を用いて行った。

【0201】

3回目のPCR (PCR3) は、鋳型としてのPCR1およびPCR2 (オーバーラッ

50

プ18bp)ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのGlnPr1778およびGlnPr1779を用いて行った。

【0202】

3つ全ての変異体について、PCR産物をpT1ベクター(GSD980)に、ユニークNheIおよびXhoI制限部位を用いて挿入した。次いで、DNAでE. coli細菌を形質転換し、アンピシリンプレートに播種した。次の日に、変異体あたり2~4個のクローンを選択し、それらのDNAを抽出し、配列決定のためにFasterisに送った。配列決定の結果に基づいて、各変異体について1つのクローン、すなわちGSB202を用いて変異体pT1-hsCCR6/mmECL1、GSB208を用いて変異体pT1-hsCCR6/mmECL2、およびGSB206を用いて変異体pT1-hsCCR6/mmECL3を選択した。

10

【0203】

HEK細胞における一過性トランスフェクションのために3つ全ての変異体についてミディプレップを行った。

【0204】

プライマー配列:

GlnPr1778: GATCGCTAGCCACCATGAGCGGGGAATCAATGAA (配列番号153)

GlnPr1779: GATCCTCGAGTCATCACATAGTGAAGGACGACG (配列番号154)

GlnPr1947: CATCGCTGAAAACCAAGTGTGGTGGCATGAGTCACTGCCAGAATGGGAGAGT
AAG (配列番号155)

20

GlnPr1948: AACACTTGGGTTTTTCAGCGATGCACTGTGTAAATTGCTAAAAGGCATCTATGCCAT
CA (配列番号156)

GlnPr1949: CTCACAGACATCACGATCCTGCAGCTCGTATTTCTTGTGAAGATAAATGTAGGGC
TGGAGATGATGACTGACAGCCCCAC (配列番号157)

GlnPr1950: GATCGTGATGTCTGTGAGCCACGGTACAGGTCTGTCTCAGAGCCCATCACGTGGA
AGCTGCTGATGTTGGGGCTTGAGCTAC (配列番号158)

GlnPr1951: CGAGGACTTTCTCGGTGCTGCAGCTCCGGCCCACTTTGCCCGTGTGGCAGCCGTC
ACAAGCAGGACCATG (配列番号159)

GlnPr1952: GCACCGAGAAAGTCTCGCCTACACCAGGAACGTGGCCGAGGTCCTGGCTTTCTC
GCACTGCTGCCTGAAC (配列番号160)

30

【0205】

2つの他のヒト/マウス変異体を作製した。変異体4は、マウスN末端領域を含有するヒトCCR6受容体からなり、変異体5は、ヒトN末端領域を含有するマウスCCR6受容体に相当する。

【0206】

hsCCR6/mmN-termと称する変異体4は、アミノ酸1~47(第1膜貫通ドメインまでのhsCCR6のN末端)がmmCCR6配列のアミノ酸1~39(第1膜貫通ドメインまでのmmCCR6のN末端)で置き換えられたhsCCR6の配列に相当する。mmCCR6/hsN-termと称する変異体5は、アミノ酸1~39(第1膜貫通ドメインまでのmmCCR6のN末端)がhsCCR6配列のアミノ酸1~47(第1膜貫通ドメインまでのhsCCR6のN末端)で置き換えられたmmCCR6の配列に相当する。

40

【0207】

変異体hsCCR6/mmN-termについて、hsN-term配列は、融合PCR(3回のPCRを用いて)によりmmN-term配列で置き換えた。

【0208】

1回目のPCR(PCR1)は、鋳型としてのmmCCR6(GSD363)、フォワードプライマーGlnPr866(NheI制限部位およびmmCCR6配列の始まりを含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1983(mmN-term配列の端部およびhsCCR6第1膜貫通ドメインの始まりを含有する)を用いて行った。

50

【0209】

2回目のPCR (PCR2) は、1回目のPCRと並行し、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1984 (mmN-term配列の端部およびhsCCR6第1膜貫通ドメインの始まりを含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1779 (hsCCR6配列の端部およびXhoI制限部位を含有する)を用いて行った。

【0210】

3回目のPCR (PCR3) は、鋳型としてのPCR1およびPCR2 (オーバーラップ40bp)ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのGlnPr866およびGlnPr1779を用いて行った。

10

【0211】

変異体mmCCR6 / hsN-termについて、mmN-term配列は、融合PCR (3回のPCRを用いて)によりhsN-term配列で置き換えた。

【0212】

1回目のPCR (PCR1) は、鋳型としてのhsCCR6 (GSD491)、フォワードプライマーGlnPr1778 (NheI制限部位およびhsCCR6配列の始まりを含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1985 (hsN-term配列の端部およびmmCCR6第1膜貫通ドメインの始まりを含有する)を用いて行った。

【0213】

2回目のPCR (PCR2) は、1回目のPCRと並行し、鋳型としてのmmCCR6 (GSD363)、フォワードプライマーGlnPr1986 (hsN-term配列の端部およびmmCCR6第1膜貫通ドメインの始まりを含有する)、およびリバースプライマーGlnPr1987 (mmCCR6配列の端部およびXhoI制限部位を含有する)を用いて行った。

20

【0214】

3回目のPCR (PCR3) は、鋳型としてのPCR1およびPCR2 (オーバーラップ33bp)ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのGlnPr1778およびGlnPr1987を用いて行った。

【0215】

変異体4および5の両方について、PCR産物をpT1ベクター (GSD980)に、ユニークNheIおよびXhoI制限部位を用いて挿入した。次いで、DNAでE. coli細菌を形質転換し、アンピシリンプレートに播種した。次の日に、変異体あたり4個のクローンを選択し、それらのDNAを抽出し、配列決定のためにFasterisに送った。配列決定の結果に基づいて、各変異体について1つのクローン、すなわちGSB210を用いて変異体pT1-hsCCR6 / mmN-term、およびGSB215を用いて変異体pT1-mmCCR6 / hsN-termを選択した。

30

【0216】

BAF細胞を用いる安定株化細胞の樹立のために、両方の変異体についてマキシプレップを行った。

プライマー配列：

40

GlnPr866: AGAGGCTAGCCACCATGAATTCACAGAGTCCTA (配列番号161)

GlnPr1983: CAAGGAGTAGGCAATCGGTACAAATACCTTGGTGAAGTTTCTGAC (配列番号162)

GlnPr1984: AAATTCACCAAGGTATTTGTACCGATTGCCTACTCCTTGATCTG (配列番号163)

GlnPr1779: GATCCTCGAGTCATCACATAGTGAAGGACGACG (配列番号154)

GlnPr1778: GATCGCTAGCCACCATGAGCGGGGAATCAATGAA (配列番号153)

GlnPr1985: CAATTGGCACAAATAGCCTGGAGAAGTGCCTGACCTCCTG (配列番号164)

GlnPr1986: TCAGGCAGTTCTCCAGGCTATTTGTCCAAATTCCTACTC (配列番号165)

GlnPr1987: CCGCGATCCTCGAGTCATTACATGGTAAAGGACGATGCATTATCA (配列番号166)

【0217】

上記の5つ全ての変異体のまとめを、以下の表3に示す。

50

【0218】

【表3】

表3: エピトープマッピングのために用いたヒト/マウス CCR6 ハイブリッド変異体のまとめ

N 末端

hsCCR6	1	msgsannfsdvfssedyfvsvntsyysvdeemllicslqevrqfslkfpiaayalicvfgllgnilvvitfafykkarsm
mmCCR6	1	----mnteasyfgddy---dnteyysigpdhgpcaleevrnftkvtfpiaayalicvfgllgnimvvtfafykkarsm
hsCCR6/mmECL1	1	msgsannfsdvfssedyfvsvntsyysvdeemllicslqevrqfslkfpiaayalicvfgllgnilvvitfafykkarsm
hsCCR6/mmECL2	1	msgsannfsdvfssedyfvsvntsyysvdeemllicslqevrqfslkfpiaayalicvfgllgnilvvitfafykkarsm
hsCCR6/mmECL3	3	msgsannfsdvfssedyfvsvntsyysvdeemllicslqevrqfslkfpiaayalicvfgllgnilvvitfafykkarsm
hsCCR6/mmN-term	1	----mnteasyfgddy---dnteyysigpdhgpcaleevrnftkvtfpiaayalicvfgllgnilvvitfafykkarsm
mmCCR6/hsN-term	1	msgsannfsdvfssedyfvsvntsyysvdeemllicslqevrqfslkfpiaayalicvfgllgnimvvtfafykkarsm
ECL1		
hsCCR6	241	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
mmCCR6	217	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
hsCCR6/mmECL1	241	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
hsCCR6/mmECL2	241	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
hsCCR6/mmECL3	241	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
hsCCR6/mmN-term	217	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
mmCCR6/hsN-term	241	tdvylinmsiadilfvltlplfawshatqawvfnatckllkgyiainfnqalllccismdryiaivqakksfvlrert
ECL2		
hsCCR6	481	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
mmCCR6	457	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
hsCCR6/mmECL1	481	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
hsCCR6/mmECL2	481	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
hsCCR6/mmECL3	481	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
hsCCR6/mmN-term	457	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
mmCCR6/hsN-term	481	lprekiiclvwqlsviiasetfvfnqkynsqsdvcepkyqvsepirwllmgllellfgffiplmfmfeytviikt
ECL3		
hsCCR6	721	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
mmCCR6	697	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
hsCCR6/mmECL1	721	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
hsCCR6/mmECL2	721	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
hsCCR6/mmECL3	721	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
hsCCR6/mmN-term	697	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
mmCCR6/hsN-term	721	lvqaqskrhkairvliavvlvflacqiphmavllvtaaalqkmnsqqsckliqyctvteaflihcclapvlyafiq
hsCCR6	961	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*
mmCCR6	937	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*
hsCCR6/mmECL1	961	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*
hsCCR6/mmECL2	961	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*
hsCCR6/mmECL3	961	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*
hsCCR6/mmN-term	937	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*
mmCCR6/hsN-term	961	qkfrnyfikilkdlwvrrkyksqgfcagrysen-larqsetadndnaasftm*

hsCCR6 - 配列番号 71、mmCCR6 - 配列番号 72、hsCCR6/mmECL1 - 配列番号 13、hsCCR6/mmECL2 - 配列番号 15、hsCCR6/mmECL3 - 配列番号 17、hsCCR6/mmN-term - 配列番号 168、mmCCR6/hsN-term - 配列番号 170

【0219】

フローサイトメトリー

CCR6 をトランスフェクトした CHO 細胞の表面への MA b の結合は、フローサイトメトリーを用いて評価した。2 × 10⁵ 細胞を 96 ウェル V 底プレートに分配し、1300 rpm にて 3 分間遠心分離した。細胞を回収し、50 μl の容量の FACS 緩衝液中で 10 μg/ml の最終濃度にて適当な mAb とインキュベートした。細胞を 30 分間氷上でインキュベートし、2 回洗浄し、FACS 緩衝液で 1/200 に希釈した 50 μl の PE 標識 2 次抗体に再懸濁した。細胞を 15 分間氷上でインキュベートし、1 回洗浄し、400 μl の FACS 緩衝液に再懸濁し、FACS 装置 (Cyan、Beckman Coulter) でチャンネル FL-2 において分析した。図 4 の FACS 分析は、全てのトランスフェクトが市販の抗マウスまたは抗ヒト CCR6 抗体により認識されたので、CCR6 のマウス - ヒトハイブリッド変異体が細胞表面上で正しく発現されたことを示した。図 4 に示すように、キメラ 4H11 mAb は、ヒト N 末端領域を含有する全てのハイブリッド変異体を認識したが (図 A、D、E および F)、マウス N 末端領域を含有するキメラ構築物と結合せず (図 4 C)、このことは、ヒト CCR6 の N 末端領域が CCR6 とキメラ 4H11 mAb との間の相互作用に必須であることを示唆した。

【0220】

CCR6 の N 末端領域へのキメラ 4H11 mAb の結合のために重要な鍵となる残基

を同定するために、2つの他の変異体をN末端領域内で作製した。

【0221】

CCR6のN末端領域内でのマウス-ヒトハイブリッド変異体の作製

目的は、マウスCCR6 (mmCCR6)のN末端配列内の2つの小領域(「ブロック」)をそれらのヒト(hsCCR6)対応物で置き換えて、これらのハイブリッド構築物に対するキメラ4H11抗体の結合活性をFACSにより評価することであった。

【0222】

2つの異なる場所を同定し、アミノ酸3~11(mmCCR6)のブロック1およびアミノ酸21~27のブロック2と命名した。mmCCR6ブロック1 hsCCR6と称する第1変異体は、アミノ酸3~11がhsCCR6配列のアミノ酸8~16で置き換えられたmmCCR6の配列に相当する。mmCCR6ブロック2 hsCCR6と称する第2変異体は、アミノ酸21~27がhsCCR6配列のアミノ酸29~35で置き換えられたmmCCR6の配列に相当する。

10

【0223】

変異体「ブロック1」について、mmCCR6配列は、鋳型としてのmmCCR6(GSD363a)、ならびにプライマーGlnPr2188(hsCCR6配列およびNH₂制限部位を含有する)およびプライマーGlnPr2189(コドン停止およびXhoI制限部位を含有する)を用いるPCRによりhsCCR6配列で置き換えた。

【0224】

変異体「ブロック2」について、mmCCR6配列は、鋳型としてのmmCCR6(GSD363a)を用いる融合PCRによりhsCCR6配列で置き換えた。プライマーGlnPr2190(コドン開始およびNH₂制限部位を含有する)およびプライマーGlnPr2191(hsCCR6配列を含有する)を用いて、第1生成物を創出した。並行して、プライマーGlnPr2192(hsCCR6配列を含有する)およびプライマーGlnPr2193(コドン停止およびXhoI制限部位を含有する)を用いて、第2生成物を創出した。2つのPCR産物が27bpのオーバーラップを有することがわかっているため、これらを、2つの最も外側のプライマーGlnPr2190(コドン開始およびNH₂制限部位を含有する)およびGlnPr2193(コドン停止およびXhoI制限部位を含有する)とともに2回目のPCRのための鋳型として用いた。

20

30

【0225】

両方の変異体(「ブロック1」および「ブロック2」)について、PCR産物をpT1ベクター(GSD980)に、ユニークNH₂およびXhoI制限部位を用いて挿入した。次いで、DNAでE. coli細菌を形質転換し、アンピシリンプレートに播種した。次の日に、変異体あたり4個のクローンを選択し、それらのDNAを抽出し、配列決定のためにFasterisに送った。配列決定の結果に基づいて、各変異体について1つのクローン、すなわちGSA32を用いて変異体pT1-mmCCR6ブロック1 hsCCR6およびGSA33を用いて変異体pT1-mmCCR6ブロック2 hsCCR6を選択した。

【0226】

CHO細胞の一過性トランスフェクション

PEI試薬を用いてCHO細胞にmmCCR6変異体をトランスフェクトした。このために、トランスフェクションの前日に、 $1 \cdot 10^6$ 細胞/mLの細胞密度が得られるよう細胞を分けた。トランスフェクションの日に、細胞をスピンドウンし、 $2 \cdot 10^6$ 細胞/mLの細胞密度($10 \cdot 10^6$ 細胞をスピンドウンしなければならなかった)まで5mLのトランスフェクション培地(GibcoからのOpti-MEM)に再懸濁した。 $12 \cdot 5 \mu\text{g}$ のDNAを250 μL の150mM NaClに加えた。並行して、 $25 \mu\text{g}$ のPEIを250 μL の150mM NaClに加えた。両方の溶液を混合し、RTにて10分間インキュベートして、複合体を形成させた。DNAカクテルを細胞に注ぎ、細胞を振とう器(105rpm、5%CO₂)上で37℃にて4~5時間インキュベートした。

40

50

5 mLの成長培地(4 mMグルタミンを含有するLonzaからのPower CHO 2)を細胞に加えて、 1.10^6 細胞/mLの最終密度を得た。最後に、細胞を振とう器(37、105 rpm、5% CO₂)上で4日間インキュベートした後にFACSで分析した。

【0227】

図5からの結果は、キメラ4H11が、マウスCCR6受容体中にヒトブロック1を含有する変異体1と結合したが、マウスCCR6受容体中のヒトブロック2配列を含有する変異体2と結合しなかったことを示す。よって、4H11のエピトープは、ヒトCCR6受容体のN末端領域内、より正確には8位のPheと16位のGluとの間の9残基で構成される配列内にある。

【0228】

N末端ヒト/マウスハイブリッド構築物のまとめを以下の表4に示す。

【0229】

【表4】

表4: エピトープマッピングに用いたハイブリッドヒト/マウスN末端CCR6配列のまとめ

HsCCR6 N末端	MNFS SDV FDSS DYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEVROFSRL
MoCCR6 N末端	MNSTESYFGTDDYDNT EYYS PPDHGPCSLEEVRNFTKV
変異体 mmCCR6 ブロック 1	ヒト マウス MNFS SDV FDSS DYDNT EYYS PPDHGPCSLEEVRNFTKV
変異体 mmCCR6 ブロック 2	マウス ヒト MN STESY FGTDDYDNT EYYS VDSEMLCSLEEVRNFTKV

hsCCR6 N末端配列 - 配列番号 172、mmCCR6 N末端配列 - 配列番号 174、変異体 mmCCR6 ブロック 1 hsCCR6 - 配列番号 180、変異体 mmCCR6 ブロック 2 hsCCR6 - 配列番号 185

【0230】

[実施例6]

マウスモノクローナル抗体4H11のヒト化

ヒトアクセプターフレームワーク、逆変異、ならびにヒトCDRグラフト化アクセプターフレームワークの結合特性を実質的に保持および/または改善する変異の選択を含む、抗ヒトCCR6マウス抗体4H11のヒト化についてここに記載する。

【0231】

再整形した可変領域の設計

相同性一致を用いて、4H11 CDRにグラフトするヒトアクセプターフレームワークを選択した。データベース、例えばヒトおよびマウスの免疫グロブリン遺伝子座からの生殖系列可変遺伝子のデータベース(IMG Tデータベース、既出)もしくはVBASE 2(Retter Iら、(2005)Nucleic Acids Res. 33、データベース版D671~D674)もしくはKabataデータベース(Johnson Gら、(2000)Nucleic Acids Res. 28:214~218)または出版物(例えばKabata EAら、既出)を用いて、マウス重鎖および軽鎖V領域(それぞれ配列番号7および8)が属するヒトサブファミリーを同定し、アクセプター分子として用いるために最もよくフィットするヒト生殖系列フレームワークを決定できる。アクセプターとして用いるためのこれらのサブファミリー内での重鎖および軽鎖可変配列(

VHおよびVL)の選択は、配列相溶性および/またはグラフト後に6つのCDRの適当な相対的提示を保存する助けとなるCDR1およびCDR2領域の構造の一致に基づくことができる。

【0232】

例えば、IMGTデータベースを用いることにより、4H11重鎖可変ドメインフレームワークとヒト重鎖可変ドメインサブファミリー3のメンバーとの間の良好な相溶性が示される。CDRおよびフレームワーク配列両方の最高の相溶性および同一性は、生殖系列配列：IGHV3-11*04(配列番号77)、IGHV3-11*01(配列番号78)、IGHV3-48*03(配列番号79)、IGHV3-23*04(配列番号80)およびIGHV3-66*04(配列番号81)について観察され、これらは全て、CDR3までの配列全体について74%を超える配列同一性を有した。IGHV3-11*04およびIGHV3-11*01は、76%の配列同一性を示し、IGHV3-48*03およびIGHV3-23*04は、75%の配列同一性を示した。IGHV3-23*04を、その安定性のために、VHフレームワークとして選択した。

10

【0233】

同じアプローチを用いて、4H11軽鎖可変ドメイン配列は、ヒト軽鎖可変ドメインカッパサブファミリー2のメンバーと良好な相溶性を示した。CDRおよびフレームワーク配列両方の最高の相溶性および同一性は、以下の生殖系列配列について観察された：IGKV2-30*02(配列番号82)およびIGKV2-30*01(配列番号83)は、それぞれ82%および81%の最高の同一性を示し、全て78%を超える配列同一性を示したIGKV2D-30*01(配列番号84)、IGKV2-29*02(配列番号85)およびIGKV2-29*03(配列番号86)からなる別の群が僅差で続いた。

20

【0234】

ヒト化プロセスの開始点として、ヒトIGHV3-23*04(配列番号80)およびIGKV2-30*02(配列番号82)可変ドメインを、4H11 CDRへのアクセプターとして選択した。ヒトガンマ1アイソタイプの第1ヒト化抗体を調製した(以下を参照されたい)。抗体は、ヒト-マウスハイブリッド重鎖可変ドメインおよびヒト-マウスハイブリッド軽鎖可変ドメインを包含した。前記ハイブリッド重鎖可変ドメインは、生殖系列CDR1および2がそれぞれ4H11重鎖CDR1および2を置き換えているヒト重鎖可変ドメインIGHV3-23*04に基づいた。ヒトアクセプターフレームワークと最良に一致するJHセグメント配列を、上記のIMGT検索から同定した。得られたヒト-マウスハイブリッド重鎖可変配列はヒトIGHV3-23*04フレームワーク領域、4H11マウスCDRおよび最良に一致するJHセグメントを有する。同様に、ヒト-マウスハイブリッド軽鎖可変ドメインは、ヒトIGKV2-30*02フレームワーク領域、4H11マウスCDRおよびヒトアクセプターと最良に一致するJKを有する。ヒトアクセプターフレームワーク上にCDRを収容するために、ヒト残基をマウス残基に置換することにより、鍵となる位置を改変した。このプロセスは逆変異とよばれ、モノクローナル抗体のヒト化において最も予測不可能な手順である。これは、親和性を保存し、同時にヒト化抗体における免疫原性の可能性を最小限にするために、保持する必要があるマウス抗体からの重要なフレームワーク残基の同定および選択を必要とする。

30

40

【0235】

CDR高次構造および/または可変ドメイン間パッキングに最も影響を与え得る残基を同定するために、可変ドメインのヒト-マウスハイブリッドVH1-VL1ペアの3Dモデルを、自動化モードに設定した構造相溶性モデル化サーバSWISS-MODEL(Arnold Kら、(2006)Bioinformatics、22(2):195~201;http://swissmodel.expasy.org)を用いて算出した。モデル分析により、CDR領域および/または重鎖-軽鎖可変ドメインパッキングに対する影響の推定に基づく位置の部分集合を選択できた。この位置の部分集合は、可変重鎖位置:24および49、ならびに可変軽鎖位置:36および46(Kabat番号付け)からなった。

50

【0236】

新しく設計した可変ドメインは、本明細書において、配列番号75を有する重鎖可変ドメインVH1、および配列番号38を有する軽鎖可変ドメインVL1という。VH1およびVL1を包含する第1ヒト化抗体は、本明細書においてVH1/VL1抗体と省略する。

【0237】

第1ヒト化抗体プロトタイプの生成

VH1およびVL1についてのコードDNA配列(cDNA)を、scFvフォーマットにおいてGENEART AG(Regensburg, Germany)により合成して、そのことにより、単一cDNA配列が両方の可変ドメイン(配列番号167)を包含することを可能にした。個別の可変ドメインcDNAは、このscFv構築物からPCRにより引き出し、PCRアセンブリ技法を用いて、それらのそれぞれの定常ドメインcDNA配列(複数可)の上流でさらに組み立てた。最後に、完全重鎖および軽鎖cDNAを、CMVプロモーターおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを有する改変pcDNA3.1ベクター(Invitrogen, CA, USA)に基づく独立ベクターにライゲーションした。軽鎖特異的ベクターは、対象の軽鎖可変ドメインcDNAをカップ軽鎖定常ドメインcDNAの前にBamHIおよびBsiWI制限酵素部位を用いてライゲーションすることにより、ヒトカップアイソタイプ軽鎖の発現を可能にしたが、重鎖特異的ベクターは、工学改変して、対象の重鎖可変ドメインcDNAを、ヒトIGHG1CH1、IGHG1ヒンジ領域、IGHG1CH2およびIGHG1CH3定常ドメインをコードするcDNA配列の前に、BamHIおよびSalI制限酵素部位を用いてライゲーションできるようにした。重鎖および軽鎖両方の発現ベクターにおいて、分泌は、BamHI部位を含有するマウスVJ2リーダーペプチドにより駆動した。BsiWI制限酵素部位はカップ定常ドメイン中にあり、SalI制限酵素部位はIGHG1CH1ドメイン中に見出される。

【0238】

VH1/VL1抗体(配列番号173の重鎖および配列番号30の軽鎖を有する)は、等量の重鎖および軽鎖ベクターを、ポリエチレンイミン(PEI, Sigma, Buchs, Switzerland)を用いて、懸濁馴化HEK293-EBNA1細胞(ATCC(登録商標)カタログ番号:CRL-10852)に同時トランスフェクトすることにより、一過的に生成した。典型的には、1mlあたり80~120万の細胞の密度の100mlの懸濁された細胞に、50μgの重鎖をコードする発現ベクターと50μgの軽鎖をコードする発現ベクターとを含有するDNA-PEI混合物をトランスフェクトする。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが宿主細胞に導入されると、細胞を4~5日の期間さらに培養して、0.1%プルロニック酸、4mMグルタミンおよび0.25μg/mlジェネテシンを補った培養培地(EX-CELL293, HEK293血清フリー培地; Sigma, Buchs, Switzerland)への分泌を可能にすることにより、抗体を生成する。

【0239】

VH1/VL1抗体を、無細胞上清から、組換えプロテインAストリームライン媒体(GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland)を用いて精製し、アッセイの前にリン酸塩緩衝食塩水に緩衝液交換した。

【0240】

ヒトCCR6を発現するCHO細胞に対する細胞ELISA

ヒトCCR6をトランスフェクトしたCHO細胞を、実施例1に記載するようにして作製した。CHO細胞で発現するCCR6とのヒト化候補の相互作用を検出するために、細胞ELISAを開発した。簡単に述べると、96ウェルマイクロタイタープレート(Costar, USA; 流通業者VWR AG, Nyon, Switzerland)をPBS中1μg/mlでの100μlのポリDリシン(Sigma-Aldrich Che

10

20

30

40

50

mie GmbH, Buchs, Switzerland) で被覆し、4 にて一晚インキュベートした。次の日に、プレートを洗浄し、CCR6 発現 CHO 細胞を 1300 rpm にて 3 分間遠心分離し、10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2 mM L-グルタミン (Lonza, Leuven, Belgium)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Biochrom AG, Berlin, Germany) を補ったダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria) 中、 1×10^6 細胞/ウェルで 37 °C、5% CO₂ にて一晚播種した。次の日に、細胞を様々な濃度 (10 ~ 0.0137 µg/ml の範囲) のヒト化 4H11 候補と、室温にて 1 時間インキュベートした。細胞インキュベーションの後に、試料を、10% FCS を含有する DMEM で 3 回洗浄し、4% の PFA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) を含有する 50 µl の PBS で、室温にて 15 分間固定した。細胞を、2% BSA (ウシ血清アルブミン、PAA Laboratories, Pasching, Austria) を含有する PBS で洗浄し、200 µl の同じ緩衝液を用いて室温にて 1 時間ブロッキングした。試料を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ヒト IgG Fc 断片特異的 - HRP (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, UK) とインキュベートした。細胞を、2% BSA を含有する PBS で 5 回洗浄し、プレートを TMB 基質 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) とインキュベートして、抗体結合を明らかにした。吸光度をマイクロプレートリーダー (Biotek, USA; 流通業者: WITTEC AG, Littau, Switzerland) により読み取った。

【0241】

マウスからヒト残基への逆変異

VH1/VL1 抗体はキメラ抗体に匹敵する結合を導いたので、VH1 および VL1 をさらなる突然変異誘発の開始点として用いた。4H11 の免疫原性を低減するために、VH 中の 24 位および 49 位ならびに VL 中の 36 位および 46 位のフレームワークマウス残基をヒト残基に逆変異させることにより、さらなるヒト化候補を設計した。さらなるバリエーションは、マウス残基であるトレオニンがヒト残基であるセリンで置換された、62 位での CDR H2 における保存的変異を含む。

【0242】

抗体発現および精製は、上記の方法に従った。ヒト化抗体候補は、それらの結合について、以前に記載するようにして細胞 ELISA によりアッセイした。

【0243】

図 6 は、ヒト化バリエーションのうちで VH5/VL1 抗体が、CHO 発現ヒト CCR6 に対して他の候補と同様またはそれらよりもよい結合を示したことを示す。同様に、図 7 は、VH5/VL1 抗体が、Ab Hunter 抗 CCR6 バイオアッセイに対して他の候補と同様またはそれらよりもよい阻害機能を示すことを示す。さらに、VH5 (配列番号 37) は、ヒトフレームワークIGHV3-23*04 (配列番号 80) と 89.5% の配列同一性の最高の同一性を有し、より低い免疫原性リスクをもたらした。

【0244】

示差走査熱量分析による、選択されたヒト化抗 CCR6 抗体の耐熱性

ヒト化抗体の耐熱性を、示差走査熱量分析 (DSC) を用いて測定した。モノクローナル抗体融解プロファイルは、それらのアイソタイプの特徴である (Garber E および Demarest SJ (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 751~7) が、FAB 断片の中間融解温度は、全長 IgG の関係においてさえ容易に同定できる。FAB 部分のこのような中間融解温度を用いて、ヒト化候補のモノクローナル安定性をモニタリングした。

【0245】

熱量測定を、VP-DSC 示差走査微小熱量計 (GE Healthcare Eur

10

20

30

40

50

ope GmbH)で行った。セル容量は0.128mlであり、加熱速度は200/hであり、過圧は65 p.s.iに維持した。全ての抗体を、PBS (pH 7.4)中で1mg/mlの濃度にて用いた。抗体のモル熱容量は、抗体を除いた同一の緩衝液を含有する2重の試料との比較により見積もった。部分モル熱容量および融解曲線を、標準的な手順を用いて分析した。サーモグラムをベースライン補正し、濃度を標準化した後に、ソフトウェアOrigin v7.0において非2状態モデル〔Non-Two State model〕を用いてさらに分析した。

【0246】

ヒト化バリエーションVH5/VL1 FAB断片は、密に折りたたまれたFAB断片について通常観察される協同的アンフォールディングと一致する形状および振幅を備えた、79.4の単一の転移を示し、これは工学改変プロセスがFAB安定性をうまく保持したことを指し示している。全体的に、ヒト化バリエーションは、良好な熱安定性を示した。

【0247】

【表5】

表5:ヒト化抗ヒトCCR6抗体

抗体バリエーション (IGHG1)	配列番号	逆変異 VH/VL	EC50	DSC (°C)
キメラ	175/176	-	1.89	76.1
H1/L1	173/30	-/-	1.27	78.7
H1/L2	173, 186	-/Y36F	1.42	77.2
H1/L3	173, 187	-/Y36F-R46L	ND	76.9
H2/L1	183, 30	T24A/-	0.3195	79.6
H2/L2	183, 186	T24A/Y36F	1.93	77.9
H2/L3	183, 187	T24A/Y36F-R46L	ND	76.5
H3/L1	184, 30	A49S/-	0.84	77.2
H3/L2	184, 186	A49S/Y36F	1.04	76
H3/L3	184, 187	A49S/Y36F-R46L	ND	76
H5/L1	37, 30	T24A-A49S-T62S/-	0.95	79.4

【0248】

上記の表に記載するH5/L1抗体は、IgG1フォーマットとしてフォーマットし、ヒンジ安定化ヒトIgG4としてもフォーマットして、非細胞傷害性抗CCR6ヒト化抗体を創出した。

【0249】

[実施例7]

ヒトおよびカニクイザルの両方の種からのCCR6の可溶性N末端領域に対する4H11ヒト化候補の結合活性の試験

キメラ4H11のエピトープはCCR6のN末端領域に局在しているため、このN末端

断片に対応する可溶性ペプチドを作製して、ヒトおよびカニクイザルの両方の種における 4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 4 H S 候補の親和性を評価するために用いた。可溶性 N 末端ペプチド領域は、以下のようにして作製した。

【 0 2 5 0 】

ヒトおよびカニクイザル C C R 6 の N 末端と I g G 1 アイソタイプのヒト F c との可溶性融合構築物の発現

ヒト C C R 6 の N 末端の可溶性融合構築物のクローニング：

ヒト C C R 6 の N 末端の可溶性融合構築物をコードする DNA は、L i f e T e c h n o l o g y (G e n e A r t (登 録 商 標) ; C a r l s b a d , C A) に注文した。アミノ酸構築物は、まず、シグナルペプチドをヒト C C R 6 の細胞外 N 末端 (s w i s s p r o t 受入番号 P 5 1 6 8 4 におけるアミノ酸 1 ~ 4 7) と融合することにより設計した。この構築物を、配列番号 [正しい番号についてヒト C C R 6 - F c を参照されたい] に示すように、ヒト I g G 1 アイソタイプの F c 部分 (s w i s s p r o t 受入番号 P 0 1 8 5 7 におけるアミノ酸 1 0 4 ~ 3 3 0) と、改変グリシンリンカー (G G G G T) を介して連結した。Gene Art は、このアミノ酸を DNA 配列に逆翻訳し、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームの 5 ' に N h e I 制限部位および K o z a k 配列を、そして 3 ' に X h o I 制限部位を付加した。この構築物を、プラスミド 1 3 A B R C 6 P にクローニングし、G l e n m a r k に届けた。

10

【 0 2 5 1 】

プラスミド 1 3 A B R C 6 P を、N h e I / X h o I を用いて切断し、挿入断片を、同じ酵素を用いて M C S で切断し、かつ再開環を防ぐために C I P 処理した p G L E X 1 8 (ヒト C M V プロモーターおよび o r i P エLEMENT の制御下の発現カセットを有する、G l e n m a r k が所有権を持つベクター) の主鎖にクローニングした。得られた構築物を p G L E X 1 8 - h s C C R 6 - N t e r - F c と命名し、配列決定 (F a s t e r i s , G e n e v a , S w i t z e r l a n d) により確認した。

20

【 0 2 5 2 】

カニクイザル融合構築物のクローニングのための手順は、同様であった。L i f e T e c h n o l o g i e s に注文した融合構築物は、カニクイザル C C R 6 の細胞外 N 末端 (s w i s s p r o t 受入番号 G 7 M R 7 2 におけるアミノ酸 6 ~ 5 2) のみが異なっており、プラスミド Gene Art 配列 # 3 1 に送達およびクローニングされた。最終構築物を p G L E X 1 8 - c y n o C C R 6 - N t e r - F c と命名し、配列決定 (F a s t e r i s , G e n e v a , S w i t z e r l a n d) により確認した。

30

【 0 2 5 3 】

発現：

懸濁 H E K 2 9 3 - E B N A 細胞に発現ベクターを、1 5 0 m l の培地を用いて 1 L の S c h o t t 瓶でポリエチレンイミン (J e t P E I (登 録 商 標) , P o l y p l u s - t r a n s f e c t i o n , I l l k i r c h , F r a n c e) を用いてトランスフェクトした。この目的のために、指数的に成長している細胞を、7 5 m L の O p t i M E M 培地 (# 3 1 9 8 5 - 0 4 7 , I n v i t r o g e n) 中に 8 E 6 細胞 / m L の密度にて播種した。Jet PEI (登録商標) : DNA 複合体を、3 (μ g / μ g) の重量比にて細胞に加えた。細胞懸濁液中の最終 DNA 濃度は、2 . 5 μ g / m L であった。3 7 ° C にて振とう (2 0 0 r p m) しながら 5 時間のインキュベーションの後に、7 5 m L の新鮮培養培地を細胞懸濁液に加えた。次いで、細胞を、3 7 ° C 、 5 % C O 2 および湿度 8 0 % にて 5 日間、振とうプラットフォーム上で採集までインキュベートした。細胞の上清を 0 . 2 μ m フィルタを用いて清澄にし、プロテイン A を用いてタンパク質を精製した。

40

配列番号 1 8 8 [ヒト C C R 6 - F c]

METDTLLLWVLLLVPGSTGMSGESMNFSDVFDSSSEDYFVSVNTSYYSVD
SEMLLCSLQEVRFQFSRLGGGGTDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV

50

YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 配列番号 189 [カニクイザル C C R 6 - F c]
 METDTLLLVWLLLWVPGSTGMSGESMNFSDVFDSEDFASVNTSYTVD
 SEMLLCTLHEVRQFSRLGGGTDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLMI SRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 2 5 4 】

E L I S A :

結合 E L I S A を行って、ヒトおよびカニクイザル種からの C C R 6 の N 末端領域からなるペプチドに対する、4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 1 および 4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 4 H S 抗体の反応性を試験した。簡単に述べると、96 ウェルマイクロタイタープレート (Costar USA、流通業者 VWR AG、Nyon、Switzerland) を、PBS 中 2 μg/ml にて 100 μl の組換えヒトおよびカニクイザル N 末端ペプチド - Fc で被覆した。プレートを 4 にて一晩インキュベートし、次いで、PBS 2% BSA (ウシ血清アルブミン、PAA Laboratories、Pasching、Austria) で室温 (RT) にて 1 時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、様々な濃度の 4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 1 および 4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 4 H S を加えた。プレートを RT にて 1 時間インキュベートし、次いで、PBS 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland) および ヤギ抗ヒト I g F (a b ') 2 断片特異的 - HRP (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd、Newmarket、UK) で 6 回洗浄した。洗浄の後に、プレートを TMB 基質 (Bio-Rad Laboratories AG、Reinach、Switzerland) とインキュベートして、抗体結合を明らかにした。2 M H₂SO₄ を加えることにより反応を停止し、光学密度を 450 nm (OD 450 nm) にて Synergy HT 2 分光光度計 (Biotek、USA; 流通業者: WITTEC AG、Littau、Switzerland) で読み取った。図 8 は、4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 1 および 4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 4 H S 抗体が、ヒト (図 8 A) およびカニクイザル (図 8 B) の両方の種からの C C R 6 の N 末端領域に対応する N 末端ペプチドを同様に認識することを示す。

【 0 2 5 5 】

表面 プラスモン 共鳴 (SPR) による動的結合親和性定数 :

動的結合親和性定数 (KD) を、Fc - 融合 hu C C R 6 N 末端および cyno C C R 6 N 末端ペプチド上で、4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 4 h s 抗体を分析物として用いて測定した。比較のために、4 H 1 1 V H 5 / V L 1 I g G 1 抗体および キメラ 4 H 1 1 抗体を用いて同様の測定を行った。測定は、BIAcore 2000 (GE Healthcare - BIAcore、GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland) で室温にて行い、2 価分析物動的親和性モデルを用いる B i a E v a l u a t i o n ソフトウェア (BIAcore; v 4.1、GE Healthcare Europe GmbH) を用いて分析した。

【 0 2 5 6 】

C M 5 研究グレードセンサチップ (GE Healthcare Europe GmbH; 参照番号 BR - 1000 - 14) を、35 μl の 1 : 1 N - ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) / 1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 溶液 (v/v; 5 μl/分の流速; 流路 1 および 2 にて) を注入することにより活性化した。Fc - 融合ヒトまたはカニクイザル C C R 6 N 末端ペプチド

10

20

30

40

50

を、酢酸緩衝液 pH 4.5 (GE Healthcare Europe GmbH、BR-1003-50; pI より 1 pH 単位低い) 中で 25 nM の最終濃度まで希釈し、その後、予め活性化した CM5 センサチップ上に、20 μ l を両方の流路 1 および 2 に注入することにより (5 μ l / 分) (これは、およそ 300 応答単位 (RU) に相当する) 固定化した。CM5 センサチップと結合したヒトまたはカニクイザル CCR6 N 末端ペプチドを、次いで、35 μ l のエタノールアミン溶液を注入することにより (5 μ l / 分) 不活性化した。最後に、3 M MgCl₂ 溶液 (GE Healthcare Europe GmbH、参照番号 BR100839) を 2 回注入して、架橋されていない Fc-融合ペプチドを遊離させた。

【0257】

親和性測定のために、1 x PBS 緩衝液中で貯蔵した組換え 4H11 抗体を、HBS-EP 緩衝液 (GE Healthcare Europe GmbH、参照番号 BR-1001-88; 0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、EDTA 3 mM、0.005 % サーフアクタント P20、pH 7.4) 中で希釈し、異なる濃度 (3.8 nM ~ 1 μ M) にて流路 1 および 2 (流路 1 は参照として用いる) に 30 μ l / 分の流速で 4 分間注入した後に、ランニングバッファー中で 10 分間の解離期間を設けた。それぞれの結合事象の後に、表面を、3 M MgCl₂ で 10 秒間 (30 μ l / 分の流速) 再生した。

【0258】

測定 (センサーグラム: fc2 ~ fc1) は、2 価分析物モデルと最もよくフィットした。測定は、参照のためのゼロ濃度試料を含んだ。このモデルは、2 つの平衡解離定数のセット、そして 2 つの KD 値である KD1 および KD2 の決定を導く、2 つの一連の反応に結合データをフィットさせる。in vivo で生じる IgG とその膜結合標的との間の相互作用を模倣する、動的データを決定するために用いたフォーマットにより、見かけの親和性を増加するアビディティが可能になる。

【0259】

カイ 2 値は、各点での実験データと参照データとの間の差の 2 乗和を表すが、残差のプロットは、フィットにおけるそれぞれの点の実験データと参照データとの間の差を示す。カイ 2 および残差の両方の値を用いて、実験データと個別の結合モデルとの間のフィットの質を評価した。

【0260】

図 9 は、4H11 VH5/VL1 IgG4hs 抗体が、Fc-融合ヒトおよびカニクイザル N 末端ペプチドを、それぞれ 1.56 nM および 4.67 nM の KD 値で認識することを示す。

【0261】

キメラヒト-マウス CCR6 構築物をトランスフェクトした BAF 細胞の CCL20 誘導遊走の阻害:

図 8 および図 9 に示すように、4H11 VH5/VL1 IgG4HS は、CCR6 受容体の N 末端部分を特異的に認識する。CCR6 の N 末端領域の生物学的機能をさらに探索するために、ヒト N 末端領域を含有するハイブリッドマウス CCR6 またはマウス N 末端領域を含有するヒト CCR6 のいずれかでトランスフェクトした BAF 細胞を、阻止する抗マウス CCR6 または 4H11 VH5/VL1 IgG4HS の存在下で用いた。遊走アッセイは、実施例 3 に記載したプロトコールに従って評価した。図 10 からの結果は、4H11 VH5/VL1 IgG4HS が、トランスフェクトした BAF 細胞のヒト CCL20 媒介性遊走を中和できたが、マウス N 末端領域を含有するヒト CCR6 受容体を BAF 細胞のマウス CCL20 媒介性遊走は中和しなかったことを示す。よって、この抗体は、CCR6 の N 末端領域が媒介する生物学的機能を特異的に阻止した。対照として、阻止するラット抗マウス CCR6 抗体 (R&D Systems、クローン 140706) を 10 μ g / ml の最終濃度にて用いた。

【0262】

CCL20 - CCR6 相互作用の阻害：

4H11 VH5/VL1 IgG4HSがCCL20 - CCR6相互作用の直接の阻害によりCCR6媒介性生物学的機能を中和するかを決定するために、フローサイトメトリーアプローチを用いるアッセイをセットアップした。簡単に述べると、CCR6をトランスフェクトしたBAF細胞を計数し、0.1%のアジ化物を含有するFACS緩衝液で 1×10^6 細胞/mlに希釈した。100 μ lのこれらの細胞を、次いで、FACS緩衝液0.1%アジ化物で希釈した様々な濃度の4H11 VH5/VL1 IgG4HSと4にて20分間インキュベートした。インキュベーションの後に、細胞を遠心分離し、2回洗浄し、0.1%のアジ化物を含有するFACS緩衝液で希釈した固定濃度(0.5 μ g/ml)の組換えCCL20(R&D systems)と20分間インキュベートした。次いで、CCL20を、FACS緩衝液+0.1%アジ化物でそれぞれ1 μ g/mlおよび1/100に希釈したビオチン化抗ヒトCCL20(R&D Systems、クローンBAF360)、続いてアロフィコシアニン(APC)標識ストレプトアビジンを用いて検出した。細胞を、FACS緩衝液、0.1%アジ化物で2回洗浄し、試料をフローサイトメトリーにより分析した。CCR6へのCCL20の結合の相対パーセンテージを、キメラIgG1アイソタイプ対照を用いる条件での蛍光シグナルを100%の蛍光活性とみなして算出した。図11は、4H11 VH5/VL1 IgG4HSが、CCR6受容体へのCCL20の結合シグナル伝達を、アイソタイプ一致対照と比較して、用量依存的な様式で著しく低減することを示す。さらに、4H11 VH5/VL1 IgG4HSは、低濃度(0.5 μ g/ml未満)にてまだ活性である。

【0263】

[実施例8]

2価および1価4H11 VH5/VL1の結合および中和能力の評価

結合アッセイにおける2価および1価VH5/VL1 mAbの試験

2価VH5/VL1 IgG1(配列番号10および30)および1価BEAT(登録商標)VH5/VL1抗体(配列番号218、219および220)の結合活性を、ヒトCCR6全長タンパク質をトランスフェクトしたBAF細胞を用いて、実施例3に記載したプロトコールに従って、フローサイトメトリーにより評価した。アッセイでは、トランスフェクトした細胞を、様々な濃度の両方の抗体(3~0.01 μ g/mlの範囲)とインキュベートした。1/200に希釈した抗ヒトH+L-フィコエリトリン-PE(BD Biosciences, Allschwil, Switzerland)を2次抗体として用いて、2価IgG1および1価BEAT(登録商標)抗体分子両方を検出した。図12は、IgG1およびBEAT(登録商標)VH5/VL1抗体がともに、細胞表面上のCCR6を用量依存的な様式で認識したことを示す。しかし、2価VH5/VL1抗体は、1価断片と比較してよりよい結合プロファイルを示し、前者は、後者よりも高い最大結合活性を示した。

【0264】

CCL20媒介性遊走バイオアッセイにおける2価および1価VH5/VL1 mAbの試験

1価BEAT(登録商標)VH5/VL1および2価VH5/VL1 IgG1抗体の中和効率を評価および比較するために、両方の分子を異なる濃度(50~0.4 μ g/mlの範囲)にて、実施例3に詳細に説明したプロトコールに従って走化性アッセイにおいて試験した。図13に示すように、1価VH5/VL1抗体は2価フォーマットと比較して活性の低減を示したが、試験した抗体はともに、アイソタイプ対照と比較して細胞遊走の低減を示した。

【0265】

まとめると、図12および13からの結果は、2価分子と比較して結合および機能的効果が低減しているにもかかわらず、1価抗体であるVH5/VL1がまだ活性であることを示す。これらの観察結果は、2重特異性抗体のような1つより多い抗原と結合できる抗体の成分としてのVH5/VL1の使用を支持する。

【0266】

[実施例9]

ヒト化VH5/VL1抗体の工学改変
親和性成熟

ヒトCCR6のN末端領域についてのVH5/VL1親和性を、ファージディスプレイによりさらに工学改変した。ファージディスプレイを用いる親和性成熟抗体への技術は知られている(Benhar I (2007) Expert Opin Biol Ther., 7(5):763~79)。VH5/VL1抗体遺伝子配列をscFv断片としてディスプレイのためにフォーマットし、多様性を部位特異的の変異導入により導入した。

【0267】

2つの異なるファージライブラリーを構築した。第1ファージライブラリーは、CDR-H2(Kabat残基52、53、56および58においてNNKコドンを用いる)において多様化し、他のCDRは変更しなかった。第2ファージライブラリーは、CDR-L3(Kabat残基92、93および94においてNNKコドン、Kabat残基96は、5つの異なるオリゴヌクレオチドのミックスによりLeu、Phe、Ile、TyrおよびTrpに多様化した)において多様化し、他のCDRは変更しなかった。得られた親和性成熟ライブラリーは、 $> 2 \times 10^7$ の多様性を有し、ビオチン化抗原(ヒトIgG1Fc断片と融合したヒトCCR6のN末端領域)およびストレプトアビジン捕捉を用いる3回の選択を行った。抗原濃度は3回の間に低下させ(1回目:50nM、2回目:5nMおよび3回目:0.5nM)、非ビオチン化抗原を用いる競合ステップを加えて、高親和性バリエーションを選択した(2回目および3回目において1 μ M)。親和性成熟scFv候補は、融合タンパク質上の結合オフレートの改善について表面プラスモン共鳴(SPR)により評価した(図14)。CDR-H2ライブラリーからのバリエーションは、オフレート改善が全くないかまたは穏やかなだけであったが、CDR-L3ライブラリーからのバリエーションは、穏やかから著しいオフレート改善を示した。

【0268】

1つの好ましいCDR-H2バリエーションは、VH5/VL1-H2-B3scFvクローン(図14A)であり、これは、置換N53TおよびI56R(Kabat番号付け)を有した。このバリエーションは、親の対照と比較して穏やかなオフレート改善を有し、Kabat53および54位にて親のCDR-H2配列で見出される推定脱アミド化部位の除去というさらなる利点を有した。

【0269】

2つの好ましいCDR-L3バリエーション、すなわちVH5/VL1-L3-C9およびVH5/VL1-L3-G8バリエーションを、親の対照に対するそれらのオフレート改善について同定した(図14B)。VH5/VL1-L3-C9は、以下のCDR-L3置換:S92T、H93YおよびV94Y(Kabat番号付け)を有し、VH5/VL1-L3-G8配列は、VH5/VL1-L3-C9から94位だけが異なっており、以下のように置換されていた:S92T、H93YおよびV94L(Kabat番号付け)。

【0270】

これらの改善されたクローンから同定されたCDR-H2およびCDR-L3中の全ての好ましいアミノ酸変化を用いて、以下に記載する新しいFAB断片および抗体をフォーマットした。

【0271】

CDR-L1での推定脱アミド化モチーフの除去

VH5/VL1のCDR-L1は、Kabat28および29位に脱アミド化モチーフを有する。そのコンセンサス配列を抑制するために、いくつかの置換を行った。CDR-L1においてN28T、N28S、N28Q、N28EおよびG29A位にて置換したVH5/VL1FAB断片を生成した。CDR-L128位での全ての置換は、ヒトまたはカニクイザル融合タンパク質上でSPRにより判断されるように結合を損なった(図15)。G29Aだけが、ヒトCCR6についてのVH5/VL1親和性またはそのFA

10

20

30

40

50

B安定性に影響しなかった(図16)。

【0272】

フォーマット

ファージディスプレイスクリーニングから同定されたCDR-L3およびCDR-H2置換を用いて、上記のG29A改変も含むことにより、CDR-L1にある脱アミド化部位も除去した、工学改変VH5/VL1抗体およびその断片を生成した。フォーマットは、図17に記載するように、ヒトFAB断片、ヒトIgG1抗体、ヒト1価BEAT(登録商標)抗体(PCR公開番号WO2012/131555およびWO2014/049003)およびヒンジ安定化IgG4抗体を含んだ。FAB構築物を、センサチップ上に結合したヒトまたはカニクイザルCCR6融合タンパク質を用いるSPRによるKD決定のために用いた。

10

【0273】

工学改変FABの第1ペアを、CDR-L1 G29A改変が付加された好ましいCDR-L3ライブラリーscFvクローンVH5/VL1-L3-C9およびVH5/VL1-L3-G8の変域ドメインを用いて生成した。本明細書においてVH5/VL1-C9-G29AおよびVH5/VL1-G8-G29Aと称する両方のFABは、同じ実験のセットにおいて対照として用いた親のFABと比較してKD値が約20倍改善されていた(図18)。なお、親のFABは、以前(実施例7)に測定された48nMに反して、約20nMのKD値を有しており、この差は、用いた融合タンパク質の質、抗原の質の変動がこの実験のセットにおいてより大きかったことにより説明される。

20

【0274】

好ましいCDR-H2置換(N53TおよびI56R)およびCDR-L1 G29A改変と組み合わせた、好ましいCDR-L3置換(S92T、H93YおよびV94YまたはS92T、H93YおよびV94L)を包含する、工学改変FABの第2ペアも生成した。本明細書においてVH5/VL1-B3C9-G29AおよびVH5/VL1-B3G8-G29AというFABは、FAB構築物の第1ペアからCDR-H2だけが異なり、KD値がさらに2倍改善されていた。両方のVH5/VL1-B3C9-G29AおよびVH5/VL1-B3G8-G29Aは、ヒトCCR6のN末端領域について約0.5nM、およびカニクイザルCCR6のN末端領域について約1nMのKD値を有し、親のVH5/VL1 FABと比較して、ヒトCCR6についての親和性の約40倍の改善、およびカニクイザルCCR6についての親和性の約30倍の改善を表した。

30

【0275】

[実施例10]

親和性成熟VH5/VL1バリエーションの改善された阻止能力

VH5/VL1 IgG1の親和性成熟が走化性活性に与える影響を評価するために、2価IgG1または1価BEAT(登録商標)フォーマットのいずれかでのVH5/VL1の4つの工学改変バリエーションを、様々な濃度(20~0.75μg/mlの範囲)にて、全長ヒトCCR6をトランスフェクトしたBAF細胞を用いる遊走アッセイにおいて試験した。簡単に述べると、100000の細胞を、親和性成熟バリエーションの存在下でHTS Transwell(登録商標)-96プレート[Corning, Chemie
Brunschwig AG, Switzerland]の上部チャンバに加えた。Transwellの下部チャンバは、235μlのBAF培地(10%のFCS(Amimed、Bioconcept、Allschwil、Switzerlandにより流通)を含有するRPMI-1640(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basel, Switzerland)中10ng/mlに希釈した組換えヒトCL20(R&D Systems)を含有した。37、5%CO2にて4時間のインキュベーションの後に、下部および上部チャンバからの細胞を採集し、Guava EasyCyte HT(Millipore AG, Zug, Switzerland)を用いて計数した。陰性対照として、ヒトIgG1の無関係の抗体を20μg/mlにて用いた。非親和性成熟2価VH5/VL1 IgG1および1価VH5/VL1 BEAT

40

50

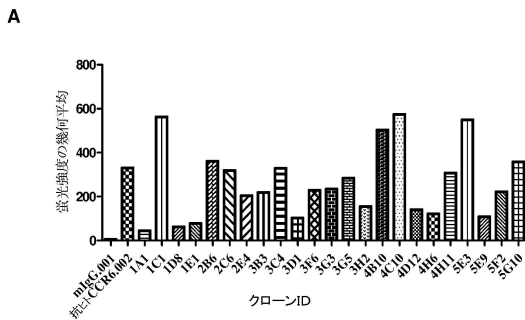
(登録商標)分子を、バイオアッセイにおいて参照として用いた。全ての試験した分子について、遊走比は、下部チャンバ中の細胞の数を、上部および下部チャンバ中の細胞の総数で除することにより算出した。遊走の障害のパーセンテージは、アイソタイプ対照について観察されたもののパーセンテージとして算出した。図19は、ヒトCCR6-N末端ペプチドに対して親和性が増加したVH5/VL1バリエーション(図18に示すB3G8G29AおよびB3C9G29A)が、CCR6発現BAF細胞の遊走をより効果的に障害したことを証明する。4つの工学改変バリエーションは、低濃度(例えば0.75 μg/ml)でさえ高い阻止能力を示した。興味深いことに、親和性成熟バリエーションの1価バリエーションは、親和性成熟前の1価VH5/VL1抗体と比較して中和能力の増加も示した。特に、低濃度にて、B3G8G29AおよびB3C9G29A変異体は、20 μg/mlの非工学改変1価VH5/VL1 BEAT(登録商標)(およそ20%)よりも高い障害プロファイル(およそ35%)を示した。

10

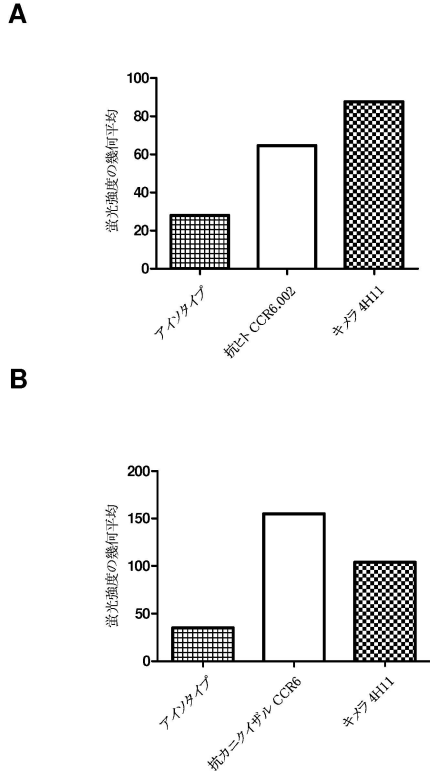
【0276】

まとめると、図19からのデータは、4つの異なる工学改変VH5/VL1バリエーションの親和性の増加と遊走アッセイにおけるそれらの阻止能力の増加との間の直接的な関係を証明する。

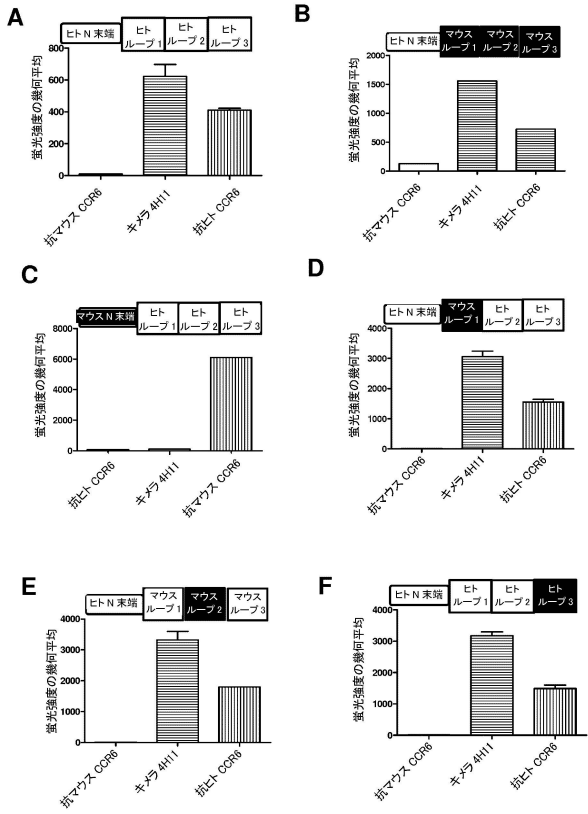
【図1】



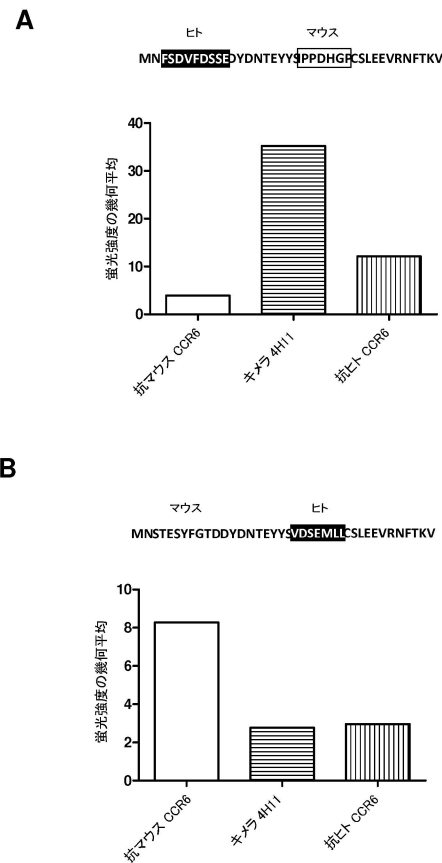
【 図 3 】



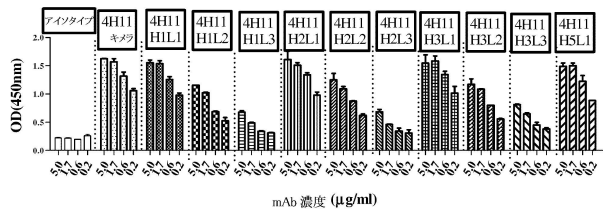
【 図 4 】



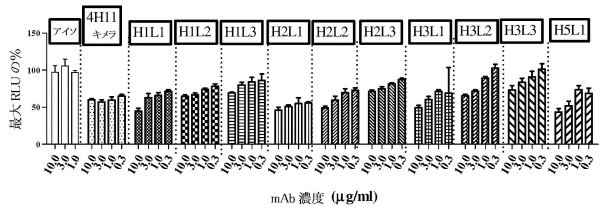
【 図 5 】



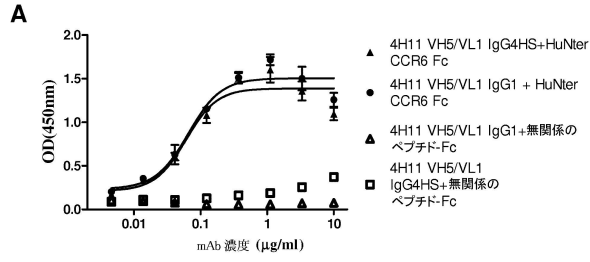
【 図 6 】



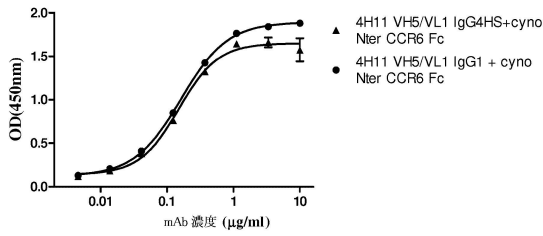
【 図 7 】



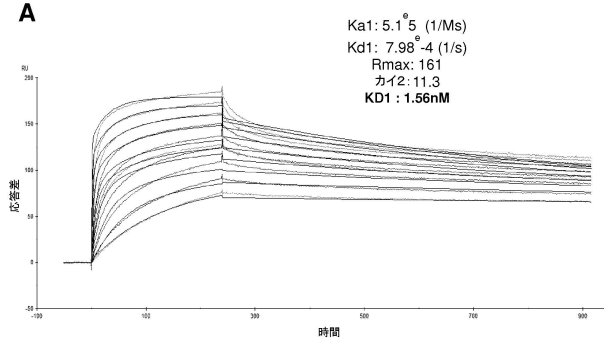
【 図 8 】



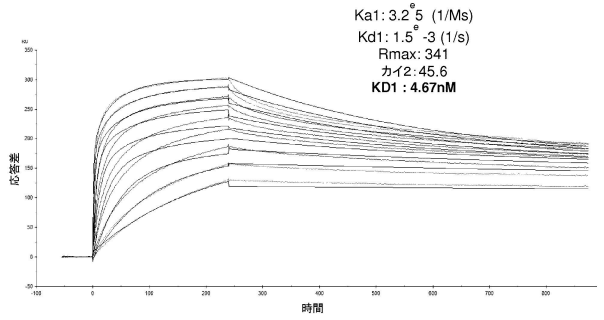
B



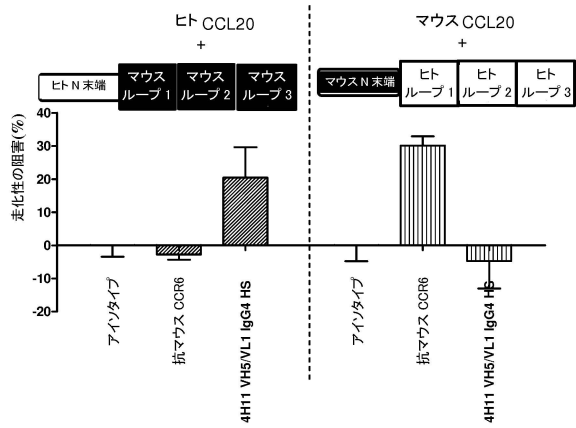
【 図 9 】



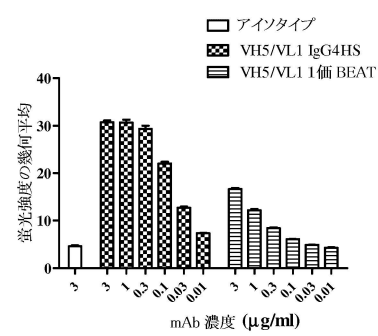
B



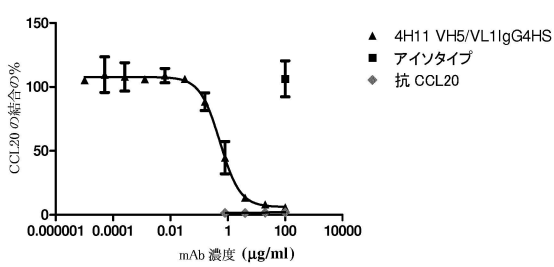
【 図 10 】



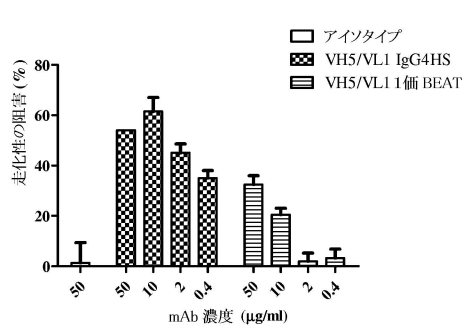
【 図 12 】



【 図 11 】



【 図 13 】



【 図 1 4 A 】

	Kabat: H52	H52a	H53	H54	H55	H56	H57	H58	Biacore 結合
H2:	T	-	N	G	G	I	T	Y	
多様化:	X	-	X	G	G	X	T	X	
scFv クローン:									
VH5/VL1-H2-H1	S					K			=
VH5/VL1-H2-D1			S			K			-
VH5/VL1-H2-B1			M			K			-
VH5/VL1-H2-C3			R			K			-
VH5/VL1-H2-A3						K			=/+
VH5/VL1-H2-C1			T			D			-
VH5/VL1-H21-C2	N		T			G			=
VH5/VL1-H2-G2			T			T			=
VH5/VL1-H2-B3			T			R			=/+
VH5/VL1-H2-E1			T			S			-
VH5/VL1-H2-G1			K			K	F		-
VH5/VL1-H2-E3	N		A			S		L	0

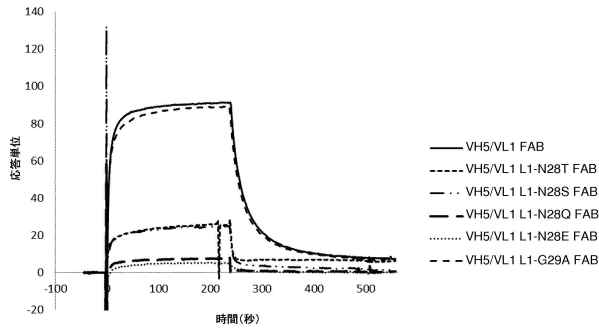
略語表
 (-) より弱いオフレート
 (=) H5/L1 親 scFv と同様のオフレート
 (+) よりよいオフレート
 (++) 著しくよりよいオフレート
 (0) 結合なし
 (ND) 未測定
 (X) 多様性: NNK-20全てのアミノ酸

【 図 1 4 B 】

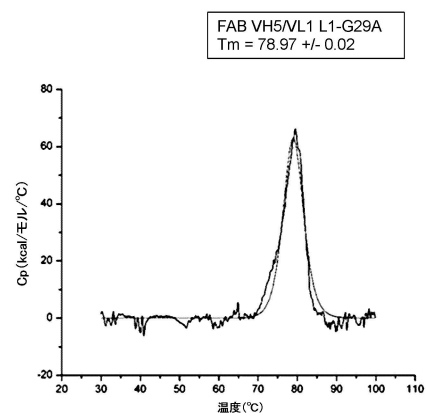
	Kabat: L92	L93	L94	L95	L96	Biacore 結合
L3:	S	H	V	P	L	
多様化:	X	X	X	P	x	
scFv クローン:						
VH5/VL1-L3-H7		L	L			++
VH5/VL1-L3-F9	T	Y	M			++
VH5/VL1-L3-B8	T	Y	N			++
VH5/VL1-L3-G8	T	Y	L			++
VH5/VL1-L3-D8	T	K	L			+
VH5/VL1-L3-E8		Y	L			+
VH5/VL1-L3-A9		L	M		I	ND
VH5/VL1-L3-B9		Y	I			ND
VH5/VL1-L3-C9	T	Y	Y			++
VH5/VL1-L3-G7	T	F	L			++
VH5/VL1-L3-F8		Y	S			0
VH5/VL1-L3-C8	T	Y	L		I	++
VH5/VL1-L3-B10		K	L			+
VH5/VL1-L3-D9	S	X	M		L	++

略語表
 (-) より弱いオフレート
 (=) H5/L1 親 scFv と同様のオフレート
 (+) よりよいオフレート
 (++) 著しくよりよいオフレート
 (0) 結合なし
 (ND) 未測定

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



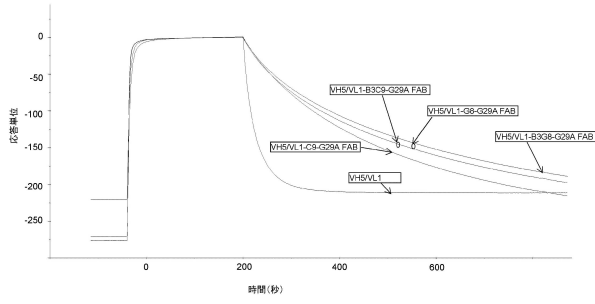
【 図 1 7 】

	ヒト FAB HC/LC 配列番号	ヒト IgG1 HC/LC 配列番号	ヒト 1 価 BEAT (登録商標) HC1/HC2/LC 配列番号	ヒト IgG4 HC/LC 配列番号
VH5/VL1-B3G8-G29A	206/207	198/199	227/228/229	214/215
VH5/VL1-B3C9-G29A	208/209	200/201	230/231/232	216/217
VH5/VL1-G8-G29A	202/203	194/195	221/222/223	210/211
VH5/VL1-C9-G29A	204/205	196/197	224/225/226	212/213
VH5/VL1	233/234	10/30	218/219/220	235/236

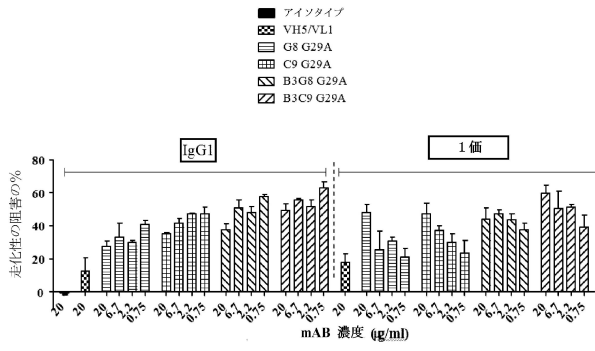
【 図 1 8 A 】

FAB	Ka ヒト CCR6	Kd ヒト CCR6	KD ヒト CCR6	Ka カニクイザル CCR6	Kd カニクイザル CCR6	KD カニクイザル CCR6
VH5/VL1-B3G8-G29A	6.46e6	3.39e-3	526 pM	1.72e6	2.02e-3	1.17 nM
VH5/VL1-B3C9-G29A	6.96e6	3.79e-3	544 pM	1.83e6	2.25e-3	1.23 nM
VH5/VL1-G8-G29A	2.65e6	2.66e-3	1.0 nM	8.97e5	1.96e-3	2.19 nM
VH5/VL1-C9-G29A	2.66e6	3.41e-3	1.28 nM	8.75e5	2.44e-3	2.79 nM
VH5/VL1	1.58e6	3.11e-2	19.6 nM	7.44e5	2.50e-2	33.6 nM

【 18 B 】



【 19 】



【 配列表 】

0006792552000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/06	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 リッシラ, ラミ

スイス国 ツェーハー 2300 ラ ショー ド フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ.アー.内

(72)発明者 ヴァルムスレイ, アドリアン

スイス国 ツェーハー 2300 ラ ショー ド フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ.アー.内

(72)発明者 ブライン, スタニスラス

スイス国 ツェーハー 2300 ラ ショー ド フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ.アー.内

(72)発明者 オリエール, ロマイン

スイス国 ツェーハー 2300 ラ ショー ド フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ.アー.内

(72)発明者 ホウ, サミュエル

スイス国 ツェーハー 2300 ラ ショー ド フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5

(72)発明者 ロヤウ, ジェレミー

スイス国 ツェーハー 2300 ラ ショー ド フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ.アー.内

審査官 山内 達人

(56)参考文献 国際公開第2013/005649(WO, A1)

The Journal of Immunology, 1999年, 162, 1, 186-194

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00-28

C12N 15/00-90

A61K 39/00-44

A61K 45/00-08

A61K 47/00-69

C07K 16/00-46

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

UniProt/GeneSeq