

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508036
(P2004-508036A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76		A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	N 4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 177 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-525234 (P2002-525234)	(71) 出願人	502343861
(86) (22) 出願日	平成13年9月10日 (2001.9.10)		マイクロメット アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月10日 (2003.3.10)		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 4
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010433		7 7 シュタッフエルゼーシュトラッセ
(87) 国際公開番号	W02002/020615		2
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	00119694.8		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成12年9月8日 (2000.9.8)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	09/948,004	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成13年9月5日 (2001.9.5)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体および／またはケモカイン構築物および免疫障害におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染している細胞の除去のため医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および／またはケモカイン構築物の使用に関連する。さらに、本発明は、炎症性腎疾患、炎症性腸疾患、多発性硬化症、皮膚疾患、糖尿病または移植拒絶反応の処置、予防および／または緩和のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および／またはケモカイン構築物の使用を提供する。さらに、本発明は、抗体構築物および／またはケモカイン構築物に関連し、ここで前記抗体構築物はケモカインレセプター5の結合部位およびCD3への結合部位を含み、ここで前記ケモカイン構築物はR A N T E Sおよびトキシンを含むものである。本発明は、また前記抗体またはケモカイン構築物をエンコードするポリヌクレオチド、並びに前記核酸分子を含むベクターおよび宿主を記載するものである。さらに、本発明は、前記抗体構築物、ケモカイン構築物、ポリヌクレオチド、ベクターおよび／または宿主を含む組成物に関連する。好ましくは、前記組成物は医薬組成物である。医薬組成物の調製のための抗体構築物、ケモカイン構築物、ポリヌクレオチド、宿主および／またはベクターの使用、並びに、免疫障害を処置、予防および／または緩和する方法または、潜伏して感染している細胞を除去する方法も記載されており、ここで前記細胞はH I V - 1のような霊長類の免疫不全ウイルスに感染したものである。さらに、本発明は、本発明の化合物を含むキットを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染している細胞の除去のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用。

【請求項 2】

前記霊長類の免疫不全ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記ヒト免疫不全ウイルスが HIV - 1 である、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

炎症性腎疾患、アレルギー反応、炎症性腸疾患、多発性硬化症、皮膚疾患、糖尿病または移植拒絶反応の処置、予防および/または緩和のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用。

【請求項 5】

前記ケモカインレセプターがケモカインレセプター 5 (CCR5) である、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

前記ケモカインレセプター 5 がヒト CCR5 である請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記抗体構築物が、第 1 の抗原としてケモカインレセプターに、第 2 の抗原としてエフェクター細胞の CD3 抗原に結合する二重特異性抗体である、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8】

前記二重特異性抗体が単鎖抗体構築物である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記単鎖抗体構築物が、ケモカインレセプターに特異的な抗体の V_L および V_H ドメイン、並びに CD3 抗原に特異的な抗体の V_H および V_L ドメインを含む、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記ケモカインレセプターに特異的な抗体がネズミ抗 - ヒト CCR5 抗体 MC - 1 である、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記 V_L および V_H ドメインが、V_L (MC - 1) - V_H (MC - 1) - V_H (CD3) - V_L (CD3) の順に配列している、請求項 9 または 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記 V_L (MC - 1) が配列番号 12 で表されるアミノ酸配列を含み、前記 V_H (MC - 1) が配列番号 16 で表されるアミノ酸配列を含み、前記 V_H (CD3) が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、および/または、前記 V_L (CD3) が配列番号 28 を含む、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

前記二重特異性抗体が配列番号 17 で表される核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含むか、または配列番号 18 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 ないし 12 のいずれかに記載の使用。

【請求項 14】

前記抗体構築物が、第 1 の抗原として前記ケモカインレセプターに、第 2 の抗原としてトキシンに結合する二重特異性抗体である、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 15】

前記抗体構築物がトキシンに共有結合する、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 16】

前記抗体構築物が、多量化ドメインを介して、*in vitro* および/または *in vivo*

10

20

30

40

50

*in vivo*でCD3抗原および/またはトキシンに結合する第2の抗体構築物に結合できる、請求項1ないし6のいずれかに記載の使用。

【請求項17】

前記ケモカイン構築物が修飾または非修飾ケモカインと修飾または非修飾トキシンとの融合構築物である、請求項1ないし6のいずれかに記載の使用。

【請求項18】

前記ケモカイン構築物が、多量化ドメインを介して、*in vitro*および/または*in vivo*でCD3抗原および/またはトキシンに結合する抗体構築物に結合できる、請求項1ないし6のいずれかに記載の使用。

【請求項19】

前記ケモカイン構築物が、CD3抗原に結合する抗体構築物に結合する、および/またはトキシンに共有結合した、抗体構築物に共有結合したケモカインを含む、請求項1ないし6のいずれかに記載の使用。

【請求項20】

前記抗体および/またはケモカイン構築物が、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカインを少なくとも1つ含むヘテロミニボディ構築物である、請求項1ないし6のいずれかに記載の使用。

【請求項21】

前記ヘテロミニボディ構築物が少なくとも1つのトキシンを含む、請求項20に記載の使用。

【請求項22】

前記ヘテロミニボディ構築物が、ケモカインレセプターおよび/またはエフェクター細胞のCD3抗原に結合する、請求項20または21に記載の使用。

【請求項23】

前記ケモカインが、RANTES、MIP-1、MIP-1、MCP-2およびMCP-3から成る群より選ばれる、請求項17ないし22のいずれかに記載の使用。

【請求項24】

前記トキシンが、切断されたシュードモナスのエクソトキシンAである、請求項15ないし19、21および22のいずれかに記載の使用。

【請求項25】

前記ケモカイン構築物が、配列番号24で表される、または配列番号23で表されるヌクレオチド配列によりエンコードされる、アミノ酸配列を含む、請求項17ないし24のいずれかに記載の使用。

【請求項26】

前記CD3抗原がT細胞であるエフェクター細胞表面上にある、請求項7ないし13、16、18、19および22のいずれかに記載の使用。

【請求項27】

前記構築物がCCR5に対する結合部位およびCD3に対する結合部位を含む、請求項5ないし16、20、21および22のいずれかで定義される抗体構築物。

【請求項28】

前記ケモカイン構築物がRANTESを含み、前記トキシンが切断されたシュードモナスのエクソトキシンA(PE38)である、請求項17ないし22のいずれかで定義されるケモカイン構築物。

【請求項29】

請求項5ないし12のいずれかで定義される抗体構築物、または請求項17ないし19、23および24のいずれかで定義されるケモカイン構築物、をエンコードするポリヌクレオチドであって、

(a) 配列番号18または配列番号24で表されるポリペプチドを特にエンコードする核酸分子を含むポリヌクレオチド；

(b) 配列番号17または配列番号23で表される核酸分子を含むポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

または、

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドの相補鎖にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項30】

DNAまたはRNAである、請求項29に記載のポリヌクレオチド。

【請求項31】

請求項29または30のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項32】

発現ベクターまたは遺伝子移入ベクターである、請求項31に記載のベクター。

【請求項33】

請求項31または32のベクターで形質転換された宿主。

【請求項34】

請求項33の宿主を培養し、産生した抗体構築物またはケモカイン構築物を単離することを含む、請求項29で定義される抗体構築物またはケモカイン構築物を産生する方法。

【請求項35】

請求項29または30のポリヌクレオチドによりエンコードされる、または請求項34の方法により産生される、抗体構築物またはケモカイン構築物。

【請求項36】

請求項29のポリヌクレオチド、請求項31または32のベクター、請求項33の宿主、請求項27または35の抗体構築物、および/または、請求項28または35のケモカイン構築物、を含む組成物。

【請求項37】

任意に医薬的に許容されるキャリアー、希釈剤、および/または、賦形剤をさらに含む医薬組成物である、請求項36に記載の組成物。

【請求項38】

免疫障害の処置のための薬剤または抗-HIV処置のための薬剤をさらに含む、請求項36または37に記載の組成物。

【請求項39】

免疫障害を処置、予防および/または緩和するための方法、または霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染している細胞を除去するための方法であって、処置、緩和および/または予防を必要とする被験者に請求項36ないし38のいずれかに記載の組成物の有効量を投与することを含む方法。

【請求項40】

免疫障害を処置、予防および/または緩和するための医薬組成物を調製するための、請求項29または30のポリヌクレオチド、請求項31または32のベクター、請求項33の宿主、請求項27または35の抗体構築物、および/または、請求項28または38のケモカイン構築物の使用。

【請求項41】

細胞が霊長類の免疫不全ウイルスに感染しており、潜伏して感染している前記細胞を除去するための医薬組成物を調製するための、請求項29または30のポリヌクレオチド、請求項31または32のベクター、請求項33の宿主、請求項27または35の抗体構築物、および/または、請求項28または38のケモカイン構築物の使用。

【請求項42】

前記免疫障害が自己免疫疾患、アレルギー疾患、皮膚疾患、炎症性疾患、糖尿病、対宿主性移植片疾患および移植拒絶反応から成る群より選ばれる、請求項39の方法または請求項40の使用。

【請求項43】

自己免疫疾患が、多発性硬化症、I型糖尿病およびリウマチ性関節炎から成る群より選ばれる、請求項42の方法または使用。

【請求項44】

10

20

30

40

50

前記皮膚疾患が、皮膚炎症、アトピー性皮膚炎および乾癬から成る群より選ばれる、請求項 4 2 に記載の方法または使用。

【請求項 4 5】

前記炎症性疾患が、炎症関節疾患、炎症性腎疾患、炎症性腸疾患から成る群より選ばれる、請求項 4 2 に記載の方法または使用。

【請求項 4 6】

前記炎症性関節疾患が（慢性）関節炎である、請求項 4 5 に記載の方法または使用。

【請求項 4 7】

前記霊長類の免疫不全ウイルスによる感染が HIV - 1 感染である、請求項 3 9 に記載の方法または請求項 4 1 に記載の使用。

10

【請求項 4 8】

前記組成物が抗ウイルス剤との組み合わせ、および/またはエイズ管理に使用される薬剤との組み合わせで投与される、請求項 4 7 に記載の方法または使用。

【請求項 4 9】

前記エイズ管理に使用される薬剤が HAART に使用される薬剤を含む、請求項 4 7 に記載の方法または使用。

【請求項 5 0】

請求項 2 9 または 3 0 のポリヌクレオチド、請求項 3 1 または 3 2 のベクター、請求項 3 3 の宿主、請求項 2 7 または 3 5 の抗体構築物、および/または、請求項 2 8 または 3 8 のケモカイン構築物を含むキット。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染している細胞の除去のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用に関連する。さらに、本発明は、炎症性腎疾患、炎症性腸疾患、多発性硬化症、皮膚疾患、糖尿病または移植拒絶反応の処置、予防および/または緩和のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用を提供する。さらに、本発明は、抗体構築物および/またはケモカイン構築物に関連し、特にここで前記抗体構築物がケモカインレセプター 5 への結合部位および CD 3 への結合部位を含み、ここで前記ケモカイン構築物が RANTES およびトキシンを含む、構築物である。本発明は、また前記抗体またはケモカイン構築物をエンコードするポリヌクレオチド、並びに前記核酸分子を含むベクターおよび宿主を記載するものである。さらに、本発明は、前記抗体構築物、ケモカイン構築物、ポリヌクレオチド、ベクターおよび/または宿主を含む組成物に関連する。好ましくは、前記組成物は医薬組成物である。免疫障害を処置、予防および/または緩和する医薬組成物、または、潜伏して感染している細胞を除去する医薬組成物の調製のための抗体構築物、ケモカイン構築物、ポリヌクレオチド、宿主および/またはベクターの使用についても記載されており、ここで前記細胞は HIV - 1 のような霊長類の免疫不全ウイルスに感染したものである。本発明はまた、免疫障害を処置、予防および/または緩和する方法、または、霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染している細胞を除去する方法に関連する。さらに、本発明は、本発明の化合物を含むキットを提供する。

30

40

【0002】

いくつかの文書がこの明細書の本文全体にわたり引用されている。ここで引用される各々の文書は（いずれの製品分析表、取扱説明書等も含む）、引用することにより本明細書に取り込まれる。

【0003】

自己免疫疾患、炎症障害、または感染性疾患のような免疫疾患/障害は、増加しているのみならず、世界的な健康問題として実質的な脅威となっている。

【0004】

例えばドイツでは、人口の約 1 % が自己免疫疾患性のリウマチ性関節炎を患っている。

50

さらに、関節炎を引き起こす多数の他のリウマチ性疾患もある。現在、非ステロイド系抗リウマチ薬、コルチゾン製剤および第2次剤の3種類の薬剤と、TNF 遮蔽剤が、炎症性関節疾患の処置に用いられている。現在まで、治療としては、抗炎症薬や第2次剤の全身投与との組み合わせで、コルチゾン製剤の局所注射に焦点が当てられてきた。

【0005】

非ステロイド系抗リウマチ薬は、穏やかな鎮痛性と抗炎症作用を有するが、頻繁に投与された場合には多くの副作用がある（例えば、胃潰瘍、ネフローゼ）。多量の投与では、コルチゾン製剤は、強力な鬱血除去と鎮痛作用があるが、治療の中断後直ぐに再発をもたらす。さらに、コルチゾン製剤は、関節疾患の破壊工程を止めることはできない。コルチゾンによる長期の治療は、通常重篤な副作用を伴う（感染、クッシング現象、骨粗鬆症、羊皮紙様皮膚、代謝およびホルモン障害）。コルチゾンの局所注射は、移動した白血球細胞の活性が減少するだけであるという基本的な不利益がある。浸潤した細胞が破壊されないため、治療の中断の後直ぐに再発が起こる。上述したように、同様のことが全身投与でも起こる。まれに、コルチゾン結晶の刺激作用のために、コルチゾンの注射後炎症が悪化することがある。コルチゾン注射の作用の持続時間は、大きく変化し、最初の無作用から数週間の作用の持続までの範囲にわたる。

10

【0006】

リウマチ学において、第2次剤を用いて炎症の長期の抑制とコルチゾン製剤の削減を行っている。かなりの毒性のため（アレルギー、感染、悪性疾患、腎不全、血圧分利、肺疾患）、患者のそばにいる医療専門家が必要である。処置の開始後、最初の3ヶ月間は治療効果が現れないであろう。現在、4、5個のこのような第2次剤が使用可能であり、これらは最初は個々に使用され、または治療が効果的でない場合は組み合わせて使用される。たいていは、第2次剤の作用形態についてはほとんど何も知られていない。第2次剤の投与が関節の破壊を消失されるかどうかは、完全には明らかになっていない。近年、新しい一群の物質がリウマチ性関節炎の処置に導入され、これはモノクローナル抗体や溶解性レセプター構築物による細胞シグナル物質（特にTNF）を遮断することに基づいている。

20

【0007】

さらに、現在利用可能な治療には反応しない患者もいる。他の場合では、許容できない副作用のために従来の治療を中止しなければならないこともある。

30

【0008】

同様の状況が、炎症性腎疾患、炎症性腸疾患、多発性硬化症および移植拒絶反応のような他の多くの炎症性および自己免疫疾患でも存在し、これらは現在の処置では多くの限界がある。例えば、炎症性および自己免疫疾患に用いられる薬剤には、アザチオプリン、シクロホスファミド、（プレドニゾンやコルチコステロイドのような）グルココルチコイド、のような抗炎症剤および免疫抑制剤；シクロスポリンA、タクロリマス（FK506）、シロリマス（ラパマイシン）のような免疫抑制剤；およびカルシニューリン、ベータ-インターフェロン、抗TNFアルファモノクローナル抗体（レミケード）のようなタンパク質薬が含まれる。これらの薬剤は、一般的な免疫調整作用を示し、それゆえ効能と副作用プロファイルが処置の選択肢の厳しい制限の原因となりうる（Harrison's Principles of Internal Medicine, eds. Fauci et al., 14th edition, McGraw-Hill publisher）。

40

【0009】

炎症性腸疾患（例としては、クローン病、潰瘍性大腸炎がある）は、抗炎症剤であるサルファザジン（アズルフィジン）およびプレドニゾンのようなグルココルチコイドにより処置され、選択された場合にはTNF- 遮蔽剤により処置される。潰瘍性大腸炎では、アザチオプリンのような薬による免疫抑制治療がよく確立しており、重症患者では、強い免疫抑制剤であるシクロスポリンが用いられる（Harrison's Principles of Internal Medicine, eds. Fauci et al.

50

, 14th edition, McGraw-Hill publisher).

【0010】

多くの場合で、現在の薬では十分な疾患活性の減少がなされず、外科的介入が時々必要となることさえある。

【0011】

炎症性腎疾患（ネフローゼ）は、例えばグルココルチコイド、アルキル化剤および/またはプラスマフェレーシスにより処置される。同様の処置の選択肢を有するさらなる疾患には、全身性エリテマトーデス（SLE）、シェーグレン症候群、多発性筋炎、皮膚筋炎、混合結合組織疾患、抗リン脂質抗体症候群が含まれる。

【0012】

いくつかのこれらの疾患には、現在ほとんど治療の選択肢がない。これらの疾患のすべてにおいて、1つの炎症性成分が共通する。しかし、この炎症性成分は現在利用可能な薬では十分に抑制できない。例えばアルキル化剤などのいくつかの薬では、患者1人当たりの最大生存投与量を超えることができない。

【0013】

移植拒絶反応は、アザチオプリン、マイコフェノレートモフェティル、グルココルチコイド、シクロスポリン、タクロリマス（FK506）、シロリマス（ラパマイシン）等の免疫抑制剤を用いて処置される。ステロイドと、T細胞上のCD3に結合するマウスのモノクローナル抗体OKT3の少量の投与との組み合わせを用いて、T細胞をアネルギー化し、涸渇させ、シクロスポリンのような免疫抑制剤を用いて治療が続けられる。ヒト抗-マウス抗体I（HAM A）は、一般的な副作用を有し、OKT3の使用が制限される（Fauci et al. sic. 2374-2381）。

【0014】

多発性硬化症を処置する方法には、アザチオプリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、コルチコステロイド、シクロスポリンA、カルシニューリン、ラパマイシン、ベータ-インターフェロン等の抗炎症剤のような全体の免疫系に作用する処置が含まれる（Fauci et al. sic. 2415-2419; Wang (2000) j. Immunol. 165, 548-57）。さらに、身体的治療および精神的薬理学剤等のクオリティオブライフを改善しうる多数の非特異的処置が行われている。上述した処置の選択肢は、いずれも治癒させる作用はない。最も有望な化合物である - インターフェロンでさえ、相当な副作用を示す一方、わずかに疾患の進行を遅らせるにすぎない。

【0015】

さらに、I型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）は、エイズの最も一般的な原因であるが、（死亡した人を含めて）5000万人以上に感染しており、また新たに感染する割合は、年間6百万人近いと推定される（AIDS Epidemic Update: December 1999（UNAIDS, Geneva, 1999）, www.unaids.org）。同様に困ったことは、その流行が不確定なことにある。アフリカのサハラ付近が世界的な中心であるが、感染の割合は近時は前ソビエト連邦や、インドと中国等の南および東南アジアの一部で増加しており、これらの場所では文字通り数億人が潜在的な危険にある。米国では、感染の新たな波が、女性、少数民族、および同性愛の男性の若い世代で認められてきた。抗レトロウイルス剤の組み合わせの治療により、多くの人々が臨床的に救われているが、その費用と処置の毒性は相当であり、HIV-1感染は依然致命的な疾患のままである。さらに、感染した人々の世界的に大多数の者は、これらの薬剤を入手できない。従って、エイズの人口統計（およびその自然な生長のいくつかの例）が変化しているが、流行は終焉から遙か遠く、その代わりに、これは進化し、拡大し、さらに大きな解決すべき課題としてとどまっている。

【0016】

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、細胞表面上の2つの鍵となる分子、CD4とコレセプターに最初に結合しない限りヒト細胞に進入できない。最初に認識されるコレセプターはCCR5であり、ウイルスのライフサイクルの後期では、もう一つのケモカインレセプ

10

20

30

40

50

ターCXCR4がHIV-1のコレセプターになる(D'Souza, Nature Med. 2, 1293 (1996); Premack, Nature Med. 2, 1174; Fauci, Nature 384, 529 (1996))。性的接触によるウイルスのほとんどの伝染原因となるHIV-1株は、M-指向性ウイルスと呼ばれる。これらのHIV-1株は(NSI1次ウイルスとしても知られているが)、1次CD4+T細胞およびマクロファージ中で複製し、ケモカインレセプターCCR5(および、頻度は低いもののCCR3)をそれらのコレセプターとして利用する。T-指向性ウイルス(時にSI1次と呼ばれる)も1次CD4+T細胞内で複製するが、*in vitro*では確立されたCD4+T細胞系にさらに感染し、これはケモカインレセプターCXCR4(フュージン)を介して行われる。これらのT-指向性株の多くが、CXCR4に加えてCCR5を利用でき、いくつかは、少なくともある*in vitro*の条件下で、CCR5を介してマクロファージに進入できる(D'Souza, Nature Med. 2, 1293 (1996); Premack, Nature Med. 2, 1174; Fauci, Nature 384, 529 (1996))。他のコレセプターがHIV-1の病因に寄与するかどうかは解明されていないが、いくつかのT-指向性株のための他のコレセプターの存在が*in vitro*試験から推察される。M-指向性HIV-1株がHIVの性的伝染の約90%に関係しているので、CCR5は患者内のウイルスに対する優勢なコレセプターであり;CXCR4を用いる(T-指向性の)株の伝染(または全身での確立)は、まれである(D'Souza, Nature Med. 2, 1293 (1996); Premack, Nature Med. 2, 1174; Fauci, Nature 384, 529 (1996), Paxton, Nature Med. 2, 412 (1996); Liu, Cell 86, 367 (1996); Samson, Nature 382, 722 (1996); Dean, Science 273, 1856 (1996); Huang, Nature Med. 2, 1240 (1996))。しかし、SIウイルスが*in vivo*で一旦進化すると(またはそれらが伝染すると)、それらは特に毒性となり、疾患の進行を早める原因となる(D'Souza, Nature Med. 2, 1293 (1996); Premack, Nature Med. 2, 1174; Fauci, Nature 384, 529 (1996), Schuitemaker, J. Virol. 66, 1354 (1992); Connor, J. Virol. 67, 1772 (1993); Richman, J. Infect. Dis. 169, 968 (1994); R. I. Connor et al., J. Exp. Med. 185, 621 (1997); Trkola, Nature 384, 184 (1996))。

【0017】

標的細胞上のコレセプター分子の数と同一性、および異なるコレセプターを介して細胞に進入しそうなHIV-1株の能力は、疾患の進行の重要な決定因子であるように思える。これらの因子は、HIV-1感染の宿主-およびウイルス-依存の両方の見地に重大な影響を与える。例えば、CCR5のホモ接合欠損(デルタ32)は、*in vivo*および*in vitro*におけるHIV-1感染の抵抗性に強く相関する。欠損したCCR5対立遺伝子に対してヘテロ接合の個体は、感染に対して単に弱い保護しかなく、疾患の進行をわずかに遅くするだけである(Paxton, Nature Med. 2, 412 (1996); Liu, Cell 86, 367 (1996); Samson, Nature 382, 722 (1996); Dean, Science 273, 1856 (1996); Huang et al., Nature Med. 2, 1240 (1996))。しかし、他の因子が活性化したCD4+T細胞上のCCR5発現のレベルに影響し、それにより*in vitro*におけるHIV-1感染の効率に影響する(Trkola, Nature 384, 184 (1996); Bleul, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 1925 (1997))。理由はまだ明確になっていないが、細胞表面のCCR5発現量(MIP-1結合により測定)は、2つの野生型CCR5対立遺伝子を有する個体からのCD4+T細胞上で20倍変化す

る (Trkola, Nature 384, 184 (1996)) (図面を参照)。CCR5 特異的モノクローナル抗体による染色により、同様の大きな変化が示された (Wu, J. Exp. Med. 186: 1373-81 (1997))。このような変化は、CCR5 の 1 つの欠損した対立遺伝子のどの効果よりもはるかに影響があるであろう。これらは疾患に対する抵抗性を増加させる制御可能な因子を示すので、この変化の原因は徹底した研究の主題になるべきである。

【0018】

最も主要なものとして、霊長類の免疫不全ウイルスの臨床的単離には、進入のためのケモカインレセプター CCR5 が用いられる (Feng, Science 272, 872 (1996); Choe, Cell 85, 1135 (1996); Deng, Nature 381, 661 (1996); Dragic et al., Nature 381, p. 667; Doranz, Cell 85, 1149 (1996); Alkhatib, Science 272, 1955 (1996))。伝染して感染当初の数年間優勢である多くの HIV-1 の単離では、CCR5 は絶対のコレセプターであり、遺伝的に CCR5 発現が欠損しているまれな個体では、HIV-1 感染に対し相対的に耐性がある (Connor, J. Exp. Med. 185, 621 (1997); Zhang, Nature 383, 768 (1996); Bjorn dal, J. Virol. 71, 7478 (1997); Dean, Science 273, 1856 (1996); Liu, Cell 86, 367 (1996); Paxton, Nature Med. 2, 412 (1996); Samson, Nature 382, 722 (1996))。感染経過の後期に起こる HIV-1 の単離にはしばしば他のケモカインレセプターが用いられ、たびたび CXCR4 が CCR5 に加えて用いられる。キメラのエンベロップ糖タンパク質の研究により、gp120 の第 3 の可変 (V3) ループがどのケモカインレセプターが使われるかの主要な決定因子であることが示された (上記の文献および Cocchi, Nature Med. 2, 1244 (1996); Bieniasz, EMBO J. 16, 2599 (1997); Speck, J. Virol. 71, 7136 (1997) を参照のこと)。たとえ CD4 の結合が野生型のレベルで起こるとしても、V3 が削除された gp120 では CCR5 に結合しない。V3 ループに対する抗体は、gp120-CCR5 の結合を妨害する (Trkola, Nature 384, 184 (1996); Wu, Nature 384, 179 (1996); Lapham, Science 274, 602 (1996); Bandres, J. Virol. 72, 2500 (1998); Hill, Science 71, 6296 (1997))。これらの結果は、ケモカインレセプターの結合に V3 ループが関与していることを支持するものである。

【0019】

M-指向性株が優勢の場合は、HIV の潜伏は感染のごく初期の段階で確立する。M-指向性株は、感染する標的細胞上の CCR5 の存在に依存する。M-指向性 HIV-1 の基本的なコレセプターとしての CCR5 の重要性は、ホモ接合 32 塩基対の欠失 (デルタ 32) による CCR5 が欠損した個体が HIV-1 感染に非常に耐性があるという事実により強調される。CD4、CD25、または CD45RO のような他のマーカーとは対照的に、CCR5 は、HIV-1 感染しやすいリンパ球や他の細胞のサブセット上にだけ存在する (Rottmann (1997) Am J Pathol 151, 1341-1351; Naif (1998) J Virol 72, 830-836; Lee (1999) Proc. Nat Acad. Sci. 96, 5315-5220)。

【0020】

潜伏して感染した細胞を除去するために、いくつかの方法が仮定された。一つの方策は、潜伏して感染しているものをウイルス産生に誘導し、それによって細胞死に誘導するものである。この文脈において、一つの方法は、ウイルスの貯蔵が涸渇するまで HAART の存在下で IL-2 (TNF-アルファ、IL-6) を投与することである (Chun (1998) J. Exp. Med. 188, 83-91; Chun (1999) N 50

at. Med. 5, 651-655; Stellbrink (1999) Abstracts of the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA), abstr. 356, p. 135; Imamichi (1999) Abstracts of the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA), abstr. 358, p. 135)。これらの細胞は、活性化の後死亡すると信じられている。潜伏して感染した細胞のすべての貯蔵を 10
涸渇させられるのかどうかは、疑問がある。

【0021】

試みられた他の方策は、細胞表面の gp-120 発現に基づいて潜伏して感染した細胞を特異的に殺すものである。gp-120 を認識する抗毒素が提案されたが、2つの理由により失敗した。ヒトにおいて試験された1つの構築物は、シュドモナスエーロギノサ(緑膿菌)のエクソトキシンA(PE)に結合した溶解性CD4から成るタンパク質であった。臨床的結果は、肝毒性の投与量制限のために失望するものであり、効果の徴候を示すことなく、その計画は終了した(Ashorn (1990) Proc. Natl Acad. Sci. 87, 8889-8893; Berger (1998) Proc. Natl Acad. Sci. 95, 11511-11513)。失敗の第2の理由は、 20
潜伏して感染した細胞は、gp-120やgp-41等のウイルス表面糖タンパク質を発現しないことであった。従って、潜伏して感染した細胞の除去のためにgp-120やgp-41を標的とするという方法は、使えない。

【0022】

潜伏して感染した細胞を除去するための他の方法としては、すべてのCD4+T細胞画分(Berger (1998) Proc. Natl Acad. Sci. 95, 11511-11513)や、CD25-陽性画分(Bell (1993) Proc. Natl Acad. Sci. 90, 1411-1415)、CD45RO記憶細胞画分(McCoig (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 11482-11485)を除去することに基づくものがある。しかし、これらのマーカーは、す 30
べての潜在的感染細胞に十分に含まれているものではない。このような細胞には、CD4-陽性細胞や記憶細胞またマクロファージに加え、非造血細胞も含まれる。

【0023】

WO98/18826には、哺乳動物(例えばヒト)のケモカインレセプター5に対して誘導された抗体が記載されており、前記抗体はCCR5を有する細胞とHIVのような潜在的リガンドとの相互作用を阻害する方法において提案されている。前記方法はHIV感染を阻害するものとして提案される。さらに、炎症性疾患、自己免疫疾患および移植拒絶反応に対する処置の選択肢として提案されている。しかし、これらの処置の選択肢はすべて、免疫グロブリン分子のような特異的抗体そのもの、またはそれらの機能的部分がレセプター-リガンド相互作用を妨害するとの仮定に基づいている。しかし、これらの抗体が 40
関連性のある細胞を涸渇させる能力を有するかどうかは、疑問がある。さらに、WO98/18826は、HIVとCCR5レセプターとの相互作用を防ぎ、これによりHIV感染を防ぐことを単に考えているにすぎない。

【0024】

白血球、特にT細胞は、感染性の物質に対する免疫反応の鍵となる調整因子と信じられており、炎症性腸疾患、炎症性腎疾患、炎症性関節疾患、多発性硬化症や関節炎のような自己免疫障害、乾癬性損傷のような皮膚疾患、糖尿病および移植拒絶反応などの、炎症工程の開始および維持のための決定的な成分である。

【0025】

従って、本発明が解決すべき技術的課題は、自己免疫疾患、炎症性の工程および/または 50

免疫細胞のウイルス感染のような免疫病理学に関連する活性化した白血球の抑制を導くことのできる新規の手段と方法を提供することである。

【0026】

よって、本発明は、霊長類の免疫不全ウイルス、好ましくはヒト免疫不全ウイルス、最も好ましくはHIV-1に潜伏して感染した細胞の除去のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用に関連する。

【0027】

本発明の文脈において、ケモカインレセプターに結合する前記抗体および/またはケモカイン構築物の結合は、標的細胞、主に前記霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染した細胞を涸渇させるおよび/または破壊する結果をもたらす。

10

【0028】

驚くべきことにこの発明において、ケモカインレセプターに対して誘導された高度に特異的な抗体が、前記ケモカインレセプターを発現している細胞を破壊し、分解し、および/または涸渇させることができないことが示された。しかし、本発明において記載され開示されたように、抗体構築物またはケモカイン構築物は、前記ケモカインレセプター陽性細胞と特異的に相互作用でき、前記細胞を涸渇させることができる。前記涸渇/破壊は、例えば単球、マクロファージ、T細胞（特に好ましくは細胞毒性T細胞）または樹状細胞のような、特異的なエフェクター細胞の誘引によりなされるであろう。たとえモノクローナル抗体が悪性細胞の破壊/涸渇において成功を示したとしても（例えば Malone 20

20

【0029】

本発明において、「抗体および/またはケモカイン構築物」（即ち抗体構築物および/またはケモカイン構築物）の用語は、ここに記載される分子、多機能構築物および化合物を含むのみならず、それらの機能的フラグメントをも含む。前記構築物の機能的フラグメントとは、標的細胞上のケモカインレセプターに結合/と相互作用でき、前記標的細胞を涸渇させ、分解しおよび/または破壊する手段を提供する、フラグメントを意味する。

30

【0030】

本発明において、特異的ケモカインレセプターは、これらに限定されないが、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、XCR1、CCR10およびCX3CR1を含む。前記ケモカインレセプターに結合するケモカインおよび/またはケモカインリガンドは、この分野においてよく知られており、特に表4に記載されるものがある。さらに、ケモカインおよび対応するレセプターはMurphy (2000), Pharm. Reviews 52, 145-176に開示されている。ケモカイン、ケモカインリガンドおよび/またはレセプターは、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトケモカイン/リガンド/レセプターである。

40

【0031】

本発明は、炎症性腎疾患、炎症性腸疾患、多発性硬化症、皮膚疾患、アレルギー性反応、糖尿病または移植拒絶反応の処置、予防および/または緩和のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用にも関連する。

【0032】

前記皮膚疾患は、特に、乾癬の障害、アトピー性皮膚炎または慢性炎症性皮膚を含む。CCR6の発現は、乾癬患者由来のPBMC中でアップレギュレートされる。さらに、CCR6リガンド(CCL20=MIP3アルファ)およびCCR6は、乾癬皮膚においてアップレギュレートされる。さらに、CCL20を発現しているケラチノサイトは、T細胞

50

が浸潤した皮膚とともに局在化する (Homey (2000) J. Immunol. 164, 6621 - 6632)。さらに、CCR10は、メラノサイト、皮膚繊維芽細胞、皮膚内皮細胞、T細胞および皮膚由来ランゲルハンス細胞で検出され、ケラチノサイトでは検出されない。CCR10リガンド(CCL27)は、皮膚関連発現パターンを有する (Homey (2000) J. Immunol. 164, 3465 - 3470; Charbonnier (1999) J. Exp. Med 190, 1755 - 1768)。さらに、CCR4およびそのリガンド(TARC、MDC)は、慢性炎症性皮膚においてアップレギュレートされる。さらにCCR4は、皮膚に侵入したT細胞のホーミングレセプターである。CCR4+T細胞は、全T細胞のほんの小さい部分集合であり、それゆえCCR4+T細胞の涸渇は種々の炎症性皮膚疾患においてその徴候を示す (Campbell (1999) Nature 400, 776 - 780)。CCR3およびエキソトキシンの発現は、アトピー性皮膚炎で増強され、炎症の開始および維持に寄与するであろう (Yawalkar (1999) J. Invest. Dermatol. 113, 43 - 48)。

10

【0033】

事実上、リウマチ性関節炎、滑液、並びに、潰瘍性大腸炎、慢性膣炎およびサルコイドーシスのような種々の炎症性組織のすべてのT細胞は、CXCR3を発現する。一方で正常リンパ節のほとんどT細胞は、CXCR3陽性ではない。

【0034】

多発性硬化症については、ミエリンを破壊された脳の損傷に浸潤するT細胞上で、影響された患者の末梢血液中と同様に、CCR5およびCXCR3が優勢に発現することが示された。対応するリガンドMIP-1 およびIP-10はプラーク中でも検出される (Balashov (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 6873 - 6878)。T細胞の除去は、この自己免疫疾患のT細胞アームを遮蔽するであろう。

20

【0035】

多発性硬化症患者の死後のCNS組織のベータケモカインレセプターの発現の免疫化学的分析により、慢性的活性MSの損傷におけるCCR2、CCR3およびCCR5の発現が泡沫状マクrophageに関係し、ミクログリアにより活性化されるが、対照CNS組織ではこれらのケモカインレセプターはミクログリア細胞では低いレベルでしか発現しないことが示された。CCR2およびCCR5は、多数の浸潤するリンパ球上にも存在し、MSの5/14の場合でCCR3およびCCR5は、星状細胞上にも発現した。MSにおけるCNSでのCCR2、CCR3およびCCR5の増加した発現は、これらのベータケモカインレセプターおよびそれらのリガンドがMSにおいて病因の役割を果たしていることを示唆している (Simpson, J. Neuroimmunol., 2000, 108, 192 - 200)。

30

【0036】

CCR3およびCCR5の高い発現は、ホジキン病患者由来のリンパ節のT細胞およびB細胞においても観察された。CCR3がCD4+およびCD8+細胞に同等に分散している一方、CCR5はおもにCD4+細胞に関係した。これらのデータは、ケモカインがホジキン病の非腫瘍性リンパ球の浸潤の形成に関係することを示唆するものである (Buri, Blood, 2001, 97, 1543 - 8)。

40

【0037】

歯周病は、グラム陰性菌の種に関連する末梢感染である。中程度から進行した歯周病患者では、CCR5ケモカインレセプターを発現している細胞が炎症性浸潤において見出された (Gamonal, J. Periodontal. Res., 2001, 36, 194 - 203およびTaubman, Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2001, 12, 125 - 35)。

【0038】

I型糖尿病は、T細胞媒介の自己免疫疾患であると見なされている。脾臓におけるCCR

50

5 レセプターの発現は、関連する動物モデルにおける I 型糖尿病の進行と関係した (Cameron (2000) J. Immunol. 165, 1102 - 1110)。特に、CCR5 の発現は、インスリン炎症の発展や自発性 I 型糖尿病と関係した。

【0039】

特定のケモカインが、関連する動物モデルの I 型糖尿病の T 細胞転移に関係した：RANTES、MCP-1、MCP-3、MCP-5、IP10。これらのケモカインは、Th1 免疫反応をもたらす (Bradley (1999) J. Immunol. 162: 2511 - 2520)。

【0040】

上述した炎症性腸疾患は、クローン病および大腸炎潰瘍を含みうる。

10

【0041】

CCR9 は腸に対してホーミングする T 細胞上で発現し、クローン病および大腸炎潰瘍において誘導される。すべての腸の粘膜固有層と上皮内リンパ球は、CCR9 を発現する (Zabel (1999) J. Exp. Med. 190, 1241 - 1256)。

【0042】

さらに、本発明の文中で記載したように、抗体および/またはケモカイン構築物は、移植の間および/またはその後の合併症を避けるため、即ち移植拒絶反応および対宿主性移植片疾患を避けるためにも有用である。

【0043】

CCR7 は、ナイーブ T 細胞および樹状細胞上で発現し、リンパ組織への細胞の移動を媒介する。従って、CCR7 + 細胞の除去は、例えば移植後の新しい抗原に対する免疫反応を防ぐであろう。このような処置は、全般的な免疫抑制ではなく、新しい抗原に対して選択的なものであり、CCR7 + 細胞を涸渇させる本発明の薬剤の投与期間に限定される (Forster (1999) Cell 99, 23 - 33)。CXCR5 は、末梢血液と扁桃腺のナイーブ B 細胞上、および記憶 T 細胞上で発現する。CXCR5 + B 細胞の除去は、体液性反応の確立を防ぐであろう。さらに、記憶 T 細胞の除去は、免疫反応の細胞成分を減少させるであろう (Murphy (2000) Pharmacological Reviews 52, 145 - 176)。

20

【0044】

アレルギーおよび/またはアレルギー反応の処置のための医薬組成物を提供するために、ここに記載されたような抗体および/またはケモカイン構築物が用いられる。エクソトキシンおよび RANTES に結合する CCR3 が、アレルギー反応に関係する、好酸球、Th2 細胞、マスト細胞、好塩基球上で発現することが示された (Romangnani (1999) Am. J. Pathol. 155, 1195 - 1204)。

30

【0045】

上述した腎または腎臓疾患に関する限り、CCR5 陽性 T 細胞が繊維症を導く間質性の工程に役割を果たすであろうことが示された。CCR5 陽性細胞は、移植拒絶反応と同様に、種々の糸球体および間質性疾患の間質性浸潤において同定された。前記疾患は、急性および慢性の腎炎、IgA 腎症、およびその他を含む (Seegerer (1999), Kidney Int. 56, 52 - 64)。

40

一時的免疫複合体糸球体腎炎 (IC-GN) のモデルにおいて、CCR1、CCR2、および CR5 は早期に発現し、尿蛋白および白血球浸潤の最大時においてはすでにダウンレギュレートされていた。CCR5 の発現は、単離された糸球体の原位置ハイブリダイゼーションおよび定量的逆転写 PCR により、糸球体に位置していた (Anders, J. Am. Soc. Nephrol., 2001, 12, 919 - 31)。いくつかの腎疾患の 38 人の患者の腎臓において、CCR1 - および CCR5 - 陽性マクロファージと T 細胞が、免疫組織化学により示されるように、糸球体および間質の両方において検出された。腎性 CCR5 - 陽性細胞は、グルココルチコイドにより誘導される回復期の間に顕著に減少した (Furuichi, Am. J. Nephrol., 2000, 20, 291 - 9)。

50

【0046】

本発明の好ましい態様において、本発明は、上述したように医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合する抗体および/またはケモカイン構築物の使用を提供し、ここで前記ケモカインレセプターは、ケモカインレセプター5 (CCR5) である。前記CCR5は、好ましくはヒトCCR5である。

【0047】

ケモカインレセプターCCR5は、前炎症性ケモカインRANTES、MIP1- α 、MIP1- β およびMCP-2に結合するGタンパク質共役型7回膜貫通ドメインレセプターの大きなファミリーの構成員である。ケモカインは、接着分子と共同して作用して白血球の管外流失を誘発し、組織損傷部位へのそれらの移動を誘導する。

10

【0048】

CCR5は、少数のT細胞上および単球上で発現し、HIV感染の早期の段階で優勢であるM-指向性HIV-1株のさらに主要なコレセプターである。

従って、上述した医薬組成物は、特にCCR5+白血球の涸渇に有用であり、HIV-1に潜伏して感染している細胞の除去に有用であろう。従って、CCR5+細胞の涸渇は、HIVに潜伏して感染している細胞の数を減少させ、有効な抗ウイルス剤、好ましくは抗レトロウイルス治療との組み合わせにおいて特に有用であろう。

特に好ましい態様において、前記抗体構築物は、第1の抗原としてケモカインレセプター、好ましくはCCR5に結合し、第2の抗原としてエフェクター細胞のCD3抗原に結合する二重特異性抗体である。好ましくは、前記CD3抗原はT細胞、好ましくは細胞毒性T細胞の表面にある。従って前記CD3は、上述した細胞上に発現している抗原を表し、多重分子(T)細胞レセプター複合体の一部であろう。

20

【0049】

二重特異性抗体は、共有結合により特異的な抗体に結合することや、ダイアボディ法のような他の方法により、ハイブリッド-ハイブリドーマ技術を用いて構築されうる(Kipriyanow, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-773)。

【0050】

前記二重特異性抗体が単鎖抗体構築物であることが好ましい。

【0051】

よく知られたように、完全な抗原認識および結合部位を含む最小抗体フラグメントFvは、1つの重鎖と1つの軽鎖可変ドメイン(V_HおよびV_L)が非共有結合的に結合したダイマーから成る。天然抗体に見出されるものに対応するこの立体配置において、各々の可変ドメインの3つの相補性決定領域(CDR)は、V_H-V_Lダイマー表面の抗原結合部位を決定するように相互作用する。集合的に、6つのCDRは、抗体に対する抗原結合特異性を付与する。CDRの側面に位置するフレームワーク(FR)は、ヒトおよびマウスのような多様な種の天然の免疫グロブリン中で本質的に保存された3次構築物を有する。これらのFRは、それらの適切な配向によりCDRを保持するように働く。

30

【0052】

不変ドメインは、結合機能を要求されず、V_H-V_L相互作用を安定化させる手助けをするであろう。通常全結合部位よりも低い親和性ではあるが、単鎖可変ドメイン(または抗原に対して特異的なわずか3つのCDRを含むFvの半分)でさえ、抗原を認識し結合する能力を有する(Painter, Biochem. 11 (1972), 1327-1337)。よって、本発明で定義され記載された抗体構築物の結合部位の前記ドメインは、異なる免疫グロブリンのV_H-V_L、V_H-V_H、またはV_L-V_Lドメインの対でもよい。ポリペプチド鎖内のV_HとV_Lドメインの順番は本発明に対して決定的なものではなく、上述したドメインの順番は機能を失うことなく通常逆にしうる。しかしながら、抗原結合部位が適切に折りたたまれるようにV_HとV_Lドメインが配列することは、重要である。

40

【0053】

50

抗体 / 免疫グロブリンの異なる部分は、通常の方法により結合され、または、組み換え DNA 技術により近接タンパク質として構築され、例えば、キメラやヒト化抗体鎖をコードする核酸分子を近接タンパク質を構築するために発現させる方法などによる (例えば、Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp. 7021 - 7025 を参照)。

【0054】

以下の Fv フラグメントを有する単鎖抗体が好ましい：ケモカインレセプターに対する、好ましくは CCR5 に対するモノクローナル抗体の sc-Fv フラグメント、および CD3 に対するモノクローナル抗体の sc-Fv フラグメント。この場合、ケモカインレセプターに対して誘導された Fv フラグメントおよび CD3 に対する Fv フラグメントの両方は、N 末端位に位置するであろう。CCR5 に対する Fv フラグメントは、N 末端位にあることが好ましい。V_L と V_H 抗体ドメインの順番は、両方の構築物で換えることができ、好ましくは CCR5 に対する Fv フラグメントの順番は、V_L - V_H であり、CD3 に対する Fv フラグメントの 1 つは、V_H - V_L である。可変ドメイン間、また同様に 2 つの Fv フラグメント間のリンカーは、ペプチドリンカーから成り、好ましくは 1 から 25 のアミノ酸の親水性で柔軟なグリシン - およびセリン - 含有リンカーから成っていてもよい。

10

【0055】

例えば、6 × His の、C - または N - 末端位にある付加的ヒスチジン鎖は、精製および検出を簡単にするために用いられる。

20

【0056】

通常の特異性抗体と比較して、二重特異性単鎖抗体は、たった 1 つのタンパク質鎖から構成され、それ故それらの組成が正確に定義できるという長所がある。それらは、通常 < 60 kD の低い分子量を有しており、組み換え技術を用いて、例えば CHO 細胞等の適当な細胞系において容易かつ大きなスケールで産生することができる。しかし、最も本質的な長所は、不変抗体ドメインを有さず、それ故これらがその標的細胞、即ちケモカインレセプター発現細胞に結合する時に、T リンパ球を溶解するように活性化するのみであるということである。従って、単鎖抗体は重篤な副作用が少ないかほとんどない臨床への使用において、通常の特異性抗体にしばしば勝るものとなる。

【0057】

MC - 1 は、ヒト CCR5 の第 2 の細胞外ループの第 1 の部分に特異的に結合し、添付の実施例に示されるようにアカゲザル由来の CCR5 と交差反応をしないことが示された。従って、単鎖抗体構築物が、ケモカインレセプター、好ましくはヒト CCR5 に対して特異的な抗体の V_L と V_H ドメイン、および、CD3 抗原に対して特異的な抗体の V_H と V_L ドメイン、を含むことが好ましい。ヒト CCR5 に特異的な前記抗体は、ネズミ抗ヒト CCR5 抗体 MC - 1 であり、特に Mack (1998), J. Exp. Med. 187, 1215 - 1224 および添付に実施例に記載されている。また、(添付の実施例で特徴づけられ、また Segerer (1999), loc. cit. に記載されているように) MC - 5 のような他の - CCR5 抗体が本発明の文脈に含まれていることを認識できるであろう。CD3 抗原に特異的な抗体は、ガンマ、デルタ、イプシロン、ゼータ鎖を認識する抗体、特に好ましくはイプシロン鎖と CD3 ゼータ鎖を認識する抗体から成る群より選ばれうる (Jakobs (1997) Cancer Immunol Immunother. 44, 257 - 264; Mezzanzanica (1991) Cancer Res 51, 5716 - 5721)。抗イプシロン鎖抗体の例としては、OKT3 (WO 91/09968, Kung et al., Science 206, 347 - 349 (1979); Van Wauwe, J. Immunol. 124, 2708 - 2713 (1980); Transy, Eur. J. Immunol. 19, 947 - 950 (1989); Woodle, J. Immunol. 148, 2756 - 2763 (1992); Ada, Human. Antibod. Hybridomas, 41 - 47 (1994)) および TR66 (Trau

30

40

50

necker (1991) EMBO J. 10, 3655-3659)がある。CD3ゼータ鎖に対するモノクローナル抗体の例としては、H2D9、TIA2(ともにベクトンディッキングソン)、G3(セロテック(株))がある。

本発明の使用の特に好ましい態様として、上述した単鎖抗体のV_LとV_Hドメインは、V_L(MC-1)-V_H(MC-1)-V_H(CD3)-V_L(CD3)の順に配列しており、ここでV_L(MC-1)が配列番号12で表されるアミノ酸配列を含み、前記V_H(MC-1)が配列番号16で表されるアミノ酸配列を含み、前記V_H(CD3)が配列番号26で表されるアミノ酸配列を含み、および/または前記V_L(CD3)が配列番号28を含むことが特に好ましい。MC-1抗体の特異的CDR部分は、配列番号29から34に示されており、ここで配列番号29はV_LMC-1のCDR1を示し、配列番号30はV_LMC-1のCDR2を示し、配列番号31はV_LMC-1のCDR3を示し、配列番号32はV_HMC-1のCDR1を示し、配列番号33はV_HMC-1のCDR2を示し、そして配列番号34はV_HMC-1のCDR3を表す。前記二重特異性抗体は、特に配列番号17で表される核酸配列によりエンコードされるアミノ酸配列を含み、または配列番号18で表されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0058】

本発明の使用の他の態様として、抗体構築物は第1の抗原として前記ケモカインレセプターに、第2の抗原としてトキシンに結合する二重特異性抗体である。抗体は前記トキシンに共有結合し、前記抗体トキシン構築物は化学的カップリングにより構築され、前記抗体および修飾された若しくは修飾されていない原核生物若しくは真核生物のトキシンから融合タンパク質またはモザイクタンパク質を産生しうる。さらに、前記抗体は、さらなる多量化ドメインを介して前記トキシンに結合してもよい。

【0059】

本発明の使用のさらなる態様として、前記抗体構築物は、多量化ドメインを介して、*in vitro*および/または*in vivo*でCD3抗原および/またはトキシンに結合する第2の抗体構築物に結合できる。前記多量化は、特にヘテロ(二)量化を介して得られるであろう。例えば、不変免疫グロブリンドメインのヘテロ(二)量化領域が用いられる。他の多量および/またはヘテロ二量化ドメインはこの分野で知られており、ロイシンジッパー、T細胞レセプターの - および - 鎖またはMHCクラスII分子に基づいている。さらに、jun-およびfos-に基づくドメインが用いられる(de Kufif (1996) J. Biol. Chem. 271, 7630-7634; Kostelny (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553)。多量化ドメインのさらなる例としては、Sakamoto (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8974-8978; Lee (1994) Nat. Struct. Biol. 1, 877-890; Jeffrey (1995) Science 267, 1498-5102 or Nooren (1999) Nat. Struct. Biol. 6, 755-759)に記載されているような、p53-およびMNT-ドメインがある。

【0060】

本発明の他の態様として、上述したケモカイン構築物は、修飾された若しくは修飾されていないケモカインと修飾された若しくは修飾されていないトキシンの融合構築物である。前記構築物は、特に多量化ドメインを介して*in vitro*および/または*in vivo*でCD3抗原および/またはトキシンに結合する抗体構築物に結合する。適切な多量化ドメインは、先行文献に記載されており、上述した。ケモカイン-トキシン構築物は、特に化学的カップリングの結果であり、(添付の実施例に示したように)組み換えにより産生され、またはケモカインと修飾された若しくは修飾されていない原核生物若しくは真核生物のトキシンの融合タンパク質として産生されうる。前記ケモカインがヒトケモカインレセプターCCR5に結合し、特にRANTES, MIP-1、MIP-1、MCP-2、MCP-3または前記レセプターに結合できるそれらのフラグメントを含むことが、特に好ましい。好ましいトキシンは、PE38、PE40またはPE37のよう

なシュードモナスのエクソトキシンの切断されたものでもよい。この発明の文脈において、最も好ましくはPE38である。

【0061】

さらに、本発明に従って、前記ケモカイン構築物は、CD3抗原に結合できる抗体構築物に結合する、および/またはトキシンに共有結合した、抗体構築物に共有結合したケモカインを含みうる。

【0062】

本発明の使用の特に好ましい態様として、抗体および/またはケモカイン構築物は、ケモカインレセプター、好ましくはCCR5レセプター、最も好ましくはヒトCCR5レセプターに結合する抗体および/またはケモカインを少なくとも1つ含むヘテロミニボディ構築物である。前記ヘテロミニボディ構築物は少なくとも1つのトキシンを含み、前記ヘテロミニボディ構築物が上記に定義したケモカインレセプターおよび/またはエフェクター細胞のCD3抗原に結合することが特に好ましい。好ましいケモカインは上述したケモカインであり、好ましいトキシンは上述したトキシンであり、これらは修飾されていても修飾されていなくてもよい。ケモカインは、この分野でよく知られており、特にMurphy (1999), loc. citに記載されている。従って、ケモカインがRANTES、MIP-1、MIP-1、MCP-2およびMCP-3またはそれらの機能的フラグメントから成る群より選ばれることが好ましい。この発明の内容において、最も好ましいケモカインはRANTESである。前記ケモカインの機能的フラグメントは、前記ケモカインレセプター、好ましくはヒトCCR5に結合またはこれと相互作用できるフラグメントである。ヘテロミニボディは、この分野で知られており、その製造については、特にWO00/06605に記載されている。前記ヘテロミニボディは、ケモカインレセプター、好ましくはヒトCCR5に結合またはこれと相互作用する少なくとも1つの抗体および/またはケモカインを含む多機能化合物であり、(さらに)以下に定義されるトキシンおよび/またはCD3抗原に対する結合部位を含みうる。

【0063】

好ましい態様として、本発明で用いられる抗体構築物またはケモカイン構築物は、融合(ポリ)ペプチドまたはモザイク(ポリ)ペプチドである。前記融合(ポリ)ペプチドは、上述したように単に構築物のドメインおよびそれらの機能的フラグメントのみを含んでいてもよい。しかし、前記融合(ポリ)ペプチドがさらにドメインおよび/または機能的伸長を含むことも企図される。従って、前記融合(ポリ)ペプチドは、少なくとも1つのさらなるドメインを含むことができ、前記ドメインは共有結合または非共有結合により結合している。このような構築物の構築と同様にその結合は、この分野で知られた方法に従った遺伝子融合に基づくことができ(Sambrook et al., loc. cit., Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989))、または例えばWO94/04688に記載されたような化学的架橋等により行うことができる。構築物に存在するさらなるドメインは、好ましくは柔軟なリンカー、より都合よくは(ポリ)ペプチドリンカーにより結合され、ここで前記(ポリ)ペプチドリンカーは好ましくは、前記さらなるドメインC末端から、ペプチド、(ポリ)ペプチドまたは抗体のN末端の、若しくはその逆の間の距離にわたり十分な長さの複数で親水性のペプチド結合したアミノ酸を含む。前記リンカーは、特にグリシン、セリン、および/または、グリシン/セリンリンカーでもよい。さらなるリンカーは、オリゴマー化ドメインを含む。オリゴマー化ドメインは、1つの機能的分子で2つまたはいくつかの自己抗原またはそれらのフラグメントの組み合わせを容易にする。オリゴマー化ドメインの非限定の例としては、(jun-fos、GCN4、E/EBPのような)ロイシンジッパー(Kostelny, J. Immunol. 148 (1992), 1547-1553; Zeng, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3673-3678, Williams, Genes Dev. 5 (1991), 1553-1563; Sut

10

20

30

40

50

er, " Phage Display of Peptides and Proteins ", Chapter 11, (1996), Academic Press)、不変ドメインCH1およびCLのような抗体由来オリゴマー化ドメイン (Mueller, F EBS Letters 422 (1998), 259-264)、および/またはGCN4-LIのような四量化ドメインがある (Zerangue, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000), 3591-3595)。

【0064】

さらに、本発明に用いられ、または以下に記載される抗体構築物またはケモカイン構築物は、少なくとも1つのさらなるドメイン、特に例えばヒスチジン伸長のような精製手段を提供するドメインを含んでいてもよい。前記さらなるドメインは、共有結合または非共有結合により結合しうる。

10

【0065】

結合は、この分野で知られたまたはここに記載された方法による遺伝子融合に基づくことができ、または例えばWO94/04686に記載されたような化学的架橋等により行うことができる。この発明で記載され、開示された構築物に存在するさらなるドメインは、好ましくは柔軟なリンカー、より都合よくはポリペプチドリンカーにより、結合部位ドメインの1つに結合し、ここで前記ポリペプチドリンカーは、水溶液に置かれたときに前記ポリペプチドが結合に適したコンフォメーションとなる、前記ドメインの1つのC末端から前記ドメインの他のN末端の距離にわたり十分な長さの複数で親水性のペプチド結合したアミノ酸を含む。好ましくは、前記ポリペプチドリンカーは、前述した態様に記載した

20

【0066】

本発明の使用、組成物および方法として開示した前記構築物が免疫調整因子として機能しうるさらなるドメインを含むことも、企図される。前記免疫調整因子には、限定されないが、サイトカイン、リンフォカイン、T細胞補助刺激リガンド等が含まれる。

【0067】

ナイーブT細胞のプライミングをもたらす十分な活性化は、1次免疫反応に重要であり、樹状細胞のような専用のAPC(抗原提示細胞)由来の2つのシグナルに依存する。第1のシグナルは、抗原特異的であり、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子との関連で提示されるプロセッシングされた抗原により誘導されるクローン型T細胞抗原レセプターの刺激により通常媒介される。しかし、この第1の刺激はナイーブT細胞のプライミング反応を誘導するには不十分であり、抗原提示細胞の補助刺激リガンド分子に結合する特異的T細胞表面分子の相互作用により提供される第2のシグナルが必要であり、これはプライミングされたT細胞の増殖をさらに支援する。従って、「T細胞補助刺激リガンド」の用語は、本発明の分子に照らして、第1の刺激との組み合わせでナイーブT細胞のプライミングを支援することができ、限定されないがB7-1(CD80)および137-2(CD86)等のタンパク質のB7ファミリーの構成員を含むものを意味する。

30

【0068】

上記に定義若しくは以下に記載される抗体および/またはケモカイン構築物は、さらなるレセプターまたはリガンド機能を含み、また免疫調整エフェクター分子またはそれらのフラグメントを含みうる。免疫調整エフェクター分子は、体液性および/または細胞性免疫系、特にその細胞性および/または非細胞性成分、その機能、および/またはその他の生理系との相互作用に、正および/または負に影響を与える。前記免疫調整エフェクター分子は、サイトカイン、ケモカイン、マクロファージ移動阻害因子(MIF;特にBernhagen(1998), Mol Med 76(3-4); 151-61 or Metz(1997), Adv Immunol 66, 197-223に記載されている)、T細胞レセプターおよび溶解性MHC分子から成る群より選ばれうる。このような免疫調整エフェクター分子は、この分野でよく知られており、特にPaul, "Fundamental immunology", Raven Press, New York (1

40

50

989)に記載されている。特に、知られたサイトカインおよびケモカインは、Meager, "The Molecular Biology of Cytokines" (1998), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England; (Bacon (1998). Cytokine Growth Factor Rev 9 (2): 167-73; Oppenheim (1997). Clin Cancer Res 12, 2682-6; Taub, (1994) Ther. Immunol. 1 (4), 229-46 or Michiel, (1992). Semin Cancer Biol 3 (1), 3-15)、に記載されている。

【0069】

10

本発明で開示され記載され、およびさらなる機能ドメインを含む抗体および/またはケモカイン構築物は、特に以下に記載されるようなヘテロミニボディのような多機能化合物でもよい。

【0070】

本発明で使用され、またはここに記載された構築物は、1つの種から、好ましくは哺乳動物から、より好ましくはヒトから由来するドメインを含む構築物でもよい。しかし、キメラおよび/またはヒト化構築物も予期されるものであり、本発明の範囲内に含まれるものである。

【0071】

特に好ましい態様として、本発明で使用され、またはここに記載された構築物を含む本発明の組成物は、架橋(ポリ)ペプチド構築物である。ここで言及するように、前記架橋は、生化学的方法や組み換えを含むこの分野で知られた方法に基づくであろう。

20

【0072】

本発明の使用のまたさらなる態様として、使用される抗体構築物またはケモカイン構築物は、少なくとも1つのトキシンを含む。前記トキシンは、シュードモナスのエクソトキシンA、ジフテリアトキシンおよび同種のトキシンでもよい。添付の実施例に記載したシュードモナスのトキシンのPE38やPE40のような、切断されたトキシンも用いられると企図される。

【0073】

前記トキシンは、上述したような方法により前記抗体またはケモカインに結合しうる。前記トキシンが短いペプチドリンカーにより抗体/ケモカインに結合することも企図される。そのリンカーは、好ましくは柔軟で親水性のアミノ酸配列からなり、特にグリシンおよびセリンである。好ましくは前記リンカーは、1から20のアミノ酸長を有する。

30

【0074】

シュードモナスのエクソトキシンAの切断したものを有するいくつかの融合タンパク質が、これまで設計されてきた。それらのほとんどは、悪性細胞を標的とし破壊するために使用されてきた。このトキシンは、タンパク質分解による切断により活性化される。完全長タンパク質がその第1のドメインで遍在する2-マクログロブリンレセプターに結合し、従ってほとんどの真核細胞に毒性であるので、トキシンの切断されたもの(PE38)は本発明の構築物として使用されうる。しかし、この問題は、シュードモナスのエクソトキシンAの第1のドメインを、トキシンの結合特異性を変化させるための特異的配列に置き換えることにより解決しうる。

40

【0075】

さらに、本発明は、霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染している細胞の除去のための医薬組成物を調製するための、ケモカインレセプターに結合するケモカイン構築物の使用に関連し、ここで前記ケモカイン構築物は、配列番号24で表され、または配列番号23で表されるヌクレオチド配列によりエンコードされるアミノ酸配列を含む。

【0076】

上述したように、また好ましい態様にあるように、本発明の範囲内で使用される抗体および/またはケモカイン構築物は、CD3抗原に結合またはこれと相互作用する。好ましく

50

は前記CD3抗原は、エフェクター細胞、主としてT細胞、好ましくは細胞毒性T細胞の表面にある。

【0077】

抗体構築物がCCR5に対する結合部位およびCD3に対する結合部位を含む構築物を使用し、前記ケモカイン構築物がRANTESを含み、前記トキシンが切断されたシュードモナスのエクソトキシンA(PE38)であるケモカイン構築物を使用することが特に好ましい。

【0078】

従って、本発明は、CCR5に対する結合部位とCD3に対する結合部位を含む抗体構築物、RANTESおよび切断されたシュードモナスのエクソトキシンA(PE38)を含むケモカイン構築物、にも関連する。

10

【0079】

本発明はまた、上記で定義した抗体構築物をエンコードするポリヌクレオチド、またはここで定義するケモカイン構築物をエンコードするポリヌクレオチドにも関連し、ここで前記ポリヌクレオチドは、(a)配列番号18若しくは配列番号24で表されるポリペプチドを特にエンコードする核酸分子を含むポリヌクレオチド；(b)配列番号17若しくは配列番号23で表される核酸分子を含むポリヌクレオチド；または(c)(a)または(b)のポリヌクレオチドの相補鎖にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド、である。

【0080】

上記(c)で特徴づけられるポリヌクレオチド/ヌクレオチド配列に関して、この文脈における「ハイブリダイズする」の用語は、通常のハイブリダイズの条件、好ましくは50%ホルムアミド/6×SSC/0.1%SDSおよび100μg/mlのssDNAでハイブリダイズさせ、ここでハイブリダイズの温度が37以上で、0.1×SSC/0.1%SDSで洗浄する温度が55以上のような条件を指す。最も好ましくは、「ハイブリダイズする」の用語は、例えばSambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているような、ストリンジェントなハイブリダイズ条件を指す。上記(c)で特徴づけられるポリヌクレオチドが(a)および/または(b)で定義されるポリヌクレオチドと高い相同性を有し、(a)および/または(b)で定義されるポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、最も好ましくは99%の相同性を有していることが企図される。(c)により定義され特徴づけられるポリヌクレオチドは、それ故(a)および(b)で定義されるポリヌクレオチドと高い相同性を有するポリヌクレオチドをエンコードしうる。当業者は、ケモカインレセプター、特にヒトCCR5レセプターに結合する、および/またはHIV-1のような霊長類の免疫不全ウイルスに感染した細胞等の細胞を除去し、涸渇させおよび/または破壊する、または免疫障害に関係する若しくはここに開示された標的細胞を除去し、涸渇させおよび/または破壊する、このような相同性ポリペプチドの能力を容易に試すことができる。当業者は、添付の実施例のin vitro、in vivoおよびex vivo試験を容易に適用して、このような構築物の結合および/または涸渇の性質を確認することができる。

20

30

40

【0081】

さらに、前記ポリヌクレオチド/核酸分子は、例えばチオエステル結合および/またはヌクレオチドアナログを含有しうる。前記修飾は、細胞中のエンド-および/またはエキソヌクレアーゼに対する核酸分子の安定化に有用であろう。前記核酸分子は、細胞中で前記核酸分子の転写を可能にするキメラ遺伝子を含んだ適当なベクターにより転写されうる。本発明の組成物のポリヌクレオチド/核酸分子は、前述したいずれの核酸分子単独または組み合わせのいずれかを含む組み換えにより産生されたキメラ核酸分子でもよい。

【0082】

50

前記ポリヌクレオチドは、例えばDNA、cDNA、RNAまたは合成により産生されたDNA若しくはRNA、または単独または組み合わせでいずれかのこれらのポリヌクレオチドを含む組み換えにより産生されたキメラ核酸分子でもよい。好ましくは、前記ポリヌクレオチドはベクターの一部である。このようなベクターは、適当な宿主細胞中および適当な条件下で前記ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子のようなさらなる遺伝子を含んでいてもよい。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、原核または真核細胞で発現可能な発現制御配列に作用的に結合する。前記ポリヌクレオチドの発現には、ポリヌクレオチドの翻訳可能なmRNAへの転写が含まれる。真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞での発現を確実にする調整因子は、当業者によく知られている。これらは通常転写の開始を確実にする調整配列、および任意に転写の終了と転写物の安定化を確実にするポリAシグナルを含む。さらなる調整因子には、転写および翻訳エンハンサー、および/または天然に組織化された若しくは異種のプロモーター領域が含まれうる。原核宿主細胞で発現が許される可能性のある調整因子には、例えば*E. coli*のPL, lac, trpまたはtacプロモーターが含まれ、真核宿主細胞で発現が許される調整因子の例としては、酵母のAOX1またはGAL1プロモーター、哺乳動物や他の動物細胞のCMV-, SV40-, RSV-プロモーター(ラウス肉腫ウイルス)、CMV-エンハンサー、SV40-エンハンサーまたはグロブリンイントロンがある。転写開始の原因となる因子に加えて、これらの調整因子は、SV40-ポリA部位やtk-ポリA部位のような転写終止シグナル、ポリヌクレオチドの下流を含んでいてもよい。さらに、用いる発現系に依存してポリペプチドを細胞区画に誘導したり、媒質中に分泌したりできるリーダー配列は、本発明のポリヌクレオチドのコード配列に加えることができる。これはこの分野でもよく知られており、また例えば添付の実施例を参照のこと。リーダー配列は、適切な相中で、翻訳、開始および終止配列、好ましくは翻訳されたタンパク質やそれらの部分の、ペリプラズム空間や細胞外媒質への分泌を誘導できるリーダー配列、とともに集合する。任意に、異種配列は、例えば発現した組み換え産物の安定化や簡潔化した精製など、望む特徴を付与するN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をエンコードできる(前掲参照)。この文脈において、適当な発現ベクターは、Okayama-Berg cDNA発現ベクターpcDV1(ファルマシア)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(インビトロジェン)、またはpSPORT1(ギブコBRL)のような、この分野で知られたものである。

10

20

30

【0083】

好ましくは、発現制御配列は、ベクター中のトランスフェクションする真核宿主細胞の形質転換を可能にする真核細胞プロモーター系でありうるが、原核細胞の宿主の制御配列を用いてもよい。ベクターが適切な宿主に取り込まれると、宿主はヌクレオチド配列の高レベルの発現に適した条件下に維持され、所望により本発明のポリペプチドの採取および精製が続いて行われる。例えば、添付の実施例を参照のこと。

【0084】

上述したように、本発明のポリヌクレオチドは、単独またはベクターの一部として用いて、例えば免疫障害の処置や抗ウイルス治療のための本発明や細胞において使用される抗体および/またはケモカイン構築物を発現できる。上記のポリペプチドのいずれか1つをエンコードするDNA配列を含むポリヌクレオチドやベクターは細胞中に導入され、次にこれは目的のポリペプチドを産生する。従って、前記ポリヌクレオチドおよびベクターは、遺伝子治療に用いてもよい。遺伝子治療は、*ex vivo*や*in vivo*技術により治療遺伝子を細胞中に導入することに基づいているが、これは遺伝子転移の最も重要な応用の1つである。*in vitro*や*in vivo*の遺伝子治療のための適したベクター、方法または遺伝子輸送系は、文献に記載され、当業者に知られている。例えば、Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Verma, *Nature* 389 (1994), 239; Isner, *Lancet* 348 (

40

50

1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N. Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO94/29469; WO97/00957, US5,580,859; US5,589,466; または Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, およびそれらの引用文献を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、細胞への直接導入または、リポソームやウイルスベクター（例えばアデノウイルス、レトロウイルス）を介した導入のために設計されうる。好ましくは、前記細胞は、微生物系細胞、胚細胞、卵細胞、またはこれら由来のものであり、最も好ましくは前記細胞は幹細胞である。胚性幹細胞の例としては、特に Nagy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 8424-8428 に記載された幹細胞が挙げられる。

上記に従って、本発明は、本発明のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを含む、遺伝子工学に通常使用されるベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージに関連する。好ましくは、前記ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子転移若しくは標的ベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシ乳頭腫ウイルスのようなウイルス由来の発現ベクターは、標的細胞集団に本発明のポリヌクレオチドやベクターを輸送するために用いることができる。当業者によく知られた方法は、組み換えベクターを構築するために用いることができ、例えば Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989) に記載された技術を参照のこと。あるいは、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、標的細胞に輸送するためのリポソーム中に再構築することができる。本発明のポリヌクレオチドを含むベクターは、よく知られた方法により宿主細胞に転移させることができ、その方法は細胞宿主の型に依存し変化するものである。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞に通常利用され、一方リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションは他の細胞宿主に用いられる（前掲 Sambrook 参照）。一旦発現すると、本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等の、この分野の標準的工程により精製できる。Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N. Y. (1982) を参照のこと。医薬用途には、実質的に少なくとも約90から95%の均質性の純粋なポリペプチドが好ましく、98から99%もしくはそれ以上の均質性が最も好ましい。部分的に、または所望の均質性まで一旦精製されると、ポリペプチドは、（体外を含めた）治療のためまたは分析工程の発展および実行のために用いれうる。

【0085】

またさらなる態様として、本発明は、上述したポリヌクレオチド若しくはベクターを含んだ細胞、または本発明のベクターにより形質転換した宿主に関連する。好ましくは、前記宿主/細胞は、真核生物のものであり、ポリペプチドの治療への使用を企図するのであれば、最も好ましくは動物細胞である。もちろん、酵母や微生物細胞のようにあまり好ましくない原核生物のもので、特に産生したポリペプチドが診断手段として使用される場合には、同様に働くであろう。

【0086】

宿主細胞に存在する本発明のポリヌクレオチドやベクターは、いずれも宿主細胞のゲノム

に統合され、または染色体外に維持されてもよい。

【0087】

「原核生物」の用語は、本発明のポリペプチドの発現のためのDNAやRNA分子により形質転換またはトランスフェクションされうるすべての微生物を含む意味である。原核生物の宿主には、例えばグラム陰性菌と同様、E. coli、S. typhimurium、霊菌、枯草菌のようなグラム陽性菌が含まれうる。「真核生物」の用語は、酵母、高等植物、昆虫および好ましくは動物細胞を含む意味である。組み換え体産生工程に用いられる宿主に依存して、本発明のポリペプチドはグリコシル化していても、グリコシル化していなくてもよい。本発明のポリペプチドは、開始メチオニンアミノ酸残基を含んでいてもよい。本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、当業者に一般的に知られたいずれの技術を用いる宿主の形質転換またはトランスフェクションもすることができる。特に好まれるのは、本発明のポリペプチドのコード配列を含み、N末端フラッグ-タグおよび/またはC末端His-タグがこれらに遺伝子的に融合したプラスミドやウイルスの使用である。好ましくは、前記フラッグ-タグの長さは約4から8アミノ酸であり、最も好ましくは8アミノ酸である。例えば哺乳動物細胞や微生物中での、融合し操作可能な結合した遺伝子の調製およびその発現の方法は、この分野でよく知られている(Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)。ここに記載された遺伝子構築物および方法は、真核生物または原核生物の宿主中での本発明のポリペプチドの発現に利用できる。一般的に、挿入されたポリヌクレオチドの十分な転写を容易にするプロモーター配列を含んだ発現ベクターは、宿主との関連で使用される。発現ベクターは、一般的には複製起点、プロモーター、ターミネーター、および形質転換した細胞の表現型による選択を提供できる特異的遺伝子を含む。さらに、本発明の細胞を含むトランスジェニック動物、好ましくは哺乳動物は、本発明の抗体および/またはケモカイン構築物の大スケールでの産生に使用されうる。最も好ましくは、前記トランスジェニック動物は本発明の抗体構築物を産生する。

10

20

【0088】

さらなる態様として、従って本発明は、抗体および/またはケモカイン構築物の発現および細胞や培地からポリペプチドを単離するのに適した条件下での本発明の(宿主)細胞の培養を含む、上述したポリペプチドの調製工程と関連する。形質転換した宿主は、最適な細胞成長を行うためのこの分野で知られた技術に従い、発酵層で成長させ、培養することができる。そして、本発明の産生された構築物は、成長培地、細胞溶解産物、または細胞膜画分から単離されうる。例えば微生物により発現した本発明のポリペプチドの単離および精製は、例えば本発明のポリペプチドのタグに対して誘導されたモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を伴うような、または添付の実施例に示したような、予備的クマトグラフによる分離および免疫的分離のようないずれの通常の方法によってもよい。

30

【0089】

宿主細胞に依存して、適切なコンフォメーションを獲得するために、復元技術が必要な場合がある。必要な場合は、最適な結合を探すための点置換が、通常のカセット式変異誘発やここに記載されたような他のタンパク質工学手法をもちいたDNAにおいて行われうる。本発明のポリペプチドの調製は、酵素、毒素、成長因子、細胞分化因子、レセプター、代謝拮抗物質、ホルモン、種々のサイトカインまたはリンフォカインのような生物活性のあるタンパク質のアミノ酸配列(または対応するDNAやRNA配列)の知識にも依存してもよい。このような配列は、文献やコンピュータによるデータベースを通じて入手可能である。

40

【0090】

本発明は、さらに上述したまたは上述した方法により産生されたポリヌクレオチドによりエンコードされた抗体構築物またはケモカイン構築物に関係する。

【0091】

50

さらに、本発明の構築物は、添付の実施例に記載されたように免疫障害、特に自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患およびエイズ（HIV感染）の管理、に用いることができる。

【0092】

さらに、本発明は、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、宿主、抗体構築物および/またはケモカイン構築物を含む組成物を提供する。

【0093】

この発明の内容において「組成物」の用語は、ここに記載された少なくとも1つのポリヌクレオチド、ベクター、宿主、抗体構築物および/またはケモカイン構築物を含む。

【0094】

前記組成物は、任意に、さらに例えば免疫系を調整および/または妨害することができる分子のような他の分子を単独または組み合わせで含む。組成物は固体、液体または気体の形態でもよく、特に粉末、錠剤、溶液またはエアロゾルの形態でもよい。好ましい態様として、前記組成物は少なくとも2つの、好ましくは3つの、より好ましくは4つの、本発明で記載された最も好ましい化合物を含む。

好ましくは、前記組成物は、任意に医薬的に許容可能なキャリアー、希釈剤および/または賦形剤をさらに含む医薬組成物である。

【0095】

適した医薬のキャリアーの例としては、この分野でよく知られており、リン酸パーファー塩溶液、水、油/水エマルジョンのようなエマルジョン、種々の型の湿潤剤、無菌溶液等が含まれる。このようなキャリアーを含む組成物は、よく知られた通常の方法により処方できる。これらの医薬組成物は、適切な投与量で被験者に投与できる。適した組成物の投与は、例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与等の異なる方法により実施できる。静脈内投与が特に好ましい。投与計画は、医師の立ち会いの下、臨床的要因により決定されうる。医療分野でよく知られているように、いずれかの1人の患者への投与量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、一般的な健康状態、および同時に投与される他の薬剤を含む、多くの要因に依存する。一般的には、医薬組成物の標準の投与の計画は、1日当たり1 μ g から10 mg 単位の範囲であろう。投与計画が連続的注入の場合は、体重1キログラム、1分当たり1 μ g から10 mg 単位の範囲であろう。しかし、連続注入のより好ましい投与量は、体重1キログラム、1時間当たり0.01 μ g から10 mg 単位の範囲であろう。特に好ましい投与量としては、以下に述べられている。進行状況は、周期的な評価により観察することができる。投与量は変化するが、DNAの静脈投与の好ましい投与量は、DNA分子の約 10^6 から 10^{12} コピーである。本発明の組成物は、局所的または全身的に投与してもよい。投与は、通常静脈内などの非経口によるが、外用投与も企図している。DNAは、例えば内側または外側の標的部位にバイオリスティックな輸送により、または動脈へのカテーテル挿入によるなど、標的部位に直接投与してもよい。非経口投与の調製物には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁物およびエマルジョンが含まれる。非水溶性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、オレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルがある。水溶性キャリアーには、水、アルコール/水溶液、エマルジョン、懸濁物、塩水およびバッファー溶媒等が含まれる。非経口の賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンガーブドウ糖液、ブドウ糖および塩化ナトリウム、リンガー液、または固定油が含まれる。静脈内投与の賦形剤には、液体および栄養補給剤、（リンガーブドウ糖液に基づいたもののような）電解質補給剤等が含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等の防腐剤や他の添加剤もある。さらに、本発明の医薬組成物は、例えば血清アルブミンや免疫グロブリン、好ましくはヒト由来のもの等のタンパク質様キャリアーを含みうる。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の意図する使用に依存して、さらに生物学的に活性な物質を含むことを企図している。このような物質は、免疫系に作用する薬剤、抗ウイルス処置に用いる薬剤、特にHIVの処置（例えばHAART）およびエイズ管理および/または抗炎症薬でありうる

10

20

30

40

50

。例えば、ウイルス容量が数週間から数ヶ月間検出濃度以下となるまで、できるだけ早期に患者がH A A R T処置を受けることを企図する。感染した患者のH A A R Tによる早期の処置は、C C R 5からC X C R 4等の他のケモカインレセプターの使用へのウイルス株転移を防ぐ(Connor (1997) J. Exp. Med. 185, 621-628)。例えば、C C R 5 x C D 3構築物等の本発明で開示された構築物は、H A A R Tに加えて投与され、H I V - 1により再感染しやすい細胞とともに潜伏して感染している細胞を除去する。C C R 5⁺細胞の潤滑は、1から10回繰り返される。C C R 5 x C D 3の投与量は、0.5 μg/m²から10 mg/m²の範囲であり、好ましくは10 μg/m²から100 μg/m²である。薬剤は、静脈内、皮下および/または大脳脊髄液中に投与できる。二重特異性抗体による数回の処置サイクルの後、H A A R Tを中断し、ウイルス容量を詳しく観察する。ウイルス容量が検出濃度以上に増加した場合は、H A A R Tおよび二重特異性抗体の新たなサイクルを上記したように開始する。

10

【0096】

本発明の種々のポリヌクレオチドおよびベクターが標準的なベクターおよび/または遺伝子輸送系を用い、また任意に医薬的に許容可能なキャリアーまたは賦形剤とともに、単独またはいずれかの組み合わせのいずれかで投与されることが、本発明により企図されている。投与の後、前記ポリヌクレオチドまたはベクターは、被験者のゲノム中に安定して統合される。好ましくは、前記被験者はヒトである。

【0097】

一方、特定の細胞や組織に特異的であり、前記細胞に執着するようなウイルスベクターを用いてもよい。適した医薬的キャリアーおよび賦形剤は、この分野でよく知られている。本発明に従って調製される医薬組成物は、異なる種類の免疫疾患の予防、処置または遅延に用いられ、これらの免疫疾患は、炎症、特に炎症性腸疾患、炎症性腎疾患、(慢性)関節炎のような炎症性関節疾患等の、炎症に関係しうる。さらに、本発明の医薬組成物は、ウイルス、好ましくは霊長類の免疫不全ウイルス、より好ましくはH I V (- 1)に潜伏して感染した細胞を除去するために用いてもよい。

20

【0098】

さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む本発明の医薬組成物を遺伝子治療に用いることも可能である。適した遺伝子輸送系には、リポソーム、レセプター媒介輸送系、裸のDNA、並びにヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルスのようなウイルスベクターが含まれる。遺伝子治療のための身体の特定期位への核酸の輸送は、Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729)に記載されたようなバイオリスティックな輸送系を用いて達成してもよい。核酸輸送のさらなる方法には、例えばVerma, Gene Ther. 15 (1998), 692-699に記載されたような粒子媒介遺伝子転移を含む。

30

【0099】

導入されたポリヌクレオチドおよびベクターが前記細胞に導入された後、好ましくは前記細胞の寿命の間その状態を維持して、遺伝子産物を産生することが理解される。例えば、適切な調整配列の制御の下でポリヌクレオチドを安定的に産生する細胞系は、当業者によく知られた方法に従って遺伝子操作することができる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを用いるよりむしろ、宿主細胞はプラスミドと同一か別個のいずれかの、本発明のポリヌクレオチドおよび選択マーカーにより形質転換される。外来DNAの導入後、遺伝子操作された細胞は、富養化された培地で1-2日間成長させ、そして選択培地に移される。組み換えプラスミドの選択マーカーは、選択耐性を付与し、そのクロモソーム中に安定して統合されたプラスミドを有する細胞の選択を可能にし、細胞系で順次複製し拡張するフォーカスを形成するように成長する。

40

【0100】

多数の選択系が使用され、例えば限定するものではないが、t k⁻、h g p r t⁻、a p r t⁻細胞における、それぞれ、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler

50

、Cell 11 (1977), 223)、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962), 2026)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, Cell 22 (1980), 817) などがある。また、代謝拮抗物質耐性は、メトトレキサート耐性を付与する dhfr (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527)、ミコフェノール酸耐性を付与する gpt (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072)、アミノグリコシド G-418 耐性を付与する neo (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1)、ハイグロマイシン耐性を付与する hygro (Santerre, Gene 30 (1984), 147)、ピューロマイシン (pat、ピューロマイシン N-アセチルトランスフェラーゼ)、による選択の基礎として使用できる。例えば細胞にトリプトファンの代わりにインドールの利用を可能にする trpB、細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールの利用を可能にする hisD (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047)、オルニチンデカルボシキラーゼ阻害因子である 2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン (DFMO) 耐性を付与する ODC (オルニチンデカルボシキラーゼ) (McCologue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) 等、さらなる選択可能な遺伝子が記載されている。

【0101】

さらなる態様として、本発明は、組成物、上述したように好ましくは医薬組成物に関連し、これらはさらに免疫障害の処置のための薬剤または抗 HIV 処置のための薬剤を含む。

【0102】

前記抗 HIV 処置には、HAART が含まれうる。HAART 治療は、3 分類の抗ウイルス薬のカクテルから成る。これらの分類は、ヌクレオシドの逆転写酵素阻害剤 (NRTI)、非ヌクレオシドの逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) およびプロテアーゼ阻害剤 (PI) である。優先的に 1 以上の分類からの 2 から 4 つの薬剤を通常組み合わせ、ウイルス容量をほとんど非検出濃度まで減少させる。製品、投与スケジュールおよび一般的な副作用については、添付の表 I ~ III に示す。

【0103】

免疫障害の前記処置には、抗炎症剤および免疫抑制剤を含みうる。抗炎症剤は、アザチオプリン、シクロホスファミド、プレドニゾンおよびコルチコステロイドのようなグルココルチコイドから成る群より選ばれうる。免疫抑制剤には、シクロスポリン A、タクロリマス (FK506)、シロリマス (ラパマイシン) が含まれうる。タンパク質薬には、カルシニューリン、ベータ-インターフェロン、抗 TNF アルファモノクローナル抗体 (レミケード) が含まれうる。抗炎症剤および免疫抑制剤の投与および使用は、特に Fauci et al., sic に記載されている。さらなる処置の選択肢は、当業者に知られており、特に上記に記載されている。

【0104】

特に好ましい態様として、本発明は、免疫障害を処置、予防および/または緩和するための、または霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染した細胞を除去するための、このような処置、予防および/または緩和を必要とする被験者に、本発明の化合物および/または組成物、好ましくは医薬組成物を有効量投与することを含む、方法に関連する。

【0105】

ここで記載された構築物は、ケモカインレセプター陽性細胞を特異的に破壊するのに特に有用である。例えば、標的細胞上の CCR5 と T 細胞上の CD3 に同時に結合する二重特異性抗体は、細胞毒性 T 細胞を CCR5 陽性標的細胞に再誘導する。添付に実施例に示したように、抗体構築物は、CCR5 陽性 T 細胞および単球を特異的に潤滑させるが、CC

R5欠損 32 / 32 PBMCのようなCCR5を発現しない細胞に対しては不活性である。さらに、*in vitro* / *ex vivo*試験において、二重特異性抗体構築物は、関節炎患者の滑液からのCCR5陽性単球およびT細胞の95%以上を除去した。ケモカイン構築物のような他の構築物では、例えば、ケモカインRANTESとシュードモナスのエクソトキシンAの切断されたもの(PE38)との融合タンパク質は、添付の実施例に例証されたように、CCR5に結合でき、細胞表面からレセプターを下降調整することができる。48時間以内に、RANTES-PE38は、2nMの濃度においてCCR5陽性CHO細胞を完全に破壊した。CCR5陰性CHO細胞に対しては、細胞毒性効果は検出されなかった。

【0106】

慢性的に炎症を起こしている組織の浸潤のCCR5陽性T細胞および単球の優位性に基づいた、CCR5陽性細胞の特異的潤濁は、免疫障害の処置における新しい概念である。

【0107】

上述したように、特異的ケモカインレセプターがHIV感染細胞上に、主としてCCR5が存在するという事実によって、本発明の化合物および組成物は、霊長類の免疫不全ウイルスに潜伏して感染した細胞の潤濁/除去に特に有用である。

【0108】

本発明は、免疫障害の処置、予防および/または緩和のための医薬組成物の調製または、潜伏して感染した細胞の除去のための医薬組成物の調製のための、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、宿主、抗体構築物および/またはケモカイン構築物にも関連し、そして前記細胞は霊長類の免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、特にHIV-1に潜伏して感染している細胞である。

【0109】

前記免疫障害は、自己免疫疾患、皮膚疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、糖尿病および移植拒絶反応であり、前記自己免疫疾患は多発性硬化症、I型糖尿病、リウマチ性関節炎から成る群より選ばれる。前記皮膚疾患は、乾癬性病巣、乾癬、萎縮性皮膚炎等を含みうる。上述の炎症性疾患は、炎症性関節疾患、炎症性腎疾患、炎症性腸疾患から成る群より選ばれる。特に、前記炎症性腸疾患には、クローン病、サルコイドーシス、全身性硬化症、膠原病、筋炎、神経炎が含まれうる。炎症性腎疾患には、腎炎、糸球体腎炎、ループス腎炎、またはIgA腎症が含まれうる。

【0110】

種々の慢性炎症性疾患において、CCR5陽性T細胞およびマクロファージの顕著な蓄積が、炎症部位に見出される。CCR5⁺細胞の蓄積は、関節炎、炎症性腎疾患、移植拒絶反応、多発性硬化症や炎症性腸疾患のような自己免疫疾患、等の炎症性疾患のいくつかの型で示された。対照的に、これらの患者の末梢血液では、ごく少数のT細胞および単球がCCR5を発現する。従って、CCR5は、慢性炎症に関与する白血球を同定するための優秀なマーカーと思われる。CCR5の発現を防ぐCCR5遺伝子の32bpの欠損の発生は、慢性炎症性疾患におけるCCR5の病態生理学的役割の研究を可能にする。リウマチ性関節炎患者において、CCR5欠損(32/32)個体の頻度は、顕著に減少する。さらに、腎臓移植での平均生存率は、CCR5-32/32患者で顕著に長い。これらの結果から、CCR5を治療の介入のための標的とできることがわかる。さらに、末梢血液の白血球上のCCR5のわずかな発現と対照的な疾患組織におけるCCR5陽性白血球の遍在は、CCR5陽性白血球が、末梢血液白血球を顕著に潤濁させることなく、多発性硬化症のような、慢性炎症、移植拒絶反応および自己免疫疾患の浸潤細胞の数の削減によって治療に有用であり得ることを意味する。炎症性浸潤からのCCR5陽性白血球の除去は、これらがすでに組織に浸潤しているので、これらの細胞のケモカインレセプターを単に遮蔽することに比べて治療として大いに有益であろう。

【0111】

添付の実施例で立証されているように、抗体および/またはケモカイン構築物は、特に炎症性関節疾患を処置、予防および/または緩和するのに有用である。従って、本発明の組

10

20

30

40

50

成物は、関節炎、特に慢性関節炎のような炎症性関節疾患の処置に特に有用である。

【0112】

本発明はさらに、医療方法および使用を提供し、ここで組成物は好ましくは医薬組成物であり、抗ウイルス剤との組み合わせおよび/またはエイズ管理に利用される薬剤との組み合わせにより投与される。

【0113】

上述したように、エイズ管理における主要な問題は、潜伏してHIV感染した細胞の発生にある。現在の処置の選択肢は、HIV-1ウイルスの2つの酵素、プロテアーゼと逆転写酵素を妨害する抗ウイルス剤に基づいている。プロテアーゼは、不活性なウイルスのプレタンパク質を活性産物の形態に切断するために不可欠なものであり、一方逆転写酵素は、ウイルスRNAゲノムのDNA中間体を産生するのに必要なものである。そしてDNA中間体は、宿主ゲノムに統合され、沈黙して潜伏した形態でそこにとどまる。最も効果的な処置の選択肢は、高活性抗レトロウイルス治療(HAART)からなり、-処置計画は少なくとも3つの抗レトロウイルス薬からなり、プロテアーゼ阻害剤の分類の薬剤を通常少なくとも1つ含む。高活性抗レトロウイルス治療(HAART)の出現は、HIV-1感染個体に重要な影響を与え、循環するウイルスを検出可能な濃度にまで低下させた(Oxenius (2000) Proc. Natl Acad. Sci. 97, 33833387; Perelson (1997) Nature (London) 387, 188-191; Hammer (1997) N. Engl. J. Med. 337, 725-733; Gulick (1997) N. Engl. J. Med. 337, 734-739)。これにもかかわらず、潜伏して感染した細胞は、かなりの期間これらの個体にとどまることができ(Chun (1997) Nature (London) 387, 183-188; Chun (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8869-8873; Zhang (1999) N. Engl. J. Med. 340, 1605-1613)、もしHAARTを中止すると、これらの細胞はウイルスを産生できることとなる(Harrigan (1999) AIDS 13, F59-F62)。潜伏して感染した細胞のプールは、霊長類のHIV-1感染の早期に作成された(Chun (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 8869-8873)。潜伏したウイルスレザバーの仮定した長い半減期(Zhang (1999) N. Engl. J. Med. 340, 1605-1613, Finzi (1999) Nat. Med 5, 512-517)、副作用、および長期のHAARTの費用(Flexner (1998) N. Engl. J. Med. 338, 1281-1292; Carr (1998) Lancet 351, 1881-1883)を考慮すると、潜伏したレザバーを除去する新しい方策を開発することが重要である。HAART処置がHIV感染個体の血漿ウイルス血症を抑制するのに非常に有効である一方、脳、リンパ系組織に関連した腸および生殖管において潜伏して感染したCD4+T細胞および他の細胞中に含まれるHIVの永続性のレザバーがなお存在する(Chun (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 10958-10961)。HAART中断後の血漿ウイルス血症の再出現は、それらの前から存在するウイルスレザバーによるものであり、HAARTではそれらのレザバーを除去することができない(Chun (2000) Nature Med. 6, 757-761)。従って、HAARTでも単にウイルス複製を抑制し、ウイルス容量を削減するにすぎず、潜伏して感染した細胞の出現を防いだり、そのような細胞を除去することはない。CCR5対立遺伝子のホモ接合32が欠損した個体がHIV-1感染に対して高い耐性を有するので、HIV-1の伝染はCCR5の存在に依存している。非常に活性な抗レトロウイルス治療はHIV-1の複製を効果的に抑制できるが、HIVの完全な根絶は、今日までなされていない。主要な障害は、潜伏して感染した細胞に対して抗レトロウイルス治療が不活性であるためと思われ、これらの細胞は数年にわたって生存でき、HIV-1の内因性の供給源として機能する。これらの細胞の多くがウイルスタンパク質を発現せずに、免疫反応を巧みに避けることができる。しかし、CCR5がその最初の感染に必要

であるので、潜伏して感染した細胞の大多数はなおCCR5を発現しているであろう。本発明の化合物は、CCR5⁺細胞の潤渴に特に有用であり、潜伏して感染したHIV⁺細胞の数を顕著に削減しうる。表面に発現したgp120等のウイルスタンパク質の特異的認識に依存するHIV-1感染細胞を除去するための他の方策は、これらの細胞中でウイルスが休眠中であるため、潜伏して感染した細胞に対しては、効果がないであろう。

【0114】

従って、本発明の組成物は、補助治療方法において特に有用であり、これはHIV感染細胞、好ましくはCCR5陽性細胞の潤渴を導くものである。本発明の組成物はHAARTとの組み合わせで用いることが好ましい。従って、本発明の構築物は、添付の実施例に示したようにHAARTとの組み合わせでHIV治療に用いられうる。HAARTの製品、投薬スケジュールおよび一般的な副作用は知られており、特に表I、IIおよびIIIに例証する。

10

【0115】

前記組み合わせは、他の抗ウイルス剤、好ましくは抗レトロウイルス剤、最も好ましくは抗HIV剤による処置の前または後の投与等の補助投与を含んでもよい。

【0116】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、宿主、抗体構築物および/またはケモカイン構築物を含むキットを提供する。

【0117】

さらに好ましくは、本発明のキットは、任意に保存溶液および/または維持試薬または科学的若しくは治療的方法を実施するのに必要な物質をさらに含む。前記キットは、特に、ここに定義した免疫障害の処置および/またはエイズ管理に用いられる薬剤および/または薬物を含んでもよい。さらに、本発明のキットの部品は、バイアル、瓶、容器の組み合わせ、または多重容器ユニットに、個々に充填できる。

20

【0118】

本発明は、以下の生化学的実施例を参照することによりここで記載されるが、これらは単に例示にすぎず、本発明の範囲を限定して解釈するためのものではない。

【0119】

【実施例】

実施例1：細胞系、PBMC調製、滑液

30

1.1 ヒトCCR5を発現するCHO細胞系の産生

CCR5のcDNA配列を、ヒトPBMCのゲノムDNAからPfu-ポリメラーゼ(ストラタジーン)を用いたPCRにより増幅した。オリゴヌクレオチドプライマーは：

【0120】

【化1】

配列番号1: 5' GGA ACA AGA TGG ATT ATC AAG TGT C 3'

配列番号2: 5' CTG TGT ATG AAA ACT AAG CCA TGT G 3'

増幅したフラグメントをゲル精製し、PCR-スクリプトAmp Sk(+)スクリプトベクター(ストラタジーン)に結紮し、配列決定した。PEF-DHFRベクターにサブクローニングした後、DHFR欠損CHO細胞をエレクトロポレーションによりトランスフェクトし、ヌクレオシドフリーのMEM培地で記載したように10%透析FCSで安定発現を選択した。CHO/CCR5トランスフェクトした細胞はFACS分析により均質であることが示された。

40

【0121】

1.2 PBMC精製

PBMCを、健康なドナーのパフィコートまたは完全血液からフィコール密度勾配遠心分離により単離した。そのように示されている場合には、CCR5対立遺伝子(32/32)にホモ接合32塩基対の欠失のあるドナーからのPBMCを用いて、CCR5の表面発現を防いだ。詳しくは、パフィコートを0.9%NaClで1:2に希釈し、35m

50

1 を 15 ml のフィコールパーク上に層化し、400 g で 25 分間遠心分離した。白色の中間相を採取し、連続した 3 回の洗浄により血小板を除去し、RPMI で 10% FCS とともに 100 g で 6 分間の遠心分離工程を行った。新たに単離した単球は非常に低いレベルの CCR5 を発現したが、RPMI で 10% FCS とともに 37 °C で 24 から 48 時間の PBMC の培養後に、発現が強く誘発された。FCS の量は、この誘発には影響しなかった。リンパ球上の CCR5 の発現は、培養の間変化しなかった。

【0122】

1.3 滑液

関節炎患者の滑液を診断若しくは治療としての関節穿刺により得、さらなる調製をすることなく実験に用いた。すべての患者からインフォームドコンセントを得た。滑液および血液サンプルを、膝関節炎の 23 人の患者から診断若しくは治療としての関節穿刺により同時に得た。診断内容としては、ここで適用可能な ACR 基準に従って、リウマチ性関節炎 (7)、反応性関節炎 (3)、未分化膝関節炎 (4)、乾癬性関節炎 (3)、変形性関節症 (2)、強直性脊椎炎 (1) および痛風 (3) が含まれた。すべての患者から書面のインフォームドコンセントを得た。滑液を光学顕微鏡により分析した。結晶を偏光顕微鏡により同定した。スチューデント t 検定およびペアード t 検定を統計分析として適用した。

10

【0123】

1.4 全血液サンプルおよび滑液におけるケモカインレセプター発現の分析

関節穿刺の直後、SF (滑液) 白血球を NaCl 0.9% 中の 5% PBS にて 2 回の洗浄工程により単離した。滑液細胞および全血液 (1 mM EDTA を含む) をケモカインレセプターに対するモノクローナル抗体および適当なアイソタイプ対照とともに 10 μg/ml の濃度で氷上でインキュベートした。抗体としては、CCR5 に対し MacK (1998) J. Exp. Med. 187, 1215-1224)、CCR2 に対しては DOC-3 で、これは CCR2 (9) に特異的に結合し、CCR1 に対しては Clone 53504 (R&D システムズ)、CXCR1 に対しては 5A12 (ファーマゲン)、CXCR2 に対しては 6C6 (ファーマゲン)、CXCR4 に対しては 12G5 (ファーマゲン)、IgG1-、IgG2a-、および IgG2b- アイソタイプ対照 (シグマ) を用いた。2 回の洗浄工程の後、細胞を PE-コンジュゲートウサギ抗マウス F(ab)2 フラグメント (R439、ダコ) とともに氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を 2 回洗浄し、CD4-FICT、CD8-PECy5 および CD14-APC (イムノテック) との組み合わせの後、10% マウス血清とともにインキュベートした。赤血球の分解の後、直ぐに細胞をフローサイトメトリー (ベクトン-ディッキンソン) により分析した。セルクエスト分析ソフトウェアにより計算を行った。ヘルパー T 細胞、細胞毒性 T 細胞、単球および好中球を光散乱特性および CD4、CD8、CD14 の発現若しくは不存在により同定した。ケモカインレセプターの発現をアイソタイプ対照に従って境界線を定義した後、計算した。

20

30

【0124】

急性および慢性の関節滲出の両方において、末梢血液に比較して、ケモカインレセプター CCR5 を発現した CD4+ および CD8+ T 細胞の割合が一貫して増加したことを見出した。これらのデータは以前の報告とよく一致する (MacK (1999) Arthritis Rheum. 42, 981-988; Qin (1998) J. Clin. Invest. 101, 746-754)。

40

【0125】

非結晶誘発関節炎における T 細胞上のケモカインレセプターの発現：滑液からの約 88% の CD4+ T 細胞および 93% の CD8+ T 細胞が、ケモカインレセプター CCR5 に対して陽性に染色された。同様に、SF 中の CD8+ および CD4+ T 細胞の多くの割合で CCR2 を発現した (66% および 48%) (図 1)。対照的に、末梢血液では少数の T 細胞しかケモカインレセプター CCR5 または CCR2 を発現しなかった。滑液において CCR5+ ヘルパー T 細胞が最も突出して豊富であった (血液：SF 比 = 1:4)。T リンパ球の大多数は両方の画分で CXCR4 に対して陽性に染色された。CXCR1、CX

50

C R 2 および C C R 1 は、T 細胞の少数にのみその割合が変化して発現した (図 1) 。 1 人の患者の典型的な例を図 2 に示し、末梢血液および滑液における白血球上の C C R 5 、 C C R 2 および C X C R 4 の発現を示す。

【 0 1 2 6 】

非結晶誘発関節炎における単球上のケモカインレセプターの発現：以前のデータと一致して、S F 中の大多数の単球は C C R 5 を発現した。さらに、末梢血液と比較して滑液中の単球において C X C R 1 、 C X C R 2 、 C X C R 4 および C C R 1 の減少した発現がここで報告される (図 1 、 2) 。 レセプター陽性細胞の低い頻度のみならず、細胞表面上のケモカインレセプターの低い密度が見出された (データは示していない) 。 基礎となる診断、関節滲出の期間または前処理との関係において違いは検出されなかった。 C C R 2 は、

10

【 0 1 2 7 】

非結晶誘発関節炎における好中球上のケモカインレセプターの発現：急性関節炎は、炎症を起こした関節への好中球の急激な流入により特徴づけられる。従って、炎症を起こした関節滲出からの好中球上のケモカインレセプターの発現を分析した。最初は、C X C R 4 の高い発現が急性および慢性関節炎患者の滑液からの好中球の大きな分画 (6 0 %) において示されるが、末梢血液ではもっと低い発現が見出された (2 4 %) (図 1 、 2) 。 痛風以外の関節炎では、C X C R 1 および C X C R 2 が、末梢血液と比べて約 5 0 % まで滑液からの好中球において減少した。C C R 1 は、両方の画分においてほんの少数の好中球しか発現しなかった。

20

【 0 1 2 8 】

1 . 5 C C R 5 遺伝子型の決定

ゲノム DNA をアフィニティークロマトグラフィー (ロシュダイアグノスティクス) により冷凍血液サンプルから調製した。続いて潜在的 3 2 塩基対欠失を含む C C R 5 遺伝子のフラグメントを、T a q ポリメラーゼを用いた 4 0 サイクルの P C R にて増幅した。プライマーは以下の通りである。

【 0 1 2 9 】

【 化 2 】

配列番号 3: 5' TTT ACC AGA TCT CAA AAA GAA G 3'

配列番号 4: 5' GGA GAA GGA CAA TGT TGT AGG 3'

30

P C R フラグメントの長さの違いにより (2 7 4 または 2 4 2 b p) 、 C C R 5 - 野生型および C C R 5 - 3 2 対立遺伝子を同定できた。

【 0 1 3 0 】

実施例 2 : 二重特異性抗体の構築

2 . 1 ヒト C C R 5 に対するモノクローナル抗体の産生

ヒト C C R 5 に対するモノクローナル抗体を産生するために、5 匹の B L A B / c マウスを 4 週間の間隔で腹腔内 (i . p .) で免疫し、最初に I L - 2 (1 0 0 U / m l) 中で 1 0 日間 1×10^7 P B M C とともに培養し、C C R 5 が高レベルで発現している 1×10^7 の C H O 細胞を 6 回続けて i . p . 注射した。この目的のために、C C R 5 をトランスフェクトした C H O 細胞を 2 0 n M メトトレキサートの存在下で成長させ、C C R 5 の発現を増幅し、C C R 5 を高レベルで発現している 1 つのクローンを選択した。C H O / C C R 5 細胞の最後の i . p . 注射の 4 日後に、脾臓を切除し、細胞を P 3 x 6 3 - A g 8 細胞系と融合した。約 6 0 0 0 のハイブリドーマからの上清を安定 C H O / C C R 5 細胞上でフローサイトメトリーにより融合の度にスクリーニングし、C C R 5 (M C - 1 、 M C - 4 、 M C - 5) に対するモノクローナル抗体を 3 回目の融合の後に検出した。M C - 1 (I g G 1) 、 M C - 4 、 M C - 5 の特異性を、C C R 1 - 3 および C X C R 4 により安定してトランスフェクトした C H O 細胞上で試験した。すべての場合で、結合が検出されなかった。さらに、抗体は、C C R 5 遺伝子の 3 2 欠失ホモ接合のドナーからの新たに単離した P B M C や培養した P B M C とは反応しなかった。

40

50

【 0 1 3 1 】

2.2 CCR5に対するMAB MC-1の可変ドメインのクローニング

CCR5ハイブリドーマMC-1からの軽(VL)および重(VH)可変ドメインをPCR増幅を用いてクローニングした(Orlandi (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833)。逆転写を、任意の6量体ヌクレオチドおよびスーパースク립ト逆転写酵素(ギブコ)を用いて行った。可変ドメインをPfu-ポリメラーゼを用いたPCRで増幅し、ベクターPCRスク립トAmpSK+(ストラタジーン)にサブクローニングし、配列決定した。

【 0 1 3 2 】

VL(1)のPCR増幅のために以下のプライマーを用いた。

【 化 3 】

配列番号5: 5' GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCA 3'

配列番号6: 5' GTTTTATTTT CAGCTTGGTC CC 3'

【 0 1 3 3 】

VH(1)のPCR増幅のために以下のプライマーを用いた。

【 化 4 】

配列番号7: 5' ACCATGGGAT GGAGCTGTGT CATGCTCTT

配列番号8: 5' TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAG

【 0 1 3 4 】

RT PCRにより得られたVL(1)のヌクレオチド配列は、配列番号9である。

【 化 5 】

```

1 GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCAGCCTCC CTATCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
61 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTTAC AGTTATTTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG
121 GGAAAATCTC CTCAACTCCT GGTCTATAAT GCAAAAACCT TAACAGAAGG TGTGCCATCA
181 AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTGA AGATCAACAG CCTGCAGCCT
241 GAAGATTTTG GGAATTATTT CTGTCAACAT CATTATGATA CTCCTCGGAC GTTCGGTGGGA
301 GGGACCAAGC TGGAAATAAA AC

```

【 0 1 3 5 】

VL(1)に対応する翻訳されたタンパク質配列は、配列番号10である。

【 化 6 】

```

1 D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y
31 S Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y N A K T L T E G V P S
61 R F S G S G S G T Q F S L K I N S L Q P E D F G N Y F C Q H
91 H Y D T P R T F G G G T K L E I K

```

【 0 1 3 6 】

増幅に用いたプライマー配列を除くVL(1)のヌクレオチド配列は配列番号11である。

【 化 7 】

```

1 GCCTCCCTAT CTGCATCTGT GGGAGAAACT GTCACCATCA CATGTCGAGC AAGTGAGAAT
61 ATTTACAGTT ATTTAGCATG GTATCAGCAG AAACAGGGAA AATCTCCTCA ACTCCTGGTC
121 TATAATGCAA AAACCTTAAC AGAAGGTGTG CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCAGGC
181 ACACAGTTTT CTCTGAAGAT CAACAGCCTG CAGCCTGAAG ATTTTGGGAA TTATTTCTGT
241 CAACATCATT ATGATACTCC TCGGACGTTT GGTGGA

```

【 0 1 3 7 】

VL(1)の配列番号11に対応する翻訳されたタンパク質配列は、配列番号12である。

【 化 8 】

10

20

30

40

1 A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y S Y L A W Y Q Q
 31 K Q G K S P Q L L V Y N A K T L T E G V P S R F S G S G S G
 61 T Q F S L K I N S L Q P E D F G N Y F C Q H H Y D T P R T F
 91 G G

【 0 1 3 8 】

R T P C Rにより得られたリーダー配列を含むV H (1)の配列は、配列番号13である。

【 化 9 】

1 ATGGGATGGA GCTGTGTGCAT GCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT CCACTCCCAG
 61 GTCCAAGTGC AGCAGCCTGG GGCTGGGAGG GTGAGGCCTG GAGCTTCAGT GAAGCTGTCC
 121 TGCAAGGCTT CTGGCTACTC CTTACCAGT TACTGGATGA ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT
 181 GGACAAGGCC TTGAGTGGAT TGGCATGATT CATCCTTCCG ATAGTAAAAC TAGGTTAAAT
 241 CAGAAGTCA ACGACAGGGC CACATTGACT GTTGACAAAT ATTCCAGCAC AGCCTATATA
 301 CAACTCAGCA GCCCGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG AGGAGAATAT
 361 TACTACGGTA TATTTGACTA CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA

10

【 0 1 3 9 】

V H (1)に対応する翻訳されたタンパク質配列は、配列番号14である。

【 化 1 0 】

1 M G W S C V M L F L V A T A T G V H S Q V Q L Q Q P G A G R
 31 V R P G A S V K L S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P
 61 G Q G L E W I G M I H P S D S E T R L N Q K F N D R A T L T
 91 V D K Y S S T A Y I Q L S S P T S E D S A V Y Y C A R G E Y
 121 Y Y G I F D Y W G Q G T T V T V S S

20

【 0 1 4 0 】

増幅に用いたリーダー配列とプライマー配列を除いたV H (1)のヌクレオチド配列は、配列番号15である。

【 化 1 1 】

1 CTTGGTAGCA ACAGCTACAG GTGTCCACTC CCAGGTCCAA CTGCAGCAGC CTGGGGCTGG
 61 GAGGGTGAGG CCTGGAGCTT CAGTGAAGCT GTCCTGCAAG GCTTCTGGCT ACTCCTTCAC
 121 CAGTTACTGG ATGAACTGGG TGAAGCAGAG GCCTGGACAA GGCCTTGAGT GGATTGGCAT
 181 GATTCACTCT TCCGATAGTG AAAGTAGGTT AAATCAGAAG TTCAACGACA GGGCCACATT
 241 GACTGTTGAC AAATATTCCA GCACAGCCTA TATACAACCTC AGCAGCCCGA CATCTGAGGA
 301 CTCTGCGGTC TATTACTGTG CAAGAGGAGA ATATTACTAC GGTATATTTG ACTA

30

【 0 1 4 1 】

V H (1)の配列番号15に対応する翻訳されたタンパク質配列は、配列番号16である。

【 化 1 2 】

1 L V A T A T G V H S Q V Q L Q Q P G A G R V R P G A S V K L
 31 S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M
 61 I H P S D S E T R L N Q K F N D R A T L T V D K Y S S T A Y
 91 I Q L S S P T S E D S A V Y Y C A R G E Y Y Y G I F D

【 0 1 4 2 】

2 . 3 二重特異性単鎖抗体 C C R 5 × C D 3 の構築および発現
 C C R 5 × C D 3 二重特異性単鎖抗体の構造および作用の様式の模式図を、図3に示す。
 以前に記載したように、軽および重可変ドメインは、(G l y 4 S e r 1) 3 リンカーを用いて単鎖フラグメントに結合し、E . c o l i のペリプラズム空間で発現させ、組み換えタンパク質の C C R 5 への結合を試験した。

40

【 0 1 4 3 】

その後、 C C R 5 単鎖フラグメントの D N A 配列を、 B s r G 1 および B s p E 1 を用いて真核生物発現ベクター (p E F - D H F R) にサブクローニングし、このベクターは6ヒスチジン残基のC末端結合テールを有する C D 3 に対して誘導された単鎖フラグメントをすでに含んでいる (M a c k (1 9 9 5) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 2 , 7 0 2 1) 。 C C R 5 および C D 3 単鎖フラグメントを、 G l y 4 S

50

e r 1 をコードするリンカーにより結合した (図 3 を参照) 。

【 0 1 4 4 】

次のドメインの順序のものが選ばれた：V L (1) - V H (1) - V H (2) - V L (2) で、(1) は C C R 5 に対して特異的であり、(2) は C D 3 に対して特異的である。

【 0 1 4 5 】

二重特異性 C C R 5 × C D 3 抗体は、配列番号 1 7 の次のヌクレオチド配列を有する。

【 0 1 4 6 】

【 化 1 3 】

```

1  ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT ACACTCCGAT
61 ATCGTGCTGA CCCAGTCTCC AGCCTCCCTA TCTGCATCTG TGGGAGAAAC TGTCACCATC
121 ACATGTCGAG CAAGTGAGAA TATTTACAGT TATTTAGCAT GGTATCAGCA GAAACAGGGA
181 AAATCTCCTC AACTCCTGGT CTATAATGCA AAAACCTTAA CAGAAGGTGT GCCATCAAGG
241 TTCAGTGGCA GTGGATCAGG CACACAGTTT TCTCTGAAGA TCAACAGCCT GCAGCCTGAA
301 GATTTTGGGA ATTATTTCTG TCAACATCAT TATGATACTC CTCGGACGTT CGGTGGAGGG
361 ACCAAGCTCG AGATCAAAGG TGGTGGTGGT TCTGGCGGGC GCGGCTCCGG TGGTGGTGGT
421 TCTCAGGTCC AACTGCAGCA GCCTGGGGCT GGGAGGCTGA GGCCTGGAGC TTCAGTGAAG
481 CTGTCCTGCA AGGCTTCTGG CTA CTCTCTC ACCAGTTACT GGATGAACTG GGTGAAGCAG
541 AGGCCTGGAC AAGGCCTTGA GTGGATTGGC ATGATTCATC CTTCCGATAG TGAAACTAGG
601 TTAAATCAGA AGTTCAACGA CAGGGCCACA TTGACTGTTG ACAAATATTC CAGCACAGCC
661 TATATACAAC TCAGCAGCCC GACATCTGAG GACTCTGCGG TCTATTACTG TGCAAGAGGA
721 GAATATTACT ACGGTATATT TGACTACTGG GGCCAAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCCTCC
781 GGAGGTGGTG GATCCGATAT CAAACTGCAG CAGTCAGGGG CTGAACTGGC AAGACCTGGG
841 GCCTCAGTGA AGATGTCTTG CAAGACTTCT GGCTACACCT TTAGTAGGTA CACGATGCAC
901 TGGGTA AAAAC AGAGGCCTGG ACAGGGTCTG GAATGGATTG GATACATTAA TCCTAGCCGT
961 GGTTATACTA ATTACAATCA GAAGTTCAAG GACAAGGCCA CATTGACTAC AGACAAATCC
1021 TCCAGCACAG CCTACATGCA ACTGAGCAGC CTGACATCTG AGGACTCTGC AGTCTATTAC
1081 TGTGCAAGAT ATTATGATGA TCATTACTGC CTTGACTACT GGCGCCAAGG CACCACTCTC
1141 ACAGTCTCCT CAGTCGAAGG TGGAAGTGGG GGTCTGGTG GAAGTGGAGG TTCAGGTGGA
1201 GTCGACGACA TTCAGCTGAC CCAGTCTCCA GCAATCATGT CTGCATCTCC AGGGGAGAAG
1261 GTCACCATGA CCTGCAGAGC CAGTTCAAGT GTAAGTTACA TGAAGTGGTA CCAGCAGAAG
1321 TCAGGCACCT CCCCCAAAAG ATGGATTTAT GACACATCCA AAGTGGCTTC TGGAGTCCCT
1381 TATCGCTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACC TCATACTCTC TCACAATCAG CAGCATGGAG
1441 GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTAGTGGCAA CAGTGGAGTA GTAACCCGCT CACGTTCCGA
1501 GCTGGGACCA AGCTGGAGCT GAAACATCAT CACCATCATC ATTAG

```

10

20

30

二重特異性 C C R 5 × C D 3 抗体は、配列番号 1 8 の次のタンパク質配列を有する。

【 0 1 4 7 】

【 化 1 4 】

40

```

1 D I V L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y
31 S Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y N A K T L T E G V P S
61 R F S G S G S G T Q F S L K I N S L Q P E D F G N Y F C Q H
91 H Y D T P R T F G G G T K L E I K G G G S G G G S G G G
121 G S Q V Q L Q Q P G A G R V R P G A S V K L S C K A S G Y S
151 F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M I H P S D S E T
181 R L N Q K F N D R A T L T V D K Y S S T A Y I Q L S S P T S
211 E D S A V Y Y C A R G E Y Y Y G I F D Y W G Q G T T V T V S
241 S G G G G S D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K T
271 S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N K P S
301 R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S
331 S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W R Q G T T
361 L T V S S V E G G S G G S G G S G G S G G V D D I Q L T Q S
391 P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q
421 K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G
451 T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F
481 G A G T K L E L K H H H H H H *

```

10

二重特異性抗体を、DHFR - 欠損CHO細胞で発現させ、固定化Ni²⁺イオンのアフィニティークロマトグラフィーにより培養上清から精製した(Hochuli (1988) *Biotechnology* 6, 1321 - 1325; Ni-NTA, Qiagen)。

要約として、二重特異性抗体の構築のためには、例えば単鎖技術を使用できる(Mack et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92: 7021 - 7025; Mack et al. (1997) *J. Immunol.* 158: 3965 - 3970)。この場合、図3(上)に模式的に示したように、2つの異なる抗体の軽(VL)および重(VH)免疫グロブリン鎖の可変ドメインは、特定の順序で融合し、任意に6×Hisのヒスチジン鎖がさらに結合する。融合は、DNA基盤に影響し、4つの異なる可変ドメインを有するタンパク質鎖が発現後に形成されることとなる(図3(上)を参照)。結合したヒスチジン鎖は、固定化Niイオンを介して1工程で簡単かつ効果的に精製できる。図3(上)に、エフェクター細胞表面のCD3抗原および標的細胞としての白血球表面のヒトCCR5に結合する二重特異性抗体の好ましい態様を示す。

20

【0148】

その後、特異性を有する単鎖抗体を、2つの可変抗体ドメインの間に(Gly₄Ser₁)₃のリンカーを挿入することにより融合PCRにより産生する。さらなる融合PCRにおいて、CCR5に対する抗体フラグメントを、Gly₄Ser₁から成るリンカーを挿入することにより、CD3に対するすでに公表された抗体フラグメントと融合する(Mack et al. 前掲、を参照)。

30

【0149】

二重特異性抗体を発現させるため、対応するDNA配列を真核生物発現ベクター(例えばPEF-DHFR、Mack et al. (1995) *PNAS*, 前掲)中でサブクローニングし、エレクトロポレーションによりDHFR欠損CHO細胞にトランスフェクトする。二重特異性抗体を、Ni-NTAのアフィニティークロマトグラフィーにより、pH値を下げることによる溶出を起こさせて安定してトランスフェクトしたCHO細胞の上清から精製する。その後、pHを調整し、タンパク質を適切な濃度に調整する。全精製得量は約900 μg/l培地上清であった。SDS-PAGEにより、いずれの検出可能な酵素によるタンパク質分解またはタンパク質の分解を示すことなく、還元および非還元条件下で約60 kDの単一のバンドが示された(図4)。

40

【0150】

実施例3: ケモカイン-トキシン融合タンパク質の発現および精製

RANTES-PE38 ケモカイン-トキシン融合タンパク質の構造と作用の様式の模式図を、図5に示す。プライマーP1およびP2により産生したRANTESのPCRフラグメントを、StuIおよびSalIを用いてE. coliのペリプラズムでの発現の

50

ためにベクター中にサブクローニングした (Mack (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7021)。制限部位 *Stu*I を *OmpA* シグナル配列の 3' 末端にあらかじめ導入しておいた。シュードモナスのエクソトキシン A の切断されたもの (PE38; Theuer (1993) Cancer Res. 53, 340) の DNA を、プライマー P3 および P4 を用いた *Pfu*-ポリメラーゼで PCR により増幅し、*Bsp*E1 および *Hind*III を用いて RANTES の cDNA をすでに含むベクター中にサブクローニングした。プライマー P4 により、PE38 の 3' 末端に 6 ヒスチジン残基のテールも付加した。ペリプラズムでの発現の間、組み換えタンパク質が RANTES の最初のアミノ酸から開始できるように、*OmpA* シグナル配列を切断した。6 ヒスチジン残基のテールが結合した C 末端により、Ni-NTA のアフィニティークロマトグラフィー (キアゲン) による精製が可能であった。

10

【0151】

プライマーの一覧：

【化15】

配列番号 19: 5' AAAGGCCTCCCATATTCCTCGGA

配列番号 20: 5' AAAGTCGACTCCGGACATCTCCAAAGAGTTGATGTAC

配列番号 21: 5' AATCCGGAGCGCGCAGCCTGGCCGC

配列番号 22: 5' GGGAAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTCAGGTCCTCGCGGG

上述したように、RANTES の DNA 配列を、シュードモナスのエクソトキシン A の切断されたもの (PE38) (Theuer (1993) Cancer Res. 53, 340) の配列と融合した。構築物の最初のものにおいて、Gly-Ser リンカーを RANTES と PE38 の間に置いた。しかし、これは、*E. coli* での発現の間融合タンパク質の酵素によるかなりのタンパク質分解をもたらした (データは示していない)。構築物を安定化させる試みとして、リンカーと PE38 の最初の 3 つのアミノ酸を除去した。新たな融合タンパク質は、SDS-PAGE (図 6 左パネル) およびウエスタンブロット (図 6 右パネル) に示すように、*E. coli* のペリプラズム空間での発現の間タンパク質分解を起こさなかった。対応する構築物を、配列番号 23 および 24 にそれぞれ表す。

20

【0152】

実施例 4：二重特異性抗体の標的抗原 CCR5 および CD3 への結合

二重特異性単鎖抗体の CHO 細胞または PBMC への結合を、FACS 分析により決定した (図 7 から 9)。6xHis (ディアノバ、ハンブルグ、ドイツ) に対する抗体および PE-コンジュゲートポリクローナルウサギ-抗マウス F(ab)2 フラグメント (R439、ダコ、ハンブルグ、ドイツ) につづき、細胞を、二重特異性抗体で氷上で 60 分間インキュベートした。二重特異性抗体が CCR5 にも結合しうるので、CCR5 対立遺伝子のホモ接合 32 塩基対の欠失による CCR5 の発現を欠いた PBMC で分析を行った。抗体は、リンパ球の分集団への良好な結合を示した。CD4 および CD8 に対する抗体による共染色により、この分集団が CD4 および CD8 陽性 T リンパ球であることを同定した (図 7)。さらに、二重特異性抗体は、T 細胞に結合するためのモノクローナル CD3 抗体 OKT-3 と競合した (データは示していない)。

30

40

【0153】

二重特異性抗体の CCR5 への結合が、CCR5 過剰発現 CHO 細胞およびヒト単球で示された (図 8 および 9)。抗体は、CCR5 トランスフェクト CHO 細胞 (図 8) および培養された単球 (図 9) に対しすばらしい結合を示したが、CXCR4 によりトランスフェクトされた CHO 細胞やホモ接合 CCR5-32/32 欠失ドナーからの培養された単球では、結合は検出されなかった。単球の一晚の培養により、野生型単球上の CCR5 の発現を誘発したが、ホモ接合 CCR5-32/32 欠失ドナーからの単球では、CCR5 を発現しなかった。さらに、CCR5 の内在化を効果的に誘発して CCR5 抗体 (25) の結合を減少させることが知られている AOP-RANTES とともに 37 で

50

30分間単球を予備インキュベーションすることにより、培養された単球上の二重特異性抗体による検出可能なCCR5シグナルは、15%以下の値に減少し得た(データは示していない)。

【0154】

実施例5：ケモカインレセプターの下降調整

5.1 CCR5に対するmAb MC-1によるCCR5の下降調整

ヒトCCR5の表面発現に対するMC-1の効果を測定した。比較のために、CCR5に対する異なるモノクローナル抗体MC-4を使用した。CHO-CCR5細胞を、種々の濃度の抗体MC-1およびMC-4とともに37°Cで30分間インキュベートした。細胞を氷上に置き、MC-1およびMC-4でそれぞれ15μg/mlの濃度で氷上で1時間染色し、その後第2抗体により検出した(ウサギ抗-マウスFITC、F313、ダコ)。FACSカリバーにより分析を行った。37°Cで30分間のMC-1とのインキュベーションは、10μg/mlの濃度で40%までヒトCCR5の下降調整をもたらした(図10)。

10

【0155】

5.2 ケモカイン-トキシンによるCCR5の下降調整

RANTESのシュードモナスのエクソトキシンAの切断したもののN末端への融合は、CCR5、CCR1およびCCR3のようなRANTESレセプターを発現している細胞への構築物の特異的結合をもたらすと予想される。修飾されたトキシンの結合におけるケモカインレセプターの内在化は、細胞の取り込みおよび構築物の細胞毒活性を増強しうる(図5下パネル)。従って、RANTES-PE38が、1次単球およびT細胞表面からのCCR5の内在化ができるかどうかを分析した(図11、白抜き)。CCR5の内在化は、構築物がCCR5に結合でき、PE38との融合後もRANTESが機能的に活性のまま維持されていることを示しうる。図11に示したように、構築物は単球およびリンパ球の表面からCCR5を内在化できる。非修飾のRANTESを陽性対照として用い、これはRANTES-PE38よりも幾分効果的であった(図11、黒塗り)。

20

【0156】

PBMCを、100μlの体積で、10%FCSのRPMIで希釈したRANTESまたはRANTES-PE38を種々の濃度において37°Cで30分間インキュベートした。溶媒単独のものを対照として用いた。そして、細胞を、PE-コンジュゲート抗-マウス抗体R439に続いて、モノクローナル抗体MC-1または陰性対照としての溶媒を用いて表面CCR5発現について氷上で染色した。FACS分析を、FACSカリバー(ベクトンディッキンソン)およびセルクエストソフトウェアにより行った。リンパ球と単球とを、その前方および側方光散乱特性並びにCD14、CD4およびCD8の発現により区別した。相対的な表面CCR5発現を、[平均チャンネル蛍光(測定値)-平均チャンネル蛍光(陰性対照)]/[平均チャンネル蛍光(溶媒)-平均チャンネル蛍光(陰性対照)]により計算した。

30

【0157】

実施例6：CCR5×CD3抗体およびRANTES-PE38による細胞の涸渇

6.1 培養したPBMCからの単球のCCR5特異的涸渇

CCR5-野生型(WT)またはCCR5欠損(CCR5^{-/-})ドナーからのPBMCを、一晚インキュベートし、単球上にCCR5の発現を誘導した。培養したPBMCを、異なる濃度の精製したCCR5-CD3二重特異性抗体または対照としての溶媒とともに20時間インキュベートした。生き残った細胞を、FACSカリバーで分析し数を数えた。

40

【0158】

CCR5陽性1次細胞を涸渇させる CCR5-CD3二重特異性単鎖抗体の能力を試験するために、ヒトPBMCを抗体とともにインキュベートした(図12)。インキュベーションの前に、PBMCを一晚培養し、単球上のCCR5の発現をアップレギュレートした。細胞毒性T細胞を再誘導することにより、二重特異性抗体は、濃度に依存して(図

50

13) 20時間以内に大多数の単球を涸渇させ、10 ng/mlの濃度に置いてCCR5陽性細胞をほとんど完全に涸渇させた。単球の涸渇が、誘導されたCCR5の発現によるものであると確認するために、CCR5を表面発現しないCCR5対立遺伝子のホモ接合32bp欠失を有するドナーからのPBMCを用いて同様の実験を行った。CCR5欠損単球では20時間後でも涸渇は検出されず、(図12の)右下のパネルを右上のパネルと比較し、左のパネルが陰性対照であることより、二重特異性抗体による細胞の涸渇がCCR5を発現する単球に限定されることが示された。単球(Mo)およびリンパ球(Ly)を、前方および側方光散乱特性により同定した。単球は、左下象限に矢印で示したように現れる。

【0159】

10

6.2 関節炎患者の滑液からの単球およびTリンパ球の涸渇
関節炎患者の新たに採取した滑液を、異なる濃度の精製したCCR5-CD3二重特異性抗体または対照としての溶媒とともに20時間インキュベートした。生き残った細胞を、FACSカリバーで分析し数を数えた。

【0160】

二重特異性単鎖抗体は、関節炎患者の炎症を起こした関節からのCCR5陽性T細胞および単球を涸渇させるために適用できる可能性がある。従って、種々の型の関節炎患者の滑液からのCCR5陽性細胞の涸渇を測定した。炎症を起こした滑液の大多数のT細胞および単球がCCR5を発現していることは、以前に示されている(Mack(1999) loc. cit.)。涸渇実験の前に得た滑液サンプルについて、大部分のリンパ球および単球がCCR5を発現しているが、顆粒球上にはCCR5の発現が検出されないことをFACS分析により確認した(データは示していない)。涸渇実験のために、滑液をex vivoで異なる濃度の二重特異性抗体とともに20時間インキュベートした(図14)。滑液を、穿刺の直後に調製することなくインキュベートし、in vitroの条件が、抗体が炎症を起こした関節内に存在するin vivoと極近い条件に確実に似せるようにした。図14に示すように、二重特異性抗体は、大多数の滑液からのリンパ球および単球の涸渇を誘発したが、CCR5を発現していない顆粒球は影響されないまま維持された。濃度0.5 μg/mlのCCR5×CD3の滑液の単球およびリンパ球の涸渇の代表的なFACS分析を図15に示す。CCR5陰性好中球(PMN:多形核細胞)だけは、二重特異性抗体によって影響されない。

20

30

【0161】

抗体を、滑液とともに1日若しくは数日間インキュベートした。24時間後、CCR5陽性リンパ球および単球は、すでにほとんど消滅していた。長いインキュベーションの後溶媒を調整したとき、単球は培地フラスコの底で視認できるマクロファージに分化していた。二重特異性抗体との適当なインキュベーションの後、マクロファージは視認できなくなった。

【0162】

上述したように、培養したPBMCを二重特異性抗体とともにインキュベートすると、一致した結果が得られる。この場合、CCR5陽性単球のほとんど完全な涸渇およびCCR5陽性Tリンパ球のほとんど完全な涸渇となる。CCR5陽性Tリンパ球および単球の涸渇を示す。

40

【0163】

その結果は、本発明の構築物がCCR5陽性単球を破壊できることを示している。これは、マクロファージに分化しているときにCCR5を発現している関節吸引からの単球および血液単球の両方の単球に適用できる。単球/マクロファージの涸渇は、数時間以内に起こる(<24時間)。特に、関節の単球/マクロファージの涸渇は、これらの細胞が関節破壊の主要な原因であることから、治療において大きな利益を有する。さらに、Tリンパ球の活性化のためにはマクロファージとの相互作用も必要であり、同時にTリンパ球の作用も抑制される。

【0164】

50

単球/マクロファージの涸渇に加え、CCR5陽性Tリンパ球の数のかなりの減少が観察される。

【0165】

6.3 モノクローナル抗体に対する二重特異性抗体CCR5×CD3の効力の比較
CCR5陽性単球の涸渇におけるCCR5-CD3二重特異性単鎖抗体の効力を、2つの非修飾モノクローナル抗体の効力と比較した。2人の異なるドナー(FおよびN)からのPBMCを一晩培養し、その後溶媒、二重特異性単鎖抗体(125ng/ml)、MC-1(5μg/ml)およびMC-5(5μg/ml)とともに24時間インキュベートした。二重特異性単鎖抗体に対する親抗体であるモノクローナル抗体MC-1はアイソタイプマウスIgG-1を有し、抗体MC-5はアイソタイプIgG-2aを有する。細胞を完全に回収してFACSにより分析し、生き残った単球およびリンパ球を定量した。

10

【0166】

図16は、驚くべきことに二重特異性抗体のみがCCR5陽性単球をかなり涸渇させることができる一方、非修飾モノクローナル抗体は二重特異性抗体CCR5×CD3の40倍以上過剰に用いた場合でもほとんど効果がないことを示す。リンパ球および単球の前方および側方光散乱特性を用いたFACS分析により、モノクローナル抗体ではなくCCR5×CD3二重特異性抗体のみが、培養した単球を涸渇させる能力があることが示された(図17の右上のパネルと下のパネルを比較)。

【0167】

6.4 RANTES-PE38によるケモカインレセプター発現細胞の涸渇
CCR5またはCXCR4を発現しているCHO細胞を、24ウェル培養プレート上にサブコンフルエントに成長させ、異なる濃度の精製したRANTES-PE38または対照としての溶媒とともにインキュベートした。40時間後、付着および非付着細胞を回収してFACSにより分析して、死亡した細胞の割合を測定した。すでに確立されたように、死亡した(プロピジウムアイオダイド陽性)CHO細胞は、光散乱特性により同定できる。

20

【0168】

RANTES-PE38の細胞毒活性をさらに分析した。この目的のため、ヒトCCR5、ネズミCCR5およびヒトCXCR4を発現しているCHO細胞を種々の濃度のケモカイン-トキシンまたは溶媒とともにインキュベートした。10nMのように低いRANTES-PE38で40時間インキュベートした後では、生き残った(付着した)ヒトまたはネズミCCR5陽性CHO細胞は光学顕微鏡によって検出されなかった。対照的に、CCR5陽性細胞を溶媒とともにインキュベートした場合、またはCXCR4陽性CHO細胞を同一濃度のケモカイン-トキシンとともにインキュベートした場合に、規則的な成長と生存が観察された(データは示していない)。死亡した細胞の割合を定量するために、付着および非付着の細胞をFACSにより分析した。以前に確立されたように、生存および死亡したCHO細胞は、光散乱特性により同定することができ、死亡または生存細胞の位置を矢印で示す(図18)。図18に示すように、RANTES-PE38の細胞毒性作用は、CXCR4を発現しているCHO細胞上では見られないが、ヒトCCR5を発現しているCHO細胞では10nMのRANTES-PE38により完全に死滅した。

30

40

【0169】

これらの実験により、RANTES-PE38が細胞表面からCCR5を内在化でき、RANTESレセプターhCCR5またはmCCR5を発現している細胞の涸渇を誘発することが示される。CXCR4陽性CHO細胞に対する構築物の不活性は、構築物の細胞毒活性が特異的なケモカインレセプターを発現している細胞に限定されることを示す。

【0170】

実施例7： 安定にトランスフェクトした細胞によるウイルス感染アッセイ

GHOST34CCR5細胞は、安定してCCR5を発現しているHOS/CD4細胞由来のものを、ダンリットマン(スカボールインスティテュート、ニューヨーク)から提供された。48ウェルトレイ中の 2.5×10^4 の細胞を、適切な希釈で37で30分間

50

100 μ l のケモカインに暴露した。100 μ l の NSI、CCR5 - 依存 HIV - 1 株、SF162 を 1000 フォーカス形成単位 / ml (FFU / ml) で添加し、細胞をさらに 3 時間インキュベートした。その後細胞を洗浄し、適当なケモカインを含む溶媒中で固定化前に 4 日間インキュベートし、前述したようにその場で p24 産生について染色して感染のフォーカスを算定した。

【0171】

実施例 8 : CCR5 x CD3 の CCR5 発現 CHO 細胞への濃度に依存した結合

CCR5 を安定してトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CCR5 + CHO) を標的細胞として用い、(実施例 2 および図 3 に記載されたような) 二重特異性 scFv CCR5 x CD3 の結合試験を行った。これらの細胞は、(実施例 5 および図 10 に示したような) 親抗体 MC - 1 による結合アッセイによる評価により、CD3 に対して陰性で CCR5 に対して > 95 % で陽性であった。結合は、フローサイトメトリーに基づく結合アッセイにより評価した。

10

【0172】

4×10^5 の CCR5 + CHO 細胞を、20 μ l / ml から 19.5 ng / ml までの範囲での異なる希釈の scFv CCR5 x CD3 を含む 50 μ l の FACS バッファー (1 % 胎児ウシ血清 (FCS) および 0.05 % のアジ化ナトリウムを含む PBS) 中に再懸濁させた。細胞を、96 ウェルマイクロタイタープレートで 4 で 30 分間インキュベートした。細胞を FACS バッファーで 2 回洗浄し、20 μ g / ml の抗 His - タグモノクローナル抗体 (ディアノバ) で 4 で 45 分間インキュベートした。特異的に結合した scFv CCR5 x CD3 を、モノクローナルヤギ抗マウス IgG F (ab')₂ - PE コンジュゲート抗体 (ディアノバ) により検出した。洗浄後、細胞を、セルクエストソフトウエア (ベクトンディッキンソン) を用いたフローサイトメトリー (FACS カリバー、ベクトンディッキンソン) により分析し、異なる濃度のサンプルの蛍光強度の中央値を計算した。非線形回帰分析を、グラフパッドプリズム (バージョン 3.02) により行った。scFv CCR5 x CD3 の CCR5 発現 CHO 細胞への濃度に依存した結合を、0.86 μ g / ml の K_D 値により観察した (図 20)。

20

【0173】

実施例 9 : エフェクター細胞として 1 次 T リンパ球による CCR5 x CD3 の細胞毒活性

CCR5 陽性細胞に対する細胞毒性を媒介する (実施例 2 および図 3 に示したような) scFv CCR5 x CD3 の能力を、標的細胞として安定してトランスフェクトした CCR5 + CHO および エフェクター細胞として末梢血液由来の CD3 陽性 T リンパ球を用いて試験した。細胞毒性の検出には、FACS に基づく分析を行った。

30

【0174】

(CD4 + および CD8 + 細胞を含む) CD3 + T 細胞を、ヒト T 細胞富養カラム (R & D システムズ) を用いたネガティブ選択により末梢血液から単離した。この目的のために、PBMC を標準フィコール - ハイパーク密度勾配分離により調製し、カラムに適用した。B 細胞および単球をカラムマトリックスに結合させる一方、T 細胞を溶出させた。濃縮した T 細胞を溶媒で洗浄し、エフェクター細胞として用いた。

40

【0175】

フローサイトメトリーによるエフェクター細胞からの標的細胞の区別のために、CCR5 + CHO 細胞を脂肪族膜染料 PKH26 (シグマ) により最終濃度 12 μ M でラベル化した。0.5 $\times 10^5$ のラベル化した CCR5 + CHO 細胞および 2.5 $\times 10^5$ の CD3 + T 細胞を、5 : 1 のエフェクター : 標的比で 96 ウェルマイクロタイタープレートに播種した。320 ng / ml から 0.3 pg / ml の範囲の scFv CCR5 x CD3 の 100 μ l の希釈物を、細胞とともに 37 で 16 時間、5 % CO₂ の加湿環境でインキュベートした。その後、細胞を 600 x g で 3 分間遠心分離し、細胞ペレットを 200 μ l の FACS バッファー (PBS、1 % FCS、0.05 % アジ化ナトリウム) に再懸濁した。1 μ g / ml のプロピジウムアイオダイド (PI) による染色の後、細胞をフロー

50

サイトメーター（FACSカリバー、ベクトンディッキンソン）で2回分析した。

【0176】

s c F v C C R 5 × C D 3 媒介の分解の特異性を確認するために、安定してC X C R 4 をトランスフェクトしたC H O細胞を陰性対照標的細胞として用いた。細胞毒性アッセイを、C C R 5 + C H O細胞に対するのと同様の条件下で行った。

【0177】

C C R 5 + C H O細胞の特異的分解を、セルクエストソフトウェア（ベクトンディッキンソン）を用いて計算し、非線形回帰分析をグラフパッドプリズムを用いて行った。S字状の用量 - 反応曲線が得られ（図21）、912 pg / mlのE C 5 0値が判明した。標的細胞としてC X C R 4 + C H O細胞を用いて、s c F v C C R 5 × C D 3に細胞毒性作用がないことが観察された。

10

【0178】

実施例10： エフェクター細胞としてのT細胞クローンCB15によるCCR5×CD3の細胞毒性

（実施例2および図3に記載されたような）C C R 5陽性細胞上のs c F v C C R 5 × C D 3の細胞毒性も、エフェクター細胞としてC D 3陽性T細胞系C D 1 5（C D 4 +）を用いて試験した。細胞毒性の検出のために、F A C Sに基づく分析を標的細胞としてC C R 5トランスフェクトC H O細胞（C C R 5 + C H O）を用いて行った。

【0179】

C C R 5 + C H O細胞を脂肪族膜染料P K H 2 6（シグマ）により最終濃度10 μ Mでラベル化した。エフェクターおよび標的細胞を、10 : 1の比でマイクロタイタープレート中で、40 μ g / mlから0.15 ng / mlの範囲で希釈したs c F v C C R 5 × C D 3の100 μ lとともに、37 °Cで6時間、5% C O₂の加湿環境でインキュベートした。細胞を600 × gで3分間遠心分離し、細胞ペレットを200 μ lのF A C Sバッファ（P B S、1% F C S、0.05%アジ化ナトリウム）に再懸濁した。細胞を1 μ g / mlのプロピジウムアイオダイド（P I）で染色し、フローサイトメーター（F A C Sカリバー、ベクトンディッキンソン）で2回分析した。

20

【0180】

C C R 5 + C H O細胞の特異的分解を、セルクエストソフトウェア（ベクトンディッキンソン）を用いて計算し、非線形回帰分析をグラフパッドプリズムを用いて行った。S字状の用量 - 反応曲線が得られ（図22）、12.8 ng / mlのE C 5 0値が判明した。

30

【0181】

生物活性アッセイにおいてエフェクター細胞としてT細胞クローンCB15により得られた結果は、s c F v C C R 5 × C D 3により媒介される特異的分解がC D 8 + C T Lの細胞毒性に限定されるのではなく、C D 4 + T細胞もこの工程に関与していることを示す。

【0182】

実施例11： s c F v C C R 5 × C D 3の構築に用いる親CCR5特異的モノクローナル抗体MC-1のエピトープのマッピング

（実施例2および図3に記載したような）s c F v C C R 5 × C D 3の構築に用いる親C C R 5特異的モノクローナル抗体MC-1のエピトープを、キメラおよび点突然変異レセプターを安定して発現している約70のC H O - K 1細胞のパネルを用いてフローサイトメトリーによりマッピングした（Samson, J. Biol. Chem., 1997, 272, 24934 - 24941; Lee, J. Biol. Chem., 1999, 274, 9617 - 9626; Blanpain, J. Biol. Chem., 1999, 274, 34719 - 34727; Blanpain, Blood, 2000, 96, 1638 - 1645）。細胞を、m a b M C - 1とともに氷上で30分間インキュベートし、洗浄してP E - コンジュゲート抗 - マウスI g抗体（シグマ）により染色した。C C R 2 bを発現しているC H O - K 1細胞を、陰性対照として用いた。M C - 1は、C C R 5分子の第2の細胞外ループ（E C L 2）の第1の部分認識すること

40

50

が示された(データは示していない)。ECL2は、aa168-199(RSQKEGLHYTCSSHFPSQYQFWKNFQTLKIV)の範囲にあり、Chen, J. *Virol.*, 1997, 71, 2705-2714に記載されたようにCCR5の膜透過領域4および5の間に位置する。

【0183】

ヒトおよびアカゲザルのCCR5のアミノ酸配列は、8つのアミノ酸において異なり、ECL2のaa171(K R)およびaa198(I M)の位置において2つのアミノ酸が変化している(Chen, J. *Virol.*, 1997, 71, 2705-2714)。これらのアミノ酸の変化による、MC-1のアカゲザルCCR5のECL2との交差反応の可能性を、FACSに基づくアッセイでヒトおよびアカゲザルのPBMCにより分析した。両方の種のPBMCを、標準フィコール勾配遠心分離により単離した。5 × 10⁵の細胞を、50 μlのFACSバッファーに懸濁し、50 μg/mlのMC-1を添加した。4での30分間のインキュベーションの後、細胞を洗浄し、ヤギ抗-マウスIgG F(ab')₂-PEコンジュゲートモノクローナル抗体(ディアノバ)を用い4で暗所にて30分間染色した。細胞を洗浄し、フローサイトメーター(FACSカリバー、ベクトンディッキンソン)により分析した。

10

【0184】

図23に示すように、MC-1は排他的にヒトCCR5に結合するが、アカゲザル由来のCCR5には反応しなかった。これらのデータは、MC-1により認識されたエピトープがヒトCCR5に対して特異的であり、ヒトCCR5配列中のaa171位におけるリジンおよびaa198位におけるイソロイシンがこの特異性に本質的であることを示している。特に、ECL2の第1の部分に位置しているaa171位のリジンが、mab MC-1によるCCR5のヒトエピトープの特異的認識に寄与している。

20

【0185】

実施例12: HIV-1感染単球におけるウイルス産生のs c F v CCR5 x CD3媒介による削減

PBMCを健康なドナーの新鮮なバフィコートからフィコール密度遠心分離により調製し、単球を一晩の培地フラスコへの付着により単離した。残っているPBLを除去し、5% CO₂下加湿環境で37にて別個に培養した。

【0186】

単球を、5 × 10⁴細胞/ウェルの密度で48ウェルマイクロタイタープレートに播種し、M-指向性HIV-1株BaL(moi = 1)により5% CO₂下加湿環境で37にて一晩感染させた。ウイルスを洗浄により除去し、単球を非刺激PBL(ウェル当たり1.5 × 10⁴) + s c F v CCR5 x CD3(1 μg/ml) + AZT(75 μM)、または陰性対照として非刺激PBL単独(ウェル当たり1.5 × 10⁴)とともにさらに培養した。感染後(p.i.)5日で単球を洗浄し、AZTまたは抗体の不存在下で培養した。上清をp.i.15日で採取し、HIV-1複製をELISAのp24の測定により定量した。この実験方法により、s c F v CCR5 x CD3を含まない対照と比較して(300 ng/ml p24)、s c F v CCR5 x CD3を含むサンプルでは75%のウイルス複製の削減をもたらした(75 ng/ml p24)。

30

40

【0187】

【表1】

表I：ヌクレオシドの逆転写酵素阻害剤(ヌクレオシドアナログ、NRTI)

物質	商品名	投薬スケジュール	一般的な副作用および概論
ジドブジン (AZT)	Retrovir	300mg、1日2回	初期の胃腸副作用、貧血、好中球減少、筋障害
ラミブジン (3TC)	Epivir	150mg、1日2回	一般によく許容される。肝炎に対して効果的
ジドブジン、ラミブジン (AZT+3TC)	Combivir	1錠1日2回	組み合わせの錠剤には300mgのAZTと150mgの3TCを含む
ジダノシン (ddI)	Videx	200mg、1日2回 または 400mg、1日1回 空腹時(体重>60kg)	15%未満精神障害、肺炎 アルコールを避ける NRTI、アデフォビア、ネビラピン およびエファビレンスすべてにより アルコール内容物が同時に与え られる。デラバジンおよび インジナビアをddIの少なくとも1時間 前に与えるべき；ネルフィナビアをddI の少なくとも1時間後に与える。
ザルシタピン (ddC)	Hivid	0.375-0.75mg、 1日3回	異なる研究において17-31%の 末梢神経障害；アフタ性潰瘍
サタブジン (d4T)	Zerit	20-40mg、 1日2回	末梢神経障害(早期の研究で1-4%； CD4>50の「拡張アクセス」患者の 24%)
アバカビア (ABA)	Zaigen	300mg、1日2回	約3%が過敏に反応する； 熱、不快感、一過性発疹の可能性、 胃腸副作用

10

【表2】

表II：プロテアーゼ阻害剤

物質	商品名	投薬スケジュール	一般的な副作用および概論
サキナビル (ハードゼラチンカプセル、SQVS)	Invirase	600mg、1日3回 高脂肪食品とともに 服用	よく許容される。吸収が悪いため 効力が限定される。
サキナビル (ソフトゼラチンカプセル、SQVS)	Forto- vase	1200mg、1日3回 高脂肪食品とともに 服用(>28g)	Inviraseにくらべて吸収が 改善されている。
リトナビア (RTV)	Norvir	600mg、 (6カプセル/7.5ml) 300mg、1日2回 で開始し、その後 10以内に600mg、 1日2回に増やす	5週間までは、吐き気、唇のしびれ。 場合により肝炎。 患者の50%までは、許容されない。
インジナビア (IDV)	Crixivan	800mg、空腹時 または軽食(<脂肪 2g)とともに、8時間毎	6-8%に神経結石、大量の水分 摂取が必要。場合により吐き気 および胃腸副作用。
ネルフィナビア (NFV)	Viracept	750mg、1日3回 または1250mg、 食事とともに1日2回	しばしば下痢、時々吐き気

30

【表3】

表III：非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NNRTI)

物質	商品名	投薬スケジュール	一般的な副作用および概論
ネビラピン (NVP)	Viramune	200mg、1日1回	肝臓酵素P450 3A4に誘発される 一過性皮膚、肝炎
デラバジン (DLV)	Rescriptor	400mg、1日3回	一過性皮膚、P450 3A4抑制
エファビレンス (EFV)	Sustiva	600mg、夜1日1回	初期のめまい、不眠、 瞬間一過性皮膚；P450 3A4誘発 クラリチスロマイシンを避ける

40

【表4】

表IV: ケモカインレセプターおよびケモカインリガンド

ケモカインレセプター	ケモカインリガンド
CXCR3	I-TAC(CXCL11), IP-10(CXCL-10), Mig(CXCL9)
CXCR4	SDF-1(CXCL12)
CXCR5	BCA1(CXCL13)
CCR1	MIP1アルファ(CCL3), RANTES(CCL5), MCP-3(CCL7), MCP-4(CCL13), HCC1(CCL14), LKN1(CCL15)
CCR2	MIP1アルファ(CCL3), RANTES(CCL5), MCP-1(CCL2), MCP-2(CCL8), MCP-3(CCL7), MCP-4(CCL13)
CCR3	RANTES(CCL5), MCP-2(CCL8), MCP-3(CCL7), MCP-4(CCL13), エオタキシン(CCL11), LKN1(CCL15), MIPF-2(CCL24), エオタキシン-3(CCL26)
CCR4	TARC(CCL17), MDC(CCL22)
CCR5	MIP1アルファ(CCL3), MIP1ベータ(CCL4), RANTES(CCL5), MCP-2(CCL8), MCP-3(CCL7), MCP-4(CCL13), エオタキシン(CCL11)
CCR6	LARC(CCL20)
CCR7	ELC(CCL19), SLC(CCL21)
CCR8	I-309(CCL1), MIP1ベータ(CCL4), TARC(CCL17)
CCR9	TECK(CCL25)
XCR1	XCL1, XCL2
CCR10	CCL27, CCL28 (Wang(2000) J. Biol. Chem. 275:22313-22323) CX3CR1: フラクタルカイン(CXC3CL1)

10

【図面の簡単な説明】

20

【図1】痛風を除く関節炎患者の末梢血液（白のカラム）および滑液（灰色のカラム）中のT細胞（第1および第2のパネル）、単球（第3のパネル）、好中球（第4のパネル）上の種々のケモカインレセプター（x軸に示した）の発現。それぞれの点は、1人の患者を示し、平均値は棒グラフで示す。好中球上のCXCR1とCXCR2の発現はy軸の蛍光強度として与えられ、他のすべてのものはレセプター陽性細胞の割合が示されている。

【図2】リウマチ性関節炎の1人の患者の末梢血液（左）および滑液（右）中の白血球上のCCR5、CCR2およびCXCR4の発現を示すFACS点プロット。境界線は、アイソタイプ対照に従って設定し、垂直線として示す。滑液中においてT細胞および単球の大多数は、高レベルのCCR5発現を示すが、末梢血液中においてこれらの細胞のほんの少数が、低いレベルのCCR5を発現する。

30

【図3】二重特異性単鎖抗体の模式図。ハイブリドーマMC-1由来のCCR5単鎖フラグメント(CCR5 VL/CCR5 VH)は、CD3に対して誘導された単鎖フラグメント(CD3 VH/CD3 VL)のN末端に融合する。二重特異性抗体のCD3+T細胞およびCCR5陽性標的細胞への結合は、CD3の架橋、エフェクターT細胞の活性化およびCCR5陽性標的細胞の分解をもたらす。

【図4】精製された二重特異性単鎖抗体CCR5-CD3のSDS-PAGE。約60kDの単一バンドが、還元（左）および非還元（右）条件下で観察される。二重特異性抗体の分解またはタンパク質分解は、検出されなかった。

【図5】ケモカイン-トキシンRANTES-PE38の模式図。ケモカインRANTESは、シュドモナスのエクソトキシンAの切断されたもの(PE38)のN末端に融合する。切断されたトキシンは真核細胞に結合できないが、融合タンパク質はRANTES部位によりCCR5に結合し、細胞中に内在化する。これによりトキシンは、タンパク質合成を阻害し、細胞死を誘発する。

40

【図6】精製したタンパク質RANTES-PE38のSDS-PAGE（左）およびウエスタンブロット（右）。約46kDの予期された大きさの明瞭なバンドが、クマシー染色されたSDS-PAGEおよびウエスタンブロットで視認できる。

【図7】CCR5-CD3二重特異性抗体のCCR5欠損リンパ球上のCD3への結合。CD4およびCD8との共染色により、二重特異性抗体がCD4+/CD8+T細胞分集団に結合することが示された。多色分析により他の細胞集団への結合が起こらないことが示された。

50

【図 8】 C C R 5 - C D 3 二重特異性抗体のトランスフェクションした C H O 細胞上の C C R 5 への結合。C C R 5 によりトランスフェクションされた C H O 細胞は黒で示し、C X C R 4 陽性 C H O 細胞は陰性対照として用い、白で示す。

【図 9】 C C R 5 - C D 3 二重特異性抗体の培養された単球上の C C R 5 への結合。C C R 5 陽性ドナー由来の単球は黒で示し、C C R 5 欠損 (3 2 / 3 2) ドナー由来の単球は陰性対象として用い、白で示す。

【図 10】 C C R 5 特異的モノクローナル抗体を、F A C S 分析により C C R 5 の下降調整を誘発する能力について比較した。m A b M C - 1 (四角)、C C R 5 - C D 3 二重特異性抗体の親抗体は顕著な内在化を示したが、M C - 4 (三角) は C C R 5 内在化の誘発を示さなかった。C H O - C C R 5 細胞は、3 7 で 3 0 分間種々の濃度でインキュベートした。 10

【図 11】 R A N T E S - P E 3 8 (白抜き) および R A N T E S (黒塗り) による P B M C 表面からの C C R 5 の下降調整。C C R 5 の表面発現は、リンパ球 (四角) および単球 (まる) で測定され、溶媒対照の % として与えられる。融合タンパク質 R A T E S - P E 3 8 は、非修飾の R A N T E S に比べ幾分低い効率で細胞表面からの C C R 5 を下降調整できる。

【図 12】 二重特異性抗体による C C R 5 陽性単球の涸渇。C C R 5 欠損 P B M C (3 2 / 3 2) または野生型 P B M C (W T - P B M C) を一晚培養し、二重特異性抗体 (1 0 0 n g / m l) または対照としての溶媒とともに 2 0 時間インキュベートした。残存している単球 (M o) およびリンパ球 (L y) を F A C S の光散乱特性により同定した。 20 C C R 陽性野生型単球は二重特異性抗体により完全に涸渇したが、C C R 5 欠損単球は生き残った。

【図 13】 二重特異性抗体による C C R 5 陽性単球の涸渇。用量 - 反応曲線は、C C R 5 - C D 3 二重特異性抗体の種々の濃度で培養された単球の涸渇を示す。単球の 9 0 % 以上が 3 3 n g / m l の濃度で涸渇した。

【図 14】 二重特異性 C C R 5 - C D 3 抗体は、慢性関節炎患者の滑液からのリンパ球および単球を涸渇させた。新たに採取した滑液を種々の濃度の二重特異性抗体または対照としての溶媒とともに 2 0 時間インキュベートし、F A C S で分析した。両方の細胞型の 9 5 % 以上が、3 1 n g / m l の濃度で涸渇した。

【図 15】 二重特異性 C C R 5 - C D 3 抗体は、慢性関節炎患者の滑液からのリンパ 30 球および単球を涸渇させた。新たに採取した滑液を二重特異性抗体 (5 0 0 n g / m l) または対照としての溶媒とともに 2 0 時間インキュベートし、F A C S (前方および側方光散乱分析) で分析した。二重特異性抗体は C C R 5 陽性単球およびリンパ球を完全に涸渇させたが、C C R 5 陰性顆粒球 (P M N) は生き残った。我々の以前のデータと一致して、この滑液中のすべての単球およびリンパ球は C C R 5 を発現したが、顆粒球 (P M N) では C C R 5 の発現は見られなかった。

【図 16】 C C R 5 陽性単球を涸渇させる場合の C C R 5 - C D 3 二重特異性単鎖抗体の効率を、2 つの非修飾モノクローナル抗体 M C - 1 および M C - 5 の効率と比較した。 40 2 人の異なるドナー (F および N) からの P B M C を一晚培養し、抗体構築物および抗体の存在下または不存在下で溶媒とともに 2 4 時間インキュベートした。濃度を示した。細胞を完全に回収し、F A C S 分析により生存する単球およびリンパ球を定量した。P B M C ドナーそれぞれの 2 つの実験結果を示す。驚くべきことに、二重特異性抗体のみが C C R 5 陽性単球を相当涸渇できたが、一方非修飾のモノクローナル抗体はほとんど効果がなかった。

【図 17】 図 16 に示したような典型的な実験の前方および側方光散乱分析の例であり、C C R 5 - C D 3 二重特異性単鎖抗体のみが左下象限の単球を涸渇させる能力を有することが示された。異なる細胞型の局在化の比較として、図 12 左パネルを参照のこと。

【図 18】 ケモカイン - トキシン R A N T E S - P E 3 8 による C C R 5 陽性 C H O 細胞の破壊。C C R 5 陽性 C H O 細胞および C X C R 4 陽性 C H O 細胞を 4 0 時間ケモカイン - トキシン (1 0 n M) でインキュベートし、F A C S で分析した。死亡した細胞が、 50

前方および側方光散乱プロットの左上領域に現れる。RANTES-PE38は、CCD5陽性CHO細胞を完全に破壊したが、CXCR4陽性CHO細胞には効果がなかった。

【図19】ペプチド結合または多量化ドメインにより組み合わされるケモカインレセプター(CCR)発現細胞に結合する抗体および/またはケモカイン構築物の例:(A)は、エフェクター細胞表面抗原に結合することによりエフェクター細胞と相互作用する抗体およびケモカイン構築物の種々の例を示し、(B)は、トキシンに結合する抗体およびケモカイン構築物の例を示し、(C)は、トキシンに対する抗体結合部位を含む抗体およびケモカイン構築物の例を示す。

【図20】 4×10^5 のCCR5+CHO細胞を、 19.5 ng/ml のscFv CCR5×CD3とともに4で30分間インキュベートし、洗浄後細胞を $20 \mu\text{g/ml}$ の抗His-タグモノクローナル抗体とともに4で45分間インキュベートした。scFv CCR5×CD3の結合をモノクローナルヤギ抗マウスIgG F(ab')₂-PEコンジュゲート抗体で検出し、セルクエストソフトウエアを用いたフローサイトメーターにより分析した。グラフパッドプリズムによる非線形回帰分析を行った。 10

【図21】scFv CCR5×CD3の細胞毒活性を、CCR5+CHOを標的とし、CD3+Tリンパ球をエフェクター細胞としたFACSに基づく分析により検査した。CD3+T細胞は、末梢血液から単離した。CCR5+CHO細胞は、 $12 \mu\text{M}$ のPKH26によりラベル化した。エフェクター細胞:標的細胞を5:1の比率で、scFv CCR5×CD3を 320 ng/ml から 0.3 pg/ml の範囲で希釈したものととも5%CO₂下37で16時間インキュベートした。 $1 \mu\text{g/ml}$ のプロピジウムアイオダイド(PI)で染色した後、フローサイトメリーにより細胞を分析した。 20

scFv CCR5×CD3媒介の分解の特異性を確認するために、安定してCXCR4でトランスフェクトしたCHO細胞を陰性対照標的細胞として用いた。細胞毒性アッセイをCCR5+CHO細胞について記載したのと同じの条件下で行った。

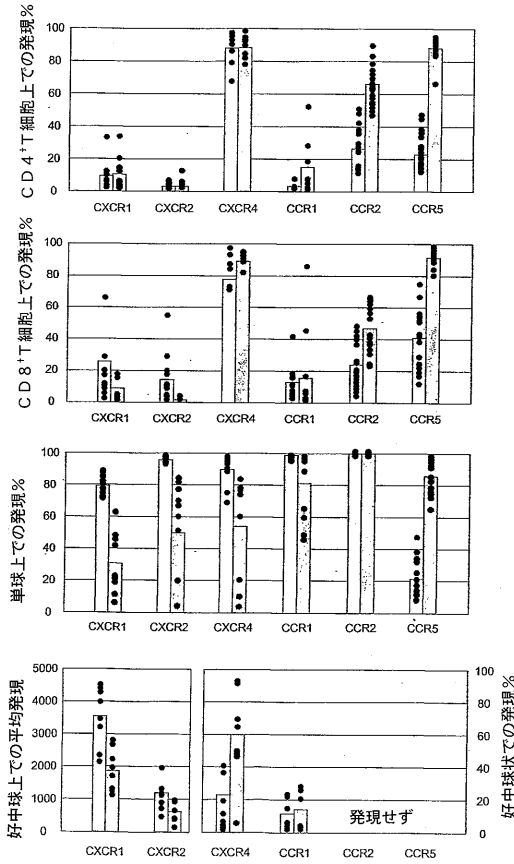
CCR5+CHO細胞の特異的分解をセルクエストソフトウエア(ベクトンディッキンソン)を用いて計算し、非線形回帰分析をグラフパッドプリズムにより行った。S字状の用量-反応曲線により、 912 pg/ml のEC50値が明らかになった。標的細胞としてCXCR4+CHO細胞では、scFv CCR5×CD3の細胞毒性作用は観察されなかった。

【図22】CCR5陽性細胞上のscFv CCR5×CD3の細胞毒活性も、エフェクター細胞としてCD3陽性T細胞系CB15を用いてFACSに基づいたアッセイにより検査した。 $10 \mu\text{M}$ のPKH26によってラベル化されたCCR5+CHO標的細胞を、エフェクター:標的が10:1の比率で用い、異なる希釈($40 \mu\text{g/ml}$ から 0.15 ng/ml)のscFv CCR5×CD3を $100 \mu\text{l}$ とともに、5%CO₂下37で6時間インキュベートした。細胞を $1 \mu\text{g/ml}$ のプロピジウムアイオダイド(PI)で染色した後、2回フローサイトメリーにより分析した。 30

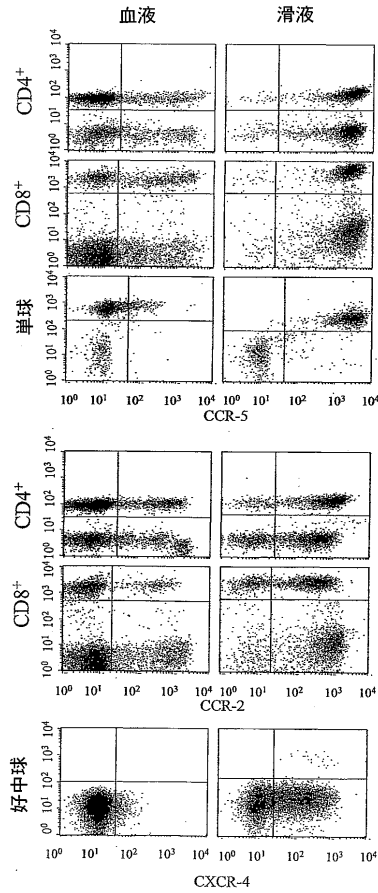
CCR5+CHO細胞の特異的分解をセルクエストソフトウエア(ベクトンディッキンソン)を用いて計算し、非線形回帰分析をグラフパッドプリズムにより行った。S字状の用量-反応曲線により、 12.8 ng/ml のEC50値が明らかになった。

【図23】MC-1の、A)ヒトPBMCおよびB)アカゲザルPBMCとの反応性。PBMC(実線)、PBMCおよびPEコンジュゲートヤギ抗マウス抗体(点線)、PBMCおよびMC-1とPEコンジュゲートヤギ抗マウス抗体(太線)。MC-1はヒトPBMC(A)と結合するが、アカゲザルPBMC(B)とは結合しないことが、M1マーカー線により示される。 40

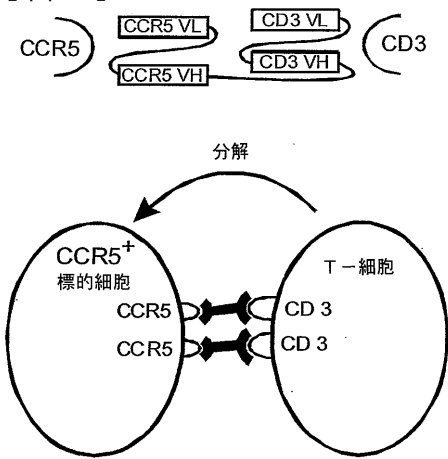
【 図 1 】



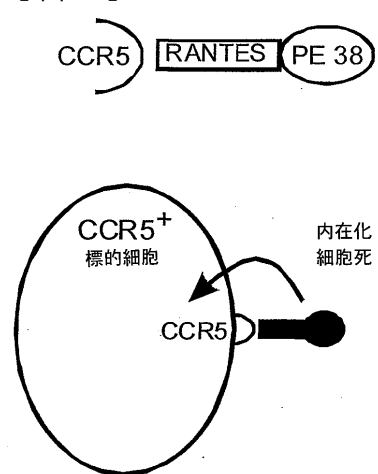
【 図 2 】



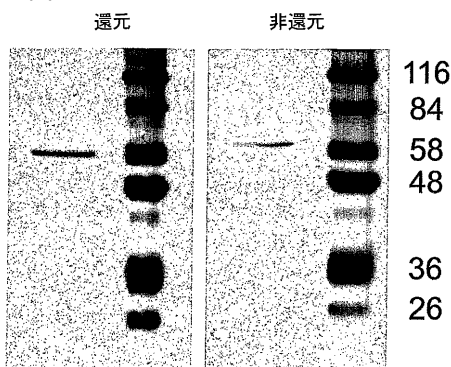
【 図 3 】



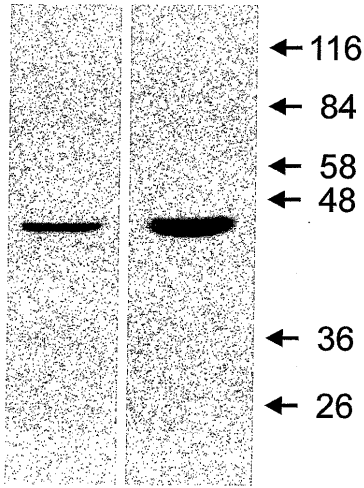
【 図 5 】



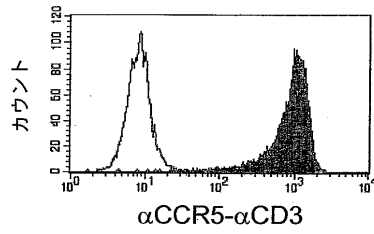
【 図 4 】



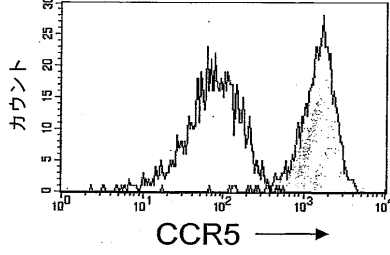
【 図 6 】



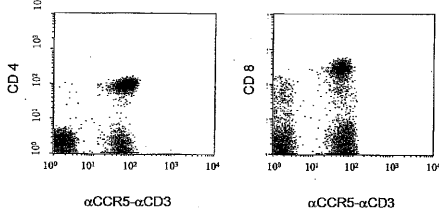
【 図 8 】



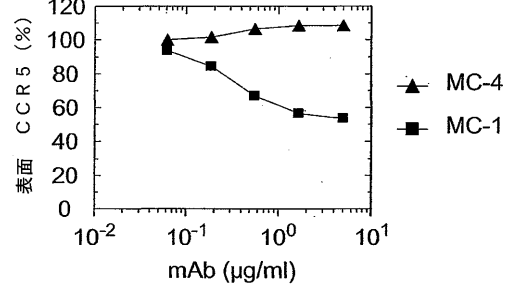
【 図 9 】



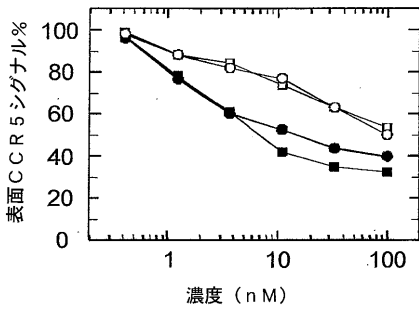
【 図 7 】



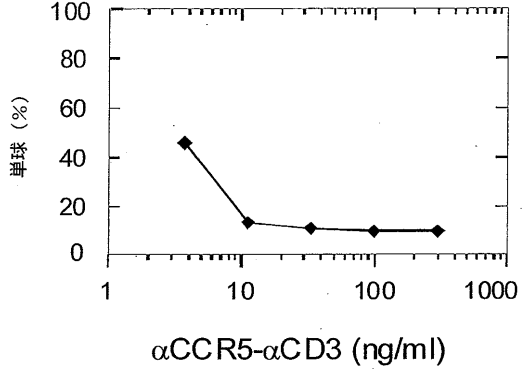
【 図 10 】



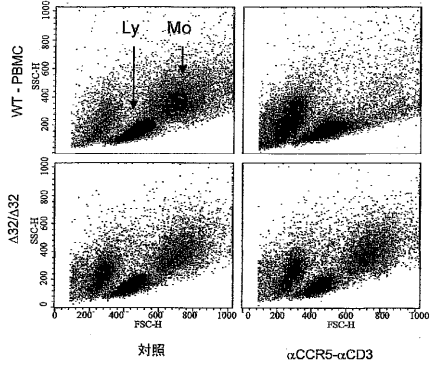
【 図 11 】



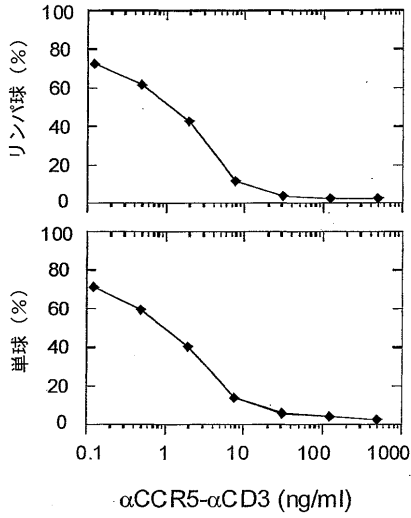
【 図 13 】



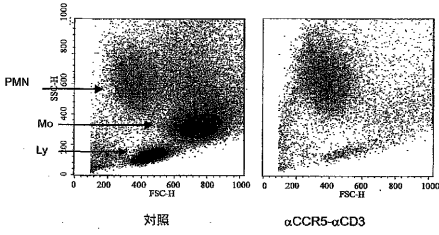
【 図 12 】



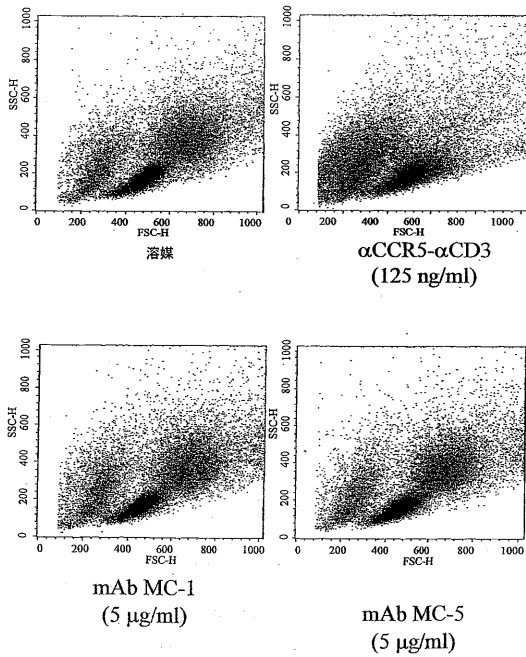
【 図 1 4 】



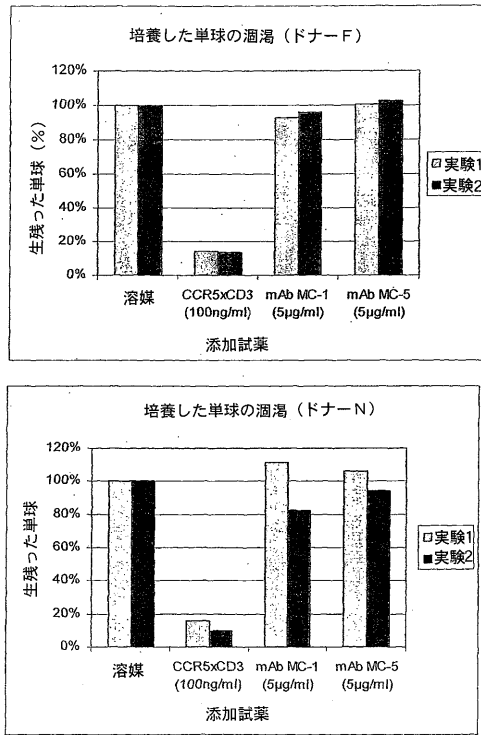
【 図 1 5 】



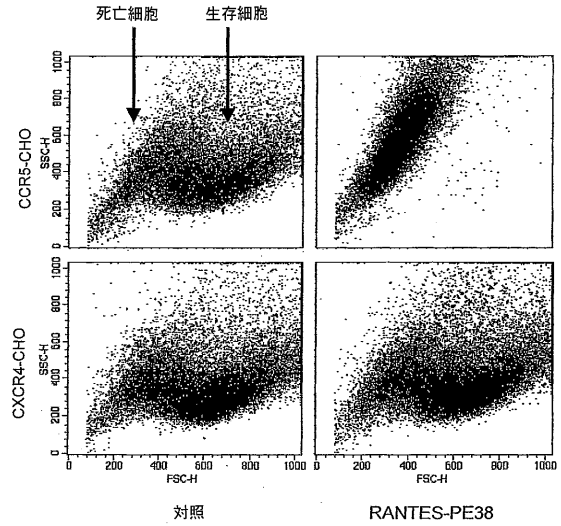
【 図 1 7 】



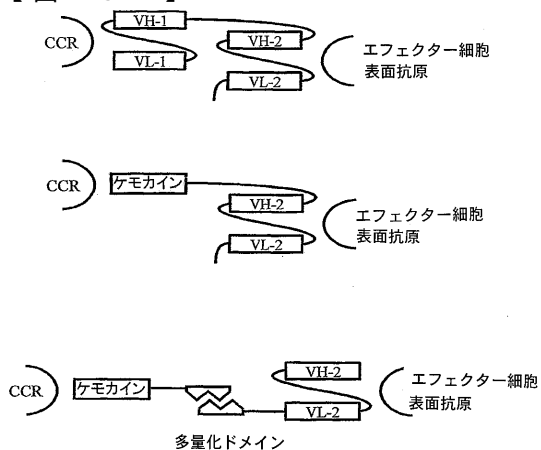
【 図 1 6 】



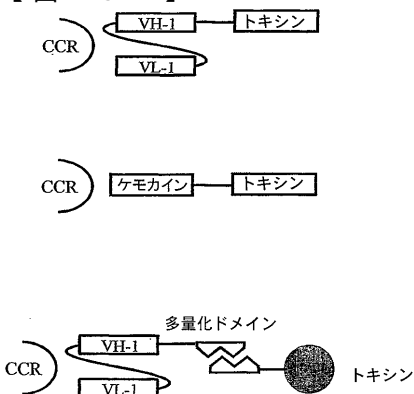
【 図 1 8 】



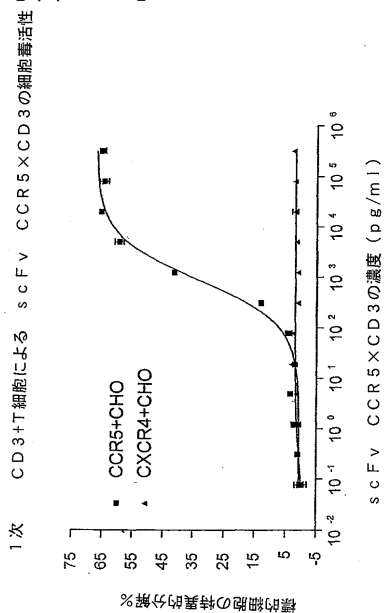
【図 19 A】



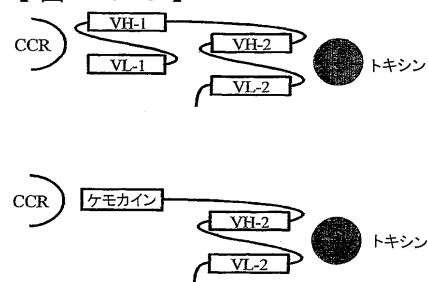
【図 19 B】



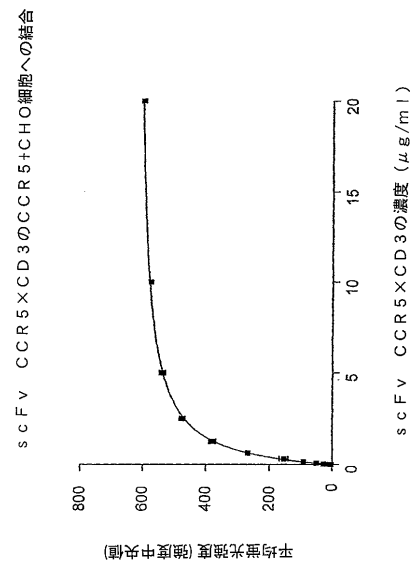
【図 21】



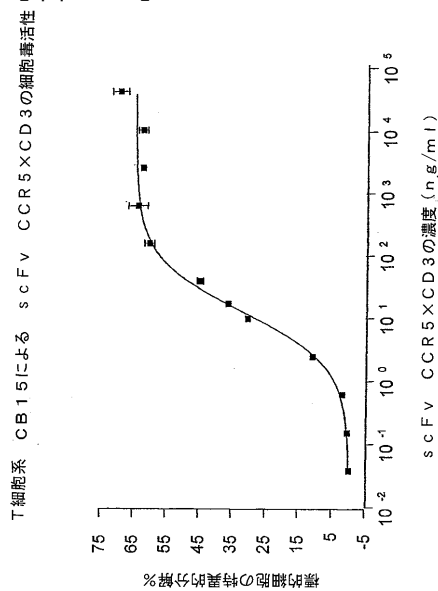
【図 19 C】



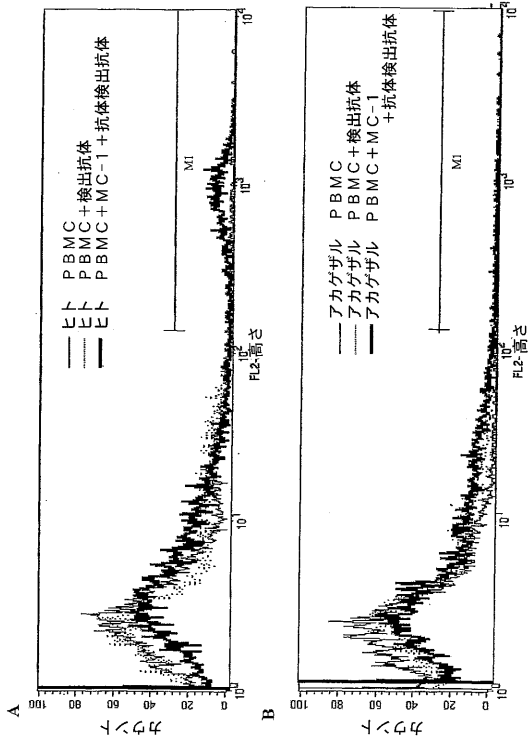
【図 20】



【図 22】



【 図 2 3 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20615 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 16/00 (74) Agent: VOSSIUS & PARTNER, Sieberstrasse 4, 81675 Munich (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/10433
- (22) International Filing Date:
10 September 2001 (10.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
001196948 8 September 2000 (08.09.2000) EP
09/948,004 5 September 2001 (05.09.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MICROMET AG [DE/DE], Am Klopferstutz 19, 82152 Martinsried/Planegg (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MACK, Matthias [DE/DE], Horemansstrasse 26a, 80636 München (DE); SCHLOENDORFF, Detlef [DE/DE], Kaiserplatz 2, 80803 München (DE); SPRING, Michael [DE/DE], Biberweg 2, 82223 Eichenau (DE).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



(54) Title: ANTIBODY AND/OR CHEMOKINE CONSTRUCTS AND THEIR USE IN IMMUNOLOGICAL DISORDERS

(57) Abstract: The present invention relates to the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus. In addition, the present invention provides for the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition of the treatment, prevention and/or alleviation of inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis, skin diseases, diabetes or transplant rejection. Furthermore, the invention relates to antibody constructs and/or chemokine constructs wherein said antibody construct comprises a binding site of chemokine receptor 5 and a binding site for CD3 and wherein said chemokine construct comprises RANTES and a toxin. The invention also describes polynucleotides encoding said antibody- or chemokine constructs, and vectors and hosts comprising said nucleic acid molecules. Additionally, the present invention relates to compositions comprising said antibody constructs, chemokine constructs, polynucleotides, vectors and/or hosts. Preferably said composition is a pharmaceutical composition. Described is also the use of antibody constructs, the chemokine constructs, the polynucleotides, the hosts and/or the vectors of the preparation of a pharmaceutical composition and methods for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for eliminating latently infected cells, wherein said cells are infected with a primate immunodeficiency virus, like HIV-1. Furthermore, the invention provides for a kit comprising the compounds of the invention.

WO 02/20615 A2

Antibody and/or chemokine constructs and their use in immunological disorders

The present invention relates to the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus. In addition, the present invention provides for the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment, prevention and/or alleviation of inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis, skin diseases, diabetes or transplant rejection. Furthermore, the invention relates to antibody constructs and/or chemokine constructs, in particular to constructs wherein said antibody construct comprises a binding site for chemokine receptor 5 and a binding site for CD3 and wherein said chemokine construct comprises RANTES and a toxin. The invention also describes polynucleotides encoding said antibody- or chemokine constructs, and vectors and hosts comprising said nucleic acid molecules. Additionally, the present invention relates to compositions comprising said antibody constructs, chemokine constructs, polynucleotides, vectors and/or hosts. Preferably said composition is a pharmaceutical composition. Described is also the use of antibody constructs, the chemokine constructs, the polynucleotides, the hosts and/or the vectors for the preparation of a pharmaceutical composition for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for eliminating latently infected cells, wherein said cells are infected with a primate immunodeficiency virus, like HIV-1. The present invention also relates to a method for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for the elimination cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus. Furthermore, the invention provides for a kit comprising the compounds of the invention.

Several documents are cited throughout the text of this specification. Each of the documents cited herein (including any manufacturers specifications, instructions, etc.) are hereby incorporated by reference.

Immunological diseases/disorders, like autoimmune diseases, inflammation disorders as well as infections diseases are not only increasing but represent substantial threats to global health.

For example, in Germany, about 1% of the population suffer from the autoimmune disease rheumatoid arthritis. In addition, there is a number of other rheumatoid diseases also leading to arthritis. Currently, three groups of drugs - non-steroidal antirheumatics, cortisone preparations and second-line agents - and TNF α blocking agents are used for treating inflammatory joint diseases. Up to now, the therapy has focused on the local injection of cortisone preparations in combination with a systemic administration of antiphlogistics or second-line agents.

Non-steroidal antirheumatics have a mild analgetic and anti-inflammatory effect, but they have many side effects when applied frequently (e.g. gastric ulcers, nephroses). In high dosages, cortisone preparations have a strong decongestant and analgetic effect, however leading to a quick relapse after discontinuation of the therapy. Moreover, cortisone preparations cannot stop the destruction process of the joint disease. A long-term therapy with cortisone usually entails severe side effects (infections, Cushing's phenomenon, osteoporosis, parchment-like skin, metabolic and hormonal disorders). The local injection of cortisone also has the essential disadvantage that the activity of the migrated white blood cells is only reduced. As the infiltrating cells are not destroyed, a quick relapse occurs after discontinuation of the therapy. As mentioned above, the same applies to the systemic application. Rarely is an inflammation due to the irritative effect of cortisone crystals aggravated after injection of cortisone. The duration of effect of a cortisone injection varies tremendously and ranges from primary ineffectiveness to a duration of effect of several weeks.

In rheumatology, second-line agents are used to achieve a long-term suppression of the inflammation and a reduction in cortisone preparations. Due to the considerable toxicity (allergies, infections, malignant diseases, renal insufficiency, blood pressure crises, pulmonary diseases) it is necessary for medical specialists to attend closely to the patients. After beginning treatment, no therapeutic effect may be apparent for the first three months. Currently, there are 4 or 5 of such second-line agents at disposal, which are used individually at first or are combined if the therapy is not effective. Mostly, there is hardly anything known about the mode of action of second-line agents. It is not yet entirely clear whether the application of second-line agents can diminish the destruction of the joint. In recent years, a new group of substances has been introduced into the treatment of rheumatoid arthritis, which is based on the blocking of cell signal substances (particularly $\text{TNF}\alpha$) by means of monoclonal antibodies or soluble receptor constructs.

In addition, there are patients that do not respond to currently available therapies. In other cases, the conventional therapy has to be stopped due to intolerable side effects.

A similar situation exists for many other inflammatory and autoimmune diseases like inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis and transplant rejection, where current treatments have many limitations. For example, agents used in inflammatory and autoimmune diseases include anti-inflammatory and immunosuppressive agents like azathioprine, cyclophosphamide, glucocorticoids like prednisone and corticosteroids; immunosuppressants like cyclosporin A, Tacrolimus (FK506), Sirolimus (Rapamycin); and protein drugs like calcineurin, beta-interferon, anti-TNF alpha monoclonal antibodies (remicade). These agents show general immunomodulating effects and therefore efficacy and side effects profiles can pose severe limitations for the treatment options (Harrison's Principles of Internal Medicine, eds. Fauci et al., 14th edition, McGraw-Hill publisher).

Inflammatory bowel diseases (examples are Crohn's disease, ulcerative colitis) are treated with the anti-inflammatory agents sulfasalazine (Azulfidine) and glucocorticoids, like prednisone and, in selected cases, with TNF- α blocking agents. In ulcerative

colitis immunosuppressive therapy with drugs such as azathioprine is well established, in severely ill patients the potent immunosuppressive agent cyclosporine is used (Harrison's Principles of Internal Medicine, eds. Fauci et al., 14th edition, McGraw-Hill publisher).

In many cases no sufficient reduction of disease activity is achieved with current drugs, such that even surgical intervention is sometimes necessary.

Inflammatory renal diseases (nephritis) are treated with e.g. glucocorticoids, alkylating agents and/or plasmapheresis. Additional diseases with similar treatment options include systemic lupus erythematosus (SLE), Sjogren's syndrome, polymyositis, dermatomyositis, mixed connective tissue disease, antiphospholipidantibody syndrome.

For some of these diseases, few therapeutic options have been available up to now. All these diseases share an inflammatory component. However, the inflammatory component cannot be sufficiently suppressed by the currently available drugs. For some drugs, e.g. alkylating agents a maximal lifetime dose per patient cannot be exceeded.

Transplant rejection is treated using immunosuppressive agents including azathioprine, mycophenolate mofetil, glucocorticoids, cyclosporine, Tacrolimus (FK506), Sirolimus (Rapamycin). A combination of steroids and a low dose of mouse monoclonal antibody OKT3 binding to CD3 on T-cells is used to anergize and deplete T-cells, therapy is continued using immunosuppressants like cyclosporine. Human anti-mouse antibodies (HAMAs) have common side effects and limit the use of OKT3 (Fauci et al. sic. 2374-2381).

Approaches to treat multiple sclerosis include treatments which effect the overall immune system like anti-inflammatory agents including azathioprine, cyclophosphamide, prednisone, corticosteroids, cyclosporin A, calcineurin, Rapamycin, beta-interferon (Fauci et al. sic. 2415-2419; Wang (2000) j. Immunol. 165, 548-57). In addition, a number of non-specific treatments are administered that may improve the quality of life including physical therapy and psycho-pharmacological agents. None of the treatment

options mentioned above has a curative effect. Even the most promising compound, β -interferon, leads only to a slower disease progression, while exhibiting significant side effects.

Furthermore, human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1), the most common cause of AIDS, has infected more than 50 million individuals (including those who have died), and the rate of new infections is estimated at nearly 6 million per year (AIDS Epidemic Update: December 1999 (UNAIDS, Geneva, 1999), www.unaids.org). Equally disturbing are the uncertainties of the epidemic to come. Although sub-Saharan Africa remains the global epicenter, rates of infection have increased in recent times in the former Soviet Union and parts of south and southeast Asia, including India and China, where literally hundreds of millions of individuals are potentially at risk. In the United States, new waves of infection have been recognized in women, minorities, and younger generations of gay men. Combination antiretroviral therapy has afforded many people clinical relief, but the costs and toxicities of treatment are substantial, and HIV-1 infection remains a fatal disease. Moreover, the vast majority of infected people worldwide do not have access to these agents. Thus, although the demographics (and, in some instances, the natural history) of AIDS have changed, the epidemic is far from over; instead, it is evolving, expanding, and posing ever greater challenges.

Human immunodeficiency virus (HIV) cannot enter human cells unless it first binds to two key molecules on the cell surface, CD4 and a co-receptor. The co-receptor that is initially recognized is CCR5, later in the life cycle of the virus another chemokine receptor CXCR4 becomes the co-receptor for HIV-1 (D'Souza, *Nature Med.* 2, 1293 (1996); Premack, *Nature Med.* 2, 1174; Fauci, *Nature* 384, 529 (1996)). The HIV-1 strains that cause most transmissions of viruses by sexual contact are called M-tropic viruses. These HIV-1 strains (also known as NSI primary viruses) can replicate in primary CD4+ T-cells and macrophages and use the chemokine receptor CCR5 (and, less often, CCR3) as their coreceptor. The T-tropic viruses (sometimes called SI primary) can also replicate in primary CD4+ T-cells but can in addition infect established CD4+ T-cell lines in vitro, which they do via the chemokine receptor CXCR4 (fusin). Many of these T-tropic strains can use CCR5 in addition to CXCR4, and some can en-

ter macrophages via CCR5, at least under certain in vitro conditions (D'Souza, *Nature Med.* 2, 1293 (1996); Premack, *Nature Med.* 2, 1174; Fauci, *Nature* 384, 529 (1996)). Whether other coreceptors contribute to HIV-1 pathogenesis is unresolved, but the existence of another coreceptor for some T-tropic strains can be inferred from in vitro studies. Because M-tropic HIV-1 strains are implicated in about 90% of sexual transmissions of HIV, CCR5 is the predominant coreceptor for the virus in patients; transmission (or systemic establishment) of CXCR4-using (T-tropic) strains is rare (D'Souza, *Nature Med.* 2, 1293 (1996); Premack, *Nature Med.* 2, 1174; Fauci, *Nature* 384, 529 (1996); Paxton, *Nature Med.* 2, 412 (1996); Liu, *Cell* 86, 367 (1996); Samson, *Nature* 382, 722 (1996); Dean, *Science* 273, 1856 (1996); Huang, *Nature Med.* 2, 1240 (1996)). However, once SI viruses evolve in vivo (or if they are transmitted), they are especially virulent and cause faster disease progression (D'Souza, *Nature Med.* 2, 1293 (1996); Premack, *Nature Med.* 2, 1174; Fauci, *Nature* 384, 529 (1996); Schuitemaker, *J. Virol.* 66, 1354 (1992); Connor, *J. Virol.* 67, 1772 (1993); Richman, *J. Infect. Dis.* 169, 968 (1994); R. I. Connor et al., *J. Exp. Med.* 185, 621 (1997); Trkola, *Nature* 384, 184 (1996)).

The numbers and identity of coreceptor molecules on target cells, and the ability of HIV-1 strains to likely enter cells via the different coreceptors, seem to be critical determinants of disease progression. These factors are major influences on both host- and virus-dependent aspects of HIV-1 infection. For example, a homozygous defect ($\Delta 32$) in CCR5 correlates strongly with resistance to HIV-1 infection in vivo and in vitro. Individuals who are heterozygous for a defective CCR5 allele are at best weakly protected against infection and have only a modestly slowed disease progression (Paxton, *Nature Med.* 2, 412 (1996); Liu, *Cell* 86, 367 (1996); Samson, *Nature* 382, 722 (1996); Dean, *Science* 273, 1856 (1996); Huang et al., *Nature Med.* 2, 1240 (1996)). However, other factors can influence the level of CCR5 expression on activated CD4+ T-cells and thereby affect the efficiency of HIV-1 infection in vitro (Trkola, *Nature* 384, 184 (1996); Bleul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1925 (1997)). For reasons that are not yet clear, the amount of CCR5 expression on the cell surface (as measured by MIP-1 binding) varies by 20-fold on CD4+ T-cells from individuals with two wild-type CCR5 alleles (Trkola, *Nature* 384, 184 (1996)) (see figure). Staining with a CCR5-specific

monoclonal antibody indicates a similar large variability (Wu, *J. Exp. Med.* 186:1373-81 (1997)). Such variation may far outweigh any effect of one defective allele for CCR5. The causes of this variation should be the subject of intensive studies, as they point to controllable factors that could increase resistance to disease.

Most primary, clinical isolates of primate immunodeficiency viruses use the chemokine receptor CCR5 for entry (Feng, *Science* 272, 872 (1996); Choe, *Cell* 85, 1135 (1996); Deng, *Nature* 381, 661 (1996); Dragic et al., *Nature* 381, p. 667; Doranz, *Cell* 85, 1149 (1996); Alkhatib, *Science* 272, 1955 (1996)). For most HIV-1 isolates that are transmitted and that predominate during the early years of infection, CCR5 is an obligate coreceptor, and rare individuals that are genetically deficient in CCR5 expression are relatively resistant to HIV-1 infection (Connor, *J. Exp. Med.* 185, 621 (1997); Zhang, *Nature* 383, 768 (1996); Björndal, *J. Virol.* 71, 7478 (1997); Dean, *Science* 273, 1856 (1996); Liu, *Cell* 86, 367 (1996); Paxton, *Nature Med.* 2, 412 (1996); Samson, *Nature* 382, 722 (1996)). HIV-1 isolates arising later in the course of infection often use other chemokine receptors, frequently CXCR4, in addition to CCR5. Studies of chimeric envelope glycoproteins demonstrated that the third variable (V3) loop of gp120 is a major determinant of which chemokine receptor is used (see references above and also Cocchi, *Nature Med.* 2, 1244 (1996); Bieniasz, *EMBO J.* 16, 2599 (1997); Speck, *J. Virol.* 71, 7136 (1997)). V3-deleted versions of gp120 do not bind CCR5, even though CD4 binding occurs at wild-type levels. Antibodies to the V3 loop interfere with gp120-CCR5 binding (Trkola, *Nature* 384, 184 (1996); Wu, *Nature* 384, 179 (1996); Lapham, *Science* 274, 602 (1996); Bandres, *J. Virol.* 72, 2500 (1998); Hill, *Science* 71, 6296 (1997)). These results support an involvement of the V3 loop in chemokine receptor binding.

Latency of HIV is established very early in the course of an infection, when M-tropic strains predominate. M-tropic strains depend on the presence of CCR5 on the target cell for infection. The importance of CCR5 as an essential co-receptor for M-tropic HIV-1 is emphasized by the fact that individuals lacking CCR5 due to a homozygous 32 basepair deletion ($\Delta 32$) are highly resistant to HIV-1 infection. In contrast to other markers like CD4, CD25, or CD45RO, CCR5 is only present on a subset of lymphocytes and other cells that are prone to HIV-1 infection (Rottmann (1997) *Am J Pathol*

151, 1341-1351; Naif (1998) *J Virol* 72, 830-836; Lee (1999) *Proc. Natl Acad. Sci.* 96, 5315-5220).

Several approaches have been postulated to eliminate latent infected cells. One strategy is to drive the latently infected to virus production and subsequent cell death. In this context, one approach is IL-2 (TNF-alpha, IL-6) administration in the presence of HAART until the viral reservoir is exhausted (Chun (1998) *J. Exp. Med.* 188, 83-91; Chun (1999) *Nat. Med.* 5, 651-655; Stellbrink (1999) Abstracts of the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA), abstr. 356, p. 135; Imamichi (1999) Abstracts of the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA), abstr. 358, p. 135). These cells are believed to die after activation. Whether the entire pool of latent infected cells can be exhausted is questionable.

Another strategy tried was to specifically kill latently infected cells based on gp-120 expression on the cell surface. Immunotoxins recognizing gp-120 have been proposed but failed for two reasons. The one construct tested in humans was a protein consisting of soluble CD4 linked to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (PE). The clinical results were disappointing due to dose-limiting hepatotoxicity without showing signs of efficacy and the program was terminated (Ashom (1990) *Proc. Natl Acad. Sci.* 87, 8889-8893; Berger (1998) *Proc. Natl Acad. Sci.* 95, 11511-11513). The second reason for failure was that latent infected cells do not express viral surface glycoproteins, e.g. gp-120 and gp-41. Thus, approaches targeting gp-120 or gp-41 for the elimination of latently infected cells cannot work.

Other approaches to eliminate latent infected cells are based on eliminating the entire CD4⁺ T-cell compartment (Berger (1998) *Proc. Natl Acad. Sci.* 95, 11511-11513), or the CD25-positive compartment (Bell (1993) *Proc. Natl Acad. Sci.* 90, 1411-1415) the CD45RO memory cell compartment (McCoig (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11482-11485). However these markers do not adequately include all potentially infected cells.

Such cells include besides CD4-positive cells, or memory cells also macrophages, and non-hematopoietic cells.

In WO 98/18826 an antibody directed against the mammalian (e.g. human) chemokine receptor 5 is described and said antibody is proposed in a method of inhibiting the interaction of cell bearing CCR5 with a potential ligand, like HIV. It is proposed that said method inhibits an HIV infection. Furthermore, treatment options for inflammatory diseases, autoimmune diseases and graft rejection are proposed. Yet, all these treatment options are based on the assumption that specific antibodies like the immunoglobulin molecules themselves or functional portions thereof interfere with receptor-ligand interactions. However, whether these antibodies are capable of depleting the relevant cells is questionable. Furthermore, WO 98/18826 merely envisages the prevention of an interaction of HIV and the CCR5 receptor and thereby preventing an HIV infection.

Leukocytes, in particular T-cells, are believed to be the key regulators of the immune response to infective agents and are critical components for the initiation and maintenance of inflammatory processes, like inflammatory bowel disease inflammatory renal diseases, inflammatory joint disease, autoimmune disorders, like multiple sclerosis and arthritis, skin diseases, like psoriatic lesions, diabetes and in transplant rejection.

Therefore, the technical problem underlying the present invention is to provide for novel means and methods which can lead to the suppression of activated leukocytes involved in immunological pathologies, like autoimmune diseases, inflammation process and/or viral infections of immune cells.

Accordingly, the present invention relates to the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus, preferably a human immunodeficiency virus, most preferably HIV-1.

In context of the present invention the binding of said antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor results in the depletion and/or destruction of

the target cell, namely the cell latently infected with said primate immunodeficiency virus.

In this invention it could surprisingly be shown that highly specific antibodies directed against an chemokine receptor were not able to destroy, lyse and/or deplete cells which express said chemokine receptor. However, antibody constructs or chemokine constructs as described and disclosed in the present invention were capable to specifically interact with said chemokine-receptor positive cells and were able to deplete said cells. Said depletion/destruction may, e.g., be achieved by the attraction of specific effector cells, like monocytes, macrophages, T-cells (particularly preferred are cytotoxic T-cells) or dendritic cells. Even if monoclonal antibodies had been shown to be successful in the destruction/depletion of malignant cells (see, e.g., Maloney (1999), Sem Oncol. 26, 76-78), they appear to be ineffective against certain subtypes of leukocytes, (comprising lymphocytes, polynuclear leukocytes and monocytes) especially CCR5⁺ monocytes, T-cells and dendritic cells as documented herein and in the appended examples.

In accordance with the present invention, the term "antibody and/or chemokine construct" (i.e. antibody construct and/or chemokine construct) not only comprises the molecules and multifunctional constructs and compounds as described herein, but also comprises functional fragments thereof. Functional fragments of said constructs are meant to be fragments which are capable of binding to/interacting with a chemokine receptor on a target cell and providing for means for depleting, lysing and/or destroying said target cell.

Specific chemokine receptors, in accordance with the present invention comprise, but are not limited to, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, XCR1, CCR10 and CX3CR1. Chemokines and/or chemokine ligands binding to said chemokine receptors are well known in the art and shown, *inter alia*, in Table 4. Furthermore, chemokines and corresponding receptors are disclosed in Murphy (2000), Pharm. Reviews 52, 145-176. The chemokines, chemokine ligands and/or receptors are preferably primate, more preferably human chemokines/ligands/receptors.

The present invention also relates to the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical

composition for the treatment, prevention and/or alleviation of inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis, skin diseases, allergic reactions diabetes or transplant rejection.

Said skin diseases comprise, inter alia, psoriatic disorders, atopic dermatitis or chronically inflamed skin. CCR6 expression is upregulated in PBMCs derived from patients with psoriasis. In addition, CCR6 ligand (CCL20=MIP3alpha) and CCR6 are upregulated in psoriatic skin. Furthermore, CCL20 expressing keratinocytes colocalize with skin infiltrating T-cells (Homey (2000) J. Immunol. 164, 6621-6632). Furthermore, CCR10 was detected on melanocytes, dermal fibroblasts, dermal endothelial cells, T-cells and skin-derived Langerhans cells but not keratinocytes. CCR10 ligand (CCL27) has a skin associated expression pattern (Homey (2000) J. Immunol. 164, 3465-3470; Charbonnier (1999) J. Exp. Med 190, 1755-1768). In addition, CCR4 and its ligand (TARC, MDC) are upregulated in chronically inflamed skin. Moreover CCR4 is a homing receptor for T-cells entering the skin. CCR4+ T-cells are only a small subpopulation of all T cells and therefore depletion of CCR4+ T-cells is indicated for various inflammatory skin diseases (Campbell (1999) Nature 400, 776-780). CCR3 and exotoxin expression is enhanced in atopic dermatitis and may contribute to the initiation and maintenance of inflammation (Yawalkar (1999) J. Invest. Dermatol. 113, 43-48).

Virtually all T-cells in rheumatoid arthritis, synovial fluid and in various inflamed tissues such as ulcerative colitis, chronic vaginitis and sarcoidosis express CXCR3. Whereas fewer T-cells within normal lymph nodes are CXCR3 positive.

For multiple sclerosis it was shown that CCR5 and CXCR3 are predominantly expressed on T-cells infiltrating demyelinating brain lesions, as well as in the peripheral blood of affected patients. The corresponding ligands MIP-1 α and IP-10 were also detectable in the plaques (Balashov (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 6873-6878). Elimination of the T-cells would block the T-cell arm of this autoimmune disease.

Immunochemical analysis of the expression of the beta-chemokine receptors in post-mortem CNS tissue from patients with multiple sclerosis revealed that in chronic active

MS lesions expression of CCR2, CCR3 and CCR5 was associated with foamy macrophages and activated microglia while low levels of these chemokine receptors were expressed by microglial cells in control CNS tissue. CCR2 and CCR5 were also present on large numbers of infiltrating lymphocytes and in 5/14 cases of MS CCR3 and CCR5 were also expressed on astrocytes. The elevated expression of CCR2, CCR3 and CCR5 in the CNS in MS suggests these beta-chemokine receptors and their ligands play a role in the pathogenesis of MS (Simpson, *J. Neuroimmunol.*, 2000, 108, 192-200).

High expression of CCR3 and CCR5 was also observed in T cells and B cells of lymph nodes derived from patients with Hodgkin disease. While CCR3 was equally distributed in CD4+ and CD8+ cells, CCR5 was mainly associated with CD4+ cells. These data suggest that chemokines are involved in the formation of the nonneoplastic leukocytic infiltrates in Hodgkin disease (Buri, *Blood*, 2001, 97, 1543-8).

Periodontal disease is a peripheral infection involving species of gram-negative organisms. In patients with moderate to advanced periodontal disease CCR5 chemokine receptor expressing cells were found in the inflammatory infiltrates (Gamonal, *J. Periodontal. Res.*, 2001, 36, 194-203 and Taubman, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2001, 12, 125-35).

Diabetes type I is considered to be a T-cell mediated autoimmune disease. The expression of CCR5 receptor in the pancreas was associated with the progression of type I diabetes in relevant animal models (Cameron (2000) *J. Immunol.* 165, 1102-1110). In particular, the CCR5 expression was associated with the development of insulinitis and spontaneous type I diabetes.

Specific chemokines are associated with T-cell migration in diabetes type I relevant animal model: RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-5, IP10. These chemokines lead to a Th1 immune response (Bradley (1999) *J. Immunol.* 162:2511-2520).

The above mentioned inflammatory bowel disease may comprise Morbus Crohn and colitis ulcerosa.

CCR9 is expressed on T-cells homing to the intestine and may be implied in Morbus Crohn and colitis ulcerosa. All intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express CCR9 (Zabel (1999) J. Exp. Med. 190, 1241-1256).

Additionally, the antibody- and/or chemokine construct as described in context of the present invention is also useful for avoiding complications during and/or after transplants, i.e. to avoid transplant rejections and graft versus host disease.

CCR7 is expressed on naïve T-cells and dendritic cells and mediates cell migration to lymphatic organs. Elimination of CCR7+ cells would therefore prevent an immune response to novel antigens, e.g., following transplantation. Such a treatment would not be generally immune suppressing but selective for novel antigens and limited for the duration of the administration of drugs of the invention depleting CCR7+ cells (Forster (1999) Cell 99, 23-33). CXCR5 is expressed on naïve B cells in the peripheral blood and tonsils and memory T-cells. Elimination of CXCR5+ B-cells would prevent the establishment of a humoral response. Furthermore, elimination of memory T-cells would reduce the cellular component of the immune response (Murphy (2000) Pharmacological Reviews 52, 145-176).

In order to provide pharmaceutical compositions for the treatment of allergies and/or allergic reactions, the antibody- and/or chemokine constructs as described herein may be employed. It was shown that CCR3 which binds exotoxin and RANTES, is expressed on eosinophils, Th2 cells, mast cells, basophils, which are involved in allergic reactions (Romangnani (1999) Am. J. Pathol. 155, 1195-1204).

As far as the above mentioned renal or kidney diseases are concerned, it has been shown that CCR5 positive T-cells may play a role in interstitial processes leading to fibrosis. CCR5 positive cells have been identified in the interstitial infiltrate of various glomerular and interstitial diseases, as well as transplant rejection. Said disease comprises acute and chronic nephritis, IgA nephropathy, and others (Segeer (1999), Kidney Int. 56, 52-64).

In a model of transient immune complex glomerulonephritis (IC-GN), CCR1, CCR2, and CCR5 were expressed early and were already downregulated at the peak of proteinuria and leukocyte infiltration. Expression of CCR5 was located to the glomerulus by in situ hybridization and quantitative reverse transcription-PCR of isolated glomeruli (Anders, J. Am. Soc. Nephrol., 2001, 12, 919-31). In kidneys of 38 patients with several renal diseases, CCR1- and CCR5-positive macrophages and T cells were detected in both glomeruli and interstitium as shown by immunohistochemistry. Renal CCR5-positive cells were dramatically decreased during convalescence induced by glucocorticoids (Furuichi, Am. J. Nephrol., 2000, 20, 291-9).

In a preferred embodiment of the present invention, the invention provides for the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition as described hereinabove, wherein said chemokine receptor is the chemokine receptor 5 (CCR5). It is preferred that said CCR5 is the human CCR5.

The chemokine receptor CCR5 is a member of a large family of G protein coupled seven transmembrane domain receptors that binds the proinflammatory chemokines RANTES, MIP1- α , MIP1- β and MCP-2. Chemokines act in concert with adhesion molecules to induce the extravasation of leukocytes and to direct their migration to sites of tissue injury.

The CCR5 is expressed on a minority of T-cells and monocytes and is further the major co-receptor for M-trophic HIV-1 strains that predominate early in the course of an HIV-infection.

The pharmaceutical composition as described hereinabove is, therefore, particularly useful in the depletion of CCR5⁺ leukocytes and would be useful in the elimination of cells latently infected with HIV-1. Depletion of CCR5⁺ cells should therefore reduce the number of cells latently infected with HIV and should be particularly useful in combination with active anti-viral, preferably anti-retroviral therapy.

In a particularly preferred embodiment said antibody construct is a bispecific antibody which binds to the chemokine receptor, preferably the CCR5, as a first antigen and a CD3 antigen of an effector cell as a second antigen. Preferably said CD3 antigen is on the surface of a T-cell, preferably a cytotoxic T-cell. Said CD3 therefore, denotes an antigen that is expressed on the above mentioned cells and may be part of the multi-molecular (T-) cell receptor complex.

Bispecific antibodies may be constructed by hybrid-hybridoma techniques, by covalently linking specific antibodies or by other approaches, like the diabody approach (Kipriyanow, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-773).

It is preferred that said bispecific antibody is a single chain antibody construct.

As is well known, Fv, the minimum antibody fragment which contains a complete antigen recognition and binding site, consists of a dimer of one heavy and one light chain variable domain (V_H and V_L) in non-covalent association. In this configuration that corresponds to the one found in native antibodies the three complementarity determining regions (CDRs) of each variable domain interact to define an antigen binding site on the surface of the V_H - V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen binding specificity to the antibody. Frameworks (FRs) flanking the CDRs have a tertiary structure which is essentially conserved in native immunoglobulins of species as diverse as human and mouse. These FRs serve to hold the CDRs in their appropriate orientation. The constant domains are not required for binding function, but may aid in stabilizing V_H - V_L interaction. Even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although usually at a lower affinity than an entire binding site (Painter, Biochem. 11 (1972), 1327-1337). Hence, said domain of the binding site of the antibody construct as defined and described in the present invention can be a pair of V_H - V_L , V_H - V_H or V_L - V_L domains of different immunoglobulins. The order of V_H and V_L domains within the polypeptide chain is not decisive for the present invention, the order of domains given hereinabove may be reversed usually without any loss of function. It is important, however, that the V_H and V_L domains are arranged so that the antigen binding site can properly fold.

Different parts of the antibodies/immunoglobulins can be joined by means of conventional methods or constructed as a contiguous protein by means of recombinant DNA techniques, e.g. in such a way that a nucleic acid molecule coding for a chimeric or humanized antibody chain is expressed in order to construct a contiguous protein (cf. for example Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp. 7021-7025).

A single-chain antibody with the following Fv fragments is preferred: sc-Fv fragment of a monoclonal antibody against the chemokine receptor, preferably against CCR5, and an sc-Fv fragment of a monoclonal antibody against CD3. In this case, both the Fv fragment directed against the chemokine receptor and the Fv fragment against CD3 may be located in N-terminal position. The Fv fragment against CCR5 is preferred to be in N-terminal position. The order of the VL and VH antibody domains can be variable in both constructs, preferably, the order of the Fv fragment against CCR5 is VL-VH and the one of the Fv fragment against CD3 is VH-VL. The linkers between the variable domains as well between the two Fv fragments may consist of peptide linkers, preferably of a hydrophilic flexible glycine- and serine-containing linker of 1 to 25 amino acids. An additional histidine chain of, e.g., 6 x His, in C- or N-terminal position can be used to simplify purification and detection.

Compared to conventional bispecific antibodies, bispecific single-chain antibodies have the advantage that they consist of only one protein chain and thus their composition is exactly defined. They have a low molecular weight of normally < 60 kD and can be produced easily and on a large scale in suitable cell lines, e.g. in CHO cells, using recombinant techniques. The most essential advantage, however, is that they have no constant antibody domains and thus only activate T-lymphocytes to lysis when these are bound to their target cells, i.e. to the chemokine-receptor expressing cells. Therefore, single-chain antibodies are often superior to conventional bispecific antibodies as their clinical use entails fewer or less severe side effects.

MC-1 was shown to bind specifically to the first part of the second extracellular loop of human CCR5 and did not crossreact with CCR5 derived from rhesus macaques as

shown in the appended examples. Therefore, it is preferred that said single chain antibody construct comprises V_L and V_H domains of an antibody specific for the chemokine receptor, preferably the human CCR5, and V_H and V_L domains of an antibody specific for a CD3 antigen. Said antibody specific for the human CCR5 is the murine anti-human CCR5 antibody MC-1, described, inter alia, in Mack (1998), J. Exp. Med. 187, 1215-1224 and in the appended examples. Yet, it is envisaged that other α -CCR5 antibodies, like MC-5 (as characterized in the appended examples and disclosed in Segerer (1999), loc. cit.) may be employed in the context of this invention. The antibody specific for a CD3 antigen may be selected from the group consisting of antibodies recognizing the gamma, delta, epsilon, zeta chains, particularly preferred are antibodies recognizing the epsilon chain and the CD3 zeta chain (Jakobs (1997) Cancer Immunol Immunother. 44, 257-264; Mezzanica (1991) Cancer Res 51, 5716-5721). Examples of anti-epsilon chain antibodies are OKT3 (WO 91/09968, Kung et al., Science 206, 347-349 (1979); Van Wauwe, J. Immunol. 124, 2708-2713 (1980); Transy, Eur. J. Immunol. 19, 947-950 (1989); Woodle, J. Immunol. 148, 2756-2763 (1992); Ada, Human. Antibod. Hybridomas, 41-47 (1994)) and TR66 (Traunecker (1991) EMBO J. 10, 3655-3659). Examples of monoclonal antibodies against the CD3 zeta chain are H2D9, TIA2 (both Becton Dickinson), G3 (Serotec Ltd.).

In a particularly preferred embodiment of the use of the present invention, the V_L and V_H domains of the single chain antibody as described above are arranged in the order $V_L(\text{MC-1})$ - $V_H(\text{MC-1})$ - $V_H(\text{CD3})$ - $V_L(\text{CD3})$, whereby it is particularly preferred that $V_L(\text{MC-1})$ comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 12, wherein said $V_H(\text{MC-1})$ comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 16, wherein said $V_H(\text{CD3})$ comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 26 and/or wherein said $V_L(\text{CD3})$ comprises in SEQ ID NO: 28. Specific CDR parts of the MC-1 antibody are shown in SEQ ID NO: 29 to 34, wherein SEQ ID NO: 29 shows the CDR1 of V_L MC-1, SEQ ID NO: 30 shows the CDR2 of V_L MC-1, SEQ ID NO: 31 shows the CDR3 of V_L -MC-1, SEQ ID NO: 32 shows the CDR1 of V_H MC-1, SEQ ID NO: 33 shows the CDR2 of V_H MC-1 and SEQ ID NO: 34 depicts the CDR 3 of V_H MC-1. Said bispecific antibody may, inter alia, comprise an amino acid sequence encoded by the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 17 or comprises the amino acid

sequence as depicted in SEQ ID NO: 18.

In another embodiment of the use of the present invention, the antibody construct is a bispecific antibody which binds to said chemokine receptor as a first antigen and a toxin as a second antigen. The antibody may be covalently bound to said toxin, and said antibody-toxin construct may be constructed by chemical coupling, producing a fusion protein or a mosaic protein from said antibody and from a modified or unmodified prokaryotic or eukaryotic toxin. Furthermore, said antibody may be joined to said toxin via additional multimerization domains.

In a further embodiment of the use of the present invention said antibody construct can, via a multimerization domain, be bound *in vitro* and/or *in vivo* to a second antibody construct which binds to a CD3 antigen and/or a toxin. Said multimerization may, *inter alia*, be obtained via hetero(di)merization. For example, the hetero(di)merization region of constant immunoglobulin domains may be employed. Other multi- and/or heterodimerization domains are known in the art and are based on leucine zippers, α - and β -chains of T-cell receptors or MHC-class II molecules. Furthermore, jun- and fos-based domains may be employed (de Kuif (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 7630-7634; Kostelny (1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553). Additional examples of multimerization domains are p53- and MNT-domains as described in Sakamoto (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8974-8978; Lee (1994) *Nat. Struct. Biol.* 1, 877-890; Jeffrey (1995) *Science* 267, 1498-5102 or Nooren (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6, 755-759).

In another embodiment of the invention, the above mentioned chemokine construct is a fusion construct of a modified or an unmodified chemokine with a modified or an unmodified toxin. Said construct may, *inter alia* via a multimerization domain, be bound *in vitro* and/or *in vivo* to an antibody construct which binds to a CD3 antigen and/or to a toxin. Suitable multimerization domains have been described in the art and are mentioned hereinabove. The chemokine-toxin constructs may, *inter alia*, result from chemical coupling, may be recombinantly produced (as shown in the appended examples), or may be produced as a fusion protein from a chemokine and a modified or unmodified prokaryotic or eukaryotic toxin. It is particularly preferred that said chemokine binds to

the human chemokine receptor CCR5 and comprises, inter alia, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2, MCP-3 or (a) fragment(s) thereof which are capable of binding to said receptor. A preferred toxin may be a truncated version of pseudomonas exotoxin, like PE38, PE40 or PE37. Most preferred, in context of this invention, is PE38.

Furthermore, and in accordance with the present invention, said chemokine construct may comprise the chemokine covalently bound to an antibody construct which binds to an antibody construct capable of binding to a CD3 antigen and/or which is a covalently bound to a toxin.

In a particularly preferred embodiment of the use of the present invention, the antibody and/or chemokine construct is a heteromibody construct comprising at least an antibody and/or a chemokine which binds to a chemokine receptor, preferably to the CCR5 receptor, most preferably to the human CCR5 receptor. Said heteromibody construct may comprise at least one toxin and it is particularly preferred that said heteromibody construct binds to the chemokine receptor as defined hereinabove and/or to a CD3 antigen of an effector cell. Preferred chemokines are the chemokines mentioned hereinabove and preferred toxins are the toxins described hereinabove, which may be modified or unmodified. Chemokines are well known in the art and described, inter alia, in Murphy (1999), loc. cit. Therefore, it is preferred that the chemokine is selected from the group consisting of RANTES, MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-2, and MCP-3 or a functional fragment thereof. The most preferred chemokine, in context of this invention is RANTES. Functional fragments of said chemokines are fragments which are capable of binding to or interacting with said chemokine receptor, preferably the human CCR5. Heteromibodies are known in the art and their production is, inter alia, described in WO 00/06605. Said heteromibody may be a multifunctional compound comprising at least one antibody and/or chemokine binding to or interacting with a chemokine receptor, preferably human CCR5, may (additionally) comprise a toxin as defined hereinbelow and/or a binding site for the CD3 antigen.

In a preferred embodiment, the antibody- or chemokine construct to be used in the present invention is a fusion (poly)peptide or a mosaic (poly)peptide. Said fusion

(poly)peptide may comprise merely the domains of the constructs as described herein above as well as (a) functional fragment(s) thereof. However, it is also envisaged that said fusion (poly)peptide comprises further domains and/or functional stretches. Therefore, said fusion (poly)peptide can comprise at least one further domain, said domain being linked by covalent or non-covalent bonds. The linkage as well as the construction of such constructs, can be based on genetic fusion according to the methods known in the art (Sambrook et al., loc. cit., Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)) or can be performed by, e.g., chemical cross-linking as described in, e.g., WO 94/04686. The additional domain present in the construct may preferably be linked by a flexible linker, advantageously a (poly)peptide linker, wherein said (poly)peptide linker preferably comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids of a length sufficient to span the distance between the C-terminal end of said further domain and the N-terminal end of the peptide, (poly)peptide or antibody or vice versa. Said linker may, inter alia, be a Glycine, a Serine and/or a Glycine/Serine linker. Additional linkers comprise oligomerization domains facilitate the combination of two or several autoantigens or fragments thereof in one functional molecule. Non-limiting examples of oligomerization domains comprise leucine zippers (like jun-fos, GCN4, E/EBP; Kostelny, J. Immunol. 148 (1992), 1547-1553; Zeng, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3673-3678, Williams, Genes Dev. 5 (1991), 1553-1563; Suter, "Phage Display of Peptides and Proteins", Chapter 11, (1996), Academic Press), antibody-derived oligomerization domains, like constant domains CH1 and CL (Mueller, FEBS Letters 422 (1998), 259-264) and/or tetramerization domains like GCN4-LI (Zerangue, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000), 3591-3595).

Furthermore, the antibody- or chemokine construct to be used in the present invention or as described hereinbelow may comprise at least one further domain, inter alia, domains which provide for purification means, like, e.g. histidine stretches. Said further domain(s) may be linked by covalent or non-covalent bonds.

The linkage can be based on genetic fusion according to the methods known in the art and described herein or can be performed by, e.g., chemical cross-linking as described in, e.g., WO 94/04686. The additional domain present in the construct as described and

disclosed in the invention may preferably be linked by a flexible linker, advantageously a polypeptide linker to one of the binding site domains wherein said polypeptide linker comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids of a length sufficient to span the distance between the C-terminal end of one of said domains and the N-terminal end of the other of said domains when said polypeptide assumes a conformation suitable for binding when disposed in aqueous solution. Preferably, said polypeptide linker is a polypeptide linker as described in the embodiments hereinbefore. The polypeptide of the invention may further comprise a cleavable linker or cleavage site for proteinases, such as enterokinase

It is also envisaged that said constructs disclosed for uses, compositions and methods of the present invention comprises (a) further domain(s) which may function as immunomodulators. Said immunomodulators comprise, but are not limited to cytokines, lymphokines, T cell co-stimulatory ligands, etc.

Adequate activation resulting in priming of naive T-cells is critical to primary immunoresponses and depends on two signals derived from professional APCs (antigen-presenting cells) like dendritic cells. The first signal is antigen-specific and normally mediated by stimulation of the clonotypic T-cell antigen receptor that is induced by processed antigen presented in the context of MHC class-I or MHC class-II molecules. However, this primary stimulus is insufficient to induce priming responses of naive T-cells, and the second signal is required which is provided by an interaction of specific T-cell surface molecules binding to co-stimulatory ligand molecules on antigen presenting cells, further supporting the proliferation of primed T-cells. The term "T-cell co-stimulatory ligand" therefore denotes in the light of the present invention molecules, which are able to support priming of naive T-cells in combination with the primary stimulus and include, but are not limited to, members of the B7 family of proteins, including B7-1 (CD80) and 137-2 (CD86).

The antibody- and/or chemokine construct defined herein above or described hereinbelow may comprise further receptor or ligand function(s), and may comprise immunomodulating effector molecule or a fragment thereof. An immuno-modulating effector

molecule positively and/or negatively influences the humoral and/or cellular immune system, particularly its cellular and/or non-cellular components, its functions, and/or its interactions with other physiological systems. Said immuno-modulating effector molecule may be selected from the group consisting of cytokines, chemokines, macrophage migration inhibitory factor (MIF; as described, inter alia, in Bernhagen (1998), *Mol Med* 76(3-4), 151-61 or Metz (1997), *Adv Immunol* 66, 197-223), T-cell receptors and soluble MHC molecules. Such immuno-modulating effector molecules are well known in the art and are described, inter alia, in Paul, "Fundamental immunology", Raven Press, New York (1989). In particular, known cytokines and chemokines are described in Meager, "The Molecular Biology of Cytokines" (1998), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England; (Bacon (1998), *Cytokine Growth Factor Rev* 9(2):167-73; Oppenheim (1997). *Clin Cancer Res* 12, 2682-6; Taub, (1994) *Ther. Immunol.* 1(4), 229-46 or Michiel, (1992). *Semin Cancer Biol* 3(1), 3-15).

Antibody and/or chemokine constructs as disclosed and described in the present invention and comprising (an) additional functional domain(s) may, inter alia, be multi-functional compounds, like heterominibodies, as described herein below.

The constructs to be used in the present invention or described herein may be constructs which comprise domains originating from one species, preferably from mammals, more preferably from human. However, chimeric and/or humanized constructs are also envisaged and within the scope of the present invention.

In a particular preferred embodiment, the composition of the invention comprises a construct to be used in the present invention or described herein is a cross-linked (poly)peptide construct. As mentioned herein, said cross-linking may be based on methods known in the art which comprise recombinant as well as biochemical methods.

In a yet further embodiment of the use of the present invention, the antibody construct or the chemokine construct to be used comprises at least one toxin. Said toxin may be *Pseudomonas* exotoxin A, diphtheria toxin and similar toxins. It is envisaged that truncated toxins are employed, like the PE38 or the PE40 of *Pseudomonas* toxin described in the appended examples.

Said toxin may be bound to said antibody or chemokine by means as described hereinabove. It is also envisaged that said toxin is bound to the antibody/chemokine by means of a short peptide linker. The linker preferably consists of a flexible and hydrophilic amino acid sequence, in particular of glycines and serines. Preferably said linker has a length of 1 to 20 amino acids.

Several fusion proteins with a truncated version of *Pseudomonas* exotoxin A have been designed so far. Most of them have been used to target and destroy malignant cells. This toxin becomes activated upon proteolytic cleavage. A truncated version of the toxin (PE38) may be employed for the constructs of the present invention, as the full-length protein binds with its first domain to the ubiquitous α 2-macroglobulin receptor and is therefore toxic to most eukaryotic cells. Yet, this problem may be overcome by replacing the first domain of *Pseudomonas* exotoxin A by a specific sequence in order to alter the binding specificity of the toxin.

Furthermore, the present invention relates to the use of a chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus wherein said chemokine construct comprises an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 24 or as encoded by the nucleotide sequence as depicted in SEQ ID NO: 23.

As mentioned hereinabove, and in a preferred embodiment, the antibody and/or chemokine constructs to be used within the scope of the present invention bind to or interact with the CD3 antigen. Preferably said CD3 antigen is on the surface of an effector cell, namely a T-cell, preferably a cytotoxic T-cell.

It is particularly preferred that an antibody construct be used wherein said construct comprises a binding site for CCR5 and a binding site for CD3 and that a chemokine construct be used, wherein said chemokine construct comprises RANTES and said toxin is a truncated *Pseudomonas* exotoxin A (PE38).

The present invention, therefore also relates to antibody constructs comprising a bind-

ing site for CCR5 and a binding site for CD3 as well as to chemokine constructs comprising RANTES and the truncated Pseudomonas exotoxin A (PE38).

The present invention also relates to a polynucleotide encoding an antibody-construct as defined hereinabove or a polynucleotide encoding a chemokine construct as defined herein, wherein said polynucleotide is a polynucleotide comprising the nucleic acid molecule in particular encoding the polypeptide as depicted in SEQ ID NO: 18 or SEQ ID NO: 24; a polynucleotide comprising the nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 23; or (c) a polynucleotide hybridizing under stringent conditions to the complementary strand of a polynucleotide of (a) or (b).

With respect to the polynucleotides/nucleotide sequences characterized under (c) above, the term "hybridizing" in this context is understood as referring to conventional hybridization conditions, preferably such as hybridization in 50%formamide/6xSSC/0.1%SDS and 100µg/ml ssDNA, in which temperatures for hybridization are above 37°C and temperatures for washing in 0.1xSSC/0.1%SDS are above 55°C. Most preferably, the term "hybridizing" refers to stringent hybridization conditions, for example such as described in Sambrook., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. It is envisaged that the polynucleotides characterized under (c) above are highly homologous to the polynucleotides as defined in (a) and/or (b) and comprise a homology of at least 95%, more preferably of at least 97%, and most preferably 99% with the polynucleotides of (a) and/or (b).

Polynucleotides as defined and characterized under (c), therefore may encode for polypeptides being highly homologous to the polypeptides as defined in (a) and (b). The person skilled in the art can easily test the capacity of such homologous polypeptides to bind to chemokine receptors, in particular to the human CCR5 receptor and/or to eliminate, deplete and/or destroy cells, for example, cells which are infected by a primate immunodeficiency virus, like HIV-1, or eliminate, deplete and/or destroy target cells involved in immunological disorders or disclosed herein. The person skilled in the art can easily adopt the *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* experiments of the appended examples to verify the binding and/or depletion properties of such constructs.

Furthermore, said polynucleotide/nucleic acid molecule may contain, for example, thio-ester bonds and/or nucleotide analogues. Said modifications may be useful for the stabilization of the nucleic acid molecule against endo- and/or exonucleases in the cell. Said nucleic acid molecules may be transcribed by an appropriate vector containing a chimeric gene which allows for the transcription of said nucleic acid molecule in the cell. The polynucleotide/nucleic acid molecule of the composition of the present invention may be a recombinantly produced chimeric nucleic acid molecule comprising any of the aforementioned nucleic acid molecules either alone or in combination

Said polynucleotide may be, e.g., DNA, cDNA, RNA or synthetically produced DNA or RNA or a recombinantly produced chimeric nucleic acid molecule comprising any of those polynucleotides either alone or in combination. Preferably said polynucleotide is part of a vector. Such vectors may comprise further genes such as marker genes which allow for the selection of said vector in a suitable host cell and under suitable conditions. Preferably, the polynucleotide of the invention is operatively linked to expression control sequences allowing expression in prokaryotic or eukaryotic cells. Expression of said polynucleotide comprises transcription of the polynucleotide into a translatable mRNA. Regulatory elements ensuring expression in eukaryotic cells, preferably mammalian cells, are well known to those skilled in the art. They usually comprise regulatory sequences ensuring initiation of transcription and optionally poly-A signals ensuring termination of transcription and stabilization of the transcript. Additional regulatory elements may include transcriptional as well as translational enhancers, and/or naturally-associated or heterologous promoter regions. Possible regulatory elements permitting expression in prokaryotic host cells comprise, e.g., the PL, lac, trp or tac promoter in *E. coli*, and examples for regulatory elements permitting expression in eukaryotic host cells are the AOX1 or GAL1 promoter in yeast or the CMV-, SV40-, RSV-promoter (Rous sarcoma virus), CMV-enhancer, SV40-enhancer or a globin intron in mammalian and other animal cells. Beside elements which are responsible for the initiation of transcription such regulatory elements may also comprise transcription termination signals, such as the SV40-poly-A site or the tk-poly-A site, downstream of the polynucleotide. Furthermore, depending on the expression system used leader sequences capable of

directing the polypeptide to a cellular compartment or secreting it into the medium may be added to the coding sequence of the polynucleotide of the invention and are well known in the art; see also, e.g., the appended examples. The leader sequence(s) is (are) assembled in appropriate phase with translation, initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein, or a portion thereof, into the periplasmic space or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, e.g., stabilization or simplified purification of expressed recombinant product; see supra. In this context, suitable expression vectors are known in the art such as Okayama-Berg cDNA expression vector pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogen), or pSPORT1 (GIBCO BRL).

Preferably, the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences, and as desired, the collection and purification of the polypeptide of the invention may follow; see, e.g., the appended examples.

As described above, the polynucleotide of the invention can be used alone or as part of a vector to express the antibody- and/or chemokine constructs to be used in the invention or in cells, for, e.g., the treatment of immunological disorders or in anti-viral therapy. The polynucleotides or vectors containing the DNA sequence(s) encoding any one of the above described polypeptides is introduced into the cells which in turn produce the polypeptide of interest. Therefore, said polynucleotides and vectors may be used for gene therapy. Gene therapy, which is based on introducing therapeutic genes into cells by *ex-vivo* or *in-vivo* techniques is one of the most important applications of gene transfer. Suitable vectors, methods or gene-delivery systems for *in-vitro* or *in-vivo* gene therapy are described in the literature and are known to the person skilled in the art; see, e.g., Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Verma, *Nature* 389 (1994), 239; Is-

ner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodera, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verma, *Gene Ther.* 5 (1998), 692-699; Nabel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811 (1997), 289-292; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-51; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, US 5,580,859; US 5,589,466; or Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640, and references cited therein. The polynucleotides and vectors of the invention may be designed for direct introduction or for introduction via liposomes, or viral vectors (e.g., adenoviral, retroviral) into the cell. Preferably, said cell is a germ line cell, embryonic cell, or egg cell or derived therefrom, most preferably said cell is a stem cell. An example for an embryonic stem cell can be, inter alia, a stem cell as described in, Nagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8424-8428.

In accordance with the above, the present invention relates to vectors, particularly plasmids, cosmids, viruses and bacteriophages used conventionally in genetic engineering that comprise a polynucleotide encoding a polypeptide of the invention. Preferably, said vector is an expression vector and/or a gene transfer or targeting vector. Expression vectors derived from viruses such as retroviruses, vaccinia virus, adeno-associated virus, herpes viruses, or bovine papilloma virus, may be used for delivery of the polynucleotides or vector of the invention into targeted cell populations. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors; see, for example, the techniques described in Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Alternatively, the polynucleotides and vectors of the invention can be reconstituted into liposomes for delivery to target cells. The vectors containing the polynucleotides of the invention can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts; see Sambrook, *supra*. Once expressed, the polypeptides of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like; see, Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). Substantially pure polypeptides of at

least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity are most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically (including extracorporeally) or in developing and performing assay procedures.

In a still further embodiment, the present invention relates to a cell containing the polynucleotide or vector described above or to a host transformed with the vector of the invention. Preferably, said host/cell is a eukaryotic, most preferably a mammalian cell if therapeutic uses of the polypeptide are envisaged. Of course, yeast and less preferred prokaryotic, e.g., bacterial cells may serve as well, in particular if the produced polypeptide is used as a diagnostic means.

The polynucleotide or vector of the invention which is present in the host cell may either be integrated into the genome of the host cell or it may be maintained extrachromosomally.

The term "prokaryotic" is meant to include all bacteria which can be transformed or transfected with a DNA or RNA molecules for the expression of a polypeptide of the invention. Prokaryotic hosts may include gram negative as well as gram positive bacteria such as, for example, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Bacillus subtilis*. The term "eukaryotic" is meant to include yeast, higher plant, insect and preferably mammalian cells. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. Polypeptides of the invention may also include an initial methionine amino acid residue. A polynucleotide coding for a polypeptide of the invention can be used to transform or transfect the host using any of the techniques commonly known to those of ordinary skill in the art. Especially preferred is the use of a plasmid or a virus containing the coding sequence of the polypeptide of the invention and genetically fused thereto an N-terminal FLAG-tag and/or C-terminal His-tag. Preferably, the length of said FLAG-tag is about 4 to 8 amino acids, most preferably 8 amino acids. Methods for preparing fused, operably linked genes and expressing them in, e.g., mammalian cells and bacteria are well-known in the art (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). The genetic constructs and methods described therein can be utilized for expression of

the polypeptide of the invention in eukaryotic or prokaryotic hosts. In general, expression vectors containing promoter sequences which facilitate the efficient transcription of the inserted polynucleotide are used in connection with the host. The expression vector typically contains an origin of replication, a promoter, and a terminator, as well as specific genes which are capable of providing phenotypic selection of the transformed cells. Furthermore, transgenic animals, preferably mammals, comprising cells of the invention may be used for the large scale production of the antibody- and/or chemokine construct of the invention. It is most preferred that said transgenic animal produces the antibody construct of the invention.

In a further embodiment, the present invention thus relates to a process for the preparation of a polypeptide described above comprising cultivating a (host) cell of the invention under conditions suitable for the expression of the antibody- and/or chemokine construct and isolating the polypeptide from the cell or the culture medium.

The transformed hosts can be grown in fermentors and cultured according to techniques known in the art to achieve optimal cell growth. The produced constructs of the invention can then be isolated from the growth medium, cellular lysates, or cellular membrane fractions. The isolation and purification of the, e.g., microbially expressed polypeptides of the invention may be by any conventional means such as, for example, preparative chromatographic separations and immunological separations such as those involving the use of monoclonal or polyclonal antibodies directed, e.g., against a tag of the polypeptide of the invention or as described in the appended examples.

Depending on the host cell, renaturation techniques may be required to attain proper conformation. If necessary, point substitutions seeking to optimize binding may be made in the DNA using conventional cassette mutagenesis or other protein engineering methodology such as is disclosed herein. Preparation of the polypeptides of the invention may also be dependent on knowledge of the amino acid sequence (or corresponding DNA or RNA sequence) of bioactive proteins such as enzymes, toxins, growth factors, cell differentiation factors, receptors, anti-metabolites, hormones or various cytokines or lymphokines. Such sequences are reported in the literature and available through computerized data banks.

The present invention further relates to an antibody construct or the chemokine construct encoded by the polynucleotide as described hereinabove or produced by the method described hereinabove.

Furthermore, the constructs of the invention can be used in the management of immunological disorders, in particular autoimmune diseases, allergic diseases, inflammatory diseases and AIDS (HIV-infection), as documented in the appended examples.

Additionally, the present invention provides for compositions comprising the polynucleotide, the vector, the host, the antibody construct and/or the chemokine construct of the invention.

The term "composition", in context of this invention, comprises at least one polynucleotide, vector, host, antibody construct and/or chemokine construct as described herein. Said composition, optionally, further comprises other molecules, either alone or in combination, like e.g. molecules which are capable of modulating and/or interfering with the immune system. The composition may be in solid, liquid or gaseous form and may be, inter alia, in a form of (a) powder(s), (a) tablet(s), (a) solution(s) or (an) aerosol(s). In a preferred embodiment, said composition comprises at least two, preferably three, more preferably four, most preferably compounds as described in the invention.

Preferably, said composition is a pharmaceutical composition further comprising, optionally, a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or excipient.

Examples of suitable pharmaceutical carriers are well known in the art and include phosphate buffered saline solutions, water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting agents, sterile solutions, etc. Compositions comprising such carriers can be formulated by well known conventional methods. These pharmaceutical compositions can be administered to the subject at a suitable dose. Administration of the suitable compositions may be effected by different ways, e.g., by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, topical or intradermal administration. Intravenous administration is particularly preferred. The dosage regimen will be determined

by the attending physician and clinical factors. As is well known in the medical arts, dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Generally, the regimen as a regular administration of the pharmaceutical composition should be in the range of 1 μg to 10 mg units per day. If the regimen is a continuous infusion, it should also be in the range of 1 μg to 10 mg units per kilogram of body weight per minute, respectively. However, a more preferred dosage for continuous infusion might be in the range of 0.01 μg to 10 mg units per kilogram of body weight per hour. Particularly preferred dosages are recited herein below. Progress can be monitored by periodic assessment. Dosages will vary but a preferred dosage for intravenous administration of DNA is from approximately 10^6 to 10^{12} copies of the DNA molecule. The compositions of the invention may be administered locally or systematically. Administration will generally be parenterally, e.g., intravenously; yet external administration is also envisaged. DNA may also be administered directed to the target site, e.g., by biolistic delivery to an internal or external target site or by catheter to a site in an artery. Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishes, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may also be present such as, for example, antimicrobials, anti-oxidants, chelating agents, and inert gases and the like. In addition, the pharmaceutical composition of the present invention might comprise proteinaceous carriers, like, e.g., serum albumin or immunoglobuline, preferably of human origin. Furthermore, it is envisaged that the pharmaceutical composition of the invention might comprise further biologically active agents, depending on the intended use of the pharmaceutical composition. Such agents might be drugs acting on the immunological system, drugs used in anti-viral treatment, in particular in HIV-treatment (for example,

HAART) and AIDS management and/or anti-inflammatory drugs. It is, for example, envisaged that patients are treated as early as possible with HAART until viral load is below detection level for several weeks to months. Early treatment of infected patients with HAART prevents the transition of viral strains from usage of CCR5 to other chemokine receptors, like CXCR4 (Connor (1997) J. Exp. Med. 185, 621-628). Constructs as disclosed in the present invention, for example, the CCR5xCD3 construct is administered in addition to HAART to eliminate latently infected cells as well as cells that are prone to reinfection by HIV-1. The depletion of CCR5⁺ cells is repeated 1 to 10 times. Doses of CCR5xCD3 are in the range of 0.5 μ g/m² to 10mg/m², preferably 10 μ g/m² to 100 μ g/m². Doses can be administered intravenously, subcutaneously and/or into the cerebro-spinal fluid. After several treatment cycles with the bispecific antibody HAART is discontinued and viral load is closely monitored. If viral load increases above detection level, a new cycle of HAART and the bispecific antibody is initiated as described above.

It is envisaged by the present invention that the various polynucleotides and vectors of the invention are administered either alone or in any combination using standard vectors and/or gene delivery systems, and optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Subsequent to administration, said polynucleotides or vectors may be stably integrated into the genome of the subject. Preferably said subject is a human.

On the other hand, viral vectors may be used which are specific for certain cells or tissues and persist in said cells. Suitable pharmaceutical carriers and excipients are well known in the art. The pharmaceutical compositions prepared according to the invention can be used for the prevention or treatment or delaying of different kinds of immunological diseases, which may be related to inflammation, in particular inflammatory bowel diseases, inflammatory renal diseases, inflammatory joint diseases like (chronic) arthritis. Furthermore, the pharmaceutical composition of the present invention may be employed to eliminate cells which are latently infected with a virus, preferably a primate immunodeficiency virus, more preferably with HIV(-1).

Furthermore, it is possible to use a pharmaceutical composition of the invention which comprises polynucleotide or vector of the invention in gene therapy. Suitable gene delivery systems may include liposomes, receptor-mediated delivery systems, naked DNA, and viral vectors such as herpes viruses, retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses, among others. Delivery of nucleic acids to a specific site in the body for gene therapy may also be accomplished using a biolistic delivery system, such as that described by Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729). Further methods for the delivery of nucleic acids comprise particle-mediated gene transfer as, e.g., described in Verma, Gene Ther. 15 (1998), 692-699.

It is to be understood that the introduced polynucleotides and vectors express the gene product after introduction into said cell and preferably remain in this status during the lifetime of said cell. For example, cell lines which stably express the polynucleotide under the control of appropriate regulatory sequences may be engineered according to methods well known to those skilled in the art. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with the polynucleotide of the invention and a selectable marker, either on the same or separate plasmids. Following the introduction of foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows for the selection of cells having stably integrated the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines.

A number of selection systems may be used, including but not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, Cell 11 (1977), 223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962), 2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, Cell 22 (1980), 817) in tk, hgprt or aprt cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527), gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1); hygromycin (Santerre,

Gene 30 (1984), 147); or puromycin (pat, puromycin N-acetyl transferase). Additional selectable genes have been described, for example, *trpB*, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); and ODC (ornithine decarboxylase) which confers resistance to the ornithine decarboxylase inhibitor, 2-(difluoromethyl)-DL-ornithine, DFMO (McCologue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

In a further embodiment, the present invention relates to a composition, preferably a pharmaceutical composition, as described hereinabove, which further comprises a medicament for the treatment of an immunological disorder or a medicament for anti-HIV treatment.

Said anti-HIV treatment may comprise HAART. HAART therapy consists of a cocktail of three classes anti-viral drugs. The classes are nucleosidal reverse transcriptase inhibitors (NRTI), non-nucleosidal reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) and protease inhibitors (PI). Usually 2 to 4 drugs from preferentially more than one class are combined to reduce viral load to almost non-detectable levels. Products, dosing schedules and common side effects are given in appended Tables I-III.

Said treatment of an immunological disorder may comprise anti-inflammatory agents and immunosuppressive agents. Anti-inflammatory agents may be selected from the group consisting of azathioprine, cyclophosphamide, glucocorticoids like prednisone and corticosteroids. Immunosuppressive agents may comprise cyclosporin A, Tacrolimus (FK506), Sirolimus (Rapamycin). Protein drugs may comprise calcineurin, beta-interferon, anti-TNF alpha monoclonal antibodies (remicade). Dosing and use of anti-inflammatory agents and immunosuppressive agents is described, inter alia, in Fauci et al., sic. Further treatment options are known to the skilled artisan and, inter alia, described hereinabove.

In a particularly preferred embodiment, the present invention relates to a method for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for the elimination cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus comprising administering to a subject in need of such a treatment, prevention and/or alleviation an

effective amount of the compounds and/or compositions, preferably the pharmaceutical compositions of the present invention.

The constructs described herein are particularly useful in specifically destroying chemokine receptor positive cells. For example, a bispecific antibody, binding simultaneously to CCR5 on target cells and to CD3 on T-cells, redirects cytotoxic T-cells to the CCR5 positive target cells. As shown in the appended examples the antibody construct specifically depletes CCR5 positive T-cells and monocytes, but is inactive against cells that do not express CCR5 such as CCR5 deficient $\Delta 32/\Delta 32$ PBMC. Furthermore, in vitro/ex vivo experiments the bispecific antibody construct eliminated more than 95% of CCR5 positive monocytes and T-cells from the synovial fluid of patients with arthritis.

Other constructs, like chemokine constructs, for example, a fusion protein of the chemokine RANTES and a truncated version of the Pseudomonas exotoxin A (PE38) are able to bind to CCR5 and to downmodulate the receptor from the cell surface as exemplified in the appended examples. Within 48 h RANTES-PE38 completely destroyed CCR5 positive CHO cells at a concentration of 2 nM. No cytotoxic effect was detectable against CCR5 negative CHO cells.

Based on the predominance of CCR5 positive T-cells and monocytes in the infiltrate of chronically inflamed tissue, the specific depletion of CCR5 positive cells represents a new concept in the treatment of immunological disorders.

As described hereinabove, due to the fact that specific chemokine receptors are present on HIV-infected cells, namely CCR5, the compounds and compositions of the invention are particularly useful for the depletion/elimination of cells latently infected with primate immunodeficiency virus.

The present invention also relates to the use of the polynucleotide, the vector, the host, the antibody construct and/or the chemokine construct of the present invention for the preparation of a pharmaceutical composition for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for the preparation of a pharmaceutical composition for eliminating latently infected cells, wherein said cells are infected with a primate immunodeficiency virus, like a human immunodeficiency virus, in particular HIV-1.

Said immunological disorders may be autoimmune diseases, skin diseases, allergic diseases, inflammatory diseases, diabetes and transplant rejections, wherein said autoimmune disease is selected from the group consisting of multiple sclerosis, type I diabetes, rheumatoid arthritis. Said skin diseases, may comprise psoriatic lesions, psoriasis, atrophic dermatitis and the like. Inflammatory disease are mentioned hereinabove is selected from the group consisting of inflammatory joint diseases, inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases. In particular, said inflammatory bowel disease may comprise Morbus Crohn, sarcoidosis, systemic sclerosis, collagenosis, myositis, neuritis. Inflammatory renal diseases may comprise nephritis, glomerulonephritis, lupus nephritis, or IgA nephropathy.

In a variety of chronic inflammatory diseases an impressive accumulation of CCR5 positive T-cells and macrophages is found at the site of inflammation. An accumulation of CCR5⁺ cells has been demonstrated in several types of inflammatory diseases, like arthritis, inflammatory renal diseases, transplant rejection, auto-immune diseases like multiple sclerosis and inflammatory bowel diseases. In contrast, in the peripheral blood of these patients only a minority of T-cells and monocytes express CCR5. Therefore, CCR5 appears to be an excellent marker to identify leukocytes that are involved in chronic inflammation. The occurrence of a 32 bp deletion in the CCR5 gene which prevents expression of CCR5, allows to study the pathophysiological role of CCR5 in chronic inflammatory diseases. In patients with rheumatoid arthritis the frequency of CCR5 deficient ($\Delta 32/\Delta 32$) individuals is significantly reduced. Moreover, the mean survival of the kidney transplants is significantly longer in CCR5- $\Delta 32/\Delta 32$ patients. These results make CCR5 a target for therapeutic intervention. Furthermore, the prevalence of CCR5 positive leukocytes in the diseased tissue in contrast to the rare expression of CCR5 on the peripheral blood leukocytes means that a specific elimination of CCR5 positive leukocytes may be therapeutically useful by reducing the number of infiltrating cells in chronic inflammation, transplant rejection and autoimmune disease, like multiple sclerosis without significantly depleting peripheral blood leukocytes. Eliminating CCR5 positive leukocytes from the inflammatory infiltrate will be of greater therapeutic benefit than simply blocking chemokine receptors of these cells, as they have already infil-

trated the tissue.

As documented in the appended examples the antibody and/or chemokine constructs are particularly useful in the treatment, prevention and/or alleviation of inflammatory joint diseases. Therefore, the compositions of the present invention are particularly useful for the treatment of inflammatory joint diseases, like arthritis, in particular chronic arthritis.

The present invention furthermore, provides for medical methods and uses, wherein the composition, preferably the pharmaceutical composition, is to be administered in combination with antiviral agents and/or in combination with drugs to be employed in AIDS management.

As mentioned hereinabove, the main problem in AIDS management in the occurrence of latently HIV-infected cells. The current treatment options are based on anti-viral agents interfering with two enzymes of the HIV-1 virus, its protease and reverse transcriptase. The protease is essential to cleave the inactive viral pre-proteins to form the active products, while the reverse transcriptase is required to generate a DNA intermediate of the viral RNA genome. The DNA intermediate can then integrate into the host genome and remain there in a silent – latent form. The most efficient treatment option consists of highly active antiretroviral therapy (HAART) – a treatment regimen consisting of a combination of at least three anti-retroviral drugs and usually including at least one drug of the protease inhibitor class. The advent of highly active antiretroviral therapy (HAART) has had a significant impact on HIV-1-infected individuals, lowering circulating virus to undetectable levels (Oxenius (2000) Proc. Natl Acad. Sci. 97, 3383-3387; Perelson (1997) Nature (London) 387, 188-191; Hammer (1997) N. Engl. J. Med. 337, 725-733; Gulick (1997) N. Engl. J. Med. 337, 734-739). Despite this, latently infected cells can remain in these individuals for significant periods of time (Chun (1997) Nature (London) 387, 183-188; Chun (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8869-8873; Zhang (1999) N. Engl. J. Med. 340, 1605-1613); if HAART is withdrawn, these cells can produce virus (Harrigan (1999) AIDS 13, F59-F62). A pool of latently infected cells is generated early during primary HIV-1 infection (Chun (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95,

8869-8873). Considering the postulated long half-life of latent viral reservoirs (Zhang (1999) *N. Engl. J. Med.* 340, 1605-1613, Finzi (1999) *Nat. Med.* 5, 512-517) and the side effects and cost of chronic HAART (Flexner (1998) *N. Engl. J. Med.* 338, 1281-1292; Carr (1998) *Lancet* 351, 1881-1883), it is important to develop new strategies to eliminate the latent reservoir. While HAART treatment has been highly successful in suppressing plasma viremia in HIV-infected individuals, there are still persistent reservoirs of HIV including in latently infected CD4⁺ T-cells and other cells in the brain, gut associated lymphoid tissue and the genital tract (Chun (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10958-10961). Re-emergence of plasma viremia after discontinuation of HAART is due to those pre-existing viral reservoirs and HAART cannot eliminate those reservoirs (Chun (2000) *Nature Med.* 6, 757-761). Therefore, even HAART merely suppresses viral replication and reduces the viral load but does not prevent the occurrence of latent infected cells or eliminates such cells. Transmission of HIV-1 depends on the presence of CCR5, as individuals with a homozygous $\Delta 32$ deletion of the CCR5 allele are highly resistant against infection with HIV-1. Although highly active antiretroviral therapy can efficiently suppress replication of HIV-1, complete eradication of HIV has not been achieved to date. The main obstacle appears to be the inactivity of antiretroviral therapy against latently infected cells that can survive for several years and function as endogenous source for HIV-1. Many of these cells fail to express viral proteins and can evade the immune response. However, the majority of latently infected cells may still express CCR5, as this receptor is necessary for their initial infection. The compounds of the present invention are particularly useful in the depletion of CCR5⁺ cells and should significantly reduce the number of latently infected HIV⁺-cells. Other strategies to eliminate HIV-1 infected cells that depend on a specific recognition of viral proteins, e.g., surface expressed gp120, would be less effective against latently infected cells, as the virus is dormant in these cells.

Therefore, the compositions of the present invention are particularly useful in co-therapy approaches, which lead to a depletion of HIV-infected cells, preferably of CCR5 positive cells. It is preferred that the composition of the present invention is employed in combination with HAART. Therefore the construct of the invention may be used in HIV-therapy in combination with HAART as shown in the appended examples. Products,

dosing schedules and common side effects of HAART are known and illustrated, inter alia, in Tables I, II and III.

Said combination may comprise the co-administration as well as an administration before or after treatment with other anti-viral, preferably anti-retroviral, most preferably anti-HIV medication.

The present invention also provides for a kit comprising the polynucleotide, the vector, the host, the antibody construct and/or the chemokine construct of the present invention.

Advantageously, the kit of the present invention further comprises, optionally (a) storage solution(s) and/or remaining reagents or materials required for the conduct of scientific or therapeutic methods. Said kit may, inter alia, comprise drugs and/or medications employed in the treatment of immunological disorders as defined herein and/or in AIDS management. Furthermore, parts of the kit of the invention can be packaged individually in vials or bottles or in combination in containers or multicontainer units.

The Figures show:

Figure 1.

Expression of various chemokine receptors (indicated on the x-axis) on T cells (first and second panel), monocytes (third panel) and neutrophils (fourth panel) in the peripheral blood (white columns) and the synovial fluid (gray columns) of patients with arthritis other than gout. Each dot represents one patient and mean values are given as bars. Expression of CXCR1 and CXCR2 on neutrophils is given as fluorescence intensity on the y-axis, while in all other cases the percentage of receptor positive cells is depicted.

Figure 2.

FACS dot plots showing the expression of CCR5, CCR2 and CXCR4 on leukocytes in the peripheral blood (left) and synovial fluid (right) of one patient with rheumatoid arthritis. The cut-offs were set according to the isotype controls and are shown as vertical lines. In the synovial fluid the majority of T-cells and monocytes show a high level of

40

CCR5 expression, while in the peripheral blood only a minority of these cells express low levels of CCR5.

Figure 3.

Scheme of the bispecific single-chain antibody. The α CCR5 single-chain fragment (CCR5 VL / CCR5 VH) derived from the hybridoma MC-1 is fused to the N-terminus of a single-chain fragment directed against CD3 (CD3 VH / CD3 VL). Binding of the bispecific antibody to CD3+ T cells and CCR5 positive target cells results in crosslinkage of CD3, activation of effector T cells and lysis of CCR5 positive target cells.

Figure 4.

SDS page of the purified bispecific single-chain antibody α CCR5- α CD3. A single band of approx. 60 kD is visible under reducing (left) and non-reducing (right) conditions. No degradation or proteolysis of the bispecific antibody is detectable.

Figure 5.

Scheme of the chemokine-toxin RANTES-PE38. The chemokine RANTES is fused to the N-terminus of a truncated version of the Pseudomonas exotoxin A (PE38). While the truncated toxin is unable to bind to eukaryotic cells, the fusion protein binds with the RANTES moiety to CCR5 and becomes internalized into the cell. Thereby the toxin inhibits protein synthesis and induces cell death.

Figure 6.

SDS-PAGE (left) and Westernblot (right) of the purified protein RANTES-PE38. A distinct band with the expected size of approx. 46 kD is visible in the coomassie stained SDS-PAGE and Westernblot.

Figure 7.

Binding of the α CCR5- α CD3 bispecific antibody to CD3 on CCR5 deficient lymphocytes. Costaining with CD4 and CD8 demonstrated that the bispecific antibody binds to the subpopulation of CD4+ / CD8+ T cells. Multicolor analysis showed that no binding to other cell populations occurred.

Figure 8.

Binding of the α CCR5- α CD3 bispecific antibody to CCR5 on transfected CHO cells. CHO cells transfected with CCR5 are shown in black, while CXCR4 positive CHO cells served as negative control and are shown in white.

Figure 9.

Binding of the α CCR5- α CD3 bispecific antibody to CCR5 on cultured monocytes. Monocytes from a CCR5 positive donor are shown in black, while monocytes from a CCR5 deficient (Δ 32/ Δ 32) donor served as negative control and are shown in white.

Figure 10.

CCR5 specific monoclonal antibodies were compared in their ability to induce downmodulation of CCR5 as analyzed by FACS. MAb MC-1 (squares), the parental antibody of the α CCR5- α CD3 bispecific antibody, showed significant internalization, while MC-4 (triangle) showed no induction of CCR5 internalization. CHO-CCR5 cells were incubated with various concentrations for 30 min at 37°C.

Figure 11.

Downmodulation of CCR5 from the surface of PBMC with RANTES-PE38 (open symbols) and RANTES (closed symbols). Surface expression of CCR5 was determined on lymphocytes (squares) and monocytes (circles) and is given as % of the medium control. The fusion protein RANTES-PE38 is able to downmodulate CCR5 from the cell surface with a somewhat lower efficiency than unmodified RANTES.

Figure 12.

Depletion of CCR5 positive monocytes by the bispecific antibody. CCR5 deficient PBMC (Δ 32/ Δ 32) or wildtype PBMC (WT-PBMC) were cultured overnight and incubated with the bispecific antibody (100 ng/ml) or medium as control for 20 h. Remaining monocytes (Mo) and lymphocytes (Ly) were identified by their light scatter properties in FACS. The CCR5 positive wildtype monocytes were completely depleted by the bispecific antibody, while the CCR5 deficient monocytes survived.

Figure 13.

Depletion of CCR5 positive monocytes by the bispecific antibody. Dose response showing depletion of cultured monocytes with various concentrations of the α CCR5- α CD3 bispecific antibody. More than 90 % of monocytes were depleted at a concentration of 33 ng/ml.

Figure 14.

The bispecific α CCR5- α CD3 antibody depletes lymphocytes and monocytes from the synovial fluid of a patient with chronic arthritis. Freshly draw synovial fluid was incubated with various concentrations of the bispecific antibody or medium as control for 20 h and analyzed by FACS. More than 95 % of both cell types were depleted at a concentration of 31 ng/ml.

Figure 15.

The bispecific α CCR5- α CD3 antibody depletes lymphocytes and monocytes from the synovial fluid of a patient with chronic arthritis. Freshly draw synovial fluid was incubated with the bispecific antibody (500 ng/ml) or medium as control for 20 h and analyzed by FACS (forward and sideward light scatter analysis). The bispecific antibody completely depleted the CCR5 positive monocytes and lymphocytes, while the CCR5 negative granulocytes (PMN) survived. Consistent with our previous data all monocytes and lymphocytes in this synovial fluid expressed CCR5, while no expression of CCR5 was found on granulocytes (PMN).

Figure 16.

The efficacy of the α CCR5- α CD3 bispecific single-chain antibody in depleting CCR5 positive monocytes was compared with the efficacy of two unmodified monoclonal antibodies MC-1 and MC-5. PBMC from two different donors (F and N) were cultured overnight and then incubated for 24 h with medium in the presence or absence of antibody construct and antibody. Concentrations were as indicated. The cells were completely recovered and analyzed by FACS to quantify surviving monocytes and lymphocytes. Shown are the results of two experiments per PBMC donor. Surprisingly only the

bispecific antibody was able to considerably deplete CCR5 positive monocytes, while the unmodified monoclonal antibodies were largely ineffective.

Figure 17.

Example of the forward and sideward light scatter analysis of a representative experiment as shown in Fig. 16, indicating that only the α CCR5- α CD3 bispecific single-chain antibody was capable of depleting the monocytes in the left lower quadrants. For comparison of the localization of different cell types also see Figure 12 left panel.

Figure 18.

Destruction of CCR5 positive CHO cells with the chemokine-toxin RANTES-PE38. CCR5 positive CHO cells and CXCR4 positive CHO cells were incubated for 40 h with the chemokine-toxin (10 nM) and analyzed by FACS. Dead cells appear in the left upper region of the forward and sideward light scatter plot. RANTES-PE38 completely destroyed the CCR5 positive CHO cells while it had no effect on the CXCR4 positive CHO cells.

Figure 19.

Examples of antibody and / or chemokine constructs binding to chemokine receptor (CCR) expressing cells that are combined by peptide linkage or by multimerization domains: (A) shows various examples of antibody and chemokine constructs that interact with an effector cell by binding to an effector cell surface antigen, (B) shows examples of antibody and chemokine constructs that are linked to a toxin, (C) shows examples of antibody and chemokine constructs, that contain an antibody binding site for a toxin.

Figure 20.

4×10^5 CCR5+CHO cells were incubated with 19,5 ng/ml scFV CCR5xCD3 for 30 minutes at 4°C. After washing cells were incubated for 45 minutes at 4°C with 20 μ g/ml anti-His-Tag monoclonal antibody. Binding of scFV CCR5xCD3 was detected with a monoclonal goat anti-mouse IgG F(ab')₂-PE conjugated antibody and analysed in a flow cytometer using the CellQuest software. Nonlinear regression analysis was performed with GraphPad Prism.

Figure 21.

The cytotoxic activity of scFv CCR5xCD3 was tested in a FACS based assay with CCR5+CHO as target and CD3+ T-lymphocytes as effector cells. CD3+ T-cells were isolated from peripheral blood. CCR5+CHO cells were labeled with 12 μ M PKH26. Effector:target cells in a ratio of 5:1 were incubated with dilutions of scFv CCR5xCD3 ranging from 320 ng/ml to 0.3 pg/ml for 16 hours at 37°C and 5% CO₂. After staining with 1 μ g/ml propidium iodine (PI), cells were analyzed by flow cytometry.

In order to verify the specificity of scFv CCR5xCD3 mediated lysis, stably CXCR4 transfected CHO cells were used as negative control target cells. The cytotoxicity assay was performed under identical conditions as described for CCR5+CHO cells.

Specific lysis of CCR5+CHO cells was calculated using the CellQuest software (Becton Dickinson) and nonlinear regression analysis was performed with GraphPad Prism. The sigmoidal dose response curve revealed an EC₅₀ value of 912 pg/ml. No cytotoxic effect of scFv CCR5xCD3 was observed using CXCR4+ CHO cells as target cells.

Figure 22.

The cytotoxic activity of scFv CCR5xCD3 on CCR5-positive cells was also tested using the CD3 positive T-cell line CB15 as effector cells in a FACS based assay. CCR5+CHO target cells labeled with 10 μ M PKH26 were used in a effector:target ratio of 10:1 and incubated with 100 μ l of scFv CCR5xCD3 in different dilutions (40 μ g/ml to 0.15 ng/ml) for 6 hours at 37°C at 5% CO₂. Cells were stained with 1 μ g/ml propidium iodine (PI) and analyzed in duplicate in a flow cytometer.

Specific lysis of CCR5+CHO cells was calculated using the CellQuest software (Becton Dickinson) and nonlinear regression analysis was performed with GraphPad Prism. The sigmoidal dose response curve revealed an EC₅₀ value of 12.8 ng/ml.

Figure 23.

Reactivity of MC-1 with A) human PBMC and B) rhesus PBMC. PBMC (solid line), PBMC with PE conjugated goat anti-mouse antibody (dotted line) and PBMC with MC-1 and PE conjugated goat anti-mouse antibody (solid bold line). Binding of MC-1 to human PBMC (A), but not to rhesus PBMC (B) is indicated by the M1 marker line.

The invention will now be described by reference to the following biological examples which are merely illustrative and are not to be construed as a limitation of scope of the present invention.

Example 1: Cell lines, PBMC preparation, synovial fluid

1.1 Generation of a CHO cell line expressing human CCR5

The cDNA sequence of CCR5 was amplified from genomic DNA of human PBMC by PCR with Pfu-polymerase (Stratagene), oligonucleotide primers were:

SEQ ID NO. 1: 5' GGA ACA AGA TGG ATT ATC AAG TGT C 3'

SEQ ID NO. 2: 5' CTG TGT ATG AAA ACT AAG CCA TGT G 3'

The amplified fragment was gel purified, ligated into the PCR-Script Amp Sk(+) script vector (Stratagene) and sequenced. After subcloning into the PEF-DHFR vector, DHFR-deficient CHO cells were transfected by electroporation and selected for stable expression in nucleoside free MEM medium with 10% dialyzed FCS as described. The CHO/CCR5 transfected cells were shown to be homogeneous by FACS-analysis.

1.2 PBMC purification

PBMC were isolated from buffy coats or full blood of healthy donors by ficoll density gradient centrifugation. Where indicated PBMC were used from donors with a homozygous 32 basepair deletion in the CCR5 allele ($\Delta 32/\Delta 32$) preventing surface expression of CCR5. Specifically, buffy coats were diluted 1:2 in 0.9% NaCl, and 35 ml were layered onto 15 ml of Ficoll Paque and centrifuged for 25 min at 400 g. The white interphase was harvested and thrombocytes depleted by three subsequent washing and centrifugation steps at 100 g for 6 min in RPMI with 10% FCS. Freshly isolated monocytes expressed a very low level of CCR5, but expression was strongly induced after culture of PBMC in RPMI with 10% FCS for 24 to 48 h at 37°C. The amount of FCS did not influence this induction. The expression of CCR5 on lymphocytes was not altered during culture.

1.3 Synovial fluid

Synovial fluid of patients with arthritis was obtained from diagnostic or therapeutic arthrocentesis and used for the experiments without further preparation. Informed consent was obtained from all patients. Synovial fluid and blood samples were simultaneously obtained from 23 patients who presented with gonarthritis for diagnostic or therapeutic arthrocentesis. Diagnoses included rheumatoid arthritis (7), reactive arthritis (3), undifferentiated gonarthritis (4), psoriatic arthritis (3), osteoarthritis (2), ankylosing spondylitis (1) and gout (3) according to ACR criteria, where applicable. Written informed consent was obtained from all patients. Synovial fluid was analyzed by light microscopy. Crystals were identified by polarized light microscopy. Student's t-test and paired t-test was applied for statistical analysis.

1.4 Analysis of chemokine receptor expression in whole blood samples and synovial fluid

Immediately after arthrocentesis SF (synovial fluid) leukocytes were isolated by two washing steps with 5% PBS in NaCl 0.9%. Synovial fluid cells and whole blood (containing 1 mM EDTA) were incubated on ice with monoclonal antibodies against chemokine receptors and the appropriate isotype controls at a concentration of 10 μ g/ml. The antibodies were for CCR5: MC-1 (Mack (1998) J. Exp. Med. 187, 1215-1224), for CCR2: DOC-3, which specifically binds to CCR2 (9), for CCR1: Clone 53504 (R&D-Systems), for CXCR1: 5A12 (Pharmingen), for CXCR2: 6C6 (Pharmingen), and for CXCR4 12G5 (Pharmingen), IgG1-, IgG2a- and IgG2b-isotype controls (Sigma). After two washing steps cells were incubated for 30 min on ice with a PE-conjugated rabbit-anti-mouse F(ab)₂ fragment (R439, DAKO). Cells were washed twice and incubated with 10% mouse serum followed by a combination of CD4-FITC, CD8-PECy5 and CD14-APC (Immunotech). After lysis of erythrocytes, cells were immediately analyzed by flow cytometry (Becton-Dickinson). Calculations were performed with Cell Quest analysis software. Helper T cells, cytotoxic T cells, monocytes and neutrophils were identified by their light scatter properties and the expression or absence of CD4, CD8 and CD14. Chemokine receptor expression was calculated after defining a cutoff according to the isotype control.

In both acute and chronic joint effusions we found a consistently increased percentage of CD4+ and CD8+ T cells that expressed the chemokine receptor CCR5 compared to the peripheral blood. These data are in good agreement with previous reports (Mack (1999) *Arthritis Rheum.* 42, 981-988; Qin (1998) *J. Clin. Invest.* 101, 746-754).

Chemokine receptor expression on T cells in non-crystal induced arthritis: Approximately 88% of CD4+ T cells and 93% of the CD8+ T cells from the synovial fluid stained positive for the chemokine receptor CCR5. Similarly, a major proportion of CD8+ and CD4+ T cells in the SF expressed CCR2 (66% and 48%) (Fig. 1). In contrast, in the peripheral blood only a minority of T cells expressed the chemokine receptors CCR5 or CCR2. The enrichment in the synovial fluid was most pronounced for the CCR5+ helper-T cells (blood: SF ratio = 1:4). The majority of T lymphocytes stained positive for CXCR4 in both compartments. CXCR1, CXCR2 and CCR1 were only expressed by a minor and variable percentage of T cells (Fig. 1). A typical example of one patient is shown in Fig. 2, showing the expression of CCR5, CCR2 and CXCR4 on leukocytes in the peripheral blood and synovial fluid.

Chemokine receptor expression on monocytes in non-crystal induced arthritis: Consistent with previous data, the majority of monocytes in the SF expressed CCR5. In addition, a reduced expression of CXCR1, CXCR2, CXCR4 and CCR1 is here reported on monocytes in the synovial fluid compared to the peripheral blood (Fig. 1, 2). Not only was a lower frequency of receptor positive cells found, but also a lower density of chemokine receptors on the cell surface (data not shown). No differences could be detected in relation to the underlying diagnoses, duration of joint effusion or pretreatment. CCR2 was equally expressed by all monocytes in both compartments (Fig.'s 1, 2).

Chemokine receptor expression on neutrophils in non-crystal induced arthritis: Acute arthritis is characterized by a rapid influx of neutrophils into the inflamed joint. Therefore, the chemokine receptor expression on neutrophils from inflamed joint effusions was analyzed. For the first time a high expression of CXCR4 is described on a large fraction of neutrophils (60%) from the synovial fluid of patients with acute and chronic arthritis, while a much lower expression was found in the peripheral blood (24 %) (Fig. 1, 2). In arthritis other than gout CXCR1 and CXCR2 was reduced on neutrophils from the synovial fluid by approximately 50% compared to the peripheral blood. CCR1 was expressed only by a minority of neutrophils in both compartments.

1.5 Determination of CCR5 genotype

Genomic DNA was prepared from frozen blood samples by affinity chromatography (Roche Diagnostics). Subsequently a fragment of the CCR5 gene containing the potential 32 basepair deletion was amplified by a 40 cycle PCR with Taq polymerase. The primers were

SEQ ID NO. 3: 5' TTT ACC AGA TCT CAA AAA GAA G 3'

SEQ ID NO. 4: 5' GGA GAA GGA CAA TGT TGT AGG 3'

Differences in the length of the PCR fragments (274 or 242 bp) allowed to identify CCR5-wildtype and CCR5- Δ 32 alleles.

Example 2: Construction of a bispecific antibody

2.1 Generation of monoclonal antibodies against human CCR5

To generate monoclonal antibodies against human CCR5, five BALB/c mice were immunized intraperitoneally (i.p.) at four week intervals, first with 1×10^7 PBMC cultured for 10 days in IL-2 (100 U/ml) and six subsequent i.p. injections of 1×10^7 CHO cells expressing high levels of CCR5. For this purpose, CCR5 transfected CHO cells were grown in the presence of 20 nM methotrexate to amplify expression of CCR5 and one clone expressing high levels of CCR5 was chosen. Four days after the last i.p. injection of CHO/CCR5 cells, the spleens were removed and the cells fused with the P3X63-Ag8 cell line. Supernatants from approximately 6000 hybridomas were screened per fusion by flow cytometry on stable CHO/CCR5 cells and monoclonal antibodies against CCR5 (MC-1, MC-4, MC-5) were detected after the third fusion. The specificity of MC-1 (IgG1), MC-4, MC-5 were tested on CHO cells stably transfected with CCR1-3 and CXCR4. In all cases no binding was detected. In addition the antibodies did not react with freshly isolated PBMCs and cultured PBMCs from a donor homozygous for the Δ 32 deletion in the CCR5 gene.

2.2 Cloning of the variable domains of MAb MC-1 against CCR5

The light (VL) and heavy (VH) variable domains from the α CCR5 hybridoma MC-1 were cloned using PCR amplification (Orlandi (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833).

Reverse transcription was carried out with random hexamer nucleotides and Super-Script reverse transcriptase (Gibco). The variable domains were amplified by PCR with Pfu-polymerase, subcloned into the vector PCR-script Amp SK+ (Stratagene) and sequenced.

For PCR amplification of VL(1) the following primers were used:

SEQ ID NO. 5: 5' GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCA 3'

SEQ ID NO. 6: 5' GTTTTATTTTC CAGCTTGGTC CC 3'

For PCR amplification of VH(1) the following primers were used:

SEQ ID NO. 7: 5' ACCATGGGAT GGAGCTGTGT CATGCTCTT

SEQ ID NO. 8: 5' TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAG

The nucleotide sequence of VL(1) obtained by RT PCR is SEQ ID NO. 9:

```

1 GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCAGCCTCC CTATCTGCAI CTGTGGGAGA AACTGTCAAC
61 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTTAC AGTTATTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG
121 GGAARAATCIC CTCAACTCCT GGTCTATAAT GCARAAACCT TACAGAAAGG TGTGCCATCA
181 AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTGA AGATCACACG CCTGCAGCCT
241 GAAGATTTTG GGAATTATTT CTGTCAACAT CATTATGATA CTCTCGGAC GTTCGGTGA
301 GGGACCAAGC TGGAAATAAA AC

```

The corresponding translated protein sequence to VL(1) is SEQ ID NO. 10:

```

1 D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y
31 S Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y N A K T L T E G V P S
61 R F S G S G S G T Q F S L K I N S L Q P E D F G N Y F C Q H
91 H Y D T P R T F G G G T K L E I K

```

The nucleotide sequence of VL(1) without the primer sequences used for amplification,

SEQ ID NO. 11:

```

1 GCCTCCCTAT CTGCACTGTG GGGGAAACT CTCACATCA CATGTGAGC AACTGAGAT
61 ATTTACAGTT ATTTAGCATG GTATCAGCAG AACAGGGAA AATCTCTCA ACTCTGGTC
121 TATATGCAA AAACCTTAC AGAGGTSFG CCATCARGGT TCAATGGCAG TGGATCAGGC
181 ACACAGTTT CTCTGAGAT CACACGCTG CAGCCTGAG ATTTTGGGAA TTATTTCTGT
241 CAACATCATT ATGATACTCC TCGGACGTC GGTGGA

```

The corresponding translated protein sequence to SEQ ID NO. 11: of VL(1) is SEQ ID NO. 12:

```

1 A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y S Y L A W Y Q Q
31 K Q G K S P Q L L V Y N A K T L T E G V P S R F S G S G S G
61 T Q F S L K I N S L Q P E D F G N Y F C Q H H Y D T P R T F

```

50

91 G G

The sequence of VH(1) including the leader sequence obtained by RT PCR is SEQ ID NO. 13:

```

1 ATGGGRTGGA GCTGTGTCAT GCTCTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT CCACTCCCAG
61 GTCCAACTGC AGCAGCCTGG GCTGGGAGG GTGAGGCTG BAGCTTCAGT GAAGCTCTCC
121 TGCAGGCTT CTGGTACTC CTTCACCAGT TACTGGATGA ACTGGGTGA SCAGAGGCTT
181 GGACAGGCC TTGAGTGGAT TGGCATGAT CATCCTCCG ATAGTGAAC TAGGTTAAAT
241 CAGAATTTCA ACGACAGGCC CACATTGACT GTTGACAAT ATTCACGAC AGCCTATATA
301 CAATCAGCA GCCCGACATC TGAGGACTCF GCGGTCTATT ACTGTGCRAG AGGAGAATAT
361 TACTACGGTA TATTGACTA CTGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA

```

The corresponding translated protein sequence to VH(1) is SEQ ID NO. 14 :

```

1 M G W S C V M L F L V A T A T G V H S Q V Q L Q Q P G A G R
31 V R P G A S V K L S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P
61 G Q G L E W I G M I H P S D S E T R L N Q K F N D R A T L T
91 V D K Y S S T A Y I Q L S S P T S E D S A V Y Y C A R G E Y
121 Y Y G I F D Y W G Q G T T V T V S S

```

The nucleotide sequence of VH(1) without the leader sequence and primer sequences used for amplification, SEQ ID NO. 15:

```

1 CTTGGTAGCA ACAGCTACAG GTGTCACCTC CCAGGTCCAA CTGCAGCAGC CTGGGGCTGG
61 GAGGTTAGAG CCTGGAGCTT CAGTGAAGCT GTCCTGCAAG GCTTCTGGCT ACTCCTTCAC
121 CAGTTACTGG ATGAAGTGGG TGAAGCAGAG GCCTGGACA GGCCTTGAGT GGATTGGCAT
181 GATTCATCCT TCCGATAGTG AAAGTGGTT AAATCAGAG TTCACGACA GGGCCACATT
241 GACTGTTGAC AAATATCCCA GCACAGCCTA TATACAACTC AGCAGCCCGA CATCTGAGGA
301 CTCTGCGGTC TATTACTGTG CAAGAGGAGA ATATTACTAC GGTATATTTG ACTA

```

The corresponding translated protein sequence to SEQ ID NO. 15 of VH(1) is SEQ ID NO. 16:

```

1 I V A T A T G V H S Q V Q L Q Q P G A G R V R P G A S V K L
31 S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M
61 I H P S D S E T R L N Q K F N D R A T L T V D K Y S S T A Y
91 I Q L S S P T S E D S A V Y Y C A R G E Y Y Y G I F D

```

2.3 Construction and expression of the bispecific single chain antibody CCR5xCD3

A schematic depiction of structure and mode of action of the CCR5xCD3 bispecific single chain antibody is shown in Fig 3. As described previously, the light chain and heavy variable domains were joined to a single-chain fragment using a (Gly4Ser1)₃ linker and expressed in the periplasmic space of E. coli to test binding of the recombinant protein to CCR5.

Subsequently, the DNA sequence of the α CCR5 single-chain fragment was subcloned with BsrG1 and BspE1 into an eukaryotic expression vector (pEF-DHFR) that already contained a single-chain fragment directed against CD3 with a C-terminally attached tail of 6 histidine residues (Mack (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7021). The α CCR5 and α CD3 single-chain fragments were joined by a linker coding for Gly4Ser1 (see Fig 3).

The following order of the domains is chosen: VL(1)-VH(1)-VH(2)-VL(2), with (1) being the specificity against CCR5 and (2) the specificity against CD3.

The bispecific CCR5xCD3 antibody has the following nucleotide sequence, SEQ ID NO. 17:

```

1  ATGGGATGGA  GCTGTATCAT  CCTCTCTTGG  GTAGCAACAG  CTACAGGTGT  ACATCCGGAT
61  ATCGTGCCTGA  CCCAGTCTCC  AGCCTCCCTA  TCTGCATCTG  TGGGAGAANC  TGTCAACCATC
121  ACATGTGCGAG  CAAGTGAGAA  TATTTACAGT  TATTTAGCAT  GGTATCAGCA  GAAACAGGGA
181  AARTCTCCTC  AACTCCTGGT  CTATAATGCA  AAAACCTTAA  CAGTAGGTGT  GCCATCAAGG
241  TTCAGTGCCA  GTGGATCAGG  CACACAGTTT  TCTCTGAAGA  TCAACAGCCT  GCAGCCTGAA
301  GATTTTGGGA  ATTATTTCTG  TCAACATCAT  TATGATACTC  CTGGGACGTT  CGGTGGAGGG
361  ACCAAGCTCG  AGATCAAAGG  TGGTGGTGGT  TCTGGCGGCG  GCGGCTCCGG  TGGTGGTGGT
421  TCTCAGGTCC  AACTGCAGCA  GCCTGGGGCT  GGGAGGGTGA  GGCCTGGAGC  TTCAGTGAAG
481  CTGTCCCTCA  AGGCTTCTGG  CTACTCCTTC  ACCAGTACT  GGATGAACCT  GGTGAAGCAG
541  AGGCCTGGAC  AAGGCCTTGA  GTGGATTGGC  ATGATTCATC  CTCCGATAG  TGAACCTAGG
601  TTAATCAGA  AGTTCACGA  CAGGGCCACA  TTGACTGTTG  ACAATATTC  CAGCACAGCC
661  TATATACAAC  TCAGCAGCCC  GACATCTGAG  GACTCTGCGG  TCTATTAATG  TGCAAGAGGA
721  GAATATTACT  ACGGTATATT  TGACTACTGG  GGCCAGGGGA  CCACGGTCAC  CGTCTCCTCC
781  GGAGGTGGTG  GATCCGATAT  CAACTGCAG  CAGTCAGGGG  CTGAACTGGC  AAGACCTGGG
841  GCCTCAGTGA  AGATGTCCCT  CAAGACTTCT  GGCTACACCT  TTAAGTAA  CAGCATGCAC
901  TGGGTAAAAC  AGAGGCCTGG  ACAGGGTCTG  GAATGGATTG  GATACATTA  TCCTAGCCGT
961  GGTATACTTA  ATTACAATCA  GAAGTTCAG  GACAGGGCCA  CRTTGAATAC  AGACAATCC
1021  TCCAGCACAG  CCTACATGCA  ACTGAGCAGC  CTGACATCTG  AGGACTCTGC  AGTCTATTAC
1081  TGTGCAGAT  ATTATGATGA  TCATTAATGC  CTTGACTACT  GGCCCARAG  CACCCTCTC
1141  ACAGTCTCCT  CAGTCGAAGG  TGGAASTEGA  GGTTCGSTG  GAAGTGGAGG  TTCAGGTGGA
1201  GTCAGCAGCA  TTCAGCTGAC  CCACTCTCCA  GCATCATGT  CTGCATCTCC  AGGGGAGAAG
1261  GTCACCATGA  CCTGCAGAGC  CAGTTCAGT  GTAAGTTACA  TGAACCTGTA  CCAGCAGAAG
1321  TCAGGCACCT  CCCCABAAAG  ATGGATTTAT  GACACATCCA  AAGTGGCTTC  TGGAGTCCCT
1381  TATCSTTCA  GTGGCSTGG  GTCTGGGACC  TCATCTCTC  TCACATCAG  CAGCATGGAG

```

52

1441 GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTACTGCCAA CAGTGGAGTA GTAACCCGCT CACGTCGGA
 1501 GCTGGACCA AGCTGGAGCT GAACATCAT CACCATCATC ATTAG

The bispecific CCR5xCD3 antibody has the following protein sequence, SEQ ID NO.

18:

```

1 D I V L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y
31 S Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y N A K T L T E G V P S
61 R F S G S G S G T Q F S L K I N S L Q P E D P G N Y F C Q H
91 H Y D T P R T P G G G T K L E I K G G G S G C G S G G G
121 G S Q V Q L Q Q P G A G R V R P G A S V K L S C K A S G Y S
151 F T S Y W M N W V K Q R P P G Q G L E N I G M I H P S D S E T
181 R L N Q K F N D R A T L T V D K Y S S T A Y I Q L S S P T S
211 E D S A V Y Y C A R G E Y Y Y G I F D Y W G Q G T T V T V S
241 S G G G G S D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K T
271 S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S
301 R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S
331 S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W R Q G T T
361 L T V S S V E G C S G G S G G S G G S G G V D D I Q L T Q S
391 P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q
421 K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G
451 T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F
481 G A G T K L E L K H H H H H H *
```

The bispecific antibody was expressed in DHFR-deficient CHO cells and purified from the culture supernatant by affinity chromatography on immobilized Ni²⁺ ions (Hochuli (1988) *Biotechnology* 6, 1321-1325; Ni-NTA, Qiagen).

In summary, for the construction of bispecific antibodies, for example the single-chain technique may be used (Mack et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92:7021-7025; Mack et al. (1997) *J. Immunol.* 158:3965-3970). In this case, as shown schematically in Figures 3 (top), the variable domains of the light (VL) and the heavy (VH) immunoglobulin chains of two different antibodies are fused in a particular order, optionally a histidine chain of 6 x His is attached in addition. The fusion is effected on a DNA basis so that a protein chain with four different variable domains is formed after expression (cf. Figures 3 (top)). The attached histidine chain enables a simple and efficient purification via immobilized Ni ions in one step. Figure 3 (top) shows a preferred embodiment of the bispecific antibody binding to the CD3 antigen on the surface of the effector cell and the human CCR5 on the surface of leukocytes as target cells.

Subsequently, a single-chain antibody with a specificity is generated by means of fusion PCR by inserting a linker of (Gly₄Ser₁)₃ between the two variable antibody domains. In a further fusion PCR, the antibody fragment against CCR5 is fused to the already published antibody fragment against CD3, with a linker consisting of Gly₄Ser₁ is inserted (cf. Mack et al. supra).

In order to express the bispecific antibody, the corresponding DNA sequence is subcloned in a eukaryotic expression vector (e.g. PEF-DHFR, Mack et al. (1995) PNAS, supra) and transfected in DHFR-deficient CHO cells by means of electroporation. The bispecific antibody is purified from the supernatant of stably transfected CHO cells by means of affinity chromatography at Ni-NTA, with elution taking place by lowering the pH value. Subsequently, the pH is adjusted and the protein is adjusted to a suitable concentration. Overall purification yield was approx. 900 µg/l culture supernatant. SDS-PAGE showed a single band of approx. 60 kD under reducing and non-reducing conditions without any detectable proteolysis or degradation of the protein (Fig. 4).

Example 3: Expression and purification of a chemokine-toxin fusion protein

A schematic depiction of structure and mode of action of the RANTES-PE38 chemokine-toxin fusion protein is shown in Fig 5. A PCR fragment of RANTES, generated with the primers P1 and P2, was subcloned with *Stu*I and *Sal*I into a vector for periplasmic expression in *E. coli* (Mack (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7021). The restriction site *Stu*I had previously been introduced at the 3' terminus of the *OmpA* signal sequence. The DNA of a truncated version of *Pseudomonas* exotoxin A (PE38; Theuer (1993) Cancer Res. 53, 340), was amplified by PCR with *Pfu*-polymerase using the primers P3 and P4 and subcloned with *Bsp*E1 and *Hind* III into the vector that already contained the cDNA of RANTES. Primer P4 also added a tail of 6 histidine residues at the 3' terminus of PE38. During the periplasmic expression the *OmpA* signal sequence is cleaved off such that the recombinant protein starts with the first aminoacid of RANTES. The C-terminally attached tail of 6 histidine residues allowed purification by affinity chromatography on Ni-NTA (Qiagen).

List of primers:

SEQ ID NO. 19: 5' AAAGCCTCCCCATATTCCTCGGA

54

SEQ ID NO. 20: 5' AAAGTCGACTCCGGACATCTCCAAGAGTTGATGTAC
SEQ ID NO. 21: 5' AATCCGGAGGCGGCAGCCTGGCCGC
SEQ ID NO. 22: 5' GGGAAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTCAGGTCCTCGCCGG

As described in the above the DNA sequence of RANTES was fused with the sequence of a truncated version of the Pseudomonas exotoxin A (PE38) (Theuer (1993) Cancer Res. 53, 340). In a first version of the construct a Gly-Ser linker was spaced between RANTES and PE 38. However this resulted in a considerable proteolytic degradation of the fusion protein during expression in E. coli (data not shown). In an attempt to stabilize the construct the linker and the first three aminoacids of PE38 were removed. The new fusion protein showed no proteolysis during expression in the periplasmic space of E. coli as demonstrated by SDS-PAGE (Fig. 6 left panel) and Western-blot (Fig. 6 right panel). The corresponding constructs are depicted in SEQ ID NOs: 23 and 24, respectively.

Example 4: Binding of the bispecific antibody to the target antigens CCR5 and CD3

Binding of the bispecific single-chain antibody to CHO cells or PBMC was determined by FACS-analysis (Fig. 7 to 9). The cells were incubated with the bispecific antibody for 60 min on ice followed by an antibody against 6xHis (Dianova, Hamburg, Germany) and a PE-conjugated polyclonal rabbit-anti mouse F(ab)2 fragment (R439, Dako, Hamburg, Germany). As the bispecific antibody would also bind to CCR5, we performed the analysis with PBMC that lack expression of CCR5 due to a homozygous 32 basepair deletion in the CCR5 alleles. The antibody showed good binding to a subpopulation of lymphocytes. Co-staining with antibodies against CD4 and CD8 identified this subpopulation as CD4 and CD8 positive T lymphocytes (Fig. 7). In addition, the bispecific antibody competed with the monoclonal CD3 antibody OKT-3 for binding to T cells (data not shown).

Binding of the bispecific antibody to CCR5 was demonstrated on CCR5 overexpressing CHO cells and human monocytes (Fig. 8 and 9). The antibody showed excellent binding to CCR5 transfected CHO cells (Fig. 8) and cultured monocytes (Fig 9), while no

binding was detectable on CHO cells transfected with CXCR4 or on cultured monocytes from a donor with a homozygous CCR5- Δ 32/ Δ 32 deletion. Overnight cultivation of monocytes induces expression of CCR5 on wild-type monocytes, while monocytes from donors with a homozygous CCR5- Δ 32/ Δ 32 deletion fail to express CCR5. Moreover we have shown that the CCR5 signal detectable with the bispecific antibody on cultured monocytes could be reduced to values below 15 % by preincubation of monocytes for 30 min at 37°C with AOP-RANTES (data not shown) that is known to efficiently induce internalization of CCR5 and reduce binding of CCR5 antibodies (25).

Example 5: Downmodulation of chemokine receptors

5.1 Downmodulation of CCR5 with mAb MC-1 against CCR5

The effect of MC-1 one on the surface expression of human CCR5 was measured. For comparison a different monoclonal antibody MC-4 against CCR5 was used. CHO-CCR5 cells were incubated with various concentrations of antibody MC-1 and MC-4 for 30 min. at 37°C. Cells were placed on ice and stained with MC-1 and MC-4 respectively at a concentration of 15 ug/ml for one hour on ice, followed by detection with a secondary antibody (rabbit anti-mouse FITC, F313 from DAKO). Analysis was performed on a FACSCalibur. Incubation with MC-1 at 37°C for 30 min resulted in a downmodulation of human CCR5 by 40% at a concentration of 10 ug/ml (Fig. 10).

5.2 Downmodulation of CCR5 by chemokine-toxin

The fusion of RANTES to the N-terminus of a truncated version of the Pseudomonas exotoxin A is supposed to result in specific binding of the construct to cells expressing RANTES receptors such as CCR5, CCR1 and CCR3. Internalization of the chemokine receptors upon binding of the modified toxin would enhance the cellular uptake and cytotoxic activity of the construct (Fig. 5 lower panel). We therefore analyzed whether RANTES-PE38 is able to internalize CCR5 from the surface of primary monocytes and T cells (Fig. 11, open symbols). Internalization of CCR5 would indicate that the construct is able to bind to CCR5 and that RANTES remains functionally active after fusion to PE38. As shown in Fig. 11 the construct is able to internalize CCR5 from the surface

of monocytes and lymphocytes. Unmodified RANTES served as positive control and was somewhat more efficient than RANTES-PE38 (Fig 11, closed symbols).

PBMC were incubated for 30 min at 37°C with various concentrations of RANTES or RANTES-PE38 diluted in RPMI with 10% FCS in a volume of 100 µl. Medium alone was used as control. The cells were then stained on ice for surface CCR5 expression using the monoclonal antibody MC-1 or medium as negative control followed by the PE-conjugated anti-mouse antibody R439. The FACS-analysis was performed on a FACSCalibur (Becton Dickinson) and CellQuest software. Lymphocytes and monocytes were distinguished by their forward and sideward light scatter properties and expression of CD14, CD4 and CD8. Relative surface CCR5 expression was calculated as $[\text{mean channel fluorescence (exp.)} - \text{mean channel fluorescence (negative control)}] / [\text{mean channel fluorescence (medium)} - \text{mean channel fluorescence (negative control)}]$.

Example 6: Depletion of cells with CCR5xCD3 antibody and RANTES-PE38

6.1 CCR5 specific depletion of monocytes from cultured PBMCs

PBMC from CCR5-wildtype (WT) or CCR5 deficient ($\Delta 32/\Delta 32$) donors were incubated over night to induce expression of CCR5 on monocytes. Cultured PBMC were incubated with different concentrations of purified $\alpha\text{CCR5-}\alpha\text{CD3}$ bispecific antibodies or medium as control for 20 h. Surviving cells were analyzed on a FACSCalibur and counted.

In order to test the ability of the $\alpha\text{CCR5-}\alpha\text{CD3}$ bispecific single-chain antibody to deplete CCR5 positive primary cells, we incubated human PBMC with the antibody (Fig. 12). Prior to incubation the PBMC were cultured overnight to upregulate CCR5 expression on monocytes. By retargeting cytotoxic T cells the bispecific antibody depleted the majority of monocytes within 20 h in a concentration dependent manner (Fig. 13) with an almost complete elimination of CCR5 positive cells at concentration of 10 ng/ml. To verify that the depletion of monocytes was due to their induced expression of CCR5, the same experiment was performed with PBMC from a donor with a homozygous 32 bp deletion in the CCR5 allele that prevents surface expression of CCR5. No depletion of CCR5 deficient monocytes was detectable after 20 h indicating that the depletion of

cells with the bispecific antibody is restricted to monocytes that express CCR5 (Fig. 12), compare lower right panel to upper right panel, left panels serve as negative controls. Monocytes (Mo) and lymphocytes (Ly) were identified by their forward and side-wards light scatter properties. Monocytes appear in the lower left quadrant see arrows.

6.2 Depletion of monocytes and T lymphocytes from the synovial fluid of patients with arthritis

Freshly drawn synovial fluid of patients with arthritis were incubated with different concentrations of purified α CCR5- α CD3 bispecific antibodies or medium as control for 20 h. Surviving cells were analyzed on a FACSCalibur and counted.

The bispecific single-chain antibody could potentially be applied to deplete CCR5 positive T cells and monocytes from the inflamed joints of patients with arthritis. Therefore determined the depletion of CCR5 positive cells from the synovial fluid of patients with various types of arthritis was determined. It was shown previously that the majority of T cells and monocytes in the inflamed synovial fluid express CCR5 (Mack (1999) loc. cit.). In synovial samples obtained before depletion experiments it was confirmed by FACS analysis that the majority of lymphocytes and monocytes express CCR5, while no expression of CCR5 was detectable on granulocytes (data not shown). For the depletion experiments the synovial fluid was incubated *ex vivo* with different concentrations of the bispecific antibody for 20 h (Fig. 14). The synovial fluid was incubated immediately after puncture without any preparation to ensure that the conditions *in vitro* resemble most closely the situation *in vivo* when the antibody would be present within inflamed joints. As shown in Fig. 14 the bispecific antibody induced a depletion of the majority of lymphocytes and monocytes from the synovial fluid, while granulocytes that do not express CCR5 remained unaffected. A representative FACS analysis of the depletion of monocytes and lymphocytes in synovial fluid at a concentration of 0.5 μ g/ml CCR5 \times CD3 is shown in Fig. 15. Only the CCR5 negative neutrophils (PMN: polymorpho-nuclear cells) are unaffected by the bispecific antibody.

Antibodies were incubated with synovial fluid for one or several days. After 24 hours, the CCR5 positive lymphocytes and monocytes have already almost disappeared. When the medium is controlled after longer incubation, the monocytes have differenti-

ated into macrophages which are visible at the bottom of the culture flask. After an appropriate incubation with the bispecific antibody, no macrophages are visible.

A corresponding result can be obtained when cultivated PBMC are incubated with the bispecific antibody as described above. In this case, there is an almost complete depletion of CCR5 positive monocytes and an almost complete depletion of CCR5 positive T-lymphocytes. The depletion of CCR5 positive T-cells and monocytes is shown.

The results show that the construct of the present invention is capable of destroying CCR5 positive monocytes. This applies to both monocytes from the joint aspirate and blood monocytes which express CCR5 when being differentiated into macrophages. Depletion of the monocytes/macrophages takes place within a few hours (< 24 hrs). In particular the depletion of monocytes/macrophages in the joint is of great advantage in therapy since it is these cells that are mainly responsible for the joint destruction. Moreover, for the activation of T-lymphocytes an interaction with macrophages is also required so that, at the same time, the function of the T-lymphocytes is suppressed.

In addition to the depletion of monocytes/macrophages, a considerable reduction in the number of CCR5 positive T-lymphocytes could be observed.

6.3 Comparison of the efficacy of the bispecific antibody CCR5xCD3 versus monoclonal antibodies

The efficacy of the α CCR5- α CD3 bispecific single-chain antibody in depleting CCR5 positive monocytes was compared with the efficacy of two unmodified monoclonal antibodies. PBMC from two different donors (F and N) were cultured overnight and then incubated for 24 h with medium, the bispecific single-chain antibody (125 ng/ml), MC-1 (5 μ g/ml) and MC-5 (5 μ g/ml). The monoclonal antibody MC-1, the parental antibody for the bispecific single-chain antibody has the isotype mouse IgG-1 and the antibody MC-5 has the isotype IgG-2a. The cells were completely recovered and analyzed by FACS to quantify surviving monocytes and lymphocytes.

Fig. 16 shows that surprisingly only the bispecific antibody was able to considerably deplete CCR5 positive monocytes, while the unmodified monoclonal antibodies were

largely ineffective even when used in a 40 fold excess over the bispecific antibody CCR5xCD3. By FACS analysis using forward and sideward light scatter properties of lymphocytes and monocytes demonstrates that only the CCR5xCD3 bispecific antibody but not the monoclonal antibodies are capable of depleting cultured monocytes (Fig 17 compare right upper panel to lower panels).

6.4 Depletion of chemokine receptor expressing cells with RANTES-PE38

CHO cells expressing CCR5 or CXCR4 were grown to subconfluence on 24 well culture plates and incubated with different concentrations of purified RANTES-PE38 or medium as control. After 40 hours the adherent and non-adherent cells were recovered and analyzed by FACS to measure the percentage of dead cells. It was previously established that dead (propidium iodide positive) CHO cells can be identified by their light scatter properties.

It was further analyzed the cytotoxic activity of RANTES-PE38. For that purpose we incubated CHO cells expressing human CCR5, murine CCR5 and human CXCR4 with various concentrations of the chemokine-toxin or medium. No surviving (adherent) human or murine CCR5 positive CHO cells were detectable by light microscopy after 40 h incubation with as little as 10 nM RANTES-PE38. In contrast regular growth and survival was observed when the CCR5 positive cells were incubated with medium or when CXCR4 positive CHO cells were incubated with equal concentrations of the chemokine-toxin (data not shown). To quantify the percentage of dead cells the adherent and non-adherent cells were analyzed by FACS. It was previously established that living and dead CHO cells can be identified by their light scatter properties, the position of dead and alive cells is indicated by arrows (Fig 18). As shown in Fig. 18 no cytotoxic effect of RANTES-PE38 was seen on CHO cells expressing CXCR4, while CHO cells expressing human CCR5 were completely killed by 10 nM RANTES-PE38.

These experiments show that RANTES-PE 38 is able to internalize CCR5 from the surface of cells and induces depletion of cells expressing the RANTES receptors hCCR5 or mCCR5. The inactivity of the construct against CXCR4 positive CHO cells demonstrates that the cytotoxic activity of the construct is restricted to cells that express specific chemokine receptors.

Example 7: Virus infection assay with stable transfected cells

GHOST 34 CCR5 cells are derived from HOS/CD4 cells stably expressing CCR5 and were provided by Dan Littman (Skirball Institute, New York). 2.5×10^4 cells in 48-well trays were exposed to 100 μ l of chemokine at appropriate dilution for 30 min at 37°C. 100 μ l of the NSI, CCR5-dependent HIV-1 strain, SF162 was added at 1000 focus forming units/ml (FFU/ml) and the cells incubated for a further 3 h. The cells were then washed and incubated in medium containing the appropriate chemokine for 4 days before fixing, staining in situ for p24 production and estimating foci of infection as previously described.

EXAMPLE 8: Concentration dependent binding of CCR5xCD3 to CCR5 expressing CHO cells

Chinese hamster ovary cells stably transfected with CCR5 (CCR5+CHO) were used as target cells for binding studies of bispecific scFv CCR5xCD3 (as described in Example 2 and Fig. 3). These cells were negative for CD3 and >95% positive for CCR5 as evaluated by binding assays with the parental antibody MC-1 (as described in Example 5 and Fig. 10). Binding was evaluated by a flow cytometry based binding assay.

4×10^5 CCR5+CHO cells were resuspended in 50 μ l FACS buffer (PBS with 1% fetal calf serum (FCS) and 0,05% sodium azide) containing different dilutions of scFV CCR5xCD3 ranging from 20 μ g/ml to 19.5 ng/ml. Cells were incubated in a 96 well microtiter plate for 30 minutes at 4°C. Cells were washed twice with FACS buffer and incubated for 45 minutes at 4°C with 20 μ g/ml anti-His-Tag monoclonal antibody (Dianova). Specifically bound scFV CCR5xCD3 was detected with a monoclonal goat anti-mouse IgG F(ab')₂-PE conjugated antibody (Dianova). After washing, the cells were analysed in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) using the CellQuest software (Becton Dickinson) to calculate the median values of the fluorescence intensities of the different concentration samples. Nonlinear regression analysis was performed with GraphPad Prism (Version 3.02). Concentration dependent binding of scFv CCR5xCD3 to CCR5 expressing CHO cells was observed with a K_D value of 0,86 μ g/ml (Fig. 20).

EXAMPLE 9: Cytotoxic activity of CCR5xCD3 with primary T lymphocytes as effector cells

The capacity of scFv CCR5xCD3 (as described in Example 2 and Fig. 3) to mediate cytotoxicity to CCR5-positive cells was tested using stably transfected CCR5+CHO as target cells and CD3 positive T-lymphocytes derived from peripheral blood as effector cells. For detection of cytotoxicity, a FACS based assay was performed.

CD3+ T-cells (include CD4+ and CD8+ cells) were isolated from peripheral blood by negative selection using a human T cell enrichment column (R&D Systems). For this purpose, PBMC were prepared by standard Ficoll-Hypaque density gradient separation and applied to the column. B cells and monocytes were bound to the column matrix, while T cells were eluted. The enriched T cells were washed in medium and used as effector cells.

For discrimination of target cells from effector cells by flow cytometry, CCR5+CHO cells were labeled with the aliphatic membrane dye PKH26 (Sigma) in a final concentration of 12 μ M. 0.5×10^5 labeled CCR5+CHO cells and 2.5×10^5 CD3+ T-cells were seeded in a 96-well microtiter plate in a effector:target ratio of 5:1. 100 μ l dilutions of scFv CCR5xCD3 ranging from 320 ng/ml to 0.3 pg/ml were incubated with the cells for 16 hours at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO₂. Subsequently cells were centrifuged for 3 minutes at 600xg, and the cell pellets were resuspended in 200 μ l FACS buffer (PBS, 1%FCS, 0.05% sodium azide). After staining with 1 μ g/ml propidium iodine (PI), cells were analyzed in duplicate in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson).

In order to verify the specificity of scFv CCR5xCD3 mediated lysis, stably CXCR4 transfected CHO cells were used as negative control target cells. The cytotoxicity assay was performed under identical conditions as described for CCR5+CHO cells.

Specific lysis of CCR5+CHO cells was calculated using the CellQuest software (Becton Dickinson) and a nonlinear regression analysis was performed with GraphPad Prism. A sigmoidal dose response curve was obtained (Fig. 21) revealing an EC₅₀ value of 912 pg/ml. No cytotoxic effect of scFv CCR5xCD3 was observed using CXCR4+ CHO cells as target cells.

EXAMPLE 10: Cytotoxic activity of CCR5xCD3 with T cell clone CB15 as effector cells

The cytotoxic activity of scFv CCR5xCD3 (as described in Example 2 and Fig. 3) on CCR5-positive cells was also tested using the CD3 positive T-cell line CB15 (CD4+) as effector cells. For detection of cytotoxicity, a FACS based assay was performed with CCR5 transfected CHO cells (CCR5+CHO) as target cells.

CCR5+CHO cells were labeled with the aliphatic membrane dye PKH26 (Sigma) in a final concentration of 10 μ M. Effector and target cells were incubated in a microtiter plate in a ratio of 10:1 with 100 μ l of scFv CCR5xCD3 in dilutions ranging from 40 μ g/ml to 0.15 ng/ml for 6 hours at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were centrifuged for 3 minutes at 600xg and the cell pellets were resuspended in 200 μ l FACS buffer (PBS, 1%FCS, 0.05% sodium azide). Cells were stained with 1 μ g/ml propidium iodide (PI) and analyzed in duplicate in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Specific lysis of CCR5+CHO cells was calculated using the CellQuest software (Becton Dickinson) and a nonlinear regression analysis was performed with GraphPad Prism. A sigmoidal dose response curve was obtained (Fig. 22) revealing an EC50 value of 12.8 ng/ml.

The results obtained with T cell clone CB15 as effector cells in bioactivity assay demonstrate that specific lysis mediated by scFv CCR5xCD3 is not restricted to the cytotoxic activity of CD8+ CTL but that CD4+ T cells are also involved in this process.

EXAMPLE 11: Epitope mapping of parental CCR5 specific monoclonal antibody MC-1 used for construction of scFv CCR5xCD3

Epitope of parental CCR5 specific monoclonal antibody MC-1 used for construction of scFv CCR5xCD3 (as described in Example 2 and Fig. 3) was mapped by flow cytometry using a panel of about 70 CHO-K1 cell lines stably expressing chimeric and point mutant receptors (Samson, J. Biol. Chem., 1997, 272, 24934-24941; Lee, J. Biol. Chem., 1999, 274, 9617-9626; Blanpain, J. Biol. Chem., 1999, 274, 34719-34727; Blanpain, Blood, 2000, 96, 1638-1645). Cells were incubated for 30 min on ice with mab MC-1, washed and stained with PE-conjugated anti-mouse Ig antibody (Sigma).

CHO-K1 cells expressing CCR2b were used as negative control. MC-1 was shown to recognize the first part of the second extracellular loop (ECL2) of the CCR5 molecule (data not shown). ECL2 ranges from aa 168-199 (RSQ KEGLHYTCSS HFPYSQYQFW KNFQTLKIV) and is located between the transmembrane regions 4 and 5 of CCR5 as described by Chen, J. Virol., 1997, 71, 2705-2714.

The amino acid sequences of human and rhesus macaque CCR5 differ in eight amino acids with two amino acid changes are situated at position aa 171 (K→R) and aa 198 (I→M) in the ECL2 (Chen, J. Virol., 1997, 71, 2705-2714). Due to these amino acid changes potential crossreactivity of MC-1 with the ECL2 of rhesus macaque CCR5 was analyzed with human and rhesus PBMCs in a FACS based assay. PBMC of both species were isolated by standard ficoll gradient centrifugation. 5×10^5 cells were suspended in 50 μ l FACS buffer and 50 μ g/ml of MC-1 was added. After 30 min incubation at 4°C, the cells were washed and stained with goat anti-mouse IgG F(ab')₂-PE conjugated monoclonal antibody (Dianova) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed and analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson).

As shown in Fig. 23 MC-1 exclusively bound to human CCR5 but did not react with CCR5 derived from rhesus macaques. These data show that the epitope recognized by MC-1 is specific for human CCR5 and that lysin at position aa 171 and isoleucin at position aa 198 in human CCR5 sequence are essential for this specificity. Especially lysin at position aa 171 which is located in the first part of ECL2 contributes to the specific recognition of the human epitope of CCR5 by mab MC-1.

EXAMPLE 12: scFv CCR5xCD3 mediated reduction of virus production in HIV-1 infected monocytes

PBMC were prepared from fresh buffy coats of healthy donors by Ficoll density centrifugation and monocytes were isolated by over night adherence to culture flasks. Remaining PBL were removed and cultured separately at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO₂.

Monocytes were seeded into a 48 well microtiter plate at a density of 5×10^4 cells/well and infected with the M-tropic HIV-1 strain BaL (moi=1) overnight at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO₂. The virus was removed by washing and the monocytes

64

were further cultured with unstimulated PBL (15×10^4 per well) + scFv CCR5xCD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) + AZT (75 μM) or with unstimulated PBL (15×10^4 per well) alone as negative control. 5 days post infection (p.i.) monocytes were washed and cultured in the absence of AZT or antibody. Supernatant was harvested on day 15 p.i. and HIV-1 replication was quantified by measurement of p24 in an ELISA. This experimental approach led to a reduction of virus replication of 75% in samples containing scFv CCR5xCD3 (75 ng/ml p24) compared to the control without scFv CCR5xCD3 (300 ng/ml p24).

Table I: Nucleosidal Reverse Transcriptase Inhibitors (nucleoside analogs, NRTI)

Substance	Trade-name	Dosing	Schedule	Common Side Effects and General Remarks
Zidovudine (AZT)	Retrovir	300 mg,	2x daily	Initial gastrointestinal (GI) side effects, anemia, neutropenia, myopathy
Lamivudine (3TC)	Epivir	150 mg,	2x daily	Generally well tolerated. Effective against hepatitis
Zidovudine, Lamivudine (AZT + 3TC)	Combivir	1 tablet 2x daily		Combination-tablet containing 300 mg AZT and 150 mg 3TC
Didanosine (ddI)	Videx	200 mg, 2x daily or 400 mg, 1x daily on an empty stomach (> 60 kg weight)		15% peripheral neuropathy, pancreatitis; avoid alcohol. Contents alcohol: could be given simultaneously with all NRTIs, Adefovir, Nevirapine, and Efavirenz; Delavirdine and Indinavir should be given at least 1 hour before ddI; Nelfinavir to be given 1 hour after ddI.
Zalcitabine (ddC)	Hivid	0,375-0,75 mg,	3x daily	17-31% peripheral neuropathy in different studies; aphteous ulcerations
Stavudine (d4T)	Zerit	20-40 mg,	2x daily	Peripheral neuropathy (1-4% in earlier studies; 24% in 'expanded access' patients with CD4 > 50)
Abacavir (ABA)	Ziagen	300 mg,	2x daily	About 3% reaction for hypersensitivity: fever, indisposition, possibly transient rash, gastrointestinal side effects.

Table II: Protease Inhibitors

Substance	Trade-name	Dosing Schedule	Common Side Effects and General Remarks
Saquinavir (hard gelatine capsule, SQV-H)	Invirase	600 mg, 3x daily, take with high-fat meal	Well tolerated. Limited efficacy due to poor resorption.
Saquinavir (soft gelatine capsule, SQV-S)	Fortovase	1200 mg, 3x daily, take with high-fat meal (>28g)	Improved resorption compared to Invirase.
Ritonavir (RTV)	Norvir	600 mg, (6 cap./7.5 ml) 2x daily. Start with 300 mg, 2x daily, then increase within 10 days to 600 mg, 2x daily;	Nausea and numb lips for up to 5 weeks. Occasionally hepatitis. Not tolerated by up to 50% of the patients.
Indinavir (IDV)	Crixivan	800 mg, every 8 hours on an empty stomach or with snack (<2g fat)	Neural calculus with 6-8%; requires large liquid intake. Occasionally nausea and gastrointestinal side effects.
Nelfinavir (NFV)	Viracept	750 mg, 3x daily, or 1250 mg, 2x daily with meals	Often diarrhea, sometimes nausea.

Table III: Non-Nucleosidal Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI)

Substance	Trade-name	Dosing Schedule	Common Side Effects and General Remarks
Nevirapine (NVP)	Viramune	200 mg, 1x daily	Transient skin, hepatitis, induced liver enzymes P450 3A4
Delavirdine (DLV)	Rescriptor	400 mg, 3x daily	Transient skin, suppresses P450 3A4
Efavirenz (EFV)	Sustiva	600 mg, 1x daily in the evening	Initially dizziness, insomnia, momentary transient skin: Induces P450 3A4; avoid Clarithromycin.

Table IV: Chemokine receptors and chemokine ligands

Chemokine Receptors	Chemokine Ligands
CXCR3	I-TAC (CXCL11), IP-10 (CXCL-10), Mig (CXCL9)
CXCR4	SDF-1 (CXCL12)
CXCR5	BCA1 (CXCL13)
CCR1	MIP1alpha (CCL3), RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), HCC1 (CCL14), LKN1 (CCL15)
CCR2	MIP1alpha (CCL3), RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13)
CCR3	RANTES (CCL5), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), eotaxin (CCL11), LKN1 (CCL15), MIPF-2 (CCL24), eotaxin-3 (CCL26)
CCR4	TARC (CCL17), MDC (CCL22)
CCR5	MIP1alpha (CCL3), MIP1 beta (CCL4), RANTES (CCL5), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), eotaxin (CCL11)
CCR6	LARC (CCL20)
CCR7	ELC (CCL19), SLC (CCL21)
CCR8	I-309 (CCL1), MIP1 beta (CCL4), TARC (CCL17)
CCR9	TECK (CCL25)
XCR1	XCL1, XCL2
CCR10	CCL27, CCL28 (Wang (2000) J. Biol. Chem. 275, 22313-22323) CX3CR1: fractalkine (CX3CL1)

CLAIMS

1. Use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus.
2. The use of claim 1, wherein said primate immunodeficiency virus is a human immunodeficiency virus.
3. The use of claim 2, wherein said human immunodeficiency virus is HIV-1.
4. Use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment, prevention and/or alleviation of inflammatory renal diseases, allergic reactions, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis, skin diseases, diabetes or transplant rejection.
5. The use of any one of claims 1 to 4, wherein said chemokine receptor is the chemokine receptor 5 (CCR5).
6. The use of claim 5, wherein said chemokine receptor 5 is the human CCR5.
7. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said antibody construct is a bispecific antibody which binds to the chemokine receptor as a first antigen and a CD3 antigen of an effector cell as a second antigen.
8. The use of claim 7, wherein said bispecific antibody is a single chain antibody construct.
9. The use of claim 8, wherein said single chain antibody construct comprises V_L and V_H domains of an antibody specific for the chemokine receptor and V_H and V_L

domains of an antibody specific for a CD3 antigen.

10. The use of claim 9, wherein said antibody specific for the chemokine receptor is the murine anti-human CCR5 antibody MC-1.
11. The use of claim 9 or 10, wherein said V_L and V_H domains are arranged in the order $V_L(\text{MC-1})$ - $V_H(\text{MC-1})$ - $V_H(\text{CD3})$ - $V_L(\text{CD3})$.
12. The use of claim 11, wherein said $V_L(\text{MC-1})$ comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 12, wherein said $V_H(\text{MC-1})$ comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 16, wherein said $V_H(\text{CD3})$ comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 26 and/or wherein said $V_L(\text{CD3})$ comprises in SEQ ID NO: 28.
13. The use of any one of claims 5 to 12, wherein said bispecific antibody comprises an amino acid sequence encoded by the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 17 or comprises the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 18.
14. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said antibody construct is a bispecific antibody which binds to said chemokine receptor as a first antigen and a toxin as a second antigen.
15. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said antibody construct is covalently bound to a toxin.
16. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said antibody construct can, via a multimerization domain, be bound *in vitro* and/or *in vivo* to a second antibody construct which binds to a CD3 antigen and/or a toxin.
17. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said chemokine construct is a fusion construct of a modified or an unmodified chemokine with a modified or an

unmodified toxin.

18. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said chemokine construct can, via a multimerization domain, be bound in vitro and/or in vivo to an antibody construct which binds to a CD3 antigen and/or to a toxin.
19. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said chemokine construct comprises a chemokine covalently bound to an antibody construct which binds to an antibody construct which binds to a CD3 antigen and/or which is a covalently bound to a toxin.
20. The use of any one of claims 1 to 6, wherein said antibody and/or chemokine construct is a heterominibody construct comprising at least an antibody and/or a chemokine which binds to a chemokine receptor.
21. The use of claim 20, wherein said heterominibody construct comprises at least one toxin.
22. The use of claim 20 or 21, wherein said heterominibody construct binds to the chemokine receptor and/or to a CD3 antigen of an effector cell.
23. The use of any one of claims 17 to 22, wherein said chemokine is selected from the group consisting of RANTES, MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-2 and MCP-3.
24. The use of any one of claims 15 to 19, 21 and 22, wherein said toxin is a truncated *Pseudomonas* exotoxin A.
25. The use of any one of claims 17 to 24 wherein said chemokine construct comprises a amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 24 or as encoded by the nucleotide sequence as depicted in SEQ ID NO: 23.
26. The use of any one of claims 7 to 13, 16, 18, 19 and 22, wherein said CD3 anti-

gen is on the surface of an effector cell which is a T-cell.

27. An antibody construct as defined in any one of claims 5 to 16, 20, 21 and 22, wherein said construct comprises a binding site for CCR5 and a binding site for CD3.
28. A chemokine construct as defined in any one of claims 17 to 22, wherein said chemokine construct comprises RANTES and said toxin is a truncated Pseudomonas exotoxin A (PE38).
29. A polynucleotide encoding an antibody-construct as defined in any one of claims 5 to 12 or a chemokine construct as defined in claims any one of claims 17 to 19, 23 and 24, wherein said polynucleotide is
 - (a) a polynucleotide comprising the nucleic acid molecule in particular encoding the polypeptide as depicted in SEQ ID NO: 18 or SEQ ID NO: 24;
 - (b) a polynucleotide comprising the nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 23; or
 - (c) a polynucleotide hybridizing under stringent conditions to the complementary strand of a polynucleotide of (a) or (b).
30. The polynucleotide of claim 29 which is DNA or RNA.
31. A vector comprising the polynucleotide of claim 29 or 30.
32. The vector of claim 31 which is an expression vector or a gene transfer vector.
33. A host transformed with the vector of claim 31 or 32.
34. A method of producing the antibody construct or the chemokine construct as defined in claim 29 comprising culturing the host of claim 33 and isolating the produced antibody construct or chemokine construct.

35. The antibody construct or the chemokine construct encoded by the polynucleotide of claim 29 or 30 or produced by the method of claim 34.
36. A composition comprising the polynucleotide of claim 29, the vector of claims 31 or 32, the host of claim 33, the antibody construct of claim 27 or 35 and/or the chemokine construct of claim 28 or 35.
37. The composition of claim 36 which is a pharmaceutical composition further comprising, optionally, a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or excipient.
38. The composition of claim 36 or 37 which further comprises a medicament for the treatment of an immunological disorder or a medicament for anti-HIV treatment.
39. A method for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus comprising administering to a subject in need of such a treatment, alleviation and/or prevention an effective amount of the composition of any one of claims 36 to 38.
40. Use of the polynucleotide of claim 29 or 30, the vector of claim 31 or 32, the host of claim 33, the antibody construct of claims 27 or 35 and/or the chemokine construct of claim 28 or 38 for the preparation of a pharmaceutical composition for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder.
41. Use of the polynucleotide of claim 29 or 30, the vector of claim 31 or 32, the host of claim 33, the antibody construct of claims 27 or 35 and/or the chemokine construct of claim 28 or 38 for the preparation of a pharmaceutical composition for eliminating latently infected cells, wherein said cells are infected with a primate immunodeficiency virus.
42. The method of claim 39 or the use of claim 40, wherein said immunological dis-

order is selected from the group consisting of autoimmune diseases, allergic diseases, skin diseases, inflammatory diseases, diabetes, graft versus host disease and transplant rejections.

43. The method or the use of claim 42, wherein said autoimmune disease is selected from the group consisting of multiple sclerosis, type I diabetes, and rheumatoid arthritis.
44. The method or the use of claim 42, wherein said skin disease is selected from the group consisting of skin inflammation, atopic dermatitis and psoriasis.
45. The method or the use of claim 42, wherein said inflammatory disease is selected from the group consisting of inflammatory joint diseases, inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases.
46. The method or the use of claim 45, wherein said inflammatory joint disease is (chronic) arthritis.
47. The method of claim 39 or the use of claim 41, wherein said infection with a primate immunodeficiency virus is a HIV-1 infection.
48. The method or the use of claim 47, wherein said composition is to be administered in combination with antiviral agents and/or in combination with drugs to be employed in AIDS management.
49. The method or the use of claims 47, wherein said drugs to be employed in AIDS management comprises drugs employed in HAART.
50. A kit comprising the polynucleotide of claim 29 or 30, the vector of claim 31 or 32, the host of claim 33, the antibody construct of claims 27 or 35 and/or the chemokine construct of claim 28 or 38.

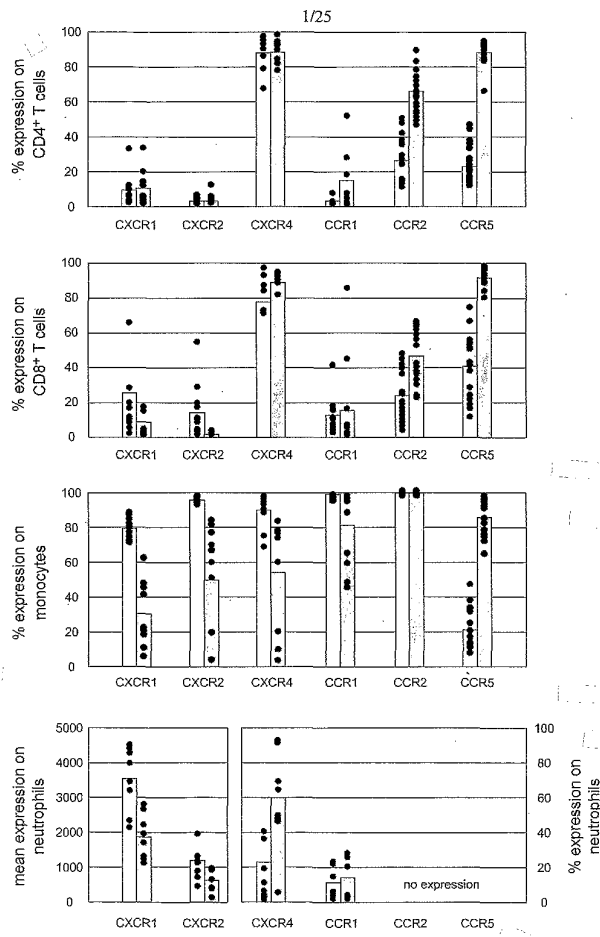


Fig. 1

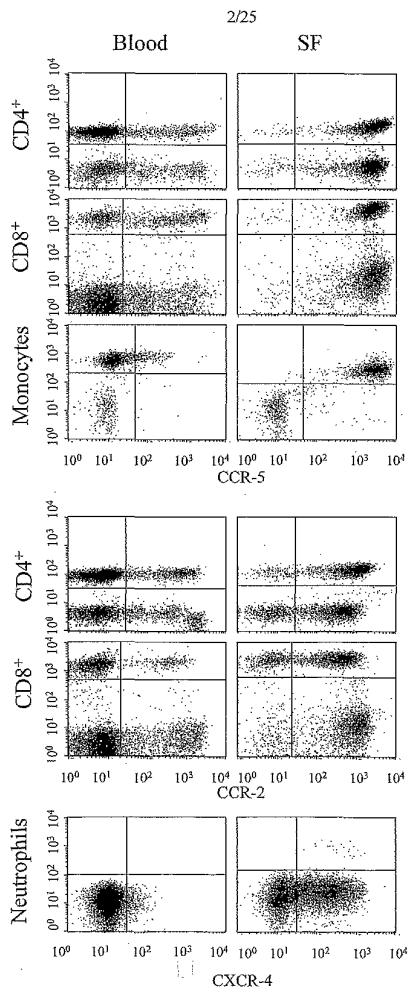


Fig. 2

3/25

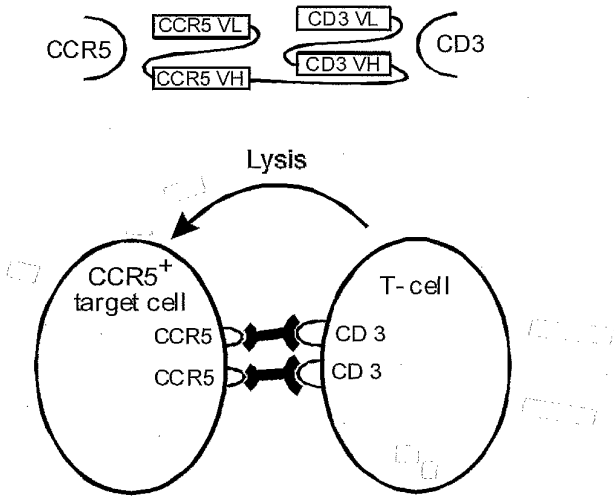


Fig. 3

4/25

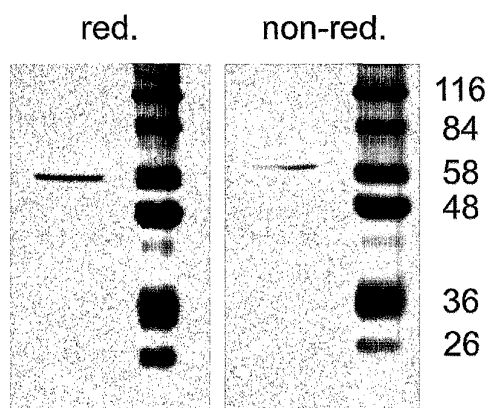


Fig. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

5/25

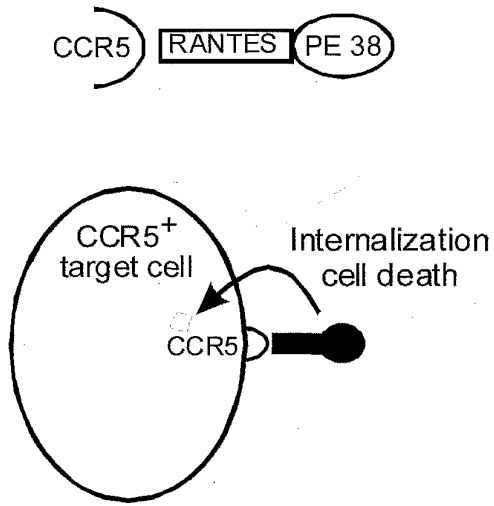


Fig. 5

6/25

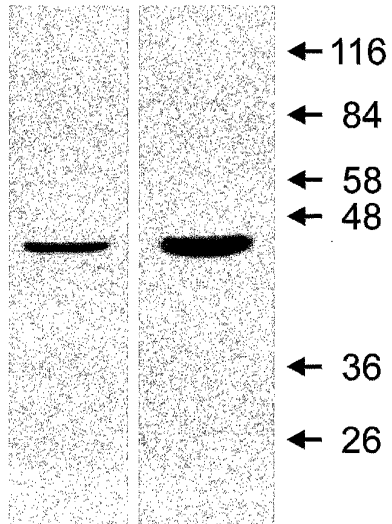


Fig. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

7/25

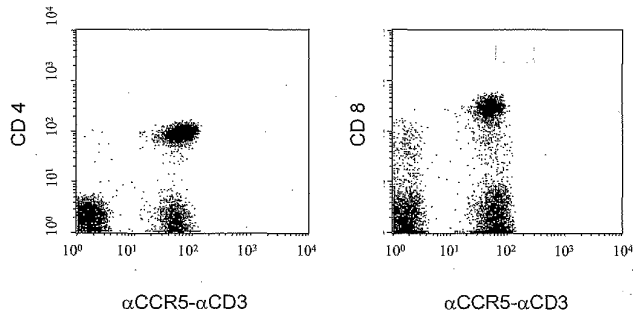


Fig. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

8/25

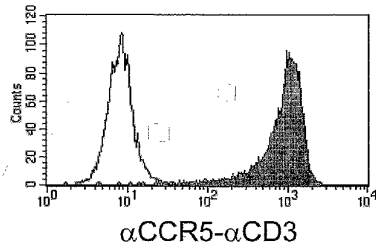


Fig. 8

9/25

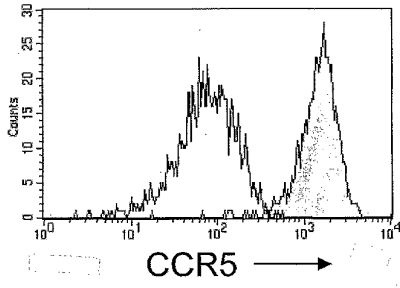


Fig. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

10/25

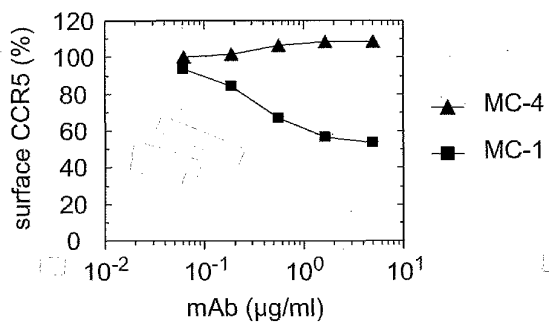


Fig. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

11/25

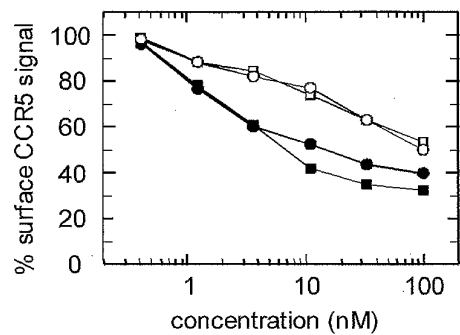


Fig. 11

12/25

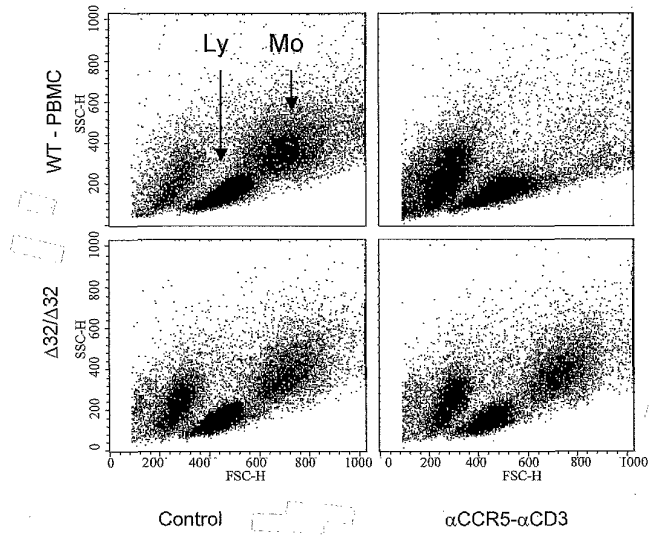


Fig. 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

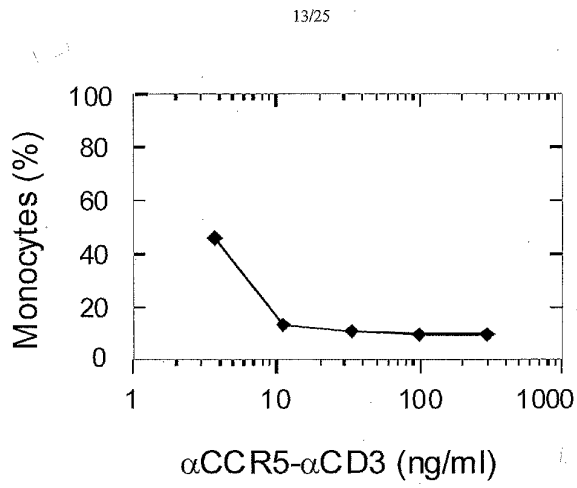


Fig. 13

14/25

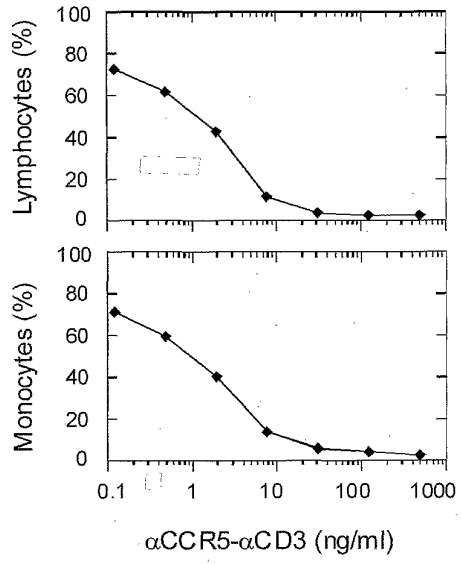


Fig. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

15/25

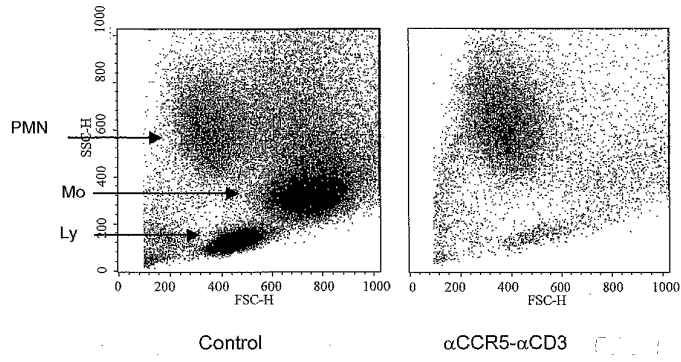


Fig. 15

16/25

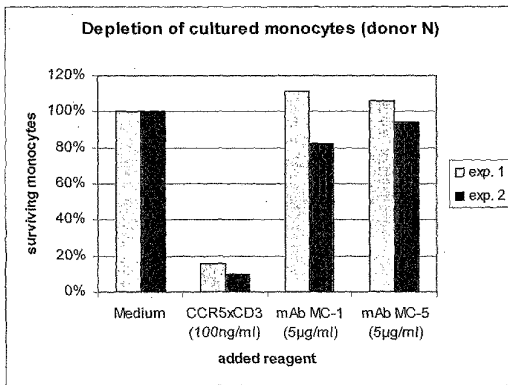
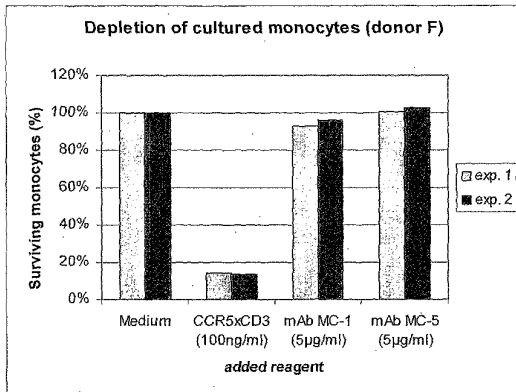


Fig. 16

17/25

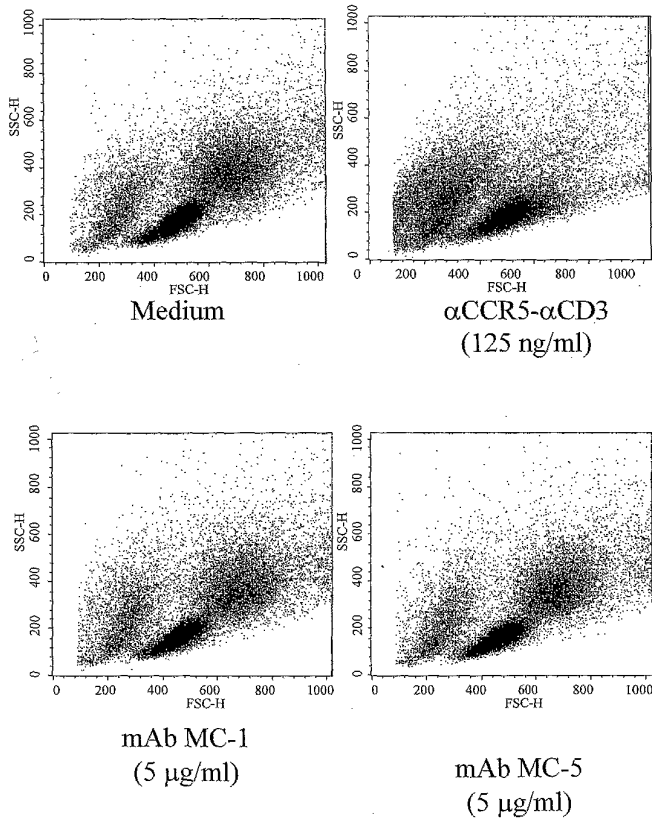


Fig. 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

18/25

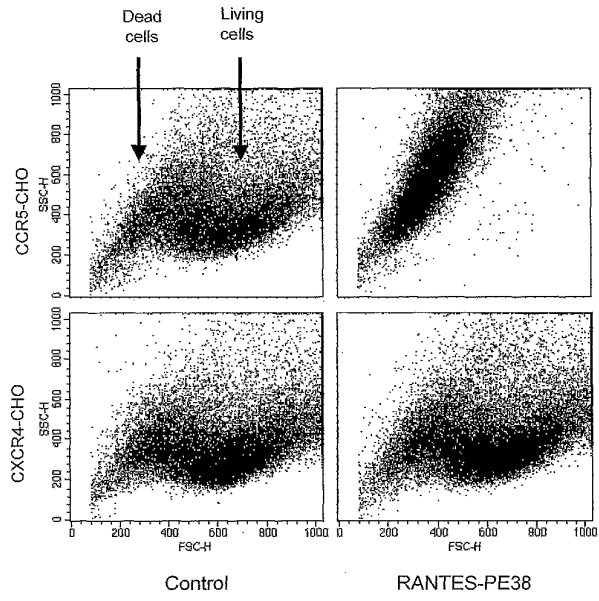


Fig. 18

19/25

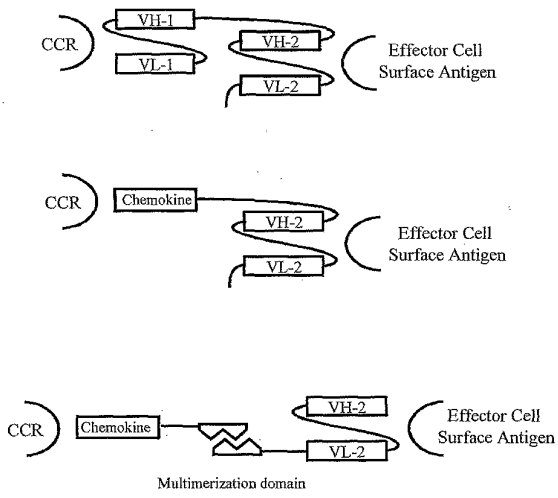


Fig. 19 A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

20/25

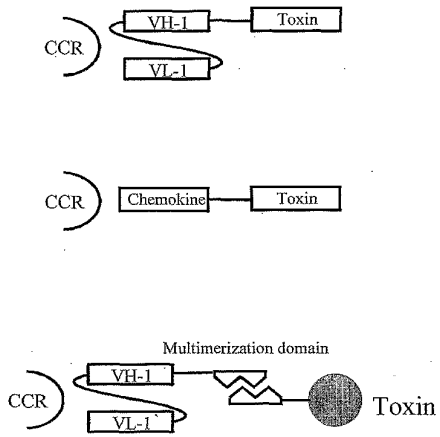


Fig. 19 B

21/25

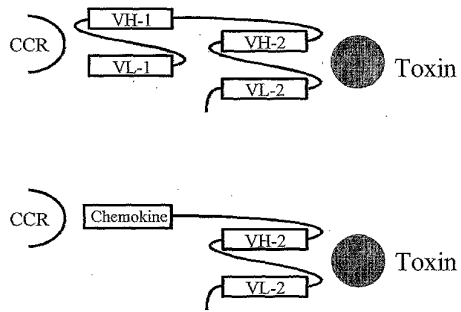


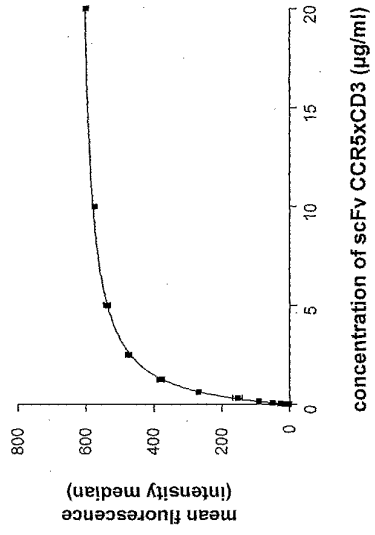
Fig. 19C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

22/25

Fig. 20

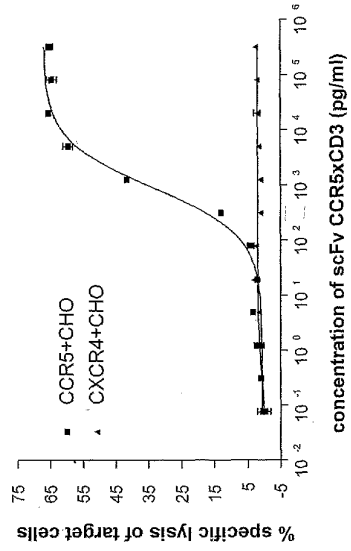
Binding of scFv CCR5xCD3 to CCR5+CHO cells



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

23/25

Fig. 21
Cytotoxic activity of scFv CCR5xCD3
with primary CD3+ T cells

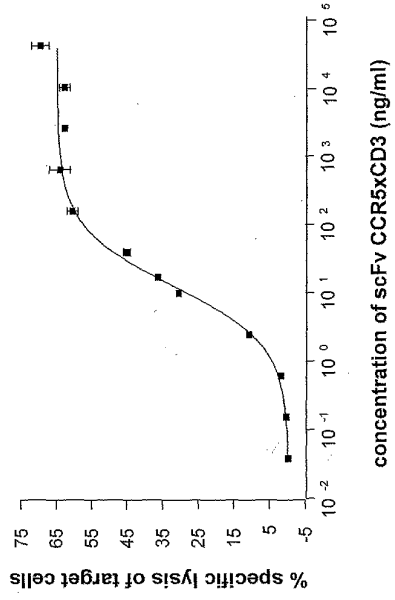


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

24/25

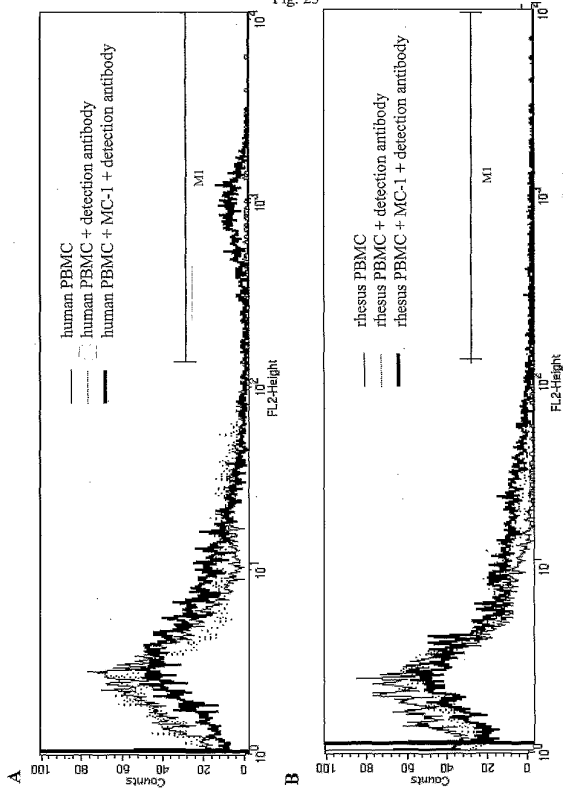
Fig.22

Cytotoxic activity of scFv CCR5xCD3
with T cell line CB15



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

25/25
Fig. 23



SEQUENCE LISTING

<110> MACK, Matthias

<120> Antibody and/or chemokine constructs and their use in immunological disorders

<130> E 2411 PCT

<140>

<141>

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1
ggacaagat ggattatcaa gtgtc 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2
ctgtgtatga aaactaagcc atgtg 25

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3
ttaccagat ctcaaaaaga ag 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

2

<400> 4
ggagaaggac aatgtttag g 21

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5
gacattcagc tgacccagtc tcca 24

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6
gtttatttc cagottggtc cc 22

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7
accatgggat ggagctgtgt catgotott 29

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
tgaggagacg gtgacctgg tcocctggcc ccag 34

<210> 9
<211> 322
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

3

```

<400> 9
gac att cag ctg acc cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac agt tat 96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct caa ctc ctg gtc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

tat aat gca aaa acc tta aca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt ggg aat tat ttc tgt caa cat cat tat gat act cct cgg 288
Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Phe Cys Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggt gga ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 322
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```

```

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

```

```

<400> 10
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Phe Cys Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```

4

<210> 11
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(276)

<400> 11
 gcc tcc cta tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga 48
 Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg
 1 5 10 15
 gca agt gag aat att tac agt tat tta gca tgg tat cag cag aaa cag 96
 Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln
 20 25 30
 gga aaa tct cct caa ctc ctg gtc tat aat gca aaa acc tta aca gaa 144
 Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu
 35 40 45
 ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag ttt tct 192
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser
 50 55 60
 ctg aag atc aac agc ctg cag cct gaa gat ttt ggg aat tat ttc tgt 240
 Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Phe Cys
 65 70 75 80
 caa cat cat tat gat act cct cgg acg ttc ggt gga 276
 Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly
 85 90

<210> 12
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 12
 Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg
 1 5 10 15
 Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln
 20 25 30
 Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu
 35 40 45
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Phe Cys
 65 70 75 80
 Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly
 85 90

5

<210> 13
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(414)

<400> 13
 atg gga tgg agc tgt gtc atg ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Cys Val Met Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct ggg agg gtg agg 96
 Val His Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Gly Arg Val Arg
 20 25 30
 cct gga gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac tcc ttc 144
 Pro.Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 acc agt tac tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ett 192
 Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg att ggc atg att cat cct tcc gat agt gaa act agg tta aat 240
 Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn
 65 70 75 80
 cag aag ttc aac gac agg gcc aca ttg act gtt gac aaa tat tcc agc 288
 Gln Lys Phe Asn Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser
 85 90 95
 aca gcc tat ata caa ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct ccg gtc 336
 Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 tat tac tgt gca aga gga gaa tat tac tac ggt ata ttt gac tac tgg 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Tyr Tyr Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125
 ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 414
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 14
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 14
 Met Gly Trp Ser Cys Val Met Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Gly Arg Val Arg
 20 25 30

7

tac ggt ata ttt gac ta 354
 Tyr Gly Ile Phe Asp
 115

<210> 16
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 16
 Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
 1 5 10 15
 Pro Gly Ala Gly Arg Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
 20 25 30
 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys
 35 40 45
 Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser
 50 55 60
 Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Asn Asp Arg Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Ile Phe Asp
 115

<210> 17
 <211> 1545
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(1545)

<400> 17
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acactcc 57
 gat atc gtg ctg acc cag tct coa gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 105
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac agt tat 153
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct caa ctc ctg gtc 201
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

8

	35	40	45	
tat aat gca aaa acc tta aca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc				249
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly				
50		55	60	
agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cag cct				297
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro				
65	70	75	80	
gaa gat ttt ggg aat tat ttc tgt caa cat cat tat gat act cct cgg				345
Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Phe Cys Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg				
85	90	95		
acg ttc ggt gga ggg acc aag ctc gag atc aaa ggt ggt ggt ggt tct				393
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser				
100	105	110		
ggc ggc ggc ggc tcc ggt ggt ggt tct cag gtc caa ctg cag cag				441
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln				
115	120	125		
cct ggg gct ggg agg gtg agg cct gga gct tca gtg aag ctg tcc tgc				489
Pro Gly Ala Ser Arg Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys				
130	135	140		
aag gct tct ggc tac tcc ttc acc agt tac tgg atg aac tgg gtg aag				537
Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys				
145	150	155	160	
cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att ggc atg att cat cct tcc				585
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser				
165	170	175		
gat agt gaa act agg tta aat cag aag ttc aac gac agg gcc aca ttg				633
Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Asn Asp Arg Ala Thr Leu				
180	185	190		
act gtt gac aaa tat tcc agc aca gcc tat ata caa ctc agc agc ccg				681
Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Pro				
195	200	205		
aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga gga gaa tat tac				729
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Tyr Tyr				
210	215	220		
tac ggt ata ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc				777
Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser				
225	230	235	240	
tcc gga ggt ggt gga tcc gat atc aaa ctg cag cag tca ggg gct gaa				825
Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Ser Gly Ala Glu				
245	250	255		
ctg gca aga cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag act tct ggc				873
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly				
260	265	270		
tac acc ttt act agg tac acg atg cac tgg gta aaa cag agg cct gga				921
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly				

9

275	280	285	
cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aat cct agc cgt ggt tat act			969
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr			
290	295	300	
aat tac aat cag aag ttc aag gac aag gcc aca ttg act aca gac aaa			1017
Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys			
305	310	315	320
tcc tcc agc aca gcc tac atg caa ctg agc agc ctg aca tct gag gac			1065
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
	325	330	335
tct gca gtc tat tac tgt gca aga tat tat gat gat cat tac tgc ett			1113
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu			
	340	345	350
gac tac tgg cgc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gtc gaa ggt			1161
Asp Tyr Trp Arg Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly			
	355	360	365
gga agt gga ggt tct ggt gga agt gga ggt tca ggt gga gtc gac gac			1209
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp			
	370	375	380
att cag ctg acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cca ggg gag			1257
Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu			
	385	390	400
aag gtc acc atg acc tgc aga gcc agt tca agt gta agt tac atg aac			1305
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn			
	405	410	415
tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc ccc aaa aga tgg att tat gac			1353
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp			
	420	425	430
aca tcc aaa gtg gct tct gga gtc cct tat cgc ttc agt ggc agt ggg			1401
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
	435	440	445
tct ggg acc tca tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa gat			1449
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp			
	450	455	460
got gcc act tat tac tgc caa cag tgg agt agt aac ccg ctc acg ttc			1497
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe			
	465	470	475
gga gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cat cat cac cat cat tag			1545
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His			
	485	490	495

<210> 18
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

10

```

<400> 18
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Phe Cys Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
115 120 125
Pro Gly Ala Gly Arg Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
130 135 140
Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys
145 150 155 160
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser
165 170 175
Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Asn Asp Arg Ala Thr Leu
180 185 190
Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Tyr Tyr
210 215 220
Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
225 230 235 240
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
245 250 255
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly
260 265 270
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
275 280 285
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
290 295 300
Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
305 310 315 320
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
325 330 335
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu
340 345 350
Asp Tyr Trp Arg Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly
355 360 365
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp
370 375 380
Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
385 390 395 400
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
405 410 415
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
420 425 430
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
435 440 445
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
450 455 460
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe

```


12

aag tgc tcc aac cca gca gtc gtc ttt gtc acc cga aag aac cgc caa 144
Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln
35 40 45

gtg tgt gcc aac cca gag aag aaa tgg gtt cgg gag tac atc aac tct 192
Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser
50 55 60

ttg gag atg tcc gga ggc ggc agc ctg gcc gcg ctg acc gcg cac cag 240
Leu Glu Met Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln
65 70 75 80

get tgc cac ctg ccg ctg gag act ttc acc cgt cat cgc cag ccg cgc 288
Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg
85 90 95

ggc tgg gaa caa ctg gag cag tgc ggc tat ccg gty cag cgg ctg gtc 336
Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val
100 105 110

ggc ctg tac ctg gcg gcg cgg ctg tgg tgg aac cag gtc gac cag gty 384
Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val
115 120 125

atc cgc aac gcc ctg gcc agc ccc gcc agc gcc gcc gac ctg gcc gaa 432
Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu
130 135 140

gcg atc cgc gag cag ccg gag cag gcc cgt ctg gcc ctg acc ctg gcc 480
Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
145 150 155 160

gcc gcc gag agc gag cgc ttc gtc cgg cag gcc acc gcc aac gac gag 528
Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
165 170 175

gcc gcc gcg gcc aac gcc ccg gcg gac agc gcc gac gcc ctg ctg gag 576
Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu
180 185 190

cgc aac tat ccc act gcc gcg gag ttc ctg gcc gac gcc gcc gac gtc 624
Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val
195 200 205

agc ttc agc acc cgc gcc acg cag aac tgg acg gty gag cgg ctg ctg 672
Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
210 215 220

cag gcg cac cgc caa ctg gag gag cgc gcc tat gty ttc gtc gcc tac 720
Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
225 230 235 240

cac gcc acc ttc ctg gaa gcg gcg caa agc atc gtc ttc gcc ggg gty 768
His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
245 250 255

cgc gcg cgc agc cag gac ctg gac gcg atc tgg cgc ggt ttc tat atc 816
Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
260 265 270

13

gcc gcc gat ccg gcg ctg gcc tac gcc tac gcc cag gac cag gaa ccc 864
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 275 280 285

gac gca cgc gcc cgg atc cgc aac ggt gcc ctg ctg cgg gtc tat gtg 912
 Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 290 295 300

ccg cgc tcg agc ctg ccg gcc ttc tac cgc acc agc ctg acc ctg gcc 960
 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 305 310 315 320

gcg ccg gag gcg gcg gcc gag gtc gaa cgg ctg atc gcc cat ccg ctg 1008
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 325 330 335

ccg ctg cgc ctg gac gcc atc acc gcc ccc gag gag gaa gcc ggg cgc 1056
 Pro Leu Arg Ser Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg
 340 345 350

ctg gag acc att ctc gcc tgg ccg ctg gcc gag cgc acc gtg gtg att 1104
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
 355 360 365

ccc tcg gcg atc ccc acc gac ccg cgc aac gtc gcc gcc gac ctc gac 1152
 Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
 370 375 380

ccg tcc agc atc ccc gac aag gaa cag gcg atc agc gcc ctg ccg gac 1200
 Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
 385 390 395 400

tac gcc agc cag ccc gcc aaa ccg ccg cgc gag gac ctg aag taa 1245
 Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 405 410 415

<210> 24
 <211> 414
 <212> FRT
 <213> Mus sp.

<400> 24
 Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala
 1 5 10 15
 Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly
 20 25 30
 Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln
 35 40 45
 Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser
 50 55 60
 Leu Glu Met Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln
 65 70 75 80
 Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg
 85 90 95
 Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val
 100 105 110
 Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val
 115 120 125
 Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu

14

130 135 140
 Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
 165 170 175
 Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu
 180 185 190
 Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val
 195 200 205
 Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 210 215 220
 Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 225 230 235 240
 His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 245 250 255
 Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
 260 265 270
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 275 280 285
 Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 290 295 300
 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 305 310 315 320
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 325 330 335
 Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg
 340 345 350
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
 355 360 365
 Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp
 370 375 380
 Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp
 385 390 395 400
 Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 405 410

<210> 25
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 25
 gat atc aaa ctg cag cag tca ggg gct gaa ctg gca aga cct ggg gcc 48
 Asp ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag atg tcc tgc aag act tot ggc tac acc ttt act agg tac 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 acg atg cac tgg gta asa cag agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg att 144
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

15

gga tac att aat cct agc cgt ggt tat act aat tac aat cag aag ttc 192
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

aag gac aag gcc aca ttg act aca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg caa ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aga tat tat gat gat cat tac tgc ctt gac tac tgg cgc caa gcc 336
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Arg Gln Gly
 100 105 110

acc act ctc aca gtc tcc tca gtc gaa 363
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu
 115 120

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 26
 Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Arg Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu
 115 120

<210> 27
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS

16

<222> (1)..(324)

<400> 27
 gtc gac gac att cag ctg acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct 48
 Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 cca ggg gag aag gtc acc atg acc tgc aga gcc agt tca agt gta agt 96
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 tac atg aac tgg tac cag cag aag tca gcc acc tcc ccc aaa aga tgg 144
 Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
 35 40 45
 att tat gac aca tcc aaa gtg gct tct gga gtc cct tat cgc ttc agt 192
 Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser
 50 55 60
 ggc agt ggg tct ggg acc tca tac tct ctc aca atc agc agc atg gag 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80
 gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc caa cag tgg agt agt aac cgg 288
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
 85 90 95
 ctc acg ttc gga gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 324
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 28
 Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

17

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: peptide

<400> 29
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: peptide

<400> 30
Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: peptide

<400> 31
Gln His His Tyr Asp Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: peptide

<400> 32
Tyr Trp Met Asn
1

<210> 33
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: peptide

18

<400> 33
Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15
Asn Asp Arg

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: peptide

<400> 34
Gly Glu Tyr Tyr Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5 10

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/020615 A3

(51) International Patent Classification: A61K 39/395, 38/19, 47/48, C12N 15/12, 15/13, 15/62, 15/79, C15N 5/10, C07K 16/28, 19/00, A61K 31/7088, A61P 17/00, 19/00, 31/18, 37/06

(74) Agent: VOSSIUS & PARTNER, Siebenstrasse 4, 81675 Munich (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/10433

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date:
10 September 2001 (10.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00119694.8 8 September 2000 (08.09.2000) TP
09/948.004 5 September 2001 (05.09.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent: (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): MICROMET AG [DE/DE]; Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried/Planegg (DE).

Published:
— with international search report(72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MACK, Matthias [DE/DE]; Horenansstrasse 26a, 80636 München (DE); SCHLOENDORFF, Detlef [DE/DE]; Kaiserplatz 2, 80803 München (DE); SPRING, Michael [DE/DE]; Biberweg 2, 82223 Eichenau (DE).(88) Date of publication of the international search report:
25 July 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIBODY AND/OR CHEMOKINE CONSTRUCTS WHICH BIND TO A CHEMOKINE RECEPTOR AND THEIR USE IN IMMUNOLOGICAL DISORDERS

WO 02/020615 A3

(57) Abstract: The present invention relates to the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition for the elimination of cells which are latently infected with a primate immunodeficiency virus. In addition, the present invention provides for the use of an antibody and/or chemokine construct which binds to a chemokine receptor for the preparation of a pharmaceutical composition of the treatment, prevention and/or alleviation of inflammatory renal diseases, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis, skin diseases, diabetes or transplant rejection. Furthermore, the invention relates to antibody constructs and/or chemokine constructs wherein said antibody construct comprises a binding site of chemokine receptor 5 and a binding site for CD3 and wherein said chemokine construct comprises RANTES and a toxin. The invention also describes polynucleotides encoding said antibody- or chemokine constructs, and vectors and hosts comprising said nucleic acid molecules. Additionally, the present invention relates to compositions comprising said antibody constructs, chemokine constructs, polynucleotides, vectors and/or hosts. Preferably said composition is a pharmaceutical composition. Described is also the use of antibody constructs, the chemokine constructs, the polynucleotides, the hosts and/or the vectors of the preparation of a pharmaceutical composition and methods for treating, preventing and/or alleviating an immunological disorder or for eliminating latently infected cells, wherein said cells are infected with a primate immunodeficiency virus, like HIV-1. Furthermore, the invention provides for a kit comprising the compounds of the invention.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/10433
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/295 A61K38/19 A61K47/48 C12N15/12 C12N15/13 C12N15/62 C12N15/79 C12N5/10 C07K16/28 C07K19/00 A61K31/7088 A61P17/00 A61P19/00 A61P31/18 A61P37/06 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indicatives, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. MACK ET AL.: "Depletion of CCR5+ cells with bispecific antibodies and chemokine-toxins: A new strategy to treat inflammatory renal diseases." KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH, vol. 23, no. 3-5, 2000, page 242 XPO01073509 Basel, Switzerland abstract 86	4-13, 16-40, 42,45,50
X	WO 00 04926 A (J. McDONALD ET AL.) 3 February 2000 (2000-02-03) claims --- -/--	1-6, 17-24, 28,50
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art **A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 April 2002		06/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2580 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/10433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 //C07K14/52,C07K14/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L. WU ET AL.: "Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: Multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 186, no. 8, 20 October 1997 (1997-10-20), pages 1373-1381, XP002060734 Tokyo, Japan abstract --- -/--	1-3,5,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*G* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 April 2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentaan 2 NL - 2280 HV Tilburg Tel: (+31-70) 340-2040, TX: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/10433

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. MACK ET AL.: "Aminoxyptane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infection." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 187, no. 8, 20 April 1998 (1998-04-20), pages 1215-1224, XP000916445 tokyo, japan cited in the application abstract page 1216, right-hand column, line 34 - line 42	10
A	M. MACK ET AL.: "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 92, 18 July 1995 (1995-07-18), pages 7021-7025, XP000566333 Washington, DC, USA cited in the application abstract figure 1	7-13
P, X	H. BRUHL ET AL.: "Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 166, no. 4, 15 February 2001 (2001-02-15), pages 2420-2426, XP002197003 Baltimore, MD, USA the whole document	1-13, 16-50
P, X	WO 00 53633 A (M. MACK ET AL.) 14 September 2000 (2000-09-14) the whole document	4-13, 16-40, 42-46,50

3

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/JP 01 /0433

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 7-13, 16, 26, 27 (all completely), 1-6, 20, 22, 29-50 (all partially)

Construct which binds to a chemokine receptor, wherein the chemokine receptor is CCR5, and wherein said construct is a bispecific single-chain antibody with specificities for CCR5 and CD3. Also polynucleotides, vectors, host cells and their therapeutic uses.

2. Claims: 17-19, 21, 23-25, 28 (completely), 1-6, 20, 22, 29-50 (all partially)

Construct which binds to a chemokine receptor, wherein the chemokine receptor is CCR5, and wherein said construct is the RANTES-PE38 fusion protein. Also polynucleotides, vectors, host cells, and their therapeutic uses.

International Application No. PCT/EP 01 /0433

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 14,15

Present claims 1-13, 16-50 relate to an extremely large number of possible compositions. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compositions claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the composition comprising a bispecific single-chain antibody with specificities for CCR5 and CD3, and to the composition comprising the RANTES-PE38 fusion protein, both of which have been disclosed in the present examples of underlying application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/10433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0004926 A	03-02-2000	AU 4891899 A	14-02-2000
		WO 0004926 A2	03-02-2000
		EP 1098664 A2	16-05-2001
WO 0053633 A	14-09-2000	AU 4104700 A	28-09-2000
		CN 1345336 T	17-04-2002
		CZ 20013270 A3	13-02-2002
		WO 0053633 A2	14-09-2000
		EP 1161456 A2	12-12-2001
		NO 20014346 A	27-09-2001
		TR 200102779 T2	21-03-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/52	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/715	C 0 7 K 14/52	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 14/715	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 5/00 A	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 マック, マチアス

ドイツ連邦共和国 8 0 6 3 6 ミュンヘン, ホレマンストラッセ 2 6 アー

(72) 発明者 シュロエンドルフ, デトレフ

ドイツ連邦共和国 8 0 8 0 3 ミュンヘン, カイザープラッツ 2

(72) 発明者 スプリング, ミカエル

ドイツ連邦共和国 8 2 2 2 3 アイシェナウ, ビバーヴェグ 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA41 CA04 DA02 DA05 DA11 EA02 EA03
EA04 FA02 GA01 GA11 HA03
4B064 AG02 AG27 CA10 CA19 CA20 CE12 DA01
4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 BA01 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 AA14 AA17 AA20 BA01 BA02 BA08 BA20
BA23 BA35 BA41 BA44 CA62 MA02 MA05 NA01 NA14 NA15
ZA022 ZA662 ZA812 ZA892 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZC352
ZC552
4C085 AA13 AA14 BB11 CC01 CC02 CC21 CC23 EE01 GG01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA66 NA01 NA05 NA14 NA15

	ZA02	ZA66	ZA81	ZA89	ZA96	ZB07	ZB11	ZB13	ZB15	ZC35
	ZC55									
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA01	DA76	EA20	FA72
	FA74	GA26								