

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6141834号
(P6141834)

(45) 発行日 平成29年6月7日 (2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月12日 (2017.5.12)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 29/00 I O I

A 6 1 P 19/02

A 6 1 P 37/06

請求項の数 19 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-514023 (P2014-514023)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月4日 (2012.6.4)
 (65) 公表番号 特表2014-523408 (P2014-523408A)
 (43) 公表日 平成26年9月11日 (2014.9.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/060524
 (87) 国際公開番号 W02012/168199
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日 (2012.12.13)
 審査請求日 平成27年6月3日 (2015.6.3)
 (31) 優先権主張番号 11168787.7
 (32) 優先日 平成23年6月6日 (2011.6.6)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/505,137
 (32) 優先日 平成23年7月7日 (2011.7.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509091848
 ノヴォ ノルディスク アー/エス
 デンマーク、ハウスヴェア ディーケー
 2880、ノヴォ アレー
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 スティーファン・セーン
 デンマーク・DK-2880・ハウスヴェ
 ア・ノヴォ・アレー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトC5aRの第2細胞外ループに結合し、C5aRに対するC5aの結合を有意に阻害するかまたは低減する抗体であって、

a. i. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、前記CDR1、CDR2、およびCDR3の配列は、それぞれ配列番号1、2、および3と同一であり、重鎖の可変領域が、配列番号4に対し、少なくとも90%同一である配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、前記CDR1、CDR2、およびCDR3の配列は、それぞれ配列番号5、6、および7と同一であり、軽鎖の可変領域が、配列番号8に対し、少なくとも90%同一である配列を含む、

抗体、ならびに、

b. i. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、前記CDR1、CDR2、およびCDR3の配列は、それぞれ配列番号9、10、および11と同一であり、重鎖の可変領域が、配列番号12に対し、少なくとも90%同一である配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、前記CDR1、CDR2、およびCDR3の配列は、それぞれ配列番号13、14、および15と同一であり、軽鎖の可変領域が、配列番号16に対し、少なくとも90%同一である配列を含む、

抗体、

から選択される、抗体。

【請求項 2】

重鎖の可変領域が、配列番号4または12に対し、少なくとも94%同一である配列を含み、および、軽鎖の可変領域が、配列番号8または16に対し、少なくとも94%同一である配列を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

a. i. 重鎖の可変領域が、配列番号4に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域が、配列番号8に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む、

抗体、

b. i. 重鎖の可変領域が、配列番号12に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域が、配列番号16に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む、

抗体、ならびに、

c. i. 重鎖の可変領域が、配列番号39に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域が、配列番号40に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む、

抗体

から選択される、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項 4】

a. i. 重鎖の可変領域が、配列番号4によって同定される配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域が、配列番号8によって同定される配列を含む、

抗体、

b. i. 重鎖の可変領域が、配列番号12によって同定される配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域が、配列番号16によって同定される配列を含む、

抗体、ならびに、

c. i. 重鎖の可変領域が、配列番号39によって同定される配列を含み、および、

ii. 軽鎖の可変領域が、配列番号40によって同定される配列を含む、

抗体、

から選択される、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

好中球における競合リガンド結合アッセイによって測定された親和性が、0.80nM未満である、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

10nM未満のIC50で、SPAアッセイにおいて、C5aと置き換え可能である、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

インビトロで、ヒト好中球の移動を有意に阻害する、請求項1から6のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

10nMのC5a存在下および抗体非存在下で観察したインビトロでのヒト好中球の移動のレベルと比較して、20%未満まで該移動を低下させる、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

IgG1アイソタイプのFcヒンジ領域を有する、請求項1から8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

IgG1アイソタイプのFc領域を有する、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

Fc領域が、配列番号33によって規定されるIgG1参照配列と比較して、1つまたは複数のFcレセプターに対する低減した結合親和性を有する、請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項12】

インビトロでADCC、CDCおよび/または好中球の食作用を有意に誘導しない、請求項1から11のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項13】

Fc領域が、AA 328～334における1～5個のアミノ酸置換を含むIgG1 Fc変異体であり、IgG1 Fc参照配列が配列番号33において規定される、請求項1から12のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項14】

Fc領域が、点変異の以下の群

a.N297Qならびに/または

b.L234AおよびL235Eならびに/または

c.G236RおよびL328Rならびに/または

d.N297Q、L234AおよびL235Eならびに/または

e.N297Q、L234A、L235EおよびG237Aならびに/または

f.L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S

のうち1つまたは複数を含むIgG1(配列番号33)である、請求項1から13のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項15】

Fc領域が、以下の点変異：L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331Sを含むIgG1(配列番号33)である、請求項1から14のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項16】

ヒト抗体である、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項17】

処置における使用のための、請求項1から16のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項18】

免疫疾患または免疫障害の処置のための、請求項1から17のいずれか一項に記載の抗体を含む医薬組成物。

30

【請求項19】

前記免疫疾患または免疫障害が、リウマチ様関節炎(RA)、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、炎症性腸疾患(IBD)または過敏性腸症候群から選択される、請求項18に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療抗体の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

40

補体タンパク質C3～C5のそれぞれのタンパク質分解は、アナフィラトキシンと呼ばれる、シグナル伝達分子を有するアミノ末端カチオン性断片を生じる。これらのうち最も強力な、C5aは、広い応答を引き起こす。白血球の辺縁趨向および浸潤などの炎症性応答の成分、粒子結合タンパク質分解酵素の放出、活性酸素および窒素誘導ラジカルの産生、血流の変化および毛細血管漏出を、平滑筋を収縮させる能力と共に考慮すると、C5a分子は、「完全型」炎症促進性媒介因子である。ナノモル濃度未満からナノモル濃度レベルにおいて、C5a分子は、全ての骨髄性系統(好中球、好酸球および好塩基球、マクロファージおよび単球)の走化性を誘発し、プロスタグランジンおよび循環する白血球によって著しく増強された血管浸透性を引き起こす。より高いナノモル濃度は、NADPHオキシダーゼの脱顆粒および活性化を引き起こす。この生物活性の幅は、他の炎症性媒介因子とは対照的であ

50

る。C5aは、リウマチ様関節炎、乾癬、敗血症、再灌流傷害および成人呼吸窮迫症候群を含む種々の障害の病因に関与する(GerardおよびGerard、1994年;MurdochおよびFinn、2000年)。

【0003】

C5aの活性は、C5aのそのレセプター(C5aR)への結合によって媒介される。C5aRは、7回膜貫通型Gタンパク質共役レセプターのファミリーに属する。C5aRは、C5aに対し約1nMのK_dを有する親和性の高いレセプターであり、白血球を含む多くの異なる細胞型に位置する。1細胞あたりのレセプターの数は、非常に多く、1つの白血球あたり200,000部位までである。レセプターの生物学的活性化が、結合を飽和させる範囲にわたって起こる。

【0004】

C5aR構造は、7回膜貫通型レセプターファミリーに適合し、細胞外のN末端に、細胞内ループと細胞外ループが交互するヘリックス間ドメインによって接続される7つの膜貫通ヘリックスが続き、細胞内C末端ドメインで終結する。C5aRは、延びたN末端細胞外ドメインを含む。この大きなN末端ドメインは、代表的なGタンパク質共役レセプターであり、IL-8およびfMet-Leu-Phe(FMLP)レセプターファミリーを含むペプチドに結合する。

【0005】

C5aRアンタゴニストによるC5a応答の阻害は、他の補体成分に影響を及ぼすことなく、C5aによって媒介される急性炎症性応答を軽減する。この目的を達成するために、C5aRペプチドアンタゴニストおよび抗C5aレセプター抗体は、以前に記載されている(Watanabeら、1995年;Pellasら、1998年;Kontetisら、1994年;Kanekoら、1995年;Morganら、1993年)。例えば、W095/00164は、C5aRのN末端ペプチド(9~29残基)に対する抗体を記載する。W003/062278もまた、C5aRに対する抗体を記載する。これらのマウス抗体3つは、7F3、6C12および12D4と呼ばれた。これらの抗体は、C5aのそのレセプターに対する結合の遮断、インビトロでの好中球のC5aを対象とする移動の阻止、および動物モデルにおける炎症の予防において非常に効果的であるなどの、優れた性質を有することが示された。慢性疾患を制御するために、この抗体を数ヶ月または数年にわたって、連続的に投与する必要がある場合がある。しかし、マウス抗体を投与することによる1つの不利益は、ヒト免疫系が、マウス抗体に対する自身の抗体を産生してしまい得ることである(HAMA応答)。HAMA応答は、マウス抗体を血液から迅速に除去し、それによってマウス抗体がその標的に結合することを防ぐことによって中和し得る。HAMA応答の発生を回避するために採られている1つの戦略は、非エピトープ結合領域における多くの「外来性」残基をヒト配列と置き換えることにより、マウス抗体を「ヒト化」することである。

【0006】

ヒト化手順の主な問題は、抗原についての親和性の喪失であり(Jonesら、1986年)、いくつかの場合、特に抗原がタンパク質である場合には、10倍以上の欠如であった(Verhoeyenら、1988年)。親和性の喪失は、無論、非常に望ましからざるものである。少なくとも、より多くのヒト化抗体が患者に注射される必要があれば、より高い費用がかかり、より大きな副作用の危険性があることを意味する。より重要なことには、低減した親和性を有する抗体は、より乏しい生物学的機能(例えば、補体溶解、抗体依存性細胞毒性またはウイルス中和)を有する場合がある。これらの困難さに直面しても、抗ヒトC5aR抗体の成功裏なヒト化は、W02009/103113に記載されている。

【0007】

患者に抗体を投与することからの何らかの望まざる副反応の危険性をさらに最小化するために、何年にもわたって、複数の戦略が開発されてきた。これには、「完全な」ヒト抗体の産生による、患者における抗薬物抗体の形成の可能性を低下させることも含まれる。

【0008】

現在も、治療適用に好適な抗体の同定は、困難な仕事である。したがって、診断方法および/または治療方法において使用され得る代替のおよび/または改善されたC5aRアンタゴニストは、高い関心の余地を有する。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】W095/00164

【特許文献2】W003/062278

【特許文献3】W02009/103113

【特許文献4】W02005040219

【特許文献5】米国特許出願公開第20050238646号

【特許文献6】米国特許出願公開第20020161201号

【特許文献7】W02011/104381

【特許文献8】W02011/147921

【特許文献9】W02008/022390

【特許文献10】W02010/000864

【特許文献11】米国特許第4568649号

【特許文献12】W008030564

【特許文献13】W02005060739

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning、John Wiley and Sons(1984年)

【非特許文献2】J.Sambrookら、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989年)

【非特許文献3】T.A.Brown(編)、Essential Molecular Biology:A Practical Approach、第1巻および第2巻、IRL Press(1991年)

【非特許文献4】D.M.GloverおよびB.D.Hames(編)、DNA Cloning:A Practical Approach、第1～4巻、IRL Press(1995年および1996年)

【非特許文献5】F.M.Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、Green e Pub.AssociatesおよびWiley-Interscience(1988年、現在までの全ての最新情報を含む)

【非特許文献6】Ed HarlowおよびDavid Lane(編)Antibodies:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory、(1988年)

【非特許文献7】J.E.Coliganら(編)Current Protocols in Immunology、John Wiley and Sons(現在までの全ての最新情報を含む)

【非特許文献8】Birdら、Science 1988年;242:42S～426

【非特許文献9】Hustonら、PNAS 1988年;85:5879～5883

【非特許文献10】IIIら、Protein Eng 1997年;10:949～57

【非特許文献11】HolligerおよびHudson、Nat Biotechnol 2005年;2S:1126～1136

【非特許文献12】Kabatら、(1991年)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S.Department of Health and Human Services、NIH Publication No.91～3242

【非特許文献13】ChothiaおよびLesk、J.Mol.Biol、1987年;196:901～917

【非特許文献14】Caceciら(Byte 9:340～362、1984年)

【非特許文献15】WongおよびLohman(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90、5428～5432、1993年)

【非特許文献16】Computational Molecular Biology、Lesk,A.M.編、Oxford University Press、New York、1988年

【非特許文献17】Biocomputing:Informatics and Genome Projects、Smith,D.W.編、Academic Press、New York、1993年

【非特許文献18】Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin,A.M.およびGriffin,H.G.編、Humana Press、New Jersey、1994年

【非特許文献19】Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje,G.、Academic Press、1987年

10

20

30

40

50

【非特許文献20】Sequence Analysis Primer、Gribskov,M.およびDevereux、J.編、M.S tockton Press、New York、1991年

【非特許文献21】Carilloら、SIAM J.Applied Math.48、1073(1988年)

【非特許文献22】Devereuxら、Nucl.Acid.Res.12、387(1984年)

【非特許文献23】Altschulら、J.Mol.Biol.215、403～410(1990年)

【非特許文献24】Dayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、vol.5、補遺3(1978年)

【非特許文献25】Henikoffら、Proc.Natl.Acad.Sci USA 89、10915～10919(1992年)

【非特許文献26】Needlemanら、J.Mol.Biol.48、443～453(1970年)

【非特許文献27】Leeら、Nat.Biotechnol,2006年;10月;24(10):1279～1284

【非特許文献28】Chu SY、Vostiar I、Karki Sら;Mol Immunol、2008年、45(15):3926～3933

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、抗C5aR抗体ならびに診断方法および/または治療方法のためのその使用に関する。本発明者らは、既に記載されている抗C5aR抗体よりもいくつかの面で機能的に優れている、ヒトC5aRに結合する一連の抗体を同定した。

【0012】

本明細書中で実証されるように、本発明者らは、ヒトC5aR(hC5aR)に結合し、hC5aRに対するhC5aの結合に置き換わり、hC5a媒介型好中球移動を阻害し得る、一連のヒト抗体を同定した。加えて、本発明者らは、これらの抗hC5aR抗体のうちの1つのフレームワーク領域に存在する非ヒト残基を、この抗体の効力に影響を及ぼすことなく、ヒト生殖細胞系残基と成功裏に変換した。

20

【0013】

さらに、Fc領域を変えることにより、本発明者らは、インビトロで食作用、ADCCまたはCDCを誘導しない抗hC5aR抗体を確立した。本発明の詳細は、例示的实施形態の開示から明らかとなる。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の一態様は、重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む抗体であって、前記CDR配列が、以下の配列の群のうちの1つを含む抗体に関する：配列番号1、2および3、配列番号9、10および11、配列番号17、18および19、配列番号25、26および27または1、2または3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列のそれぞれの変異体。

30

【0015】

本発明の一態様は、軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む抗体であって、前記CDR配列が、以下の配列の群のうちの1つを含む抗体に関する：配列番号5、6および7、配列番号13、14および15、配列番号21、22および23、配列番号29、30および31または1、2または3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列のそれぞれの変異体。

40

【0016】

本発明の一態様は、hC5aRに特異的に結合するヒト抗体であって、好ましくは、hC5aRの第2細胞外ループに結合するヒト抗体に関する。

【0017】

本発明の一態様は、hC5aRに特異的に結合する抗体であって、抗体Fc領域が、この抗体がFcガンマレセプター(Fc γ R)相互作用を介して食作用、ADCCおよび/またはCDCを誘導する能力を低下するよう、IgG1、IgG2、IgG4およびIgG4/G2参照配列と比較して改変されている抗体に関する。特定の実施形態において、抗体Fc領域は、IgG1であり、さらに特定の実施形態において、Fc領域は、以下の点突然変異の群の1つまたは複数を含む：

50

I)N297Qならびに/または
II)L234AおよびL235Eならびに/または
III)G236RおよびL328Rならびに/または
IV)N297Q、L234AおよびL235Eならびに/または
V)N297Q、L234A、L235EおよびG237Aならびに/または
VI)L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S。

【0018】

さらなる態様において、本発明は、免疫疾患または免疫障害の処置のための、本発明による抗体の使用に関する。

【0019】

さらなる態様において、本発明は、必要とする対象に、治療量の本明細書中に記載される抗体を投与することを含む、疾患または障害の処置のための方法に関する。

【0020】

別の態様において、本発明は、対象において障害を処置するかまたは予防する方法を提供し、この方法は、対象に、本発明の抗体を投与することを含む。1つの実施形態において、この障害は、自己免疫疾患などの、免疫病理学的障害である。

【0021】

本発明のさらなる態様および実施形態は、例示的实施形態を含む本明細書中の開示から明らかになる。本開示から、本発明は、本明細書中で特徴付けられるとおりの種々の利点および利益を有する新規な治療抗体を提供していることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本出願において単離され特徴付けられたモノクローナル抗体の選択の可変領域のアラインメントを示す図である。

【図2】マウスおよびヒトのC5aRキメラに対する抗体の選択の結合特異性を示す図である。32F3A6、35F12A2および35F32A3のキメラヒト/マウスC5aRに対する結合を、Ref Ab Qの結合と比較する。キメラレセプターを模式的に示す。ヒトおよびマウスのC5aRに由来する領域を細線および太線で、それぞれ示す。

【図3】1つの抗体由来の可変領域と、近接の生殖細胞系ヒト抗体可変重鎖および軽鎖の配列とのアラインメントを示す図である。「/」は、配列中の破断、例えばV、DまたはJのセグメント間の破断を示す。

【図4】K/BxN-hC5aR-KO/KI血清移入モデルにおける炎症確立の5日間後、0.5、1.5または10mg/kgの単回負荷量(矢印)を腹腔内に与えられ、その後それぞれ0.25、0.5または2mg/kgの9回の日用量を与えられた、3つの処置群についての臨床スコアを示す図である。エラーバーは、±SDを表す。対照は、IgG1 3G12を与えられた。

【図5】乾癬性関節炎および骨関節炎(対照)の患者の滑液におけるC5aタンパク質発現を示す図である。C5aレベルは、乾癬性関節炎の患者群において有意に高かった($p=0.001$; Mann-Whitney)。

【図6】クローン病および潰瘍性大腸炎におけるC5aRタンパク質発現の半定量的分析を示す図である。C5aRタンパク質発現を、免疫組織学によって調査し、GraphPad Prism 5においてDunnの試験後多重比較を用いたKruskal-Wallis試験によって分析し、そして $P<0.05$ を有意と考えた。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0023】

(定義)

他に示されない限り、組換えタンパク質、本発明において使用される細胞培養および免疫学的技術は、標準の手順であり、当業者に周知である。このような技術は、以下のような情報源の文献を通して記載され、そして説明されている: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984年)、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989年)、T.A. Brown(

10

20

30

40

50

編)、Essential Molecular Biology:A Practical Approach、第1巻および第2巻、IRL Press(1991年)、D.M.GloverおよびB.D.Hames(編)、DNA Cloning:A Practical Approach、第1～4巻、IRL Press(1995年および1996年)、ならびにF.M.Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub.AssociatesおよびWiley-Interscience(1988年、現在までの全ての最新情報を含む)、Ed HarlowおよびDavid Lane(編)Antibodies:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory、(1988年)、ならびにJ.E.Coliganら(編)Current Protocols in Immunology、John Wiley and Sons(現在までの全ての最新情報を含む)。

【0024】

本明細書中で使用される場合、「C5aレセプター」、「C5aR」、「C5aRI」または「ヒトC5aR」およびこれらの変形は、ヒト補体成分5レセプター1をいい、これはまた、当該分野でC5aアナフィラトキシンレセプターおよびCD88抗原としても公知である。C5aRIは、7回膜貫通型Gタンパク質共役レセプターのファミリーに属し、C5aに結合する(GerardおよびGerard、1991年)。ヒトC5aRのアミノ酸配列の例は、配列番号41番に提示されるが、当業者は、用語「C5aR」によって包含されるこの分子の天然に存在する対立遺伝子変異型が存在することを理解する。ヒトC5aRの変異型ドメインは、以下のように規定される：

アミノ酸1～37:細胞外ドメイン(N末端)、

アミノ酸38～61:膜貫通ドメイン、

アミノ酸62～71:細胞内ドメイン、

アミノ酸72～94:膜貫通ドメイン、

アミノ酸95～110:細胞外ドメイン(細胞外ループ1)、

アミノ酸111～132:膜貫通ドメイン、

アミノ酸133～149:細胞内ドメイン、

アミノ酸150～174:膜貫通ドメイン、

アミノ酸175～206:細胞外ドメイン(細胞外ループ2)、

アミノ酸207～227:膜貫通ドメイン、

アミノ酸228～242:細胞内ドメイン、

アミノ酸243～264:膜貫通ドメイン、

アミノ酸265～283:細胞外ドメイン(細胞外ループ3)、

アミノ酸284～307:膜貫通ドメイン、

アミノ酸308～350:細胞内ドメイン(C末端)。

【0025】

用語「処置」は、本明細書中で使用される場合、それを必要とする任意のヒトまたは他の動物の対象の医学的治療をいう。前記対象は、前記特定の処置の使用が前記ヒトまたは他の動物の対象の健康に対し有益であることを示すと考えられる仮診断または決定診断を与えた医師または獣医師によって身体検査を受けていることが予測される。前記処置のタイミングおよび目的は、対象の健康の現状にしたがって、個体間で変動し得る。したがって、前記処置は、予防処置であっても、緩和処置であっても、対症処置であっても、および/または治癒的処置であってもよい。本発明に関して、予防処置、緩和処置、対症処置、および/または治癒的処置は、本発明の別個の態様を表し得る。

【0026】

医学的処置に関して、本明細書中で使用される用語「対象」は、任意の動物、詳細には哺乳動物、例えば、ヒト、ウマ、雌ウシ、ネコおよびイヌを意味することを企図し、適切な場合、用語「患者」と相互交換可能に使用され得る。好ましくは、対象は、ヒトである。本明細書中で使用される場合、用語「処置すること」、「処置する」、もしくは「処置」およびこれらの変形は、障害の少なくとも1つの症候を軽減するかまたはなくすために十分な治療的有效量の本発明の抗体を投与することを含む。

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「予防すること」、「予防する」もしくは「予防」またはこれらの変形は、対象を疾患の少なくとも1つの症候の発症から守ること、または

10

20

30

40

50

障害の症候の重篤度を軽減することをいう。

【0028】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞を曝露する」は、細胞上にC5aRが存在する場合に、ヒトC5aRに接触/結合できるように、抗体を提供することをいう。

【0029】

用語「有効濃度50%」(「EC50」と略す)は、抗体が標的する分子の所与の効果を50%にする(例えば、ヒトC5aRに対するヒトC5aの結合を阻害する/置き換える)ために必要とされる、本発明の抗体の濃度を表す。当業者は、より低いEC50値は、より強力な抗体に対応することを理解する。

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「阻害する」は、所定の活性の有意な低減を意味し、完全な消滅を意味してもよい。好ましくは、所定の活性は、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、なおより好ましくは少なくとも90%低下するかまたは阻害される。

【0031】

本明細書を通して、語「含む(comprise)」または変形「含む(comprises)」もしくは「含むこと」などは、言及した要素、整数もしくは工程、または要素、整数もしくは工程の群の包含を意味するが、他の要素、整数もしくは工程または要素、整数もしくは工程の群の除外を意味しないことが、理解される。

【0032】

1つの実施形態において、分子は、本質的に、所定の配列からなる。

【0033】

別の実施形態において、分子は、所定の配列からなる。

【0034】

1つの実施形態において、抗体またはDNA配列などの分子は、単離された分子である。用語「単離された抗体」は、その天然の環境の別/他の成分から分離されおよび/もしくは回収されているか、ならびに/またはその天然の環境における成分の混合物から精製されている抗体をいう。

【0035】

本明細書中でいう用語「抗体」は、全抗体および任意の抗原結合断片(すなわち、「抗原結合部分」)またはその一本鎖を含む。全長抗体(または全抗体)は、4本のポリペプチド鎖(ジスルフィド結合によって相互接続する2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖)を含む。各重鎖は、重鎖可変領域(VH)および重鎖定常領域(CH)からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域(VL)および軽鎖定常領域(CL)からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3からなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書中でLCVRまたはVLと略す)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLからなる。VH領域およびVL領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域と、その間に配置されるより保存的なフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域にさらに分けられ得る。

【0036】

各VHおよびVLは、3つのCDRおよび4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順に並ぶ:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織または宿主因子(免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1の成分(C1q)を含む)への結合を媒介し得る。

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、全ての抗体および任意の抗原結合断片(すなわち、「抗原結合部分」)またはその対応する抗原に特異的に結合するその一本鎖を記載するために使用される。抗原結合断片の例としては、以下が挙げられる:Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、F(ab)S、Fv(代表的には、抗体の1本の腕のVLドメインおよびVHドメイン)、一本鎖Fv(scFv;例えば、Birdら、Science 1988年;242:42S~426;およびHustonら、PNAS 1988年;85:5879~5883を参照されたい)、dsFv、Fd(代表的には、VHドメインおよびCH

10

20

30

40

50

1ドメイン)、およびdAb(代表的には、VHドメイン)の断片;VH、VL、VhH、およびV-NARドメイン;1つのVH鎖および1つのVL鎖を含む1価の分子;ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディおよびカッパボディ(例えば、IIIら、Protein Eng 1997年;10:949~57を参照されたい);ラクダIgG;IgNAR;ならびに、1つまたは複数の単離されたCDRまたは機能的パラトープ(この単離されたCDRまたは抗原結合残基もしくはポリペプチドは、互いに会合もしくは連結して、機能的抗体断片を形成し得る)。種々の型の抗体断片が、例えば、HolligerおよびHudson、Nat Biotechnol 2005年;23:1126~1136;WO2005040219および公開された米国特許出願第20050238646号および同第20020161201号に記載され、または概説されている。

【0038】

用語「相補性決定領域」(「CDR」)または「超可変領域」は、本明細書中で使用される場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。CDRは一般的に、軽鎖可変領域ドメインにおけるアミノ酸残基24~34 (L1)、50~56 (L2)および89~97 (L3)、ならびに重鎖可変領域ドメインにおける31~35 (H1)、50~65 (H2)および95~102(H3) (Kabatら、(1991年)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S.Department of Health and Human Services、NIH Publication No.91~3242)ならびに/または「超可変ループ」からの残基(軽鎖可変ドメインにおける残基26~32 (L1)、50~52(L2)ならびに91~96 (L3)および重鎖可変ドメインにおける26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3);ChothiaおよびLesk、J.Mol.Biol、1987年;196:901~917)からなる。代表的には、この領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabatら(前出)に記載される方法によってなされる。「Kabat位置」、「Kabat残基」および「Kabatに従い」などの語句は、本明細書中で、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについてのこの番号付けシステムをいう。Kabat番号付けシステムを用いて、ペプチドの実際の直鎖状のアミノ酸配列は、可変ドメインのフレームワーク(FR)またはCDRを短縮するか、またはこれらに挿入されることに対応する、アミノ酸の減少または追加を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、CDR H2の残基52の後にアミノ酸挿入(Kabatに従い、残基52a、52bおよび52c)ならびに重鎖FR残基82の後に挿入残基(例えば、Kabatに従い、残基82a、82bおよび82cなど)を含み得る。残基のKabat番号付けは、「標準」Kabat番号付け配列と所与の抗体の配列が相同な領域におけるアラインメントによって、その抗体について決定され得る。

【0039】

用語「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書中で定義されるように、CDR内にはないVHまたはVLアミノ酸残基をいう。

【0040】

抗体の断片結晶可能領域(「Fc領域」/「Fcドメイン」)は、Fcレセプターと呼ばれる細胞表面レセプターならびに補体系のいくつかのタンパク質と相互作用する抗体の「尾」領域である。

【0041】

モノクローナル抗体は、代表的には、所望の抗原によって免疫化されているマウス由来の骨髄腫細胞と脾臓細胞とを融合させることによって作製される。ヒトモノクローナル抗体は、ヒト抗体をコードするトランスジェニック動物(例えば、マウスまたは他の好適な種)から得られ得る。あるいは、組換えモノクローナル抗体は、レパートリークローニングまたはファージディスプレイ/酵母ディスプレイと呼ばれる技術を用いて作製され得る。組換え抗体操作は、抗体を作製するために、マウスよりもむしろ、ウイルスまたは酵母の使用を伴う。

【0042】

用語「ヒト化抗体」は、本明細書中で使用される場合、配列、通常、少なくとも最小の、非ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の相補性決定領域(CDR配列)を含む、ヒト/非ヒトキメラ抗体をいう。ヒト化抗体は、したがって、レシピエントの超可変領域からの残基がマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類由来などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域由来の残基によって置き換えられた、所望の特異性、親和性および能力を有する、

10

20

30

40

50

ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。

【0043】

少なくともCDR領域を含むヒト化抗体は、ヒト生殖細胞系由来ではなく、抗体軽鎖および重鎖の遺伝子が、代表的には遺伝子操作によって、異なる種由来の免疫グロブリン可変領域および定常領域の遺伝子によって構築されている場合、「キメラ抗体」と呼ぶことができる。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変セグメントは、ヒト定常セグメントに連結してもよい。

【0044】

用語「ヒト抗体」は、本明細書中で使用される場合、フレームワーク領域およびCDR領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことが企図される。それにもかかわらず、このような抗体は、インビボまたはインビトロでの成熟に起因して起こる突然変異に起因してヒト生殖細胞系配列において見出されないアミノ酸残基を含み得ることに留意されたい。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域もまた、主にヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。それにもかかわらず、本発明のヒト抗体は、(例えば、インビトロのランダム突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボの体細胞突然変異によって)ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る。他方、用語「ヒト抗体」は、本明細書中で使用される場合、CDR配列が別の哺乳動物種(例えば、マウス)の生殖細胞系に由来し、その後ヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体または代替の抗原性結合領域を含むことを企図しない(上のヒト化抗体を参照されたい)。ヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体であってもよい。このようなヒトモノクローナル抗体は、ヒト重鎖トランスジーンおよび軽鎖トランスジーンを含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物(例えば、トランスジェニックマウス)由来の、不死化細胞と融合されたB細胞を含むハイブリドーマによって産生され得る。ヒト抗体はまた、ヒト生殖細胞系配列の選択に基づいて確立された配列ライブラリーからも単離され得、天然および合成の配列多様性によってさらに多様化される。ヒト抗体は、ヒトリンパ球のインビトロ免疫化およびその後のエプスタイン・バーウイルスによるリンパ球の形質転換によって、調製され得る。ヒト抗体の配列は、同定され得、組換え方法によって抗体の産生を可能にする。

【0045】

さらに、ヒト化抗体、ヒト抗体および完全ヒト抗体は、レシピエント抗体において、またはドナー抗体において見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体機能をさらに改善する。

【0046】

用語「抗体誘導体」は、抗体の任意の改変形態、例えば、抗体と別の薬剤または抗体とのコンジュゲートをいう。

【0047】

用語「抗原」は、抗原を認識する抗体を産生するための免疫応答性脊椎動物の免疫化のために、使用される分子実体をいう。本明細書中で、抗原の用語は、より広範に使用され、一般的に、抗体によって特異的に認識される標的分子を含むことを企図し、したがって、抗体を惹起するための免疫化プロセスにおいて使用される分子の断片もしくは模倣物、または免疫化の際のスクリーニングのために使用されるこのような分子、ならびにまた、ファージディスプレイスクリーニングなどの代替方法によって抗体が得られる場合にスクリーニングのために使用される分子を、含む。

【0048】

用語「エピトープ」は、本明細書中で使用される場合、抗体などの「抗原結合ポリペプチド」とその対応する「抗原」との間の分子相互作用の文脈で規定される。一般的に、「エピトープ」は、抗原上の、抗体が特異的に結合する範囲または領域、すなわち、抗体と物理的に接触する範囲または領域をいう。タンパク質エピトープは、抗体との結合に直接的に関与する抗原におけるアミノ酸残基(エピトープの免疫優性成分とも呼ばれる)および結合には直接的に関与しない他のアミノ酸残基、例えばAbによって効果的に遮断される抗

10

20

30

40

50

原のアミノ酸残基(言い換えれば、そのアミノ酸残基は抗体の「溶媒除外表面」および/または「フットプリント」内にある)を含み得る。所与の抗原は、限定しないが、直鎖状ペプチド抗原決定基、ネイティブの(成熟)立体構造において互いに近くに位置する1つまたは複数の不連続アミノ酸からなる立体構造抗原決定基;および抗原に共有結合する分子構造(例えば、炭水化物基)から全体的に、または部分的にのいずれかからなる翻訳後抗原決定基が挙げられ得る、多くの異なるエピトープを含み得る。

【0049】

エピトープの記載および定義が、異なる詳細のレベルで得られる使用されるエピトープマッピング方法に依存するという事実から、同じAg上の異なるAbについてのエピトープの比較は、同様に異なる詳細のレベルで行われ得ることになる。

10

【0050】

用語「結合すること」「特異的に結合すること」および「結合特異性」は、本明細書中で、抗体またはその抗原結合断片の選択性を記載するために使用される。

【0051】

本発明による抗体は、C5aRに特異的に結合し得、このことは、抗体が、他の抗原に対して有意に低い親和性を有することを示し、ここで、有意に低いとは、大きくとも2分の1、または5分の1もしくは10分の1の親和性であり得る。抗体は、さらに、種特異的であり得、例えば、抗体は、ヒトC5aRに特異的に結合するが、マウスC5aRには高い親和性で結合しない。

【0052】

20

用語「結合親和性」は、本明細書中で、2つの分子間、例えば抗体またはその断片と抗原との間の非共有結合的相互作用の強さの尺度として使用される。用語「結合親和性」は、一価性相互作用(固有活性)を記載するために使用される。2つの分子間、例えば抗体またはその断片と抗原との間の、一価性相互作用を通じた結合親和性は、解離定数(K_D)の決定によって定量され得る。次に、 K_D は、複合体形成と解離との動態学の測定によって、例えば、SPR方法によって、決定され得る。一価複合体の会合および解離に対応する速度定数は、それぞれ、会合速度定数 k_a (または k_{on})および解離速度定数 k_d (または k_{off})と呼ばれる。 K_D は、方程式 $K_D = k_d / k_a$ を通して、 k_a および k_d と関わる。

【0053】

さらに、「親和性」は、分子(例えば、抗体)の1つの結合部位とリガンド(例えば、抗原)との間の結合の強度に関する。分子XのリガンドYについての親和性は、解離定数(K_D)によって表され、これは、溶液中のX分子の半分の結合部位を占拠するために必要とされるYの濃度である。より小さい K_D は、より強いまたはより親和性の高い相互作用、ならびにより低い濃度のリガンドが部位を占拠するために必要とされることを示す。同様に、相互作用の特異性は、目的の相互作用(例えば、抗体と抗原との間の特異的相互作用)についての K_D 値の決定および、目的ではない相互作用の K_D 値との比較により、評価され得る。

30

【0054】

代表的には、標的に対する抗体についての K_D は、他の非標的分子(例えば、無関係な物質または環境もしくは対照中に付随する物質)に対する K_D の2分の1、好ましくは5分の1、より好ましくは10分の1である。より好ましくは、 K_D は、50分の1、例えば100分の1、または200分の1である;なおより好ましくは、500分の1、例えば1,000分の1、または10,000分の1である。

40

【0055】

この解離定数の値は、周知の方法によって直接的に決定され得、そして例えば、Caceciら(Byte 9:340~362、1984年)に示されるような方法によって、複合混合物についてすらも、計算され得る。例えば、 K_D は、例えばWongおよびLohman(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90、5428~5432、1993年)によって開示されるような二重フィルターのニトロセルロースフィルター結合アッセイを用いて確立され得る。抗体などのリガンドの標的に対する結合能力を評価するための他の標準的アッセイは、当該分野で公知である。例えば、ELISA、ウエスタンブロット、RIAおよびフローサイトメトリー分析が挙げられる。抗体の結合動態

50

学および結合親和性もまた、当該分野で公知の標準的アッセイ、例えばSPRによって評価され得る。

【 0 0 5 6 】

競合的結合アッセイは、標的への抗体の結合がその標的の別のリガンド(例えば、別の抗体)による標的の結合と比較されるものにおいて実施され得る。50%阻害が起こる濃度は、 K_i として知られる。理想的条件において、 K_i は、 K_D と等しい。 K_i 値は、 K_D よりも低くなることはなく、 K_i の測定は、好都合に、 K_D の上限値を提供することと置き換えられ得る。

【 0 0 5 7 】

当業者が理解するように、「アビディティ」は、2つの分子、例えば抗体と抗原との間の相互作用の強さ全体に関する。アビディティは、相互作用の親和性および結合価の両方に依存する。

【 0 0 5 8 】

所与の抗体の機能性を決定するためのさらなるアッセイとしては、所与の抗原および抗体結合の効果に特異的な細胞ベースのアッセイが挙げられ得る。

【 0 0 5 9 】

用語「同一性」は、当該分野で公知であるとおり、2つ以上のポリペプチドの配列を比較することによって決定される、配列の間の関係性をいう。当該分野において、「同一性」はまた、一連の2つ以上のアミノ酸残基の間の適合の数によって決定される、ポリペプチドの間の配列関連性の程度をも意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のより小さい方と、(もしあれば)特定の数学的モデルまたはコンピュータープログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によって対処されるギャップアラインメントとの間の同一な適合の百分率を測定する。関連のポリペプチドの同一性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない:Computational Molecular Biology、Lesk,A.M.編、Oxford University Press、New York、1988年;Biocomputing:Informatics and Genome Projects、Smith,D.W.編、Academic Press、New York、1993年;Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin,A.M.およびGriffin,H.G.編、Humana Press、New Jersey、1994年;Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje,G.、Academic Press、1987年;Sequence Analysis Primer、Gribskov,M.およびDevereux、J.編、M.Stockton Press、New York、1991年;ならびにCarilloら、SIAM J.Applied Math.48、1073(1988年)。

【 0 0 6 0 】

同一性を決定するための好ましい方法は、試験する配列間の最も大きな適合を与えるために設計される。同一性を決定する方法は、公に利用可能なコンピュータープログラムにおいて記載される。2つの配列の間の同一性を決定するための好ましいコンピュータープログラム方法としては、GCGプログラムパッケージが挙げられ、これは、GAP(Devereuxら、Nucl.Acid.Res.12、387(1984年);Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(Altschulら、J.Mol.Biol.215、403~410(1990年))を含む。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI)および他の供給源(BLAST Manual、Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda、Md.20894;Altschulら、前出)から公に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【 0 0 6 1 】

例えば、コンピューターアルゴリズムGAP(Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.)を用い、配列同一性百分率が決定される2つのポリペプチドは、そのそれぞれのアミノ酸の最適適合のために並べられる(アルゴリズムによって決定される「一致距離」)。ギャップ開始ペナルティ($3 \times$ 平均対角として計算される;「平均対角」は、使用される比較マトリクスの対角の平均である;「対角」は、特定の比較マトリクスによる各完全アミノ酸適合に割り当てられたスコアまたは数である)およびギャップ伸長ペナルティ(通常、ギャップ開始ペナルティを{分数(1/10)}倍したもの)、ならびにPAM 250もしくはBLOSUM 62などの比較マトリクスが、アルゴリズムと組み合わせて使用される

。標準的比較マトリクス(PAM 250比較マトリクスについてはDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure, vol.5、補遺3(1978年)を; BLOSUM 62比較マトリクスについてはHenikoffら、Proc.Natl.Acad.Sci USA 89、10915 ~ 10919(1992年)を参照されたい)もまた、アルゴリズムによって使用される。

【0062】

ペプチド配列比較のために好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる:アルゴリズム:Needlemanら、J.Mol.Biol.48、443 ~ 453(1970年);比較マトリックス:BLOSUM 62、Henikoffら、PNAS USA 89、10915 ~ 10919(1992年)より;ギャップペナルティ:12、ギャップ長ペナルティ:4、類似の閾値:0。

【0063】

GAPプログラムは、上記のパラメータによって有用である。上記のパラメータは、ペプチド比較のためのGAPアルゴリズムを用いたデフォルトパラメータ(末端ギャップについてはペナルティを伴わない)である。

【0064】

「保存的アミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性もしくは電荷に影響が僅かしかないか、または全くない、1つのアミノ酸残基の別の残基との置換を含み得る。これは、以下のアミノ酸の群によって例示され、ここでは、1つのアミノ酸の、同じ群における異なるアミノ酸との置換が、保存的置換と考えられる:親水性:Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr。脂肪族:Val、Ile、Leu、Met。塩基性:Lys、Arg、His。芳香族:Phe、Tyr、Trp。さらに、任意の残基が、しばしばアラニンと置換され得る。

【0065】

さらに、所望される場合、非天然のアミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、本発明の抗体および/または免疫グロブリン鎖への置換または付加として、導入され得る。このようなアミノ酸としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:一般的アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、6-アミノヘキサン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトラリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ベータ-アラニン、フルオロ-アミノ酸、ベータ-メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、および一般的なアミノ酸アナログ。

【0066】

本発明の抗体および/または免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列突然変異体は、本発明の核酸内に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、または所望のポリペプチドのインビトロ合成によって、調製され得る。このような突然変異体としては、例えば、アミノ酸配列内の残基の欠失、挿入または置換が挙げられる。最終ポリペプチド産物が、所望の特性を有するという条件で、欠失、挿入および置換の組合せを行って最終構築物に到達することができる。突然変異した(変化した)ポリペプチドは、当該分野で公知の任意の技術を用いて調製され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、インビトロ突然変異誘発に供され得る。このようなインビトロ突然変異誘発技術は、好適なベクター内へポリヌクレオチドをサブクローニングすること、このベクターをE.coli XL-1 red(Stratagene)などの「ミューテーター」株内に形質転換し、好適な世代数の間、形質転換した細菌を繁殖させることを含む。突然変異/変化したDNA由来の産物は、本明細書中で記載される技術を用いて容易にスクリーニングされ、これらはレセプター結合活性および/または阻害活性を有するか否かを決定し得る。

【0067】

アミノ酸配列突然変異体を設計する際、突然変異部位の位置および突然変異の性質は、改変する特徴に依存する。突然変異の部位は、個別に、または連続して、例えば、(1)保存的アミノ酸選択によって最初の置換を行い、次いで、達成される結果に基づいてより変化の大きな選択による置換を行うこと、(2)標的残基を欠失すること、または(3)配置され

10

20

30

40

50

る部位に隣接して他の残基を挿入することによって、改変され得る。

【0068】

アミノ酸配列欠失は、一般に、約1～15残基、より好ましくは約1～10残基および代表的には1～5の連続する残基の範囲である。

【0069】

(説明)

本発明者らは、生物学的治療薬および特定の抗体の機能性および効力についての適切性のいくつかの面を同定しており、本発明の主な領域は、C5aRに結合するC5a結合の阻害による炎症性疾患の処置のための抗体である。

【0070】

本発明の一態様は、その機能性ならびに/またはCDR、重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列、ならびに/またはFcドメインの配列によって特徴付けられる、一連の抗体の1つまたは複数に関する。

【0071】

1つの実施形態において、抗体は、標準的抗体ドメインおよび領域を含む全長抗体である。

【0072】

1つの実施形態において、抗体は、抗体断片であり、このような断片は、従来の組換え技術またはタンパク質操作技術を用いて得られ得る。本発明の抗体断片は、短縮によって、例えば、ポリペプチドのN末端および/またはC末端からの1つまたは複数のアミノ酸の除去によって、作製され得る。断片はまた、1つまたは複数の内部欠失によって作製され得る。本発明の抗体は、本発明がベースとする抗体の任意の1つの断片であってもよく、またはこれを含んでもよい。本発明の抗体は、これらの抗体またはその変異体の1つの抗原結合部位であってもよく、またはこれを含んでもよい。例えば、本発明の抗体は、これらの抗体またはその変異体の1つのFab断片であってもよく、または、これらの抗体またはその変異体に由来する一本鎖抗体であってもよい。

【0073】

本発明の抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ブタまたは非ヒト霊長類などの哺乳動物種を含む異なる種由来であってもよい。抗体は、げっ歯類抗体であってもよく、より詳細には、マウス抗体であってもよい。あるいは、抗体は、非哺乳動物種、例えばニワトリ由来であってもよい。抗体は、さらに、ヒト化抗体またはヒト抗体であってもよい。

【0074】

本発明の抗体は、本明細書中で記載されるC5aRに結合するための本発明の別の抗体と競合する能力を有し得る。このような交差競合抗体は、標準的結合アッセイにおいて本発明の公知の抗体と交差競合するその能力に基づいて同定され得る。このような交差競合は、同一のエピトープ、重複するエピトープまたは類似のエピトープに結合する2種の抗体を示唆し得る。

【0075】

(ヒト抗体)

本明細書中の実施例において記載されるように、本発明者らは、ヒト免疫グロブリン生殖細胞系遺伝子座を含むトランスジェニックマウスに由来する一連の抗C5aR抗体を同定している。抗体は、モノクローナルハイブリドーマ抗体として単離され、結合特性が評価される。述べたとおり、C5aRは、7回膜貫通型GPCRであり、ネイティブの立体構造を保持する可溶性形態は、産生不可能である。hC5aRにhC5aが結合することを遮断するヒト抗体を惹起するために、トランスジェニックマウスを、ネイティブのhC5aRを発現する細胞で免疫化した。しかし、遮断抗体は、得ることが非常に困難であり、所望の遮断特性を有するヒト抗体が同定されるまでに、本発明者らによって、32回の融合が実施された。35回の融合および100,000を超えるハイブリドーマ上清のスクリーニングから、計11の遮断抗体が得られた。

【0076】

さらに、hC5aRの性質に起因して、標準的Biacore分析によって抗体の親和性を決定することは不可能であり、したがって、アッセイは、IC50およびEC50値が実施例2および実施例7において記載されるとおりに決定される機能的hC5aR依存性読み出しに基づいて確立された。

【0077】

1つの態様において、本発明は、C5aRに結合するヒト抗体に関し、特異的にhC5aRに結合する抗体(例えば、hC5aRへの結合が他の種由来のC5aR、詳細にはマウスC5aRなどへの結合よりも強い抗体)がさらに好ましい。1つの実施形態において、C5aRの第2細胞外ループに結合する抗体が好ましく、ヒトC5aRの第2ループに結合する抗体がより好ましい。1つの実施形態において、抗体は、ヒトC5aRの第2細胞外ループに結合するが、マウスC5aRの第2細胞外ループには結合しない。さらなる実施形態において、本発明による抗体は、ネイティブの立体構造でのみC5aRの第2細胞外ループに結合し得る。

10

【0078】

抗C5aR抗体の機能性は、C5aRへのC5aの結合を有意に阻害または低減する前記抗体の能力に依存する。

【0079】

1つの実施形態において、本発明は、C5aRに結合するヒト抗体、または本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体に関し、ここで、前記抗体は、C5aRへのC5aの結合を有意に阻害可能であるかまたは低減可能である。これは、本明細書実施例2において記載されるように、IC50値が決定され得る置換アッセイ(SPA)によって決定され得る。table1(表1)から明らかであるように、11の抗体が単離され、そして50nM未満のIC50濃度を有することが記載される。本発明のさらなる実施形態において、抗体は、50nM未満のIC50、例えば40nM未満、例えば30nM未満、例えば20nM未満、例えば10nM未満、例えば5nM未満もしくははなお4nM未満、または3nM未満もしくははなお2.5nMもしくはは2.0nM未満のIC50で、SPAアッセイにおいてhC5aを置き換えることが可能である。

20

【0080】

さらなるアッセイにおいて、ヒト好中球のC5a依存性移動を阻害する抗C5aR抗体の能力が評価され、同定されたヒト抗体のいくつかは、以前に記載されたC5aR抗体(WO2009/103113からのQ)よりも強力なC5a媒介型好中球移動のインヒビターであることが見出された。1つの実施形態において、したがって、本発明は、本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体またはC5aRに結合するヒト抗体に関し、個々で、前記抗体は、ヒト好中球の移動を有意に阻害可能である。1つの実施形態において、抗体は、10nM C5aの存在下および抗C5aR抗体非存在下で観察された移動のレベルと比較して、移動を50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満にまで阻害する。1つのこのような実施形態において、移動は、10nM C5aの存在下および抗体非存在下での30分後に観察された移動のレベルと比較して、10nM C5aの存在下および抗体存在下での30分後に測定される。あるいは、抗体が好中球移動を阻害する能力は、同じ設定に基づくIC50値を用いて表され得る。1つのこのような実施形態において、IC50は2.5 µg/ml未満、例えば2.5 µg/ml未満、例えば1.5 µg/ml未満、例えば1.2 µg/ml未満またははなお1.0 µg/ml未満である。

30

【0081】

標準的Biacore分析の代替として、hC5aR抗体の機能性は、実施例7において記載される好中球における競合結合アッセイによって決定され得る。この機能性は、抗体の親和性と呼ばれ、競合リガンド結合アッセイによって測定されるが、相互作用のアビディティの測定値とも考えられ得る。1つの実施形態において、本発明は、本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体、またはC5aRに結合するヒト抗体に関し、ここで、好中球に対する競合リガンド結合アッセイによって測定されるこの抗体の親和性またはアビディティは、0.80nM、0.70nM、0.60nM未満、例えば0.50nM、0.45nM、0.40nMまたは0.35nM未満である。

40

【0082】

抗体を特徴付けるためのさらなる選択肢は、カルシウムフラックスアッセイを用いて開

50

発され、これは、実施例7で記載されたものと同様に、エキソピボでのC5a誘導好中球活性化を阻害する抗体の能力を測定する。さらなる実施形態において、本発明は、本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体、またはC5aRに結合するヒト抗体に関し、ここで、カルシウムフラックスアッセイにおいて決定されたIC50は、7.0 µg/ml未満、例えば5.0 µg/ml未満、例えば2.5 µg/ml未満である。

【0083】

さらなるエキソピボアッセイが、CD11bおよびCD62L発現などの二次効果に基づいてC5a誘導好中球成熟を阻害するかまたは中和する抗体の能力を決定するために使用され得る。CD11bおよびCD62Lは、C5a/C5aR相互作用による活性化の際にそれぞれ上方制御および下方制御される、好中球の成熟マーカーである。

10

【0084】

CD11b上方制御アッセイにおける効果は、決定された。1つの実施形態において、本発明は、本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体、またはC5aRに結合するヒト抗体に関し、ここで、CD11b上方制御アッセイにおいて決定されるIC50は、3.5 µg/ml未満、例えば3.0 µg/ml未満、例えば2.5 µg/ml未満、例えば2.0 µg/ml未満または例えば1.5 µg/mlもしくはなお1.0 µg/ml未満である。

【0085】

同様に、CD62L下方制御アッセイにおける抗体の効果は、決定された。1つの実施形態において、本発明は、本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体、またはC5aRに結合するヒト抗体に関し、ここで、CD62L下方制御アッセイにおいて決定されるIC50は、1.8 µg/ml未満、例えば1.5 µg/ml未満、例えば1.2 µg/ml未満またはなお1.0 µg/ml未満である。

20

【0086】

4つのモノクローナル抗体が、可変領域における配列および詳細にはCDR配列を決定する配列決定のために選択された。配列のアラインメントは、図1に提示され、配列は、同様に、添付の配列表にも含まれる。

【0087】

配列表は、単離された抗体に関する以下の配列を含む:

配列番号1~3:Vh 35F32A3 CDR 1~3

配列番号4:Vh 35F32A3

配列番号5~7:VI 35F32A3 CDR 1~3

配列番号8:VI 35F32A3

同様に、配列番号9~16は、32F3A6を記載する。

同様に、配列番号17~24は、35F12A2を記載する。

同様に、配列番号25~32は、35F24A3を記載する。

【0088】

(可変領域またはCDR配列によって規定される抗体)

したがって本発明による抗体は、CDR配列、重鎖および軽鎖の可変領域の配列ならびに抗体の機能性を変更することなく当業者が行い得るこれに対する僅かな改変に基づいて規定され得る。これは、CDR配列のそれぞれにおける1つまたは複数、例えば1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基のアミノ酸置換、欠失または挿入を含む。

30

40

【0089】

1つの態様において、本発明は、CDR領域の配列によって規定されるC5aRに結合する抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、以下の群から選択されるCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む:

a) その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号1、2および3;ならびに

b) その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号9、10および11;ならびに

c) その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ

50

酸を含む配列番号17、18および19;ならびに

d)その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号25、26および27。

【0090】

1つの実施形態において、本発明は、CDR領域の配列によって規定されるC5aRに結合する抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、

ここで、前記CDR1配列は、配列番号1、9、17、25を含むか、または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換される前記配列のうちの1つを含み、

ここで、前記CDR2配列は、配列番号2、10、18、26を含むか、または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換される前記配列のうちの1つを含み、

ここで、前記CDR3配列は、配列番号3、11、19、27を含むか、または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換される前記の配列のうちの1つを含む。

【0091】

1つの実施形態において、本発明は、CDR領域の配列によって規定されるC5aRに結合する抗体に関し、ここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、以下の群から選択されるCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む：

a)その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号5、6および7;ならびに

b)その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号13、14および15;ならびに

c)その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号21、22および23;ならびに

d)その0、1、2または3つが、異なるアミノ酸残基と置換される1、2または3個のアミノ酸を含む配列番号29、30および31。

【0092】

1つの態様において、本発明は、CDR領域の配列によって規定されるC5aRに結合する抗体に関し、ここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、

ここで、前記CDR1配列は、配列番号5、13、21、29を含むか、または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換される前記配列のうちの1つを含み、

ここで、前記CDR2配列は、配列番号6、14、22、30を含むか、または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換される前記配列のうちの1つを含み、

ここで、前記CDR3配列は、配列番号7、15、23、31を含むか、または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換される前記配列のうちの1つを含む。

【0093】

1つの実施形態において、本発明は、重鎖の可変領域のCDRが配列番号1、2および3または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含み、可変軽鎖のCDRが配列番号5、6および7または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含む抗体に関する。

【0094】

1つの実施形態において、本発明は、重鎖の可変領域のCDRが配列番号9、10および11または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含み、可変軽鎖のCDRが配列番号13、14および15または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含む抗体に関する。

【0095】

1つの実施形態において、本発明は、重鎖の可変領域のCDRが配列番号17、18および19または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含み、可変軽鎖のCDRが配列番号21、22および23または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含む抗体に関する。

【0096】

1つの実施形態において、本発明は、重鎖の可変領域のCDRが配列番号25、26および27または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含み、そして可変軽鎖のCDRが配列番号29、30および31または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列を含む抗体に関する。

【0097】

したがって本発明の1つの実施形態は、抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、ここで、前記CDR配列は、配列番号1、2および3、配列番号9、10および11、配列番号17、18および19、配列番号25、26および27または1つの配列につき2つまでの置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列、の配列の群のうちの1つを含み、ならびにここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、ここで、前記CDR配列は、配列番号5、6および7、配列番号13、14および15、配列番号21、22および23、配列番号29、30および31または1つの配列につき2つまでの置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列、の配列の群のうちの1つを含む。

10

【0098】

したがって本発明の1つの実施形態は、抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、ここで、前記CDR配列は、配列番号1、2および3、配列番号9、10および11、配列番号17、18および19、配列番号25、26および27または1つの配列につき1つまでの置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列、の配列の群のうちの1つを含み、ならびにここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、ここで、前記CDR配列は、配列番号5、6および7、配列番号13、14および15、配列番号21、22および23、配列番号29、30および31または1つの配列につき1つまでの置換、欠失および/もしくは挿入を有する前記配列、の配列の群のうちの1つを含む。

20

【0099】

したがって本発明の1つの実施形態は、抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、ここで、前記CDR配列は、配列番号1、2および3、配列番号9、10および11、配列番号17、18および19、配列番号25、26および27の配列の群のうちの1つを含み、ならびにここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列を含み、ここで、前記CDR配列は、配列番号5、6および7、配列番号13、14および15、配列番号21、22および23、配列番号29、30および31の配列の群のうちの1つを含む。

30

【0100】

本発明の1つの実施形態は、抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号4、12、20または28に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含む。

【0101】

1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号4、12、20または28に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0102】

本発明の1つの態様は、抗体に関し、ここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号8、16、24または32に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含む。

40

【0103】

1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号8、16、24または32に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0104】

したがって本発明の1つの実施形態は、抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号4、12、20または28に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含むか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号8、16、24または32に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含む。

【0105】

50

1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号4に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含むか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号8に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0106】

1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号12に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含むか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号16に対し少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0107】

したがって1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号20に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含むか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号24に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0108】

よって1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号28に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含むか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号32に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0109】

1つの実施形態において、本発明は抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号39に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含むか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号40に対し、少なくとも96、97、98または99%同一である配列を含む。

【0110】

1つの実施形態において、本発明は抗体であり、ここで、前記抗体の重鎖の可変領域は、配列番号39によって同定されるか、ならびに/または前記抗体の軽鎖の可変領域は、配列番号40によって同定される。

【0111】

本明細書の実施例6および7において記載されるとおり、抗体の成熟の間、フレームワーク領域において自発的な突然変異が起こり得、単離されたモノクローナル抗体の1つの可変領域は、ヒト抗体生殖細胞系配列と比較されて、可変重鎖および可変軽鎖の両方について最も近接するヒト生殖細胞系を同定した。免疫学的反応の危険性を最小限にするために、したがって、フレームワーク領域において点突然変異を導入することにより、ヒト生殖細胞系配列をフレームワーク領域内に有する抗体を構築して、抗体をさらに最適化することを決定した。実験から分かり得るとおり、これは、抗体の機能性に影響しなかった。1つの実施形態において、本発明は、本明細書中上で記載される参照抗体の可変領域に対する配列同一性によって規定される抗体に関し、ここで、前記抗体の重鎖および/または軽鎖の可変領域は、フレームワーク領域内に1つまたは複数の突然変異を含む。本発明にしたがって、1つまたは複数の突然変異を導入し、最も近接するヒト生殖細胞系配列に対する同一性を増大することは魅力的であり得るが、他の突然変異もまた、考慮され得る。1つの実施形態において、このような突然変異は、保存的突然変異である。

【0112】

(Fc領域によって規定される抗体)

Fc領域は、抗体が免疫系を活性化することを可能にし、抗体は、Fc内に改変を含むように、代表的には、1つまたは複数の機能特性(例えば、血清半減期、補体結合、Fcレセプター結合、タンパク質安定性および/または抗原依存性細胞傷害性またはこれらの欠失)を変化させるように操作され得る。さらに、本発明の抗体は、化学的に改変され得る(例えば、1つまたは複数の化学的部分が抗体に付着され得る)か、またはそのグリコシル化を変化させ、抗体の1つまたは複数の機能特性を再び変化させるように改変され得る。

【0113】

本発明の1つの態様は、C5aRに結合する抗体または本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体に関し、ここで、Fc領域は、1つまたは複数のFc Rに対する結合親和性を低減しているかまたはなくしている。

【0114】

1つの実施形態において、本発明は、C5aR、好ましくは上で記載されるようにヒトC5aRに結合する抗体または本明細書中で配列定義(以下を参照されたい)によって記載される抗体に関し、ここで、Fc領域は、1つまたは複数のFc Rに対する結合親和性を低減している。

【0115】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、それぞれ配列番号33、34、35および36によって規定されるIgG1、IgG2、IgG2/4またはIgG4 Fc参照配列と比較して、1つまたは複数のFc Rに対し低減した結合親和性を示す。特異的アミノ酸残基が、Fc R相互作用を担い、これを通して作用し得、このことは、このようなFc領域の特異的アミノ酸残基が異なるアミノ酸と置換されている抗体に、有利に適用され得る。

【0116】

1つの実施形態において、上記Fc領域は、それぞれ配列番号33、34、35および36によって規定されるIgG1、IgG2、IgG4/G2またはIgG4 Fc参照配列と比較して、1つまたは複数の点突然変異を含み、1つまたは複数のFc レセプターまたは補体成分に対する親和性を低減する。

【0117】

Fc領域における点突然変異の導入の結果を評価するために、一連の抗C5aR抗体についてのエフェクター機能が、実施例4に記載されるように評価された。食作用アッセイは、ヒト単球による好中球(hC5aRを発現する)の食作用を誘導する抗hC5aR抗体の能力におけるFc領域の役割を測定するために確立された。Table2(表2)から分かり得るとおり、いくつかのFc変異体は、記載のアッセイにおいて、抗C5aR抗体によって誘導される食作用のレベルを低減する。

【0118】

本発明による抗体の1つの実施形態において、抗体は、インビトロで好中球の食作用を有意に誘導しない。このことは、食作用のレベルが、抗C5aR抗体の非存在下で測定されたバックグラウンドを有意に超えないことを意味する。1つの実施形態において、抗体は、食作用の検出可能な誘導を何ら生じない。食作用のレベルを評価するためのアッセイは、実施例4において記載されるように、ヒト好中球を用いて実施され得る。

【0119】

代替のアッセイにおいて、ADCC(抗体依存性細胞傷害性)およびCDC(補体依存性細胞傷害性)を誘導する抗hC5aRの能力が、評価された。このアッセイは、ADCCまたはCDCに依存するメカニズムを介して細胞枯渇を媒介するFc変異体の能力を試験するために確立された。これは、インビボ設定における活性を模倣し得ると考えられる。

【0120】

アッセイは、標的細胞としてhC5aR発現細胞を、そしてエフェクター細胞(単球枯渇PMBC)または補体含有血清を適用し、実施例4に記載されるように応答を誘発した。

【0121】

本発明による抗体の1つの実施形態において、抗体は、有意にADCCを誘導しない。このことは、ADCCのレベルが、抗C5aR抗体の非存在下で測定したバックグラウンドより有意に上ではないことを意味する。1つの実施形態において、抗体は、ADCCの検出可能な誘導を何ら生じない。すなわち、ADCCのレベルは、バックグラウンドよりも上ではない。

【0122】

本発明による抗体の1つの実施形態において、抗体は、有意にCDCを誘導しない。1つの実施形態において、抗体は、CDCの検出可能な誘導を何ら生じない。すなわち、CDCのレベルは、バックグラウンドよりも上ではない。

【 0 1 2 3 】

1つの実施形態において、本発明による抗体は、配列が単数または複数のエフェクター細胞機能を変化させるために改変されているFc領域を含む。Fc配列の改変は、アミノ酸配列における点突然変異によって得られ得る。重鎖Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG4またはIgG2/4のキメラ配列であってもよい。参照配列は、以下のように配列表において規定される：配列番号33によるIgG1、配列番号34によるIgG2、配列番号35によるIgG2/4、および配列番号36によるIgG4。

【 0 1 2 4 】

1つの実施形態において、Fc領域は、IgG1(配列番号33)、IgG2(配列番号34)、IgG2/4(配列番号35)、またはIgG4(配列番号36)であり、以下の点突然変異

10

- a. E233P
- b. L234AまたはV234AまたはF234LまたはF234V
- c. L235EまたはL235A
- d. G236RまたはG236A
- e. G237A
- f. S239D
- g. S254W
- h. N297Q
- i. L328R
- j. A330S
- k. P331S
- l. I332E

20

の1つまたは複数を有する。

【 0 1 2 5 】

Fc変異体間の相違は、上述のとおり、Fc Rまたは補体系の補体と相互作用するそれらの能力にある。Fc領域における配列相違は、抗体の構造および柔軟性にさらに影響をおよぼし、抗体機能にも影響をおよぼし得る。実施例5およびtable3(表5)に記載されるように、本発明者らは、Fc領域がさらなる点突然変異を有するかまたは有さないIgG1型である抗hC5aR抗体が、IgG4型のFc領域を有する対応する抗体よりもhC5R媒介型作用のより強力なインヒビターであることを、さらに実証する。したがって、本発明の実施形態は、本明細書

30

中で規定される、IgG1アイソタイプのFc領域または少なくともIgG1アイソタイプのFcヒンジ領域を有する抗体のいずれかに関する。

【 0 1 2 6 】

1つの実施形態において、IgG1 Fc領域は、配列番号33に規定されるIgG1 Fc参照配列と比較して、1～10個のアミノ酸置換を含む。Fc領域は、より少ない突然変異(例えば、AA 231～240の間の1～8個のアミノ酸置換、または例えばAA 328～334の間の1～5個のアミノ酸置換)しか含まないことが好ましい。アミノ酸置換は、上述のように、インビトロで好中球の食作用、ADCCおよび/またはCDCを有意に誘導する抗体の能力を低減する置換の中から好ましく選択される。

【 0 1 2 7 】

40

1つの実施形態において、抗体Fc領域は、以下の点突然変異の1つまたは複数を含むIgG1である：

- a) N297Qおよび/または
- b) L234Aおよび/または
- c) L235EまたはL235Aおよび/または
- d) G236RまたはG236Aおよび/または
- e) G237Aおよび/または
- f) L328Rおよび/または
- g) A330Sおよび/または
- h) P331S。

50

【 0 1 2 8 】

1つの実施形態において、抗体Fc領域は、以下の点突然変異の群の1つまたは複数を含むIgG1である：

- a) N297Qおよび/または
- b) L234AおよびL235Eならびに/または
- c) L234AおよびG236Rならびに/または
- d) L235EおよびG236Rならびに/または
- e) L234A、L235EおよびG236Rならびに/または
- f) G236RおよびL328Rならびに/または
- g) N297Q、L234AおよびL235Eならびに/または
- h) N297Q、L234A、L235EおよびG236Rならびに/または
- i) N297Q、L234A、L235EおよびG237Aならびに/または
- j) L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S。
- k) N297Q、L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S。

10

【 0 1 2 9 】

1つの実施形態において、抗体Fc領域は、以下の点突然変異の群の1つまたは複数を含むIgG1である：

- a) N297Qおよび/または
- b) L234AおよびL235Eならびに/または
- c) G236RおよびL328Rならびに/または
- d) N297Q、L234AおよびL235Eならびに/または
- e) N297Q、L234A、L235EおよびG237Aならびに/または
- f) L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S。

20

【 0 1 3 0 】

重鎖および軽鎖の両方のフレームワーク領域内の点突然変異がアミノ酸残基を置換するための標準的基準に基づいて導入され得ることが本発明の範囲内であることは、当業者に明らかである。本明細書中に記載される機能アッセイは、このような突然変異が抗体の機能性に影響を与えないことを確かめるために使用され得る。

【 0 1 3 1 】

同定された抗体の結合特異性は、可変領域またはCDRによって提供されることは上から明らかであり、類似の抗原性結合領域を有する異なるタイプの抗体が、本発明に包含されることが、明らかである。

30

【 0 1 3 2 】

本発明の1つの実施形態において、抗体は、全長抗体である。本発明の1つの実施形態において、抗体は、抗体断片または一本鎖抗体である。1つの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。1つの実施形態において、抗体は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、または非ヒト霊長類の抗体である。1つの実施形態において、抗体は、マウスまたはヒトの抗体である。1つの実施形態において、抗体は、ヒト抗体である。1つの実施形態において、抗体は、ヒト化抗体である。本出願の定義の部で記載されたように、ヒト化抗体は、少なくともヒト生殖細胞系配列に由来しないCDR領域を含む。上からさらに明らかであるように、ヒト抗体は、生殖細胞系配列と比較して1つまたは複数の点突然変異を含み得るが、配列は、少なくともフレームワーク領域内またはFc領域内においてヒト生殖細胞系配列に対し少なくとも95%同一であるべきであると、一般に理解される。

40

【 0 1 3 3 】

(医薬製剤)

本発明は、薬学的に許容される担体および本発明によるポリペプチドまたは抗体を含む医薬組成物/製剤、ならびにこのような組成物を含むキットをさらに含む。

【 0 1 3 4 】

本発明による抗体は、本発明の態様において、医薬組成物に製剤され得る。このような医薬組成物は、当該分野における一般的知識、例えば薬局方またはRemingtonに基づいて

50

調製され得る。

【0135】

1つの実施形態において、本発明による医薬組成物は、本明細書中で記載される抗体を薬学的に許容される担体と共に含む。製剤は、水性製剤の形態であっても、または水または水性緩衝剤組成物中で投与前に再構成される乾燥製剤の形態であってもよい。

【0136】

本発明による抗体の医薬組成物は、WO2011/104381に記載される組成物のように、塩および/または緩衝剤を含み得る。

【0137】

さらなる実施形態において、本発明による抗体の医薬組成物は、WO2011/147921に記載される組成物のように、多数の用途のために好適であってもよい。

【0138】

(処置の方法)

本発明の1つの態様は、対象における障害を処置するかまたは予防する方法に関し、この方法は、本明細書中に記載される治療量の抗体を、必要とする対象に投与することを含む。以前の刊行物、例えばWO2009/103113に記載されるように、抗C5aR抗体は、種々の疾患および障害の処置のために使用可能である/好適である。したがって本発明の実施形態は、免疫疾患または免疫障害、詳細には炎症性疾患の処置のための方法に関する。本明細書中の実施例8は、これを、本発明による抗C5aR抗体のマウス関節炎モデルにおける機能を実証することによって、さらに支持する。実施例9～11は、乾癬性関節炎、クローン病および潰瘍性大腸炎の患者由来の組織サンプルにおけるC5aRの上方制御を実証する。抗C5aR抗体は、乾癬性関節炎患者由来の滑液によって誘導されるPMNの細胞移動を阻害し得ることが、さらに実証される。

【0139】

処置の方法は、疾患または障害を治療することを目的とし得るが、免疫疾患および炎症性疾患、例えば慢性疾患または慢性障害を含むいくつかの疾患に関しては、1つまたは複数の症候を緩和することまたは、処置と考えられ、症候の部分的緩和が得られるか、または効果が一時的もしくは部分的なものでしかない場合であっても、対象の有意な改善であり得る。

【0140】

本発明による方法は、以下を含むが、これらに限定されない1つまたは複数の疾患の処置を含む：リウマチ様関節炎(RA)、乾癬、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、I型糖尿病、グレーブス疾患、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)、過敏性腸症候群、多発性硬化症(MS)、自己免疫性心筋炎、川崎病、冠状動脈疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、間質性肺疾患、自己免疫性甲状腺炎、強皮症、全身性硬化症、骨関節炎、アトピー性皮膚炎、白斑、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、自己免疫性腎炎、グッドパスチャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、ANCA関連血管炎、ぶどう膜炎、強皮症、水疱性類天疱瘡、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞蹈病、嚢胞性繊維症、痛風、加齢性黄斑変性、アレルギー、喘息および急性または慢性のいずれかの炎症の結果である他の自己免疫疾患。さらなる実施形態において、疾患または障害は、急性または慢性の炎症であり、障害は、自己免疫疾患であり得る。1つの実施形態において、障害は、リウマチ様関節炎(RA)、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、クローン病(CD)または潰瘍性大腸炎(UC)または過敏性腸症候群を含む炎症性腸疾患(IBD)である。さらなる実施形態において、障害は、RAまたはSLEである。慢性疾患から離れて、抗C5aR抗体は、移植、虚血/再灌流傷害(例えば、急性心筋梗塞、脳卒中など)、敗血症(例えば、SIRS、MODS、ALI)、アテローム硬化症および脳内出血(ICH)のような急性兆候に関して関連し得る。

【0141】

さらなる態様において、本発明は、疾患または傷害の処置のための、本明細書中で記載された抗体、単離された抗体または抗体組成物に関する。前記抗体のさらなる実施形態に

において、単離された抗体または抗体組成物は、本明細書中で処置の方法に関して上記された疾患および障害の1つまたは複数の処置のためである。

【0142】

本発明の1つの態様は、疾患または障害の処置のための医薬の調製のための本明細書中で記載された抗体、単離された抗体または抗体組成物の使用に関し、ここで、この疾患または障害は、本明細書中で処置の方法に関して上記した通りであり得る。

【0143】

(投与の様式)

本発明の抗体は、非経口的に、例えば静脈内、例えば筋肉内、例えば皮下に投与されてもよい。あるいは、本発明の抗体は、非経口的でない経路を介して、例えば経口で、または局所的に投与されてもよい。本発明の抗体は、予防的に投与されてもよい。好ましい実施形態において、この抗体は、静脈内または皮下に投与される。

10

【0144】

投与の用量およびタイミングは、考慮される疾患/障害または症候、ならびに問題の対象を含む種々の因子に依存する可能性が高い。一般的に、抗体は、0.010mg/kgから4~6mg/kgまでの用量で投与されることが予測される。同様に、抗体の用量レジメンはまた、個々の対象および前記対象の疾患状態にも依存するが、本発明に従い、抗体(または抗体組成物)が対象に週に1回または2週に1回、またはより長い間隔、例えば月に1度投与される処置を用いることが望ましい。

【0145】

本発明の抗体は、必要に応じて投与され得る。すなわち、この抗体は、患者の経験、例えば、特定の症候が出た場合、または特定のバイオマーカーが所定のレベルに達した場合に、基づいて投与され得る。

20

【0146】

(特異的処置組合せ)

本発明の抗体は、1つまたは複数の他の治療剤または製剤と同時に投与されてもよい。他の薬剤は、本発明の抗体の効果を増強する薬剤であってもよい。他の薬剤は、患者の他の症候または状態を処置することを意図されてもよい。例えば、他の薬剤は、鎮痛剤、免疫抑制剤または抗炎症剤であってもよい。他の薬剤は、別のモノクローナル抗体、例えば、国際特許出願WO2008/022390およびWO2009/103113において記載されるものの1つであってもよい。

30

【0147】

2種以上の薬剤の組合せ投与は、多くの異なる方法において達成され得る。1つの実施形態において、抗体および他の薬剤は、1つの組成物中で一緒に投与されてもよい。別の実施形態において、抗体および他の薬剤は、別の組成物において組合せ治療の一部として投与され得る。例えば、モジュレーターは、他の薬剤の前、後、またはこれと同時に、投与され得る。

【0148】

本発明による抗体は、他の薬物(例えば、メトトレキサート、デキサメタゾンおよびプレドニゾン)および/または他の生物学的薬物と共に投与され得る。本発明による1つの実施形態において、抗体は、WO2009/103113に記載されるように、抗リウマチ薬のATCコードM01Cクラスおよび免疫抑制剤のATCコードL04(アザチオプリン、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、シクロスポリン、D-ペニシラミン、金塩(金チオリンゴ酸ナトリウム、オーラノフィン(auranofm))、レフルノミド、メトトレキサート、ミノサイクリン、スルファサラジンおよびシクロホスファミド、グルココルチコステロイド、ミコフェノール酸またはミコフェノレートおよびタクロリムスが挙げられるが、これらに限定されない)から選択される1種または複数の治療剤と同時に投与され得、別々の実施形態においては、プラキニル、アザルフィジンおよびメトトレキサート、デキサメタゾンおよび/またはプレドニゾンの1種または複数と同時に投与され得る。

40

【0149】

50

別の例において、本発明の抗体はまた、他の抗体と組み合わせて(例えば、CCR2およびCCR3が挙げられるがこれらに限定されないケモカインレセプターに結合する抗体と組み合わせて)、または抗TNFまたは他の抗炎症剤と組み合わせて、または予防処置もしくは治療処置において使用される既存の血漿製剤(例えば、市販のガンマグロブリンおよび免疫グロブリン製剤)と組み合わせて、使用され得る。本発明の抗体は、抗生物質および/または抗微生物剤と組み合わせて与えられる、別個に投与される組成物として使用されてもよい。

【0150】

抗体は、自己免疫において既に使用されている薬剤などの薬剤と組み合わせて投与され得、これらの薬剤としては、限定されないが、IFN-ベータ、オレンシア(商標)(CTLA4-Ig)、ヒュミラ(商標)(抗TNF)、シムジア(商標)(抗TNF、PEG Fab)、タイサブリ(商標)(4-インテグリンmAb)、シンボニー(商標)、リツキサン/マブセラ(商標)、アクテムラ/ロアクテムラ(商標)、キネレット(商標)、ラプティバ、Ustekinumabなどの免疫モジュレーター、アスプリン(商標)、イブプロフェン(商標)などの非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)、コルチコステロイド、プラキニル(商標)、アザルフィジン(商標)、メトトレキサート(商標)などの疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)、コパキソン(商標)(グラチラマーアセテート)、ジレニア(Gilneya)(商標)(フィンゴリモド)、フラジール(商標)、シプロ(商標)のような抗生物質、局所用コルチコステロイド、ビタミンDアナログクリーム(ドボネックス(商標))、局所用レチノイド(タゾラック(商標))、保湿剤、局所用免疫モジュレーター(タクロリムスおよびピメクロリムス)、コールタール、アントラリン、などを含む局所用(皮膚適用)医薬が挙げられ、ならびに、さらにPUVA、UVBなどの光線治療およびセルセプト(商標)(ミコフェノレートモフェチル)が、本発明による抗体を用いる処置と組み合わせられ得る。

【0151】

処置される対象は、既に1種または複数の他の薬剤によって処置されていてもよく、場合により、本発明の抗体が、前記処置レジメンに加えられてもよい。

【0152】

(抗体調製のための方法)

抗体は、当該分野で公知の種々の方法によって、主に抗体産生のためのハイブリドーマクローンまたは組換え宿主における抗体の発現のいずれか(後者はW02010/000864に記載される)に依拠して、調製され得る。当該分野の知識に基づいて、所望の抗体鎖をコードするヌクレオチド配列が構築され得、抗体の組換え発現のために使用され得る。ここで、重鎖および軽鎖は、1つまたは2つの別個のポリヌクレオチドから発現されてもよい。

【0153】

さらなる態様における本発明は、本明細書中に記載される抗体の抗体鎖のポリペプチド配列をコードする1つまたは複数の単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0154】

さらなる実施形態は、本明細書中に記載される抗体の抗体鎖のポリペプチド配列をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関する。

【0155】

本発明は、さらに、本発明による抗体を産生するためのプロセスに関し、このプロセスは、上述の宿主細胞を、抗体鎖の1つまたは複数のポリペプチド配列の発現を支持する条件下で培養することを含む。このプロセスは、1つの連続するポリヌクレオチド上の2つの別個のオープンリーディングフレームによって抗体鎖がコードされ、場合によりこの抗体は、前記宿主細胞培養物から回収されることを、さらに含み得る。

【0156】

本発明は、以下の実施形態によって説明されるが、これらに限定されない。

【0157】

(実施形態)

1. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、

前記CDR1配列は、配列番号1または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号2または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号3または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0158】

2. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号1、2および3または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

10

【0159】

3. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号1、2および3と同一である、抗体。

【0160】

4. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、

前記CDR1配列は、配列番号5または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号6または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号7または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

20

【0161】

5. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号5、6および7または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

【0162】

6. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号5、6および7と同一である、抗体。

【0163】

7. 重鎖の可変領域が、実施形態1、2または3のいずれかとして規定され、抗体の軽鎖の可変領域が、実施形態4、5または6のいずれかとして規定される、抗体。

30

【0164】

8. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、

前記CDR1配列は、配列番号9または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号10または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号11または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0165】

40

9. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号9、10および11または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

【0166】

10. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号9、10および11と同一である、抗体。

【0167】

11. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、

前記CDR1配列は、配列番号13または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

50

前記CDR2配列は、配列番号14または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号15または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0168】

12. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号13、14および15または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

【0169】

13. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号13、14および15と同一である、抗体。

10

【0170】

14. 重鎖の可変領域が、実施形態8、9または10のいずれかとして規定され、軽鎖の可変領域が、実施形態11、12または13のいずれかとして規定される、抗体。

【0171】

15. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR1配列は、配列番号17または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号18または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

20

前記CDR3配列は、配列番号19または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0172】

16. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号17、18および19または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

【0173】

17. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号17、18および19と同一である、抗体。

【0174】

30

18. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR1配列は、配列番号21または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号22または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号23または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0175】

19. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号21、22および23または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

40

【0176】

20. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号21、22および23と同一である、抗体。

【0177】

21. 重鎖の可変領域が、実施形態15、16または17のいずれかとして規定され、軽鎖の可変領域が、実施形態18、19または20のいずれかとして規定される、抗体。

【0178】

22. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR1配列は、配列番号25または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿

50

入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号26または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号27または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0179】

23. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号25、26および27または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

【0180】

24. 重鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号25、26および27と同一である、抗体。

【0181】

25. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、

前記CDR1配列は、配列番号29または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR2配列は、配列番号30または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含み、および/または

前記CDR3配列は、配列番号31または1、2もしくは3個のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する前記配列を含む、抗体。

【0182】

26. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号29、30および31または1、2もしくは3個のアミノ酸が異なるアミノ酸残基と置換されている前記配列の変異体を含む、抗体。

【0183】

27. 軽鎖の可変領域がCDR1、CDR2およびCDR3の配列を含む抗体であって、前記CDR配列は、配列番号29、30および31と同一である、抗体。

【0184】

28. 重鎖の可変領域が、実施形態22、23または24のいずれかとして規定され、軽鎖の可変領域が、実施形態25、26または27のいずれかとして規定される、抗体。

【0185】

29. 重鎖の可変領域が、配列番号4、12、20または28に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含む、抗体。

【0186】

30. 重鎖の可変領域が、フレームワーク領域内に1つまたは複数の突然変異を含む、実施形態29による抗体。

【0187】

31. 前記突然変異が、保存的突然変異である、実施形態29による抗体。

【0188】

32. 前記突然変異が、最も近接するヒト生殖細胞系配列に対する同一性を増大する、実施形態29による抗体。

【0189】

33. 重鎖の可変領域が、配列番号39によって同定される、実施形態32による抗体。

【0190】

34. 軽鎖の可変領域が、配列番号8、16、24または32に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含む、抗体。

【0191】

35. 軽鎖の可変領域が、フレームワーク領域内に1つまたは複数の突然変異を含む、実施形態34による抗体。

【0192】

10

20

30

40

50

36. 前記突然変異が、保存的突然変異である、実施形態35による抗体。

【0193】

37. 前記突然変異が、最も近接するヒト生殖細胞系配列に対する同一性を増大する、実施形態35による抗体。

【0194】

38. 軽鎖の可変領域が、配列番号40によって同定される、実施形態34による抗体。

【0195】

39. 重鎖の可変領域が、配列番号4、12、20または28に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含み、軽鎖の可変領域が、配列番号8、16、24または32に対し、少なくとも80、85、90または94%同一である配列を含む、抗体。

10

【0196】

40. 前記重鎖の可変領域が、配列番号4、12、20または28に対し、少なくとも96%、例えば97%、例えば98%、または例えば99%同一である配列を含み、前記軽鎖の可変領域が、配列番号8、16、24または32に対し、少なくとも96%、例えば97%、例えば98%、または例えば99%同一である配列を含む、実施形態39による抗体。

【0197】

41. 重鎖の可変領域が、フレームワーク領域内に1つまたは複数の突然変異を含み、および/または軽鎖の可変領域が、フレームワーク領域内に1つまたは複数の突然変異を含む、実施形態39または40による抗体。

【0198】

20

42. 前記突然変異が、保存的突然変異である、実施形態41による抗体。

【0199】

43. 前記突然変異が、最も近接するヒト生殖細胞系配列に対する同一性を増大する、実施形態41による抗体。

【0200】

44. 重鎖の可変領域が、配列番号39によって同定され、および/または軽鎖の可変領域が、配列番号40によって同定される、実施形態41による抗体。

【0201】

45. C5aRに結合する、実施形態1から44のいずれかによる抗体。

【0202】

30

46. 全長抗体、または抗体断片もしくは一本鎖抗体である、実施形態1から45のいずれかによる抗体。

【0203】

47. モノクローナル抗体である、実施形態1から46のいずれかによる抗体。

【0204】

48. ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、または非ヒト霊長類の抗体である、実施形態1から47のいずれかによる抗体。

【0205】

49. マウス抗体またはヒト抗体である、実施形態1から48のいずれかによる抗体。

【0206】

40

50. ヒト抗体またはヒト化抗体である、実施形態1から49のいずれかによる抗体。

【0207】

51. ヒト抗体である、実施形態1から50のいずれかによる抗体。

【0208】

52. C5aRに結合するヒト抗体。

【0209】

53. ヒトC5aRに結合する、実施形態1から52のいずれかによる抗体。

【0210】

54. C5aRの第2細胞外ループに結合する、実施形態1から53のいずれかによる抗体。

【0211】

50

55. ヒトC5aRの第2細胞外ループに結合する、実施形態1から54のいずれかによる抗体。

【0212】

56. ヒトC5aRに結合するが、マウスC5aRには結合しない、実施形態1から55のいずれかによる抗体。

【0213】

57. ヒトC5aRの第2細胞外ループに結合するが、マウスC5aRの第2細胞外ループには結合しない、実施形態1から56のいずれかによる抗体。

【0214】

58. ネイティブの立体構造のヒトC5aRの第2細胞外ループにのみ結合する、実施形態1から57のいずれかによる抗体。

【0215】

59. C5aのヒトC5aRに対する結合を有意に阻害するかまたは低減する、実施形態1から58のいずれかによる抗体。

【0216】

60. SPAアッセイにおいて、10nM未満または5nM未満または好ましくは3nM未満でC5aと置き換え可能である、実施形態1から59のいずれかによる抗体。

【0217】

61. インビトロで、ヒト好中球の移動を有意に阻害する、実施形態1から60のいずれかによる抗体。

【0218】

62. 10nMのC5a存在下、抗体非存在下で30分後に観察した移動のレベルと比較して、10nMのC5a存在下で30分後に測定した場合、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、または10%未満まで移動を低下させるか、または、同じ設定のIC50は、2.5 µg/ml未満、例えば2.5 µg/ml未満、例えば1.5 µg/ml未満、例えば1.2 µg/ml未満またはなお1.0 µg/ml未満である、実施形態1から61のいずれかによる抗体。

【0219】

63. 好中球における競合リガンド結合アッセイによって測定された親和性が、0.80nM未満、例えば0.50nMもしくは0.35nM未満である、実施形態1から62のいずれかによる抗体。

【0220】

64. エキソピボでのC5a誘導型好中球活性化を、カルシウムフラックスアッセイにおいて決定された7.0 µg/ml未満、例えば5.0 µg/ml未満、例えば2.5 µg/ml未満のIC50で中和する、実施形態1から63のいずれかによる抗体。

【0221】

65. エキソピボでのC5a誘導型好中球移動を、

a. CD11b上方制御アッセイにおいて決定された3.5 µg/ml未満、例えば2.5 µg/ml未満、例えば1.5 µg/ml未満、もしくはなお1.0 µg/ml未満のIC50で、または

b. CD62L下方制御アッセイにおいて決定された1.8 µg/ml未満、例えば1.5 µg/ml未満、例えば1.2 µg/ml未満もしくはなお1.0 µg/ml未満のIC50で阻害する、実施形態1から64のいずれかによる抗体。

【0222】

66. Fc領域が、それぞれ配列番号33、34、35および36によって規定されるIgG1、IgG2、IgG4またはIgG4/G2 Fc参照配列と比較して、1つまたは複数のFc レセプターに対する低減した親和性/低減した結合を有する、C5aRに結合する抗体。

【0223】

67. Fc領域が、それぞれ配列番号33、34、35および36によって規定されるIgG1、IgG2、IgG4またはIgG4/G2 Fc参照配列と比較して、1つまたは複数のFc レセプターに対する親和性を低減する1つまたは複数の点突然変異を含む、実施形態1から66のいずれかによる抗体。

【0224】

68. インビトロで好中球の食作用を有意に誘導しない、実施形態1から67のいずれかによ

10

20

30

40

50

る抗体。

【 0 2 2 5 】

69. インビトロでADCCを有意に誘導しない、実施形態1から68のいずれかによる抗体。

【 0 2 2 6 】

70. インビトロでCDCを有意に誘導しない、実施形態1から69のいずれかによる抗体。

【 0 2 2 7 】

71. Fc領域が、1つまたは複数の以下の点突然変異

a. E233P

b. L234AまたはV234AまたはF234LまたはF234V

c. L235EまたはL235A

d. G236RまたはG236A

e. G237A

f. N297Q

g. L328R

h. A330S

i. P331S

を含む、IgG1(配列番号33)、IgG2(配列番号34)、IgG2/4(配列番号35)、またはIgG4(配列番号36)である、実施形態1から70のいずれかによる抗体。

【 0 2 2 8 】

72. Fc領域は、IgG1またはIgG1突然変異体である、実施形態1から71のいずれかによる抗体。

【 0 2 2 9 】

73. Fc領域は、配列番号33において規定されるIgG1 Fc参照と比較して1～10個のアミノ酸置換を含むIgG1 Fc突然変異体である、実施形態1から72のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 0 】

74. Fc領域は、AA 231～240における1～8個のアミノ酸置換を含むIgG1 Fc突然変異体であり、IgG1 Fc参照配列が配列番号33において規定される、実施形態1から73のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 1 】

75. Fc領域は、AA 328～334における1～5個のアミノ酸置換を含むIgG1 Fc突然変異体であり、IgG1 Fc参照配列が配列番号33において規定される、実施形態1から74のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 2 】

76. 抗体Fc領域は、点突然変異の以下の群

a. N297Qならびに/または

b. L234AおよびL235Eならびに/または

c. G236RおよびL328Rならびに/または

d. N297Q、L234AおよびL235Eならびに/または

e. N297Q、L234A、L235EおよびG237Aならびに/または

f. L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S

のうち1つまたは複数を含むIgG1である、実施形態1から75のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 3 】

77. 全長抗体、または抗体断片もしくは一本鎖抗体である、実施形態52から76のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 4 】

78. モノクローナル抗体である、実施形態1から77のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 5 】

79. ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタまたは非ヒト霊長類の抗体である、実施形態1から78のいずれかによる抗体。

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

50

80. マウス抗体またはヒト抗体である、実施形態1から79のいずれかによる抗体。
【0237】
81. ヒト抗体またはヒト化抗体である、実施形態1から80のいずれかによる抗体。
【0238】
82. ヒト抗体である、実施形態1から81のいずれかによる抗体。
【0239】
83. 免疫疾患または免疫障害の処置のための、実施形態1から82のいずれかによる抗体。
【0240】
84. 障害が、炎症性疾患である、実施形態83による抗体。
【0241】 10
85. 障害が、急性または慢性の炎症である、実施形態83による抗体。
【0242】
86. 障害が、自己免疫疾患である、実施形態83による抗体。
【0243】
87. 静脈内にまたは皮下に投与される、実施形態83から86のいずれかによる抗体。
【0244】
88. 0.010mg/kgから6mg/kgまでの用量で投与される、実施形態83から87のいずれかによる抗体。
【0245】
89. 週に1回または2週に1回投与される、実施形態83から88のいずれかによる抗体。
【0246】 20
90. 別の薬物と組み合わせて投与される、実施形態83から89のいずれかによる抗体。
【0247】
91. 疾患または障害が、リウマチ様関節炎(RA)、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)または過敏性腸症候群である、実施形態83から90のいずれかによる抗体。
【0248】
92. 患者は、別の薬物、例えばメトトレキサートによって処置される、実施形態83から91のいずれかによる抗体。
【0249】 30
- 実施形態1から82のいずれかによる抗体の治療量を必要とする対象に投与するステップを含む、対象において障害を処置するかまたは予防するための方法。
【0250】
94. 障害が、免疫疾患または免疫障害である、実施形態93による方法。
【0251】
95. 抗体が、静脈内にまたは皮下に投与される、実施形態93または94による方法。
【0252】
96. 抗体が、0.010mg/kgから6mg/kgまでの用量で投与される、実施形態93から95のいずれかによる方法。
【0253】 40
97. 抗体が、週に1回または2週に1回投与される、実施形態93から96のいずれかによる方法。
【0254】
98. 抗体が、少なくとも1つの他の薬物と組み合わせて投与される、実施形態93から97のいずれかによる方法。
【0255】
99. 障害が、免疫病理学的障害、例えば自己免疫疾患である、実施形態93から98のいずれかによる方法。
【0256】
100. 対象が、リウマチ様関節炎(RA)、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、 50

ループス腎炎、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)または過敏性腸症候群に罹患している患者である、実施形態93から99のいずれかによる方法。

【0257】

101.患者が、別の薬物によって処置される、実施形態93から101のいずれかによる方法。

【0258】

102.実施形態1から82のいずれかによる抗体を、場合により、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む、医薬組成物。

【0259】

103.水性製剤または投与の前に水/水性緩衝剤中で再構成される乾燥製剤の形態である、実施形態102による医薬組成物。

10

【0260】

104.実施形態1から82のいずれかによる抗体のポリペプチド配列をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【0261】

105.実施形態104による1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【0262】

106.実施形態1から82のいずれかによる抗体を産生するための方法であって、実施形態105による宿主細胞を、前記抗体の1つまたは複数のポリペプチド配列の発現を支持する条件下で培養するステップを含む、方法。

20

【0263】

107.重鎖および軽鎖が、1つの連続するポリヌクレオチド上の2つの別個のオープンリーディングフレームによってコードされる、実施形態106による方法。

【0264】

108.宿主細胞の培養物から前記抗体を回収するステップをさらに含む、実施形態106または107による方法。

【0265】

109.医薬を製造するための、実施形態1から82のいずれかによる抗体の使用。

【0266】

110.免疫疾患または障害、例えば、リウマチ様関節炎(RA)、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、炎症性腸疾患(IBD)または過敏性腸症候群の処置のための医薬を製造するための、実施形態1~82のいずれかによる抗体の使用。

30

【0267】

(実施例)

(実施例1:ヒト抗hC5aR抗体の産生)

(免疫化およびスクリーニング)

一般的に、GPCRに対する抗体を惹起することは、可溶性タンパク質が正しいネイティブのタンパク質立体構造を有することは、産生が不可能でないとしても非常に困難であるので、困難である。従来的には、GPCRを過剰発現する細胞は、免疫化のために使用されているが、得られた抗体は、非常に非特異的に応答する傾向があり、このことは、所望のプロファイル、すなわち、リガンド結合およびGPCRシグナル伝達を遮断可能なプロファイルを有する抗体を同定することを、困難にする。実際に、本発明者らは、C5aRに対してC5aが結合することを遮断し得るヒト抗hC5aR抗体を発生させることは非常に困難であることを見出し、多くの免疫化戦略は、これらの抗体が同定される前に適用された。

40

【0268】

HumAbマウス(Medarex)を、ヒトC5aR(1細胞あたり約80,000コピー)を高度に発現しているL1.2マウス細胞(マウスB細胞リンパ腫細胞株)で免疫化し(Leeら、Nat.Biotechnol,2006年;10:1279~1284)、免疫化マウス由来の脾臓細胞を、標準的手順を用いる細胞融合のために使用した。可溶性hC5aRを欠くために、上清は、標準的ELISAアッセイにおいてスクリーニングされ得ず、したがって、細胞ベースの結合アッセイが、確立された。得られたハ

50

イブリドーマ上清を、W02008/022390において記載されるとおり、多数(1細胞あたり約1,000,000コピー)のネイティブhC5aRを安定的に発現する(FACS分析による)トランスフェクトしたラット細胞株(RBL)に対する結合について、試験した。一般的に、ハイブリドーマ上清を、非トランスフェクト細胞(CellTrackerによって標識する)およびhC5aRトランスフェクト細胞の混合物またはhC5aR ノックアウト/ノックイン(KOKI)マウス(W02005/060739)由来の好中球と共にインキュベートし、そしてAPCコンジュゲートF(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG(IgG-APC)と共にインキュベートした。hC5aRトランスフェクト細胞に結合するが、非トランスフェクト細胞には結合しない上清を同定し、抗hC5aR産生ハイブリドーマをサブクロニングし、そしてヒト好中球およびKOKIマウスから単離した骨髓由来好中球に対する結合を試験した(データは示さず)。抗hC5aR抗体は、タンパク質Aセファロースおよび標準的プロトコルを用いて、ハイブリドーマ上清から精製した。

10

【0269】

(実施例2: 抗hC5aR抗体の同定および特徴付け)

述べたとおり、ヒト抗hC5aR抗体を得るプロセスは問題が多く、hC5a/hC5aR遮断抗体を同定するまでに、32回の融合を実施しなければならなかった。35回の融合および100,000を超えるハイブリドーマ上清のスクリーニングから、11のクローンのみが、hC5aのhC5aRに対する結合を遮断可能であると同定した。抗体の特徴付けにおいて適用されるアッセイは、以下に記載される。参照抗体(Ref. Ab Q)は、W02009/103113に記載される。加えて、カルシウムフラックスアッセイおよびCD11b上方制御において親和性および機能性を決定するために好適なさらなるアッセイは、実施例7に記載される。

20

【0270】

(置換アッセイ)

シンチレーション近接アッセイ(SPA)を、hC5aRに結合するhC5aを置換する抗hC5aR抗体の効力を決定するために適用した。SPAの詳細な説明は、米国特許第4568649号および製造業者(Amersham Biosciences)によって提供されるプロトコルにおいて提供される。簡潔には、RBL-hC5aR細胞から精製されたレセプター保有膜断片は、コムギ胚芽凝集素(WGA)によってコーティングされたシンチレーションする微粒子に結合する。放射能標識されたhC5a(¹²⁵I)トレーサーの添加後、レセプターへの結合は、粒子からの光の放出をもたらす。SPAの原理に特異的、放射性同位体のみ、および互いにすぐ近接する粒子が、光を放つ。すなわち、レセプターに結合した放射性標識hC5aは、光を発するために十分なほど、WGA粒子に近接している。放出された光の量は、したがって、レセプター結合¹²⁵I-hC5aの量を表す。このアッセイは、競合アッセイであり、ここでは、抗hC5aR/未標識hC5aが、レセプターに対する結合の際にトレーサーと競合する。このアッセイにおいて、固定量の¹²⁵I標識C5aが、WGA粒子に添加され、C5aRレセプターは、1分間あたりのカウント(cpm)で測定されるある特定の量の光の放出を生じる。未標識C5aまたは抗C5aRが添加された場合、ここでのレセプターへの結合は、¹²⁵I C5aの置換によって、より低いcpmをもたらす。%置換を、以下のように計算した：

30

【0271】

【数1】

$$\frac{S - S_{\max}}{S_0 - S_{\max}} \cdot 100\%$$

40

【0272】

S: サンプル

S_{max}: 非特異的結合。特異的に結合した¹²⁵I-hC5aと取って代わるために十分な量の未標識hC5aを添加することによって測定する。

S₀: 最大結合。未標識hC5aは添加しない。

IC50値は、C5aの50%を置き換える濃度として規定される。cpmは、実験の間で一定に保たれ、したがって、IC50値は、時間経過にわたって減衰するトレーサーと比例する。ヒト抗hC5aR抗体が¹²⁵I-hC5aと置き換わる効力(IC50)を測定した。データを、table1(表1)に提

50

供する。

【0273】

(好中球移動(化学走性)アッセイ)

hC5a(またはmC5a)依存性好中球移動を阻害する抗体の効力を、ボイデンチャンバーにおいて分析した。ヒトまたは動物の血液から単離した好中球を、カルセインで染色し、そしてボイデンチャンバーにおける上方コンパートメントに添加し、そして抗体と混合した。hC5aまたはmC5aは、ボイデンチャンバーにおける下方コンパートメントに適用し、好中球の化学誘引物質として作用する。下方チャンバーに移動する好中球の能力は、3 μ mまたは5 μ mのfluoroblok膜を通過するカルセイン染色した好中球の数によって決定される。

【0274】

ヒトPMN(多形核白血球;顆粒球)を、EDTAを含むバイアルに採取したヒト血液サンプルから得た。血球を、血液(4部)のフィコール・パックプラス(GE Health Care)勾配(3部)を通した30分間の室温における遠心分離(400 \times g)によって分離した。PMN含有層を、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)含有デキストラン-500(Sigma)中に1時間にわたって浮遊させ、夾雑する赤血球を除去した。上清を、室温にて5分間遠心分離し(250 \times g)、残留する赤血球を、0.2% NaClを用いて55秒間、浸透圧溶解した。この溶液を、1.2%のNaCl+PBSによって等張にし、そして250 \times gにて5分間遠心分離し、その後浸透圧溶解を繰り返した。遠心分離の後、PMNを、反応混合物(RM):NaCl 137mM、KCl 5.3mM、Na₂HPO₄ 0.33mM、NaHCO₃ 4mM、K H₂PO₄ 0.44mM、グルコース5mMを含み、MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.4mM、MgCl₂ 0.5mM、CaCl₂ 0.5mM、HEPES 20mMで補った、HBSS(カタログ番号14175 Gibco)中に再浮遊させた。細胞密度を、NucleoCounter(Chemometec)によって決定した。このPMN浮遊液は、ギムザ染色したサンプルの顕微鏡検査によって評価すると、95%を超える好中球を含んでいた。

【0275】

PMNのローディング:カルセイン、AM(Fluka)を、DMSO(ジメチルスルホキシド)中に溶解し、細胞(1mlあたり 2×10^6 個の細胞)を含むRM中に1000倍に希釈し、10 μ Mの濃度にした。浮遊液を、30分間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベーター内でインキュベートし、次いで、RMで3回洗浄し、過剰なカルセインを除去した。最後に、細胞を、RM中に再浮遊させた(4×10^6 個の細胞/ml)。

【0276】

移動を、FluoroBlok(登録商標)3 μ m孔サイズ96ウェル(カタログナンバー351161.BD Falcon(VWR))を用いるボイデンチャンバー技術によって評価した。上方チャンバー、すなわちFluoroblok膜を含む挿入物を、1mg/ml PBS中のヒトフィブリノゲン(カタログ番号F3879-1G、Sigma)によって、37 $^{\circ}$ Cで2時間にわたって被膜した。洗浄後、膜を、PBS中2%のウシ血清アルブミン(BSA)を含む溶液によって遮断した。RMを用いたもう1回の洗浄後、hC5aR含有または非含有のカルセインローディングした 10^5 個のPMNを、各ウェルに添加し、対照溶液または化学誘引物質hC5a(Sigma、C5788)を含むレシーバープレート(下方チャンバー)内に置いた。各群は、少なくとも6つのウェルからなった。その後、プレートを、485/538 nm、37 $^{\circ}$ Cで60分間にわたり5分間毎に、プレートリーダー(SpectraMax、Molecular devicesまたはFluoroscan、Thermo LabSystems.)内で測定した。30分時点における相対的蛍光単位による値を、移動の尺度として使用した。

【0277】

曲線適合。移動を阻害する抗体の能力を、GraphPad Prism 5(GraphPad Software、Inc.)を用いてIC50によって表した。

【0278】

Table1(表1)は、置換アッセイおよび、ヒト好中球のhC5a依存性(10nM)移動を阻害する10 μ g/mlのヒトmAbの能力を試験した化学走性アッセイからのデータを含む。抗体の非存在下で得られた値を、100と設定した。データを、3ドナーから集めた。平均値は、table1(表1)に含まれる。3種のmAbである、32F3A6、35F12A2および35F32A3は、両アッセイにおいて最も強い効力を示し、これは、W02009/103113において記載される対照抗体Ref.Ab Qの効力と同じか、これより僅かに高かった。

【 0 2 7 9 】

【表 1】

Ab	hC5a 置換(SPA) IC50(nM)	ヒト好中球の移動 (抗体非存在下における移動 と比較した%で表す)
35F32A3	0.95	11
32F3A6	1.90	2
35F12A2	2.04	19
35F24A3	2.97	30
35F16A2	3.90	22
35F3A1	10.7	38
35F34A1	18.6	35
35F6A1	22.9	ND
34F12A5	32.1	>70
35F33A1	33.4	>70
34F12A3	46.6	>70
hC5a	4.1	100
Ref. Ab Q	3.7	20-21

Table 1. 抗 hC5aR 抗体の機能特性。

【 0 2 8 0 】

(抗 hC5aR mAb CDR配列の特徴付け)

抗 hC5aR Abである35F32A3、32F3A6、35F12A2および35F24A3からの可変領域を、組換え的にクローニングし、ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列を、標準的方法を用いて特徴付けた。アミノ酸配列は、図1および添付の配列表に含まれる。

【 0 2 8 1 】

(結合特異性の特徴付け)

ヒト-マウスC5aRキメラ構築物を使用して、C5aRの結合領域を決定した。キメラレセプターを、HEK細胞において一時的に発現させ、個々の抗体の結合を、細胞株を変えたことを除きWO2008/022390において以前に記載されたように、FACSによって決定した。32F3A6、35F32A3および35F12A2の結合は、細胞外ループ2のヒト配列に依存していたが、ヒトN末端は、必須でなかった(図2)。

【 0 2 8 2 】

(実施例3.Fc変異体の産生)

4つのヒトIgGサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4)は、Fc領域において95%を超える相同性を共有するが、ヒンジ領域において大きな相違を示す。Fc領域は、エフェクター機能、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)および補体依存性細胞傷害性(CDC)を媒介する。ADCCにおいて、抗体のFc領域は、免疫エフェクター細胞(例えば、ナチュラルキラー細胞および単球)の表面上の活性型Fcレセプター(Fc γ R)に結合し、標的細胞の食作用または溶解に導く。CDCにおいて、Fc領域は、Fc γ R結合部位とは異なる部位において補体に結合し、そして、抗体は、細胞表面上における補体カスケードを始動させることによって、標的細胞を殺傷する。種々のIgGアイソフォームは、異なるレベルのエフェクター機能を発揮し、IgG4<IgG2<IgG1<IgG3の順に増大する。多くのIgG Fc変異体(全て、Ref Ab Qの可変領域を含む)を、QuickChange(登録商標)部位特異的突然変異誘発キット(カタログ番号200518、Stratagene)を用いて、部位特異的突然変異誘発によって産生し、実施例4において記載されるように特徴付けた。

【 0 2 8 3 】

(実施例4.Fc変異体のエフェクター機能の特徴付け)

(Fc γ Rに対するFc変異体の結合親和性)

Fc γ Rに対するFc変異体の親和性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定によって決定し、これを、CM5センサーチップ (GE) を用いてBIAcore T100装置上で行った。Fc変異体を、アミンカップリング化学を用いて、フローセル上に固定化した。Fc変異体に対するFc γ Rの親和性を測定する動態SPRでは、His-Fc γ Rを分析物として使用し、HBS-EP緩衝液中でフローセル内に注入した。高親和性レセプターFc γ RIを、流量40 μ l/分で、180秒間の接触時間および300秒間の解離時間で注入した。他のFc γ Rを、流量50 μ l/分、30秒間の接触時間および120秒間の解離時間で注入した。チップ表面を、10mM NaOHおよび500mM NaClを含む溶液で再生した。親和性 (Kd値) を、table2A (表2) において列挙した。

【 0 2 8 4 】

【 表 2 】

IgG	抗体 Fc 領域	Fc γ RI	Fc γ RIIA (131R)	Fc γ RIIA (131H)	Fc γ RIIB	Fc γ RIII (158F)	Fc γ RIII (158V)
IgG1	L234A, L235E, G237A, A330S お よび P331S	-	-	-	2.10E-6	-	-
	N297Q, L234A, L235E, G237A	-	-	-	-	-	-
	N297Q, L234A, L235E	-	-	-	-	-	-
	G236R, L328R	-	-	-	-	-	-
	L234A, L235E	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.96E-6
	N297Q	0.36E-6	-	-	-	-	-
	IgG1 参照	6.64E-10	0.95E-6	0.64E-6	0.42E-6	0.33E-6	0.07E-6
IgG2	N297Q	-	nd ^a	nd ^a	-	-	-
	IgG2 参照	-	2.79E-6	0.22E-6	1.54E-6	-	1.50E-6
IgG2/4 ⁽¹⁾	N297Q	-	-	-	-	-	-
	V234A, G236A	-	-	-	5.34E-6	-	-
	IgG2/IgG4 参照	-	nd ^a	1.03E-6	1.83E-6	-	-
IgG4 ⁽²⁾	N297Q, F234L, L235A	nd ^a	-	-	-	-	-
	N297Q, E233P, F234V, L235A	-	-	-	-	-	-
	E233P, F234V, L235A	0.38E-6	-	-	nd ^a	-	nd ^a
	N297Q	0.13E-6	-	-	-	-	-
	IgG4 ⁽²⁾ 参照	2.71E-9	0.80E-6	3.52E-6	1.08E-6	-	nd ^a

Table 2A. Fc γ R に対する Fc 変異体の親和性の分析から得られた結果のまとめ (M における Kd)。(-=結合なし; 0=結合における変化なし; nd^a=弱すぎる結合のため Kd が計算できなかった)。 (1) CH1 および IgG2 の下方ヒンジ領域および残りの IgG4 の CH2~CH3 を含む IgG2/IgG4 Fc 変異体; (2) IgG4 突然変異体は、点突然変異 S228P を含む。

【 0 2 8 5 】

(食作用アッセイ)

好中球の食作用を媒介する能力が低減しているかまたはなくしているFc変異体を同定するために、インビトロ食作用アッセイを確立した。以下に記載される食作用アッセイは、ヒト抹消血から単離されたヒト好中球 (食作用についての標的細胞) を蛍光染料CMFDAで標識し、これらを、やはりヒト抹消血から単離したヒト単球の培養物に添加することを伴う。CMFDA標識好中球を、試験mAb (またはPBS) で事前に被膜し、ヒト単球と一緒にインキュベーション後、CD14/CMFDA二重陽性単球の数を、FACSによって決定する。種々のFc変異体

10

20

30

40

50

からの結果を、table2B(表4)に提示する。

【0286】

全ての試験した抗体は、WO2009/103113において記載され、上記のRef Abとして使用されるQ抗体の可変領域を含む。

【0287】

単球およびマクロファージの両方は、好中球の抗体依存性食作用を媒介可能であることが見出され、両細胞型を用いる食作用アッセイが、確立された。結果は、両アッセイにおいて定性的に同様であったが、マクロファージアッセイはより変わりやすかったため、分析は、単球を用いて主に行われた。

【0288】

(ヒト単球の調製)

ヒト単球およびリンパ球を、健康なヒト志願者から抗凝血剤としてEDTA(K2E、BD Biosciences、カタログ番号367525)を含むチューブ内に採取された抹消静脈血から、パーコール勾配遠心分離を用いて単離した。100mlの血液から、一般的に、約 $8 \sim 20 \times 10^7$ 個の抹消血単核細胞(PBMC)が得られた。少なくとも3容量のdPBSを、単離された細胞に加え、次いで、 $100 \times g$ で10分間、室温(RT)で遠心分離した。上清を捨てた後、リンパ球/単球層を、同容量の前工程のdPBS:培養培地50:50混合物中に再浮遊させ、 $100 \times g$ で10分間RTにて再び遠心分離した。上清を捨て、リンパ球/単球層を、細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlで培養培地中に再浮遊させた。再浮遊させた細胞を、6ウェル組織培養プレート(Corning、Costar、カタログ番号3516)内に2ml/ウェル、細胞 4×10^6 個/mlで入れ、2時間、37℃にて、5%CO₂中でインキュベートした。非接着の細胞(リンパ球および死細胞)を、吸引によって除去し、接着した細胞(単球)を、4回、1mlの培養培地(RPMI 1640(Invitrogen-GIBCO、カタログ番号11875)+10% FCS(Invitrogen-GIBCO、カタログ番号16000、56℃で30分間加熱不活化)+25mM HEPES(Invitrogen-GIBCO、カタログ番号15630)+1% Pen/Strep(Invitrogen-GIBCO、カタログ番号15070))中でゆっくりと旋回させ、その後、洗浄培地を吸引して、洗浄した。血液由来の単球を洗浄後、1mlの新鮮な培養培地を各ウェルに加えた。細胞を、1つのウェルから掻き取り、培養培地中に浮遊させて、1ウェルあたりの単球の数を推定した。

【0289】

(ヒト好中球の調製)

ヒト好中球を、健康な志願者から採取した抹消静脈血からパーコール勾配遠心分離を用いて単離し、CellTracker(商標) Green(5-クロロメチルフルオレセインジアセテート、CMFDA)によって染色した。100mlの血液から、一般的に、約 $10 \sim 20 \times 10^7$ 個の好中球が得られた。染色を、CellTracker(商標) Green CMFDAをDMSO中に10mMの終濃度まで溶解することによって実施した。好中球を、細胞 1×10^7 個/mlにてdPBS中に再浮遊させ、CMFDAを、 $2 \mu M$ の終濃度まで添加した。細胞および染料を、15分間にわたって37℃でインキュベートした。過剰な染料を、細胞を3回、10mlのdPBSで(RTで $300 \times g$ にて5分間の遠心分離により)洗浄することによって除去した。細胞の計数を、最終洗浄工程の後に実施した。CMFDA標識した好中球を、 2×10^6 個/mlにてdPBS中に再浮遊し、抗体(終濃度0.001、0.01、0.1、1、10または100 $\mu g/ml$)またはPBS(抗体なしの対照として)と共にインキュベートした。いくつかのアッセイにおいて(示されるとおり)、好中球+Abインキュベーション工程はまた、4mg/mlのヒトIgGを含んでいた。細胞プラス抗体を、30分間にわたり、37℃でインキュベートした。好中球を、 $300 \times g$ にて5分間、RTでの遠心分離の後、dPBSで2回洗浄し、培養培地中で 1×10^7 個/mlに再浮遊させた。

【0290】

(FACS分析)

CMFDA標識した好中球を、抗体(上述のように調製した)にて事前に被膜し、単球(上述のとおり)に1ml培養培地中の所望の濃度で添加した。6ウェルプレートの各ウェルにおける総容量は、2mlであった。いくつかのアッセイにおいて(示されるとおり)、培養培地はまた、4mg/mlのヒトIgGを含んでいた。5:1の比(好中球:単球)が、一般的に使用された。接着した単球の数が、1ウェルあたり細胞 4×10^5 個未満であった場合、 2×10^6 個の好中球を

10

20

30

40

50

添加した(すなわち、好中球:単球比が、5:1を超えた)。単球の数が1ウェルあたり細胞 4×10^5 個を超える場合、この数の5倍量の好中球を添加し、好中球:単球比を5:1に保った。培養物を、1時間にわたって37℃にて5%CO₂中でインキュベーター内でインキュベートした。

【0291】

インキュベーション後、培地を吸引し、非接着かつ取り込まれていない好中球を除去した。接着した単球を、3回、1ml/ウェルの培養培地によって(ゆっくりとした旋回により)洗浄した。単球を、15mlチューブ内に、培養培地中の細胞をウェルから細胞スクレイパー(Corning、カタログ番号CP3010)によって掻き取ることによって収集した。細胞を、 $300 \times g$ にて5分間RTで遠心分離し、上清を除去した。細胞ペレットを、160 μ lのPBS中1%(w/v)パラホルムアルデヒド中に再浮遊させ、FACS前に固定した。

【0292】

サンプルを、FACSCaliburフローサイトメトリー(BD Biosciences)において分析した。CMFDAで標識された好中球を同定し、そしてFL-1(蛍光チャネル1)において、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)を用いて測定し、そして単球を、単球のみのサンプルをフィコエリトリン標識抗CD14によって染色することによって同定し、これを、FL-2(蛍光チャネル2)において測定した。単球ゲートを、単球のみのサンプルのFCS(前方散乱)対SSC(側方散乱)プロファイルを用いて規定し、インキュベーションの間にサイズが増大した単球を含むように(FSC軸およびSSC軸に沿って)広げた。このゲートは、好中球のみのサンプルにおけるFSC対SSCプロファイルにおいて規定された好中球を含むFSC対SSCプロファイルの領域を除外した。食作用の程度を、総単球ゲート中のFL-1⁺ve単球の百分率に計算した。

【0293】

非特異的食作用のバックグラウンドレベルは、抗体で被膜しないCMFDA標識した好中球を含むサンプル(「Abなし」サンプル)におけるFL-1⁺ve単球の百分率であった。バックグラウンドを、データ(% FL-1⁺ve単球対Ab濃度)をグラフ化のためにPrism(v4.0c、GraphPad Software Inc)に入力する前に、Abを含む各サンプルから減算した。データを、シグモイド用量応答(可変勾配)、すなわち、4パラメータロジスティック方程式に供して、適切な場合、EC50値を決定した。

【0294】

データを、Table2B(表4)に提示する。「-」は、検出可能な食作用がなかったことを表し、「+」~「++++」は、アッセイにおいて測定された低レベルから高レベルの食作用を表す。

【0295】

(ADCC(抗体依存性細胞傷害性)およびCDC(補体依存性細胞傷害性)アッセイ)

以下のインビトロアッセイを、ADCCまたはCDC依存性のメカニズムを介した細胞枯渇を媒介するFc変異体の能力を試験するために、確立した。

【0296】

(標的細胞)

これらのアッセイにおいて、標的細胞は、hC5aR発現RamosクローンE2またはヒト好中球であった。hC5aR発現RamosクローンE2を、hC5aRをコードする哺乳動物発現ベクターによって標準的手順を用いてRamosクローンE2細胞をトランスフェクトすることによって発生させた。得られた細胞株は、高レベルのヒトC5aR(ヒト好中球の5~7倍高い)およびCD20を発現する。ヒト好中球を、食作用アッセイに関して上に記載されるように得た。

【0297】

標的細胞を、蛍光細胞膜染料であるPKH-26によって染色した。所望の数の標的細胞(5×10^4 個/サンプル/ウェル $\times 4$)を、15mlにdPBS中に希釈し、1,200rpmで5分間RTで遠心分離した。次いで細胞を、2 μ M PKH-26(各 1×10^6 個の標的細胞につき100 μ l溶液)中に再浮遊させた。標識を、室温で正確に3分間進行させ、その後、等量の熱不活化FCS(または熱不活化ヒト血清(Millipore))を加えて、標識反応を止めた。正確に1分後、RPMIを総量15mlまで加えた。細胞を、上述のように遠心分離し、アッセイ培地中に細胞 2×10^6 個/mlにて再浮遊させた。抗体による被膜のために、PKH-26標識された標的細胞のアリコート(25 μ l、

すなわち 5×10^4 個)を、アッセイ培地中に希釈した $200 \mu\text{g/ml}$ の抗体を $25 \mu\text{l}$ 含む(終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$)滅菌U底96ウェルプレートに分注し、 37°C にて $5\%\text{CO}_2$ 中で30分間にわたってインキュベートした。

【0298】

(エフェクター細胞)

エフェクター細胞は、健康なドナー由来の単球枯渴PMBCであった。PMBCは、上述のように得られた。再浮遊した細胞(リンパ球/単球)を、 2ml /ウェルで細胞約 4×10^6 個/ウェルにて6ウェル組織培養プレート(Corning)内に入れるか、または 20ml /フラスコにてT75フラスコ(Corning)に入れ、2時間にわたって 37°C にて $5\%\text{CO}_2$ 中でインキュベートした。非接着の細胞(リンパ球およびNK細胞を含む)を、吸引によって除去し、 $100 \times \text{g}$ で10分間RTにて遠心分離した。細胞を、リンパ球およびナチュラルキラー細胞の数を増やすために 100ng/ml の組換えヒトIL-2を含む 20ml 培地中に再浮遊させた。細胞を、一晚 37°C にて $5\%\text{CO}_2$ 中でインキュベートした。翌日、細胞を、 $1,400\text{rpm}$ で10分間RTにて遠心分離し、次いで、ADCCアッセイにおけるエフェクター細胞としての使用のために、アッセイ培地中に細胞 2.5×10^7 個/ ml にて再浮遊させた。

【0299】

(ADCCアッセイ)

標的細胞のPKH-26による標識および抗体による被膜後、 $100 \mu\text{l}$ のエフェクター細胞または $100 \mu\text{l}$ のアッセイ培地(対照、標的細胞のみ)を、 $50 \mu\text{l}$ の標的細胞に直接添加した。サンプルを、さらに3時間 37°C にて $5\%\text{CO}_2$ 中でインキュベートした。サンプルを、 $10 \mu\text{l}$ の $10 \mu\text{M}$ To-Pro-3生存性染料(TP-3)を終濃度約 625nM になるように含む 1.2ml マイクロタイターFACSチューブに移し、サンプルを、FACSによって分析した。FSC対SSCプロットにおいて、破片を除く全ての細胞にゲートをかけた。ゲートをかけた細胞を、FL-2対FSCにおいて分析し、FL-2陽性細胞(すなわち、PKH-26標識された標的細胞)にゲートをかけた。FACSデータを、FlowJoソフトウェア(Tree Star, Inc.v6.3.4)を用いて分析した。

【0300】

特異的ADCCを、対応サンプルの平均 $\%TP3^{+ve}$ 「標的+エフェクター」(B)から、平均 $\%TP3^{+ve}$ 「Abなし標的のみ」(C)および平均 $\%TP3^{+ve}$ 「Abなし、標的+エフェクター」(D)をそれぞれ減算した後、平均 $\%TP3^{+ve}$ 「標的のみ」(A)を減算した;すなわち、

特異的ADCC=(B-D)-(A-C)または=(B-A)-(D-C) 方程式1

【0301】

table2B(表4)に提示される結果を、単球枯渴IL-2刺激ヒトPBMC(主にNK細胞だが、B細胞、T細胞および樹状細胞を含む)をエフェクター細胞集団として用いて得た。標的細胞は、hC5aRおよびCD20の両方を発現するトランスフェクトされた細胞株Ramos E2であった(抗CD20抗体リツキシマブを陽性対照として使用することを可能にする)。結果は、リツキシマブと同等の効力でADCCを誘導するFc変異体を示す「+++」、高度のドナー変動性が観察されたFc変異体を示す「+/-」、および有意なADCCの誘導が検出されなかったFc変異体を示す「-」の範囲に及ぶ。Fc変異体が媒介するADCCの増大(IgG1_S239D、I332E)(Chu SY、Vostiar I、Karki Sら;Mol Immunol、2008年、45(15):3926~3933)を、アッセイの陽性対照として含めた。

【0302】

(CDCアッセイ)

Fc変異体を、CDCを誘導するその効力についても分析した。実験設定は、エフェクター細胞をヒト血清と置き換えることを除き、ADCCアッセイについて記載されたものと本質的に同じであった。

【0303】

標的細胞、例えば3%ウサギ補体血清を含む培地中のRamos E2細胞(細胞 2×10^6 個/ ml)を、等容量の、3%ウサギ補体血清を含む $2 \times$ 抗体溶液($200 \mu\text{g/ml}$)と、96ウェルU底組織培養プレート内で混合した。同じウェルセットが、 $25 \mu\text{l}$ の補体を含まない培地中の $2 \times$ 抗体溶液($200 \mu\text{g/ml}$)と混合された $25 \mu\text{l}$ のRamos E2細胞(細胞 2×10^6 個/ ml)を含んでいた。3つの

ウェルの1セットが、25 μ lのRamos E2細胞(細胞 2×10^6 個/ml)+25 μ lの3%ウサギ補体血清中のアッセイ培地(「抗体なし」サンプル)を含んでいた。もう1つの3ウェルのセットが、25 μ lのRamos E2細胞(細胞 2×10^6 個/ml)+25 μ lの補体を含まないアッセイ培地(「抗体なし」サンプル)を含んでいた。インキュベーション前に、100 μ lの、3%ウサギ補体血清を適切に含むかまたは含まないアッセイ培地を、各ウェルに添加した。サンプルを、3時間にわたって、37 $^{\circ}$ Cにて5%CO₂中でインキュベートした。

【0304】

(標的細胞生存度の決定)

蛍光生存性染料To-Pro-3(Molecular Probes)を、フローサイトメトリーによる分析の直前に、各サンプルに添加した。各チューブ内のTo-Pro-3の終濃度は、約62.5nMであった。To-Pro-3陽性(TP3+)細胞を、非生存であるかまたは溶解していると規定した。

10

【0305】

(フローサイトメトリーおよびデータ分析)

サンプルを、FACSCalibur(BD Biosciences)において分析し、得られたデータを、FlowJoソフトウェア(v6.3.4, TreeStar Inc.)を用いて分析した。FSC対SSC散乱プロットにおいて、破片を除く全ての細胞にゲートをかけて、5,000個の標的細胞事象を、各サンプルについて収集した。FL-4チャンネルにおいてゲートをかけた標的細胞のヒストグラムを作成し、これは、細胞によるTo-Pro-3取り込みのレベルを示した。各サンプルにおけるTP3+細胞(すなわち、非生存細胞)の数を、決定し(これらは、主ピークの右側の細胞として規定される)、この数を、サンプル中の標的細胞の総数の百分率で表した。

20

【0306】

3連でアッセイしたサンプルを、以下のカテゴリー概要において示される4つのカテゴリー、A、B、CおよびDの1つに分類した。

【0307】

【表3】

カテゴリー概要

右記と共にインキュベートした標的細胞	100 μ g/ml 抗体	抗体なし
補体なし	A	B
ウサギ補体血清	C	D

分析したサンプルのカテゴリー

30

【0308】

抗体を含む各サンプルについて、反応を、補体ありまたはなしで実施した。抗体を含み、補体を含まないサンプルから、抗体特異的なバックグラウンド溶解のレベルを得た。カテゴリーBおよびDからは、抗体なしまたは抗体および補体の両方共なしのいずれかの非特異的バックグラウンド溶解を得た。

【0309】

TP3+非生存標的細胞の百分率(%溶解)を、3%補体を含む各サンプルについておよび補体を含まない各サンプルについて、計算した。各抗体および「抗体なし」対照について、3連のサンプルからのデータを平均化した。

40

【0310】

各抗体について、特異的CDC活性を計算するために、補体非存在下での抗体特異的溶解(「A」サンプルにおける平均%溶解)を、補体を含むAbサンプルの%溶解(「C_{1/2/3}」サンプル)から減算し、その後、非特異的バックグラウンド溶解を減算した。非特異的バックグラウンド溶解は、補体を含む「抗体なし」サンプルにおける溶解(「D」サンプルにおける平均%溶解)から補体なしの「抗体なし」サンプルにおける溶解(「B」サンプルにおける平均%溶解)を減算したものである。Fc変異体によって媒介されるCDCの増大(IgG1_S254W)(WO 08030564)を、アッセイについての陽性対照として含めた。

特異的CDC(%溶解)=(C-A)-(D-B)[または=(C-D)-(A-B)] 方程式2

【0311】

50

統計学的分析を、GraphPad Prism(v4.0)において実施し、群のいずれかの間の相違が有意であるかを決定した。全ての4つのアッセイからの各サンプルの特異的CDC活性を、使用された抗体にしたがってスプレッドシートに入力した。群を、パラメトリック検定を用いて比較した：一元配置分散分析(ANOVA)の後、チューキーの多重比較事後試験を行った。

【 0 3 1 2 】

結果は、table 2B(表4)に含まれる。結果は、IgG1 S254W突然変異体と同等の効力でCDCを誘導するFc変異体を示す「+++」、高度の変動性が観察されたFc変異体を示す「+/-」、および有意なCDCの誘導が検出されなかったFc変異体を示す「-」の範囲に及ぶ。

【 0 3 1 3 】

【表 4】

10

IgG	抗体 Fc 領域	食作用	ADCC	CDC
IgG1	L234A_L235E_G237A_A330S_P331S	-	-/+	-
	N297Q_L234A_L235E_G237A	-	++	-
	N297Q_L234A_L235E	-	++	-
	G236R_L328R	-	+++	-
	L234A_L235E	+	+++	-
	N297Q	++	+	-
	IgG1 参照	+++	+++	-
	S239D_I332E	+++	+++	-
	S254W	++++	+++	+++
IgG2	N297Q	-	++	-
	IgG2 参照	++	-	-
IgG2/4 ⁽¹⁾	N297Q	-	-	-
	V234A_G236A	-	-	-
	IgG2/IgG4 参照	+	-	-
IgG4 (S228P) ⁽²⁾	N297Q_F234L_L235A	-	-/+	-
	N297Q_E233P_F234V_L235A	-	-	-
	E233P_F234V_L235A	+	-	-
	N297Q	+	-/+	-
	L235A	++	+	-/+
	F234L_L235A	++	+	/+
	IgG4 参照	+++	+	/+

20

30

Table 2B. 細胞ベースのエフェクター機能アッセイにおける Fc 変異体の活性。

【 0 3 1 4 】

食作用アッセイ、ADCCアッセイおよびCDCアッセイにおけるFc変異体の分析から得られた結果のまとめ。(-=エフェクター機能なし; +=エフェクター機能あり)。 (1)CH1およびIgG2の下方ヒンジ領域、およびIgG4の残りのCH2-CH3を含むIgG2/IgG4 Fc変異体; (2)半抗体の形成を排除するためにIgG4 Fc領域に導入されたS228P突然変異体。

40

【 0 3 1 5 】

(実施例5: 抗hC5aR抗体Fc変異体の効力の特徴付け)

Fc領域における突然変異がhC5aRに対するhC5aの結合およびhC5a媒介型好中球移動を阻害する抗体の効力に影響を及ぼすか否かを試験するため、それぞれ、異なるFc変異体を、上述の置換アッセイおよび移動アッセイにおいて試験した。好中球移動アッセイを、使用されたPMNがhC5aR-KO/KIマウス(mC5aレセプターノックアウト/ヒトC5aRノックイン、W020 05060739)から単離されたマウスPMNであったことを除き、上述のように実施した。細胞を、以下のように得た。骨髓PMNを、2匹のhC5aR-KO/KIマウスの大腿骨および脛骨から単離した。骨髓細胞を、PBSを用いて骨から流し、その後、細胞浮遊液をセルストレイナー(BD Falcon、352350;70ミクロンナイロンメッシュ)を通して50mlチューブに濾過し、そして

50

遠心分離した(10分間、1600rpm)。細胞を、培地中に再浮遊させ、滅菌15mlチューブの中で、3mlのフィコール・パックプラス(GE Healthcare)の上に、注意深く層状に重ねた。20分間にわたる600×gにて室温での遠心分離後、好中球/赤血球ペレットを、単離する。赤血球を、溶解緩衝液(Sigma、R7757; 10mM Tris-HCl pH7.5中8.3g/L塩化アンモニウム)を用いて1分間溶解させる。2周期の遠心分離および洗浄の後、細胞ペレットを、反応混合物中に再浮遊させる。浮遊液は、ギムザ染色したサンプルの顕微鏡検査によって評価すると、95%を超える好中球を含んでいた。試験した抗体の可変領域は、Ref.Ab Qの可変領域と同一であった。データを、table3(表5)に示す。

【 0 3 1 6 】

hC5aRに対するhC5aの結合を阻害する効力における有意な相違を、SPA分析においてFc変異体について観察した(table3(表5)、欄1)。Ref.Ab QのIgG1バージョンを、さらなるIgG Fc変異体と共に分析し、データは、IgG1 Fc変異体が、一般的に、IgG4およびIgG2/IgG4 Fc変異体の両方よりもより強力にhC5aの結合を阻害したことを示した。Ref.Ab QのF(ab')₂断片もまた、分析に含め、全長Ref.Ab Q(IgG4)と同程度にhC5aの結合を阻害することを見出した。これらの知見は、ヒンジ領域がhC5aの結合を阻害する抗体の能力に重要であることを示した。この考えは、F(ab')₂断片がRef.Ab Qと同程度に好中球移動を阻害可能であるという事実によって支持された(Table3(表5))。また、IgG1変異体は、IgG2またはIgG4ヒンジ領域を含むIgGよりも好中球移動の阻害において強力であることもまた、見出された(Table3(表5、欄2))。

【 0 3 1 7 】

Ref.AbのIgG1バージョンの、IgG4バージョンより高い効力は、IgGヒンジ領域のより高い柔軟性に起因するより高いアビディティに関連し得る。これを調査するために、Ref.AbのIgG1バージョンおよびIgG4バージョンのヒト好中球に対する結合を、FACSによって分析した。このデータは、IgG1バージョンが、IgG4バージョンよりも高いアビディティで好中球に結合することを実証した。データは示さない。

【 0 3 1 8 】

合わせると、これらの知見は、IgG1ヒンジ領域における柔軟性の増大が、hC5aRに対する結合の増大に寄与し、これが効力の増大をもたらすことを支持する。

【 0 3 1 9 】

【 表 5 】

抗体 Fc 領域	hC5a 置換(SPA)	ヒト好中球の移動の 阻害
IgG4	++	++
IgG1	+++	ND
IgG1 (L234A_L235E_G237A_A330S_P331S)	+++	+++
IgG1 (S239D, I332E)	+++	++++
IgG2/4	+	ND
IgG2/4 (V234A, G236A)	+	+
F(ab) ₂ である Ref.Ab Q	++	++

Table 3. hC5a 結合(SPA)および hC5a への好中球移動における Fc 変異体の効果。(+=低活性、++=中程度活性、+++/+高)。

【 0 3 2 0 】

(実施例6.「完全」ヒト抗hC5aR抗体の産生および特徴付け)

実施例2に記載される分析から、抗体32F3A6を、さらなる研究のために選択した。この抗体の組換え体クローニングの間に、ヒト生殖細胞系配列とは異なるVHフレームワーク領域内の7つの突然変異を同定し、一方で、LC内には何らフレームワーク突然変異を見出さなかった(図3)。突然変異は、32F3A6から全ての入手可能なヒト生殖細胞系配列までのVH

およびVL配列を並べることによって見出した。

【0321】

抗体をなおさらにヒト様にするために、32F3A6のVH領域における7つの突然変異を、ヒト生殖細胞系残基に突然変異させ直し、上述のように食作用、ADCCおよびCDCの誘導をなくすることが示されている5つの突然変異L234A_L235E_G237A_A330S_P331Sを含むIgG1 Fc領域上にグラフトした。この化合物を、32F3A6 GLと呼ぶ。戻し突然変異した抗体の効力を、元の抗体と比較し、hC5aRに対するhC5aの結合を阻害する効力(SPAにおいてアッセイした)、またはhC5a媒介型好中球移動を阻害する効力において、32F3A6または32F3A6 GLの間に相違は観察されなかった(データは示さない)。

【0322】

好中球食作用、ADCCまたはCDCを誘導する上述の完全ヒト抗体の能力を、実施例4において記載されるように評価し、結果を、table4(表6)にまとめる。

【0323】

table4(表6)に含まれる特異的ADCCに関する結果は、単球枯渴ヒトPBMCをエフェクター細胞として、そしてヒト好中球を標的細胞として用いて、得られた。

【0324】

【表6】

化合物		食作用	特異的 ADCC	特異的 CDC
対照としての PBS		-	ND	-
可変領域	Fc 領域			
3G12(無関係な抗原)	IgG1	-	+	-
32F3A6 GL	IgG1AEASS	-	+	-
32F3A6 GL	IgG1	+	+++	ND
Sigma	IgG4	ND	+	ND

Table 4. 抗 C5aR 抗体の Fc 媒介性細胞性エフェクター機能。「-」は、検出可能なエフェクター機能が無いことを表し、「+」～「+++」は、実施例4において記載されたアッセイにおいて測定された、低レベルから高レベルまでのエフェクター機能を表す。ND(決定されていない)。

【0325】

以前に観察されたように、IgG1のFc領域における5つの点突然変異は、野生型IgG1のFc領域と比較して、食作用、ADCCおよびCDCをなくす。

【0326】

(実施例7. ヒト抗hC5aR抗体(32F3A6 GL)のさらなる特徴付け)

同定した抗体の機能性をさらに明瞭にするため、ならびに親和性および効力を決定するために、さらなるアッセイを、抗C5aR抗体の1つをRef.Ab Qと比較して用いて行った。親和性を、ヒト好中球における競合リガンド結合アッセイによって決定した。この機能性を、競合リガンド結合アッセイによって測定された抗体の親和性と呼ぶが、相互作用のアビディティの測定値とも考えられ得る。このエキソピボのアッセイは、インピトロ設定における抗体のC5a媒介性作用を中和する能力を測定する。効力アッセイは、C5aの誘導するCaフラックス、CD11bレセプター上方制御およびCD62L下方制御の中和を、ヒト好中球においてそれぞれ測定した。32F3A6GLについて得られたデータを、Table5(表7)に与える。

【0327】

(親和性測定)

(新鮮なヒト血液からの好中球の単離)

血液を、PBS+2% FBSで1:1に希釈し、フィコール・パックプラス(GE Healthcare #17-14 40-03)上に3部のフィコールおよび4部の血液の比(50mlチューブ内に15mlのフィコールおよび20mlの血液)で層状に重ね、その後、400×gでRTにて30分間にわたる遠心分離によって成層化した。吸引により、中間のPBMCバンドをゆっくりと取り出した。押し固まった赤

血球上で層になった顆粒球を、プラスチックのパスツールピペットによって吸引した。新しい50mlチューブ内に顆粒球および赤血球を移し、ペレットにした。このペレットを、1×PBSで40mlに希釈し、そして10mlの4%デキストラン500(sigma、31392) PBS中溶液(比1:5)を加え、逆さにしてゆっくりと混合した。20~30分後、得られた顆粒球豊富な上清を、新しいチューブに移し、250×gでRTにて5分間にわたって遠心沈殿した。夾雑する赤血球を、細胞ペレットを7.5mlの0.2% NaCl中に再浮遊させ、55~60秒間ゆっくりと混合することによる、浸透圧溶解によって除去した。その後、17.5mlの1.2% NaClを加え、次いでPBSで50mlに希釈し、そして250×gで5分間にわたって遠心沈殿した。この工程を、1回繰り返した。細胞ペレットを、その後、1mlの反応混合物(dPBS/RPMI)中に再浮遊させた。生存度および細胞数を、NucleoCounter(登録商標)を用いてモニタリングした。

10

【0328】

(好中球における競合リガンド結合アッセイ。)

ヒト好中球を、精製し、洗浄し、そして結合緩衝液(50mM HEPES、pH7.5、1mM CaCl_2 、5mM MgCl_2 および0.5%ウシ血清アルブミン(フラクシオンV、IgG非含有))中に細胞約 5×10^6 個/mlで再浮遊させた。各サンプルにつき、40 μl の細胞浮遊液(細胞 1×10^5 個/ウェル)を、96ウェルV型プレート(Greiner、カタログ番号651101)内に播種した。競合研究を、12濃度の競合する未標識リガンドを、1 μM の最高濃度で始まる半対数希釈で用いて行った。最終アッセイ容量を120 μl と考え、40 μl の抗体を加えた。40 μl の放射性リガンド[^{125}I]-hC5a(Perkin Elmer、カタログ番号NEX250)を、バックグラウンド対照を除く全てのサンプルに加えた。アッセイにおける放射性リガンドの終濃度は、1nMであり、最終容量は、120 μl であった。全てのサンプルを、3連で実施し、4時間にわたって4℃でインキュベートした。次いで、細胞を、1200rpm、4℃にて2分間の遠心分離にて収集し、100 μl の洗浄緩衝液(50mM HEPES、pH7.5、1mM CaCl_2 、5mM MgCl_2 、150mM NaClおよび0.5%ウシ血清アルブミン(フラクシオンV、IgG非含有))で3回洗浄した。最後に、細胞を、30 μl の洗浄緩衝液中に再浮遊させ、OptiPlate(Perkin Elmer、カタログ番号6005290)に移し、そして150 μl のMicroScint 20(Perkin Elmer、カタログ番号6013621)を各ウェルに加えた。プレートをカバーし、混合したウェルをキャリアレーションしたTop Counter上で1時間の遅延により計数した。アッセイに加えた放射性リガンドの総量を、別のプレート上で決定した。各サンプル内の計数の数を、百分率の正規化された値で表し、100%が計数の最大レベルであり、1nMの[^{125}I]-hC5aおよび冷抗体の添加なし、ならびに0%が、1 μM 冷hC5aの存在下で決定した非特異的結合である。データを、PRISM(GraphPad)を用い、非線形回帰によって分析した。

20

30

【0329】

(カルシウムフラックスアッセイ)

(ヒト好中球のFluo-4 AM細胞染料による染色)

好中球を遠心分離し、そしてPBS中で洗浄し、次いで、細胞 1×10^7 個/mlにて細胞染料中に再浮遊させ、室温にて40分間、暗闇でインキュベートした。細胞を、遠心分離し、そして洗浄して(過剰な染料を除去し)、再び遠心分離して、細胞 2×10^6 個/mlにて細胞緩衝液中に再浮遊させた。細胞(0.5ml)を、非滅菌ガラスFACSチューブ内に分注し(各サンプルにつき1チューブ)、室温にて保存し、2時間以内に使用した。各サンプルは、 1×10^6 個の好中球を使用した。

40

【0330】

(アッセイ)

カルシウムフラックスアッセイを、以下のように実施した。簡潔には、0.5mlの細胞緩衝液中のFluo-4 AMと共にローディングした 1×10^6 個の好中球を、FACSCaliburフローサイトメトリー(BD Biosciences)において、x軸FSC対y軸SSCを用いて好中球にゲートをかけて分析した。FL-1(FITC)チャンネルを使用し、チューブに種々の試薬(例えば、抗体、C5a、イオノマイシン(I-MGBまたはC-MGBよりもむしろ細胞緩衝液中に10×終濃度で溶解した))の添加の後に、好中球蛍光を測定した。サンプル蛍光を、毎秒得られた平均蛍光強度(MFI)値により連続的に測定した。このデータを、CellQuest(BD Biosciences)ファイル内に保

50

存し、さらなる処理および分析のために、Excel(Microsoft)およびPrism(v4.0c、GraphPad Software Inc.)に移した。好中球に対し加えた試薬の程度およびインキュベーション時間は、実施したアッセイの型にしたがって変動した。

【0331】

(C5a中和アッセイ)

抗体の10×3倍連続希釈物(1000 μg/mlから1.37 μg/mlの範囲の濃度)を、調製した。Fluo-4 AMをローディングした好中球(0.5mlの細胞緩衝液中 1×10^6 個)を、50 μlの10×抗体溶液(チューブ内の最終Ab濃度:100~0.137 μg/ml)と共に、10分間にわたって室温でインキュベートした。細胞プラス抗体を、FACSにより、約60秒間分析し、ベースライン蛍光を確立した。次いで、50 μlの10nM C5aを加えて約1nMの終濃度にし、蛍光測定を、さらに約60秒間続けた。抗体がC5a誘導性Ca²⁺放出を遮断した場合、蛍光のスパイクは存在しなかった。抗体がC5aを中和しなかった場合、蛍光にスパイクが存在した。最後に、50 μlの1 μg/mlイオノマイシンを添加して終濃度を0.1 μg/mlにし、蛍光測定をさらに約60秒間続けて、細胞が未だ応答性であることを確認した。

【0332】

(CD11bレセプター上方制御)

(アッセイ設定)

以下の設定を、C5a誘導性好中球活性化を中和する同定された抗体の能力を、CD11b発現の変化を測定することによって決定するために設計した。

【0333】

抗C5aRおよびアイソタイプ対照抗体を、PBS中に2×終濃度まで3倍連続希釈で希釈し(60~0.003387 μg/ml)、50 μlを、2連で、96ウェルU底プレートのウェル内に分注した。ヘパリン添加全血の50 μlのアリコートと、各ウェルに加えた。4組の対照ウェル(2連)は、50 μlのPBSプラス50 μlの血液のみを含んでいた。プレートを、20分間にわたり、37 °Cにて、5%のCO₂インキュベーター内でインキュベートした。好中球を活性化するために、50 μlヒトC5a(特定されたように、終濃度10nMまたは100nM)を、Abを含むウェルおよび1組の抗体を含まない対照ウェルに添加した。PBS(50 μl)を、抗体を含まない第2組の対照ウェルに添加した。ホルボールミリステートアセテート(PMA)(終濃度5 μg/ml)を、抗体を含まない第3組の対照ウェルに添加した。プレートを、再び、20分間にわたって、37 °Cにて5%のCO₂インキュベーター内でインキュベートした。最後に、50 μlのPBS中で1/50に希釈した50 μlの抗CD11b-PE(BD Biosciences、カタログ番号555388)混合物(終濃度1/200)を、全てのウェル(Abを含まず、C5aまたはPMAを含まない第4組の2対照ウェルを除く。これらのサンプルは、ベースラインMFI値を提供した)に添加した。プレートを、再び、20分間にわたって、37 °Cにて5%のCO₂インキュベーター内でインキュベートし、次いで、2,000rpmで3分間遠心分離して、血液細胞をペレットにした。上清(150 μl)を除去し、ペレットを、200 μlの1×FACS溶解溶液中に再浮遊させて、赤血球を溶解させた。室温で5分後、プレートを再び遠心分離し、200~225 μlの上清を除去し、ペレットを、160 μlの1×FACS溶解溶液中に再浮遊させた。細胞を、フローサイトメトリーによる分析のために、マイクロタイターチューブに移した。

【0334】

(FACSおよびデータ分析)

FACSCaliburフローサイトメトリー(BD Biosciences)を、チャンネルFL-2のために確立した補償パラメータを用いて設定した。サンプルに、死細胞および破片を除いてゲートを開けた。好中球を、高いFSCおよびSSCを有し、ゲートにかかったものとして同定した。FL-2(CD11b-PE)チャンネルにおいてゲートにかかった好中球の平均蛍光強度(MFI)を計算した。

【0335】

結果を、バックグラウンドを減算し、最大CD11b発現の百分率として表した。最大CD11b発現(MaxCD11b)は、C5aを含むがAbを含まないでインキュベートされた好中球の平均MFIであった。最小(バックグラウンド)CD11b発現(MinCD11b)は、C5aもAbも含まないでインキュベートされた好中球の平均MFIであった。各サンプルについての最大CD11b発現の%を計算

するために使用した式は、以下である：

$$\% \text{ Max サンプル} = (\text{MFI}_{\text{サンプル}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) / (\text{MFI}_{\text{Max}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) \times 100$$

【 0 3 3 6 】

データを、GraphPad Prism(v4.0)に入力し、シグモイド用量応答曲線(可変勾配)、すなわち、4パラメータロジスティック方程式に、非線形回帰を用いて適合させ、EC50を計算した。

【 0 3 3 7 】

(CD62Lレセプター下方制御)

(アッセイ設定)

以下の設定を、C5a誘導性好中球活性化を中和する同定された抗体の能力を、CD62L発現における変化を測定することによって決定するために設計した。

【 0 3 3 8 】

上記のCD11bアッセイを、CD62Lを認識するコンジュゲート抗体(BD Biosciences、カタログ番号559772)を用いてCD62L検出に適用した。CD62Lに特異的な実験詳細を、以下に与える。

【 0 3 3 9 】

(FACSおよびデータ分析)

FACSCaliburフローサイトメトリー(BD Biosciences)を、チャンネルFL-4のために確立した補償パラメータを用いて設定した。サンプルに、死細胞および破片を除いてゲートをかけた。好中球を、高いFSCおよびSSCを有し、ゲートにかかったものとして同定した。FL-4 (CD64L-APC)チャンネルにおいてゲートにかかった好中球の平均蛍光強度(MFI)を計算した。

【 0 3 4 0 】

結果を、バックグラウンドを減算し、最大CD62L発現の百分率として表した。最大CD62L発現(MaxCD62L)は、C5aもAbも含まないでインキュベートされた好中球の平均MFIであった。最小(バックグラウンド)CD62L発現(MinCD62L)は、C5aを含むがAbを含まないでインキュベートされた好中球の平均MFIであった。各サンプルについての最大CD62L発現の%を計算するために使用した式は、以下である：

$$\% \text{ Max サンプル} = (\text{MFI}_{\text{サンプル}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) / (\text{MFI}_{\text{Max}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) \times 100$$

【 0 3 4 1 】

データを、GraphPad Prism(v4.0)に入力し、シグモイド用量応答曲線(可変勾配)、すなわち、4パラメータロジスティック方程式に、非線形回帰を用いて適合させ、EC50を計算した。

【 0 3 4 2 】

上記のアッセイからの結果を、以下のtable5(表7)にまとめる。

【 0 3 4 3 】

【表 7】

	親和性競合リガンド結合アッセイ	IC50 カルシウムフラックスアッセイ	IC50 C11b 上方制御	IC50 CD62L 下方制御
32F3A6 GL	0.34nM	1.8μg/ml	0.7μg/ml	0.5μg/ml
Ref. Ab Q	0.84nM	7.3μg/ml	3.6μg/ml	1.9μg/ml

Table 5. データは、親和性アッセイ、カルシウムフラックスアッセイ、CD11bおよびCD62L アッセイにおいて得られる。

【 0 3 4 4 】

データは、32F3A6 GLが、C5aの作用を用量依存的様式で阻害することを確認した。好中球Ca²⁺放出における阻害は、32F3A6 GLの濃度を増大すると増大し、より低いIC50値によって示されるように、Ref. Ab Qよりも高い効力を有する。

【 0 3 4 5 】

同様に、32F3A6 GLはまた、CD11bおよびCD62L制御アッセイにおいてもRef. Ab Qよりも

効果的であり、Ref. Ab Qよりも4～5倍高い効力を示す。

【0346】

好中球移動(走化性)アッセイにおける32F3A6 GLのさらなる試験もまた、1.0 µg/mlのIC50で用量依存性を示した。

【0347】

(実施例8. インビボマウス関節炎モデル)

インビボ効果を、hC5aR KO/KIマウスにおけるK/BxNモデル(WO2009/103113およびLeeら、Nat Biotechnol. 2006年10月;24(10):1279～84)において試験した。K/BxNマウスは、自発的に、GPI(自己抗原グルコース6リン酸イソメラーゼ)に対する循環するAbによって媒介される自己免疫様疾患を発症していた。関節炎K/BxNマウス由来の血清は、他のマウス系
10
統において、ヒトRAのホールマークの多くの特徴(関節破壊を伴う慢性進行性疾患を含む)を有する疾患を誘導する。

【0348】

(動物)

ヒトC5aR KO/KIトランスジェニックマウス(C57BL/6;H-2b;ヒトC5aR+/+/マウスC5aR-/-;系統略称:H5Rtg)は、8～27週齢であった。

【0349】

(K/BxN血清)

実験のための血清を産生するために、KRNg雄マウスを、NOD雌マウスと交雑させた。KR
20
Nトランスジーンを保有し、関節の炎症を発症したF1子孫(8～10週齢)を屠殺し、血液を、心臓穿刺によって採取した。37℃にて2時間のインキュベーションおよび10分間にわたる4,000rpmでの遠心分離後、血清を収集した。複数のマウス由来の血清をプールし、分注し、-80℃にて保存した。全てのマウスに、同バッチのK/BxN血清を注射した。

【0350】

(関節炎誘導およびスコアリング)

炎症性関節炎を、0日目および2日目の両方において、150 µlのK/BxN血清を腹腔内注射することによって、レシピエントH5Rtgマウスにおいて誘導させた。疾患進行を、肢のサイズを測定することおよび前肢および後肢ならびに肢関節における炎症の程度に基づく臨床的スコアを決定することによって、毎日モニタリングした。0日目からの平均肢サイズ
30
の変化を、以下のように計算した。後肢のそれぞれの足首の厚み(mm)を、毎日カリパスを用いて測定した。後肢のそれぞれの1回または2回の読み取りの平均が、毎日の平均肢サイズ(PS)であった。0日目の平均肢サイズを、毎日の平均肢サイズから減算し、各実験日における肢サイズの平均変化(ΔPS)を得た。臨床スコアを、Table6(表8)に示すスコアリングシステムに基づき、各マウスの各肢について計算した。四肢からのスコアを合計し、各実験日の各マウスについての総臨床スコア(CS)を得た。

【0351】

【表8】

スコア	外観
0	正常な関節
1	軽度/中程度の足首のむくみおよび/または1本のむくんだ指
2	むくんだ足首または2以上の指のむくみ
3	肢の全ての面に亘るかまたは全5指の重度のむくみ

Table 6. 関節炎臨床スコアリングシステム

【0352】

処置期間に入るマウスを5日目に決定するために、「RAスコア」を、臨床スコアに0日目からの肢サイズの変化(mm)をかけて、各マウスについて計算した。一般的に、0.7を超えるRAスコアを有するマウスのみを、研究の処置段階に入れた。

【0353】

10

20

30

40

50

(32F3A6 GLによる治療処置)

疾患の発症後(0日目)、KO/KI hC5aRマウスを、5日目において32F3A6 GLの負荷用量を与え、次いで9日目に日用量を与えた。負荷用量は、10、1.5および0.5mg/kgであり、日用量は、2、0.5および0.25mg/kgであった。各処置群についての臨床スコア(平均+/-SD)を、図4において示した。NNC0215-0384による処置は、無関連の対照抗体によって処置されたマウスと比較して、炎症の用量依存性軽減を示した。類似の作用を、平均肢サイズにおける変化に基づいて観察した(示さず)。

【0354】

(実施例9. 乾癬性関節炎患者におけるC5a発現レベル)

C5aを、11の乾癬性関節炎患者由来の滑液サンプルおよび対照としての12の骨関節炎患者由来の滑液サンプルにおいて測定した。市販のC5a ELISAキットからのプロトコールは、以下である(BD OptEIA(商標)、Human C5a ELISA Kit II(BD Biosciences; カタログ番号557965))。データを、図5に提示し、以下のtable7(表9)にまとめる。C5aレベルは、乾癬性関節炎患者群において有意に高く($p=0.001$; Mann-Whitney)、このことは、C5aが、乾癬性関節炎において滑液炎症の駆動因子であることを示す。

【0355】

【表9】

	対照(骨関節炎患者)	乾癬性関節炎患者
平均 C5a レベル(±SEM)	7.989±0.6999	64.17±34.53

Table 7. 対照および乾癬性関節炎患者由来の滑液における C5a の検出レベル

【0356】

(実施例10. 乾癬性関節炎を有する患者由来の滑液におけるC5aRの発現)

ホルマリン固定されパラフィン包埋されたPsA(n=9)を有する患者および正常範囲(n=5)由来の滑液生検を含む組織マイクロアレイ(TMA)スライドを、Biochain Institute Inc./BioCat GmbH, Heidelberg, Germanyから得た。1つのPsAサンプルは、Dr. Bliddal(Frederiksborg Hospital, Denmark)およびDr. Sphe(Gentofte Hospital, Denmark)の共同研究による。全てのヒト材料を、ドナー/または近い血縁者から、インフォームドコンセント、および適切な地元の倫理委員会、BioCat Ge, personal communication; Cambridge Biosciences、供給者情報:Tissue Supply Network(www.bioscience.co.uk)の承認によって得た。Dr. Bliddal/Dr. Spheからのサンプルは、倫理許可番号H-4-2009-117の下で得た。以下の抗体が、使用された: マウスモノクローナル抗ヒトC5aR(R&D Systems、MAB3648クローン347214 (IgG2a))、マウスIgG2aアイソタイプ特異的対照(Dako, X0943、クローンDAK-G05)、ビオチンコンジュゲートロバ抗マウスJackson ImmunoResearch(715-065-150)。

【0357】

免疫組織化学を、以下のように実施した。切片を、キシレンにおいて脱パラフィンし、濃度が低下するアルコールにおいて再水和した。抗原回復を、Tris-EGTA緩衝液(10mM; 0.5 mM)、pH9.0において、電子レンジで15分間実施した。製造業者の指示に従い、内因性ペルオキシダーゼ活性を、3% H_2O_2 によって遮断し、内因性ビオチンを、アビジンおよびビオチン遮断溶液とのそれぞれ10分間のインキュベーションによって遮断した。非特異的結合を、3%スキムミルク、7%ロバ血清、3%ヒト血清および3.2mg/mlポリ-L-リジン(PLL)を含むTBSと共の30分間にわたるインキュベーションによってブロックした。一次抗体および二次抗体を、0.5%スキムミルク、7%ロバ血清および3%ヒト血清を含むTris緩衝液中に希釈し、インキュベーションを、一晩にわたって4 で、そして60分間にわたって室温で、それぞれ実施した。第1増幅工程を、0.5% Du Pont遮断試薬(TNB)を含む0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)によって希釈したベクタステインABCペルオキシダーゼキットと共の、30分間にわたるインキュベーションによって実施し、その後、ビオチン化チラミドにおける6分間にわたるインキュベーションによる第2増幅工程を続けた。最終増幅を、上述のように希釈したベクタステインABCペルオキシダーゼキットと共の、30分間にわたるさらなるインキ

ュベーションによって実施した。発色反応を、ジアミノベンジジンによって達成した。核を、ヘマトキシリンによって対比染色し、切片を再水和し、キシレン内で清浄し、そしてEukittでマウントした。RA、OAおよび正常な滑液におけるC5aRタンパク質発現についてのTMAの評価を、観察者に対し盲検で行った。DP70デジタルカメラを備えたOlympus BX51顕微鏡(Olympus Denmark A/S;Ballerup,Denmark)を、切片の評価のために使用した。

【0358】

(結果)

C5aR免疫陽性細胞が、乾癬性関節炎を有する患者の10人中8人の滑膜下内層において、そして乾癬性関節炎を有する患者の10人中10人のストロマにおいて、リンパ球凝集物中で混じっているのを見出した。対照は、これらの滑液区画において何らC5aR染色を示さなかった(0/5)。C5aR免疫陽性滑膜細胞を、5人のうち4人の対照において、ならびに乾癬性関節炎を有する患者10人中10人において、内層細胞において検出した。結果を、以下のtable8(表10)にまとめる。

【0359】

【表10】

滑液区画	正常	乾癬性関節炎患者
滑膜下内層組織内のリンパ球凝集物における C5aR+細胞の浸潤	0/5	8/10
ストロマにおける C5aR+細胞	0/5	10/10
内層の滑膜細胞における C5aR+細胞	4/5	10/10

Table 8. 正常な滑膜および乾癬性関節炎を有する患者由来の滑膜における C5aR⁺細胞の検出。正常滑膜と比較した乾癬性関節炎を有する患者における C5aR 発現間の相違についての P 値(フィッシャー直接検定):0.007(リンパ球凝集物)および 0.0003(ストロマ)。

【0360】

(実施例11. 抗C5aRによる、乾癬性関節炎患者由来の滑液によって誘導される好中球移動の阻害)

(好中球顆粒細胞移動(走化性)アッセイ)

ヒト好中球顆粒球(ヒトPMN(多形核白血球))のhC5a依存性移動を阻害する抗体の効力を、BD FluoroBlok 96マルチウェル挿入システムを使用するボイデンチャンバーアッセイにおいて分析した。

【0361】

ヒト血液サンプルから得られたヒトPMNを、EDTAを含むバイアル内に入れた。血液細胞を、フィコール・パックプラス(GE Health Care)勾配(3部)を通した血液(4部)の30分間にわたる(400×g)室温での遠心分離によって分離した。PMN含有層を、デキストラン-500(Sigma)を含有するPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)において1時間にわたって浮遊させ、夾雑する赤血球を除去した。上清を、5分間にわたって(250×g)室温にて遠心分離し、残留する赤血球を、0.2% NaClを用いて55秒間にわたって浸透圧溶解させた。溶液を、1.2% NaCl+PBSによって等張にし、250×gにて5分間にわたって遠心分離し、その後、浸透圧溶解を繰り返した。遠心分離後、PMNを、反応混合物(RM):NaCl 137mM、KCl 5.3mM、Na₂HPO₄ 0.33mM、NaHCO₃ 4mM、KH₂PO₄ 0.44mM、グルコース5mMを含み、MgSO₄・7H₂O 0.4mM、MgCl₂、0.5mM、CaCl₂ 0.5mM、HEPES 20mMで補った、HBSS(カタログ番号、14175 Gibco)中に再浮遊させた。細胞密度を、NucleoCounter(Chemometec)によって決定した。PMN浮遊液は、ギムザ染色したサンプルの顕微鏡検査によって評価すると、95%を超える好中球を含んでいた。

【0362】

ローディングPMN:カルセイン、AM(Fluka)を、DMSO(ジメチルスルホキシド)中に溶解し、RM中で細胞と共に(細胞 2×10^6 個/ml)1000×に希釈し、濃度を10μMにした。浮遊液を、30分間にわたり、インキュベーター内で37℃にてインキュベートし、次いで、RMで3回洗浄して、過剰なカルセインを除去した。最後に、細胞を、RM中に再浮遊させた(細胞 4×10

⁶個/ml)。

【0363】

ヒト滑液(SF)を、2人の乾癬性関節炎患者から、膝穿刺によって得た。遠心分離による細胞の除去後、サンプルを凍結させ、そして-80℃で保存した。移動実験のために、サンプルを解凍し、0.2% EDTAを含むRMを用いて2×に希釈した。

【0364】

移動を、FluoroBlok(登録商標)3μm孔サイズ96ウェル(カタログ番号351161.BD Falcon(VWR))を用いて、ボイデンチャンバー技術によって評価した。上方チャンバー、すなわちFluoroBlok膜を含む挿入物を、1mg/ml PBS中のヒトフィブリノゲン(カタログ番号F3879-1G、Sigma)により、37℃にて、2時間にわたって被膜した。洗浄後、膜を、PBS中の2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む溶液によって遮断した。RMを用いたもう1回の洗浄の後、hC5aR抗体(100μg/ml)含有または非含有のカルセインローディングした10⁵個のPMNを、各ウェルに添加し、そして、対照溶液または化学誘引物質溶液(hC5a(Sigma、または滑液のサンプル))を含むレシーバープレート(下方チャンバー)に置いた。各群は、4~6ウェルからなった。細胞移動の定量を、下方チャンバーにおける細胞の蛍光の測定によって達成した。FluoroBlok膜は、効果的に490~700nmの光の通過を遮断するので、下方チャンバーに入らなかった細胞からの蛍光は、485/530nmで検出できない。プレートを、485/538nm励起/放出波長において、37℃にて、60分間にわたり5分間毎に、底読み取り能力を有する蛍光プレートリーダーにおいて、読み取った(SpectraMax、Molecular devicesまたはFluorosc an、Thermo Labsystems)。

【0365】

移動を、60分における蛍光値によって評価し、相対的蛍光値によって表した。table9(表11)において、アイソタイプ抗体の存在下における移動を100%と設定し、移動を阻害する抗C5aR抗体の能力を計算した。移動は、hC5aR抗体によって明らかに減弱になった。10nM hC5aによって誘発される移動は、83%阻害された。3つのSFサンプルについての値は:15%、70%および48%であった。結果は、C5aR抗体は、乾癬性関節炎患者由来のSFの化学誘引性効果を阻害することを実証した。

【0366】

【表11】

	hC5a (10 nM C5a)	SF サンプルドナー1	SF サンプルドナー1	SF サンプルドナー1
アイソタイプ抗体	100	100	100	100
抗 C5aR	17	85	30	52

Table 9. hC5a または 3 人の乾癬性関節炎患者由来の滑液に応答する PMN の移動および hC5aR 抗体(参照抗体 Q)によるその阻害。アイソタイプ抗体と共にインキュベートされた際に検出された移動について、全ての値を正規化した。

【0367】

(実施例12. クローン病および潰瘍性大腸炎を有する患者の腸におけるC5aR発現)

正常範囲(n=14)内、潰瘍性大腸炎を有する患者由来(n=21)およびクローン病を有する患者由来(n=25)の腸組織サンプルを、Cambridge Bioscience(Cambridge, UK)から得た。全てのヒト材料を、ドナー/または近い血縁者から、インフォームド Consent、および適切な地元の倫理委員会、Cambridge Biosciences、供給者情報:Tissue Supply Network(www.bioscience.co.uk)の承認によって得た。使用された抗体および免疫組織化学プロトコールは、実施例9に記載されたとおりである。

【0368】

(半定量的スコアリング)

(C5aR免疫陽性(C5aR⁺)細胞を、以下のように、半定量的スコアリングした:)

【 0 3 6 9 】

粘膜関連リンパ球区画を、個々にスコアリングした：粘膜(M)：上皮内リンパ球(IEL) 区画(表面上皮)、基底膜およびろ胞関連上皮(FAE)。粘膜下(SM)：単離された(孤立した)リンパ球(ILF)、パイエル氏板(腸骨)/結腸IEL(結腸)および単離された浸潤リンパ球。外筋層(ME)：IELおよび単離された浸潤リンパ球。各区画を、0～4のスケールでスコアリングした：0、なし；1、僅か；2、中程度；3、多い、および4、ふんだんな数のC5aR⁺細胞。蓄積したスコアを、それぞれの腸の層(M、SM、ME)、および腸全体についての総合(M+SM+ME)について計算した。最大スコア：M=12、SM=12、ME=8および腸全体について32。C5aRタンパク質発現についての免疫組織化学データの半定量的スコアリングを、GraphPad Prism 5において、ダンの多重比較事後検定を用いたクラスカル・ワリス検定によって分析した。P<0.05は、有意であるとみなした。

10

【 0 3 7 0 】

(結果)

C5aR陽性好中球および骨髄様細胞を、CDを有する患者の25人中23人について、UCを有する患者の21人中19人について、そして14中7の正常腸サンプルについて、上皮内リンパ球区画において、ろ胞関連上皮において、そして粘膜の基底膜における孤立細胞として、見出した(P値(フィッシャー直接検定)は、それぞれ0.005および0.015であった)。加えて、C5aR陽性細胞を、CDを有する患者の25人中21人について、UCを有する患者の21人中18人について、そして14中7の正常腸サンプルについて、パイエル氏板/結腸リンパ球；単離された(孤立した)リンパ球および粘膜下の孤立細胞において見出した(P値(フィッシャー直接検定)は、0.03であり、それぞれ有意ではなかった)。最後に、C5aR陽性細胞を、CDおよびUCを有する患者由来の浸潤外筋層、ならびに正常な腸から見出した。結果を、図6に示し、table10(表12)にまとめる。半定量的分析に基づき、C5aRは、腸壁全体、例えば、3つの腸の層にわたる蓄積スコア(粘膜、粘膜下および外筋層)で、正常な腸と比較して、CDを有する患者由来の腸(P<0.01)およびUCを有する患者由来の腸(P<0.05)において、有意に高く発現されていることが見出された。

20

【 0 3 7 1 】

【表 1 2】

診断	以下における C5aR 発現		
	粘膜	粘膜下	外筋層
正常	7/14	7/14	8/14
クローン病	23/25	21/25	19/25
潰瘍性大腸炎	19/21	18/21	11/21

30

Table 10. 正常な腸と比較した、クローン病を有する患者および潰瘍性大腸炎を有する患者に由来する腸における C5aR 発現のまとめ。

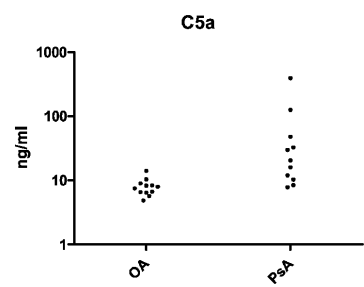
【 0 3 7 2 】

本発明のある特定の特徴は、本明細書中で説明され、記載されているが、多くの改変、置換、変更、および均等物が、当業者により想到されるものである。したがって、添付の実施形態は、全てのこのような改変および変更を本発明の真の趣旨の範囲内に包含するものであることが理解されるべきである。

40

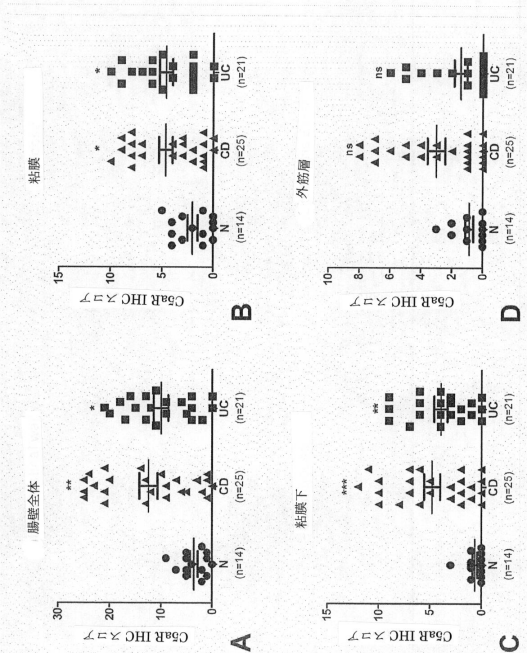
【図 5】

Fig. 5



【図 6】

Fig. 6



【配列表】

0006141834000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 12159172.1
 (32)優先日 平成24年3月13日(2012.3.13)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

前置審査

(72)発明者 ルイーセ・イエリル・ソイデン
 デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー
 (72)発明者 アンカー・ヨーン・ハンスン
 デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー
 (72)発明者 クレスチャン・ケーアスゴー
 デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー
 (72)発明者 セーアン・ロン
 デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスヴェア・ノヴォ・アレー

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特表2005-535562(JP,A)
 特表2010-501164(JP,A)
 特表2011-500073(JP,A)
 NATURE BIOTECHNOLOGY, 2006年, Vol.24, No.10, p.1279-1284
 European Journal of Immunology, 2009年, Vol.39, Suppl.1, S571, WSA06/4
 Current Opinion in Biotechnology, 2009年, Vol.20, p.685-691

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)