

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4975020号
(P4975020)

(45) 発行日 平成24年7月11日 (2012. 7. 11)

(24) 登録日 平成24年4月20日 (2012. 4. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 K 16/24 (2006. 01)

C O 7 K 16/24 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 5 (全 85 頁)

(21) 出願番号	特願2008-512576 (P2008-512576)	(73) 特許権者	509087759
(86) (22) 出願日	平成18年5月19日 (2006. 5. 19)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー
(65) 公表番号	特表2008-546374 (P2008-546374A)		テッド
(43) 公表日	平成20年12月25日 (2008. 12. 25)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1904
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/019627		4 ホーシヤム・リッジビュードライブ80
(87) 国際公開番号	W02006/125202		0/850
(87) 国際公開日	平成18年11月23日 (2006. 11. 23)	(74) 代理人	100092783
審査請求日	平成21年1月16日 (2009. 1. 16)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	60/682, 654	(74) 代理人	100095360
(32) 優先日	平成17年5月19日 (2005. 5. 19)		弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100093676
(31) 優先権主張番号	60/682, 620		弁理士 小林 純子
(32) 優先日	平成17年5月19日 (2005. 5. 19)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MCP-1抗体、組成物、方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単球走化性タンパク質 (MCP-1) に結合する単離抗体であって、配列番号27の重鎖可変配列および配列番号28の軽鎖可変配列を含んでなる、上記抗体。

【請求項2】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、MCP-1 に結合する単離抗体であって、前記重鎖可変領域が配列番号6、7および9の重鎖相補性決定領域 (CDR) アミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号13、14および16の軽鎖CDRアミノ酸配列を含んでなる、上記抗体。

【請求項3】

10^{-9} M ~ 10^{-12} M の親和性でMCP-1 と結合する、請求項1 または2 に記載の抗体。

【請求項4】

請求項1 ~ 3 のいずれか1項に記載の抗体、および製薬学的に受容可能な担体または希釈剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項5】

請求項1 ~ 3 のいずれか1項に記載の抗体を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる包装材料および容器を含んでなる製造品。

【発明の詳細な説明】

【関連出願との関係】

【 0 0 0 1 】

本出願は、2005年5月19日付けの米国仮特許出願第60/682654号明細書および同第60/682620号明細書に対する優先権を請求するものであり、それらの内容が引用することにより完全に組み込まれている。

【 技術分野 】

【 0 0 0 2 】

本発明は、少なくとも1つのヒト単球化学誘引性 (chemoattractant) タンパク質 - 1 (MCP-1) タンパク質またはそのフラグメントについて特異的な、特定された部分または変異体を含む抗体、ならびに抗イディオタイプ抗体、およびかかる抗 MCP-1 抗体をコードする核酸、相補的核酸、ベクター、宿主細胞および、治療用処方、投与およびデバイスを含めたその製造および使用方法に関する。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

76個のアミノ酸残基を含有する8.6kDaのタンパク質であるヒト単球化学誘引性タンパク質 - 1 (MCP-1) (CCL-2とも呼ばれる) は、サイトカインのケモカイン・ベータ (またはC-C) ファミリの一員である。ケモカインは、組織損傷部位での白血球の特異的サブセットの血管周囲の通り抜けおよび蓄積において中心的役割を果たすことが示されてきた低分子量 (8~10kDa) で誘発可能な分泌型炎症性走化性サイトカインである。4つの保存されたシステインの位置づけに応じて、2つの主要なファミリーが定義されてきた。CXCまたは - ケモカインは、主に好中球を誘引し、一方CCまたは - ケモカインは主に単球およびその他の白血球を誘引するが、好球中は誘引しない (非特許文献1)。単球走化性タンパク質 - 1 (MCP-1) ファミリの成員は、ケモカインのC-Cファミリーの主要な構成要素を形成し、単球、マクロファージおよび活性化リンパ球の可動化に関与する主要なケモカインとみなされている。異なる種からのMCP-1の相同性を見てみると、ヒトとサルのMCP-1は、2つのアミノ酸においてのみ異なっており、97%の配列同一性を明らかにしているが、125個のアミノ酸残基を含有する13.8kDaのタンパク質であるマウスMCP-1は、グリコシル化の範囲および分子サイズがヒトMCP-1と異なっている。

20

【 0 0 0 4 】

ケモカインレセプターは、Gタンパク質共役型の7つの膜貫通 (7TM) ドメインレセプター (GPCR、蛇行レセプターとも呼ばれる) の大きなファミリーに属している。1996年の走化性サイトカインに関するゴードン研究会議で作成されたレセプター命名法に基づくと、CXCケモカインを結合させるケモカインレセプターは、CXC Rと呼称され、CCケモカインを結合させるレセプターはCCRと呼称される。

30

【 0 0 0 5 】

MCP-1は、ケモカインレセプターCCR2を通して結合し、シグナル伝達することが知られている。CCR2は、単球、T細胞、B-細胞および好塩基球を含む数多くの細胞上で発現される7回膜貫通全域Gタンパク質共役型レセプターである。MCP-1のナノモル (nM) 濃度に応答してシグナル伝達する2つのMCP-1特異的レセプターCCR2AおよびCCR2Bがクローニングされてきた。CCR2A (CC-CKR2A) およびCCR2B (CC-CKR2A) は、選択的スプライスを受けたカルボキシル尾部をもつ2つのMCP-1特異的レセプターをコードする2つのcDNAを表わす。MCP-1は、高い親和性で両方のイソタイプに結合する。MCP-1はCCR2Bを発現する細胞中でカルシウム流出を誘発するが、CCR2Aを発現する細胞内ではこれを誘発しない。CCR2Aを発現する細胞と比べてCCR2Bを発現する細胞内では5分の1のMCP-1で走化性が誘発される。

40

【 0 0 0 6 】

ヒトMCP-1に対するある種の機能的および配列上の相同性を有するその他のタンパク質が知られている。特にMCP-1 (GenBank NP_002973) に類似しているのは、MCP-2 (GenBank NP_005614) およびエオタキシン (

50

GenBank P_51671)であり、MCP-1に対してMCP-2は61.8パーセントの配列同一性をもち、エオタキシン-1は63.2パーセントの配列同一性を有する。ヒトホメオスタシス機構および病理におけるこれらのタンパク質の関与スペクトルおよび活動の範囲は、MCP-1相同体についてはさほどよく理解されていない。例えばMCP-2(CCL8と改名)はMCP-1およびMCP-3(CCL7と改名、GenBank NP_006264)に密に関係づけられており、その機能的レセプターとしてCCR1ならびにCCR2Bの両方を使用する。MCP-3は、D6と呼称されるレセプターに結合する。MCP-3は同様にCCR10およびCCR1にも結合する。MCP-3タンパク質(アミノ酸97個)配列はMCP-1と74パーセントの同一性を示し、MCP-2と58パーセントの相同性を示す。分泌されたMCP-3はN-グリコシル化されているという点でMCP-1と異なっている。MCP-4(CCL13と改名、GenBank NP_005399)は、3つの既知の単球走化性タンパク質と56~61パーセントの配列同一性を共有し、エオタキシン-1と60パーセント同一である。MCP-4の機能は、MCP-3およびエオタキシンのものときわめて類似しているものと思われる。MCP-3と同様に、MCP-4は単球およびT-リンパ球について強力な化学誘引性を有する。これは、好中球上で不活性である。単球上では、MCP-4は、MCP-1、MCP-3、RANTES(CCL5)およびエオタキシン(CCR1およびCCR3レセプター)を認識するレセプターに結合し、エオタキシン-1と完全な交差脱感作を示す。MCP-5はマウスCC-ケモカインであり、ヒトMCP-1に最も密に関係している(66%のアミノ酸同一性)。MCP-5についての遺伝子記号はSCYA12(CCL12に改名)である。ケモカインレセプターCCR2でトランスフェクトされた細胞は、MCP-5に応答することが示されてきた。サイトカインおよびケモカインに関する一般的情報については<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>を、又現行の分類系については非特許文献2を参照のこと。

【0007】

125I-MCP-1は単球に結合し、スカッチャード(Scatchard)プロット分析は、単球が約2nMのKdで細胞1個あたり最低約1700個の結合部位を有することを示した(非特許文献3)。ヒト単球でのその後の平衡結合実験は、0.77nMのKdで細胞1個あたり約3000個の結合部位の存在を明らかにしている(非特許文献4)。125I-MCP-1は同様に、0.4nMのKd値でCCR2レセプターを発現するdEoL-3細胞に対する高親和性結合も実証し(非特許文献5)、MCP-1のそのレセプターに対するサブナノモル親和性を確認した。そのレセプターCCR2と接触するMCP-1の領域を同定するために、全ての表面露出残基がアラニンと置換させられた。一部の残基は、特定の位置での電荷、疎水性または芳香性の重要性を同定するために、その他のアミノ酸に突然変異させられた。35A疎水性溝で分離された主として塩基性である残基(R24、K35、K38、K49およびY13)の2つのクラスターが結合レベルを15-100分の1に低減させた。データは、MCP-1の大きな表面積がレセプターと接触する1つのモデルを示唆しており、数多くの弱い相互作用の蓄積の結果、野生型(WT)タンパク質について35pMの親和性が観察された(非特許文献6)。文献中の2nMから35pMまでの親和性範囲は、使用された検定およびそれぞれの検定の制限に起因するものであるかもしれない。

【0008】

ヒトMCP-1に対するある種の機能的および配列上の相同性を伴うその他のタンパク質が知られている。特にMCP-1(GenBank NP_002973)に類似しているのは、MCP-2(GenBank NP_005614)およびエオタキシン(GenBank P_51671)であり、MCP-2はMCP-1に対する61.8パーセントの配列同一性をもち、エオタキシン-1は63.2パーセントの配列同一性を有する。ヒトホメオスタシス機構および病理におけるこれらのタンパク質の関与スペクトルおよび活動の範囲は、MCP-1相同体についてはさほどよく理解されていない。例えばMCP-2はMCP-1およびMCP-3(GenBank NP_006264)に密に関

10

20

30

40

50

係づけされており、その機能的レセプターとしてCCR1ならびにCCR2Bの両方を使用する。MCP-3は、D6と呼称されるレセプターに結合する。MCP-3は同様にCCR10にも結合する。MCP-3タンパク質（アミノ酸97個）配列はMCP-1と74パーセントの同一性を示し、MCP-2と58パーセントの相同性を示す。分泌されたMCP-3はN-グリコシル化されているという点でMCP-1と異なっている。MCP-4（GenBank NP_005399）は、3つの既知の単球走化性タンパク質と56～61パーセントの配列同一性を共有し、エオタキシン-1と60パーセント同一である。MCP-4の機能は、MCP-3およびエオタキシンのものときわめて類似しているものと思われる。MCP-3と同様に、MCP-4は単球およびT-リンパ球について強力な化学誘引性を有する。これは、好中球上で不活性である。単球上では、MCP-4は、MCP-1、MCP-3およびRANTES（CCR2）を認識するレセプターに結合する。好酸球上では、MCP-4はMCP-3、RANTESおよびエオタキシンと類似の有効性および効力を有する。MCP-4は、エオタキシン（CCR1およびCCR3）とレセプターを共有し、エオタキシン-1と完全な交差脱感作を示す。

【0009】

MCP-1を結合できるその他の抗体が報告されている：すなわち特許文献1は、単離血球から得た抗体を開示しており、特許文献2は、IgM抗ヒトMCP-1を分泌するハイブリドーマを開示している。より最近では、MCP-1を含む複数のベータケモカインを結合する能力をもつ抗体（特許文献3）および同じくエオタキシンも結合させるMCP-1結合抗体（特許文献4）が開示された。

【特許文献1】日本特開平09-067399号公報

【特許文献2】日本特開平05-276986号公報

【特許文献3】国際公開第03/048083号パンフレット

【特許文献4】米国特許出願公開第2004/0047860号明細書

【非特許文献1】レオナルドおよび吉村（Leonard and Yoshimura）ら、1990年

【非特許文献2】ズロトニック（Zlotnik）A.、ヨシエ（Yoshie）O.、2000年、「Cemokines: a new classification system and their role in immunity」、Immunity第12号、121～127頁

【非特許文献3】吉村およびレオナルド（LEONARD）、1990年

【非特許文献4】エルンスト（Ernst）ら、1994年

【非特許文献5】サロー（Sarau）ら、1997年

【非特許文献6】ヘマリッヒ（Hemmerich）ら、1999年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、MCP-1依存性疾患の症候を軽減または除去するための療法において使用するためのヒトMCP-1に特異的なヒト抗体、ならびに既知の抗体またはそのフラグメントに対する改良を提供する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、当該技術分野において既知のものと組合せた形で、本明細書に記載された通りに、単離ヒト、霊長類、ゲッ歯類、哺乳動物、キメラ、ヒト化および/またはCDR移植型抗MCP-1抗体およびその他の免疫グロブリン由来のタンパク質、フラグメント、分割産物およびその他の特定の部分および変異体、ならびに抗-MCP-1抗体組成物、コーディングまたは相補的核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、処方物、デバイス、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物およびその製造および使用方法を提供している。本明細書に記載されている通りの本発明の抗体の組成物に加えて、本発明の抗体は、ヒトMCP-1についてのその親和性、ヒトMCP-1についての特異性およ

10

20

30

40

50

びヒトMCP-1の生物活性を遮断する能力により定義される。

【0012】

本発明は同様に、本明細書に記載されている通りの少なくとも1つの抗体、抗体融合タンパク質またはフラグメントといったような（ただしこれらに限定されるわけではない）少なくとも1つの単離抗MCP-1抗体をも提供している。本発明に従った抗体には、さらにヒト免疫グロブリンの少なくともCH1、ヒンジ、CH2またはCH3が場合により含まれていてもよく、表4Cに記載されている通りのフレームワーク領域（例えばFR1、FR2、FR3、FR4）またはそのフラグメント（配列番号2～5）と場合によって機能的に会合させられている、表4A、B、DおよびE（配列番号6～26）内に提供されている通りの重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖の相補性決定領域（CDR）またはそのリガンド結合部分といった（ただしこれらに限定されるわけではない）少なくとも1つのリガンド結合ドメインといった（ただしこれらに限定されるわけではない）免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含んでなるあらゆるタンパク質またはペプチド含有分子が含まれる。少なくとも1つの抗体アミノ酸配列はさらに、場合により、本明細書に記載されているかまたは当該技術分野において既知のとおり少なくとも1つの特定された置換、挿入または欠失を含んでなり得る。

10

【0013】

一実施形態においては、抗体のリガンド結合部分は、配列番号27および28を含んでなる。一態様においては、本発明は、配列番号27または28を含む少なくとも1つの可変領域を含んでなる、少なくとも1つの単離哺乳動物抗-MCP-1抗体を提供する。

20

【0014】

もう1つの態様においては、本発明は(i)配列番号6、7および9の重鎖相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列の全て；または(ii)配列番号13、14および16の軽鎖CDRアミノ酸配列の全て、のいずれかを含んでなる少なくとも1つの単離哺乳動物抗-MCP-1抗体を提供している。

【0015】

本発明は、1つの態様において、少なくとも1つの特定された配列、ドメイン、部分またはその変異体を含む特定の抗MCP-1抗体をコードするポリヌクレオチドを含むかまたはこれに対し相補的な、またはこれに対しハイブリッド形成する単離核酸分子を提供している。本発明はさらに、前記抗MCP-1抗体核酸分子を含む組換え型ベクター、かかる核酸および/または組換え型ベクターを含有する宿主細胞、ならびにかかる抗体核酸、ベクターおよび/または宿主細胞の製造および/または使用方法をも提供している。

30

【0016】

本発明の少なくとも1つの抗体は、配列番号1中に提供されているもののような少なくとも1つのMCP-1タンパク質または変異体または誘導体に特異的な少なくとも1つの特定されたエピトープを結合させる。該少なくとも1つのエピトープは、前記タンパク質の少なくとも一部分を含んでなる少なくとも1つの抗体結合領域を含んでなり得、このエピトープは好ましくは、前記タンパク質の少なくとも1つの機能的、細胞外、可溶性、親水性、外部または細胞質ドメインまたはその任意の部分といった（ただしこれらに限定されるわけではない）その少なくとも一部分の少なくとも1～5個のアミノ酸で構成されている。

40

【0017】

少なくとも1つの抗体は、少なくとも1つの定常領域または可変フレームワーク領域またはその任意の部分の場合によりさらに含んでなる、配列番号6、7、9、13、14および16として提供されている少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）（例えば、それぞれ配列番号27および28として提供されている重鎖または軽鎖可変領域のCDR1、CDR2またはCDR3）の少なくとも1つの特定された部分の場合により含んでなり得、ここで該抗体は、細胞表面上のレセプターに対するMCP-1結合、CCR2レセプター内在化、MCP-1刺激型Ca²⁺可動化またはその他のあらゆる適切な既知のMCP-1検定といったような（ただしこれらに限定されるわけではない）少なくとも1つの

50

活性を遮断、阻害または防止する。かくして、抗MCP-1抗体は、MCP-1タンパク質に向かっての少なくとも1つの生物活性といった（ただしこれらに限定されるわけではない）対応する活性について、既知の方法に従ってスクリーニングされ得る。

【0018】

本発明はさらに、本発明の少なくとも1つのMCP-1抗体に対する少なくとも1つのMCP-1抗イディオタイプ抗体を提供する。該抗イディオタイプ抗体は、本発明の抗イディオタイプ抗体の中に取込むことのできる、重鎖または軽鎖の相補性決定領域（CDR）またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域、またはその任意の部分といった（ただしこれらに限定されるわけではない）少なくとも1つのリガンド結合部分（LBP）といった（ただしこれらに限定されるわけではない）免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含んでなるあらゆるタンパク質またはペプチド含有分子を内含する。本発明の抗イディオタイプ抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、ゲッ歯類、霊長類などといった（ただしこれらに限定されるわけではない）あらゆる哺乳動物を含むかまたはこれらから誘導され得る。

【0019】

本発明は、一態様において、少なくとも1つの特定された配列、ドメイン、部分またはその変異体を含んでなる、少なくとも1つのMCP-1抗イディオタイプ抗体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるか、これに対し相補的であるかまたはこれに対しハイブリッド形成する単離核酸分子を提供している。本発明はさらに、核酸分子をコードする前記MCP-1抗イディオタイプ抗体を含んでなる組換え型ベクター、このような核酸および/または組換え型ベクターを含有する宿主細胞、ならびに、かかる抗イディオタイプ抗体核酸、ベクターおよび/または宿主細胞の製造および/または使用方法を提供している。

【0020】

本発明は同様に、少なくとも1つの抗MCP-1抗体が検出可能かつ/または回収可能な量で発現される条件下で、本明細書に記載された通りの宿主細胞を培養する工程を含んでなる、宿主細胞中で少なくとも1つの抗MCP-1抗体またはMCP-1抗イディオタイプ抗体を発現させるための少なくとも1つの方法をも提供している。

【0021】

本発明は同様に、（a）本明細書に記載されている通りの核酸および/または抗体をコードする単離抗MCP-1抗体；および（b）適切な担体または希釈剤を含んでなる少なくとも1つの組成物をも提供する。担体または希釈剤は場合により、既知の担体または希釈剤に従って製薬学的に受容可能であり得る。組成物は場合により、さらに少なくとも1つのさらなる化合物、タンパク質または組成物を含むことができる。

【0022】

本発明はさらに、当該技術分野で既知のとおりのおよび/または本明細書に記載されている通りの関連する身体条件の前後またはその間に、かつ/または細胞、組織、器官、動物または患者の中の少なくとも1つのMCP-1関連の身体条件を変調または治療するべく治療上有効な量を投与するための、少なくとも1つの抗MCP-1抗体方法または組成物を提供している。

【0023】

本発明は同様に、本発明に従った治療的または予防的有効量の少なくとも1つの抗MCP-1抗体の少なくとも1つの送達用組成物、デバイスおよび/または方法をも提供している。

【0024】

本発明はさらに、当該技術分野で既知のとおりのおよび/または本明細書に記載されている通りの関連する身体条件の前後またはその間に、かつ/または細胞、組織、器官、動物または患者の中の少なくとも1つのMCP-1関連の身体条件について診断を下すための、少なくとも1つの抗MCP-1抗体方法または組成物を提供している。

【0025】

本発明は同様に、本発明に従った少なくとも1つの抗MCP-1抗体の診断目的の少なくとも1つの送達用組成物、デバイスおよび/または方法をも提供している。

【0026】

1つの態様においては、本発明は、配列番号27または28を含んでなる少なくとも1つの可変領域を含んでなる少なくとも1つの単離哺乳動物抗-MCP-1抗体を提供している。

【0027】

もう1つの態様においては、本発明は(i)配列番号6、7および8または9の重鎖相補性決定領域(CDR)アミノ酸配列の全て；または(ii)配列番号13、14および15または16の軽鎖CDRアミノ酸配列の全て、のいずれかを含んでなる少なくとも1つの単離哺乳動物抗-MCP-1抗体を提供している。

10

【0028】

もう1つの態様においては、本発明は(i)配列番号6、7および8または9の重鎖相補性決定領域(CDR)アミノ酸配列の全て；または(ii)配列番号13、14および15または16の軽鎖CDRアミノ酸配列の全て、のうちの少なくとも一方を含んでなる少なくとも1つの単離哺乳動物抗-MCP-1抗体を提供している。

【0029】

少なくとも1つの抗体は場合により、少なくとも 10^{-9} M、少なくとも 10^{-10} M、少なくとも 10^{-11} Mまたは少なくとも 10^{-12} Mから選択された少なくとも1つの親和性でMCP-1を結合させること、または少なくとも1つのMCP-1タンパク質の少なくとも1つの活性を実質的に中和することのうちの少なくとも1つのことを行なうことができる。同様に提供されているのは、少なくとも1つの単離哺乳動物抗MCP-1抗体をコードする単離核酸、単離核酸を含んでなる単離核酸ベクターおよび/または単離核酸を含んでなる原核生物宿主または真核生物宿主細胞である。該宿主細胞は、場合により、NSO、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、HepG2、YB2/0、SP2/0、HeLa、骨髓腫またはリンパ腫細胞、またはそのあらゆる誘導体、不死化または形質転換細胞から選択された少なくとも1つのものであり得る。同様に提供されているのは、MCP-1抗体が検出可能なまたは回収可能な量で発現されるようにインビトロ、インビボまたはインサイチュ(in situ)条件下で核酸をコードする抗体を翻訳する工程を含んでなる、少なくとも1つの抗MCP-1抗体の生産方法である。

20

30

【0030】

同様に提供されているのは、少なくとも1つの単離哺乳動物抗MCP-1抗体および少なくとも1つの製薬学的に受容可能な担体または希釈剤を含んでなる組成物である。

【0031】

同様に提供されているのは、細胞、組織、器官または動物内のMCP-1関連の身体条件を診断し治療するための方法であって、(a)前記細胞、組織、器官または動物と有効量の本発明の少なくとも1つの単離哺乳動物抗MCP-1抗体を含んでなる組成物と接触させる工程またはそれらに対しかかる組成物を投与する工程を含んでなる方法である。

【0032】

40

同様に提供されているのは、非経口、皮下、筋内、静脈内、関節内、気管支内、腹内、関節包内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸郭内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、膈内、直腸、口腔内、舌下、鼻腔内または経皮から選択された少なくとも1つの様式により、少なくとも1つの抗MCP-1抗体を投与または接触させる工程に適している本発明の少なくとも1つ単離哺乳動物抗MCP-1抗体を含んでなる医療デバイスである。

【0033】

同様に提供されているのは、本発明の少なくとも1つの単離哺乳動物抗MCP-1抗体を溶液、微粒子または凍結乾燥形態で含んでなる包装材料および容器を含んでなる、ヒト

50

の製薬または診断用途向けの製造品である。

【 0 0 3 4 】

同様に提供されているのは、抗体を回収可能な量で発現する能力をもつ宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞を提供する工程を含んでなる、本発明の少なくとも1つの単離哺乳動物抗MCP-1抗体の生産方法である。さらに本発明において提供されているのは、上述の方法により生産された少なくとも1つの抗MCP-1抗体である。

【 0 0 3 5 】

本発明はさらに、本明細書に記載のあらゆる発明を提供している。

【 0 0 3 6 】

【表 1】

配列表の簡単な説明

配列番号	説明
1	抗-MCP-1 結合剤を選択するために使用されたヒト MCP-1 (CCL2)および変異体
2	VH1A 重鎖可変配列:FR1、CDR1、FR2、CDR2 変異体、FR3、CDR3、FR4
3	VH3 重鎖可変配列:FR1、CDR1、FR2、CDR2 変異体、FR3、CDR3、FR4
4	カッパ3 軽鎖可変配列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 変異体、FR4
5	ラムダ3 軽鎖可変配列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 変異体、FR4
6	VH1A CDR1 全MOR03471
7	VH1A CDR2 3781、3790、CNT0 888
8	VH1A CDR2 3899
9	VH1A CDR3 全MOR03471
10	VH3 CDR1 全MOR03548
11	VH3 CDR2 3744、3747
12	VH3 CDR3 全MOR03548
13	カッパ3 CDR1 全MOR03471
14	カッパ3 CDR2 全MOR03471
15	カッパ3 CDR3 3781
16	カッパ3 CDR3 3790、CNT0888
17	カッパ3 CDR3 3899
18	ラムダ3 CDR1 全MOR03548
19	ラムダ3 CDR2 全MOR03548
20	ラムダ3 CDR3 3744
21	ラムダ3 CDR3 3747
22	VH1A CDR2 変異体
23	VH3 CDR2 変異体
24	Lκ CDR3 変異体
25	Lλ CDR3 変異体
26	HC CDR1 変異体
27	CNT0888 重鎖可変領域
28	CNT0888 軽鎖可変領域

10

20

30

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

本発明は、少なくとも1つの精製、単離、組換え型および/または合成抗MCP-1ヒト、霊長類、グッ歯類、哺乳動物、キメラ、ヒト化、改変(engineered)またはCDR移植抗体およびそれに対するMCP-1抗イディオタイプ抗体、ならびに少なくとも1つの抗

50

MCP-1抗体または抗イディオタイプ抗体をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含んでなる組成物およびコーディング核酸分子を提供している。本発明はさらに、診断用および治療用組成物、方法およびデバイスを含めた、かかる核酸および抗体および抗イディオタイプ抗体の製造および使用方法を内含するが、これらに限定されない。

【0038】

引用：本明細書で引用されている全ての刊行物または特許は、本発明の時点における技術的現状を示すことから、かつ/または本発明の描写および使用可能性を提供する目的で、その全体が本明細書に参照により援用されている。刊行物というのは、あらゆる科学的または特許刊行物、または全ての記録、電子または印刷形式を含めた任意のメディア形式で利用可能なその他のあらゆる情報を意味する。以下の参考文献はその全体が本明細書に参照により援用されている：アウスベル(Ausubel)ら編、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons、Inc.、ニューヨーク州ニューヨーク(1987~2004年)；サンプルック(Sambrook)ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor、ニューヨーク(1989年)；ハロウおよびレーン(Harlow and Lane)、「Antibodies, a Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク(1989年)；コリガン(Colligan)ら編、「Current Protocols in Immunology」、John Wiley & Sons、Inc.、ニューヨーク(1994~2004年)；コリガンら、「Current Protocols in Protein Science」、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク(1997~2004年)。

【0039】

略号

aa：アミノ酸； BSA：ウシ血清アルブミン； CDR：相補的決定領域； ECL：電気化学発光； HuCAL（登録商標）：ヒトコンピナトリアル抗体ライブラリ； HSA：ヒト血清アルブミン； MCP-1：単球化学誘引性タンパク質-1； Ig：免疫グロブリン； IPTG：イソプロピル-D-チオガラクトシド； mAb：モノクローナル抗体； PBS：リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4； SET：溶解平衡滴定； VH：免疫グロブリン重鎖可変領域； VL：免疫グロブリン軽鎖可変領域。

【0040】

定義

本明細書で使用されている「抗CCL2抗体」、「抗MCP-1抗体」、「抗MCP-1抗体部分」、または「抗MCP-1抗体フラグメント」および/または「抗MCP-1抗体変異体」などという用語には、本発明の抗体の中に取込むことのできる、MCP-1レセプターまたは結合タンパク質の少なくとも1部分または、重鎖または軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域またはその任意の一部といった（ただしこれらに限定されるわけではない）免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含んでなるあらゆるタンパク質またはペプチド含有分子が含まれている。かかる抗体は場合によりさらに、特定のリガンドに影響を及ぼし、例えばかかる抗体は、インビトロ、インサイチュおよび/またはインビボで少なくとも1つのMCP-1活性または結合またはMCP-1レセプター活性または結合に、変調、低減、増大、拮抗、作動、軽減、緩和、遮断、阻害、無効化および干渉（ただしこれらに限定されるわけではない）という影響を及ぼす。制限的意味のない例として、本発明の適切な抗MCP-1抗体、その特定された部分または変異体は、少なくとも1つのMCP-1またはその特定された部分、変異体またはドメインを結合させることができる。

【0041】

本明細書で使用されている「エピトープ」という用語は、抗体に対して特異的に結合す

る能力をもつタンパク質のセグメントまたは特長を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖といったような分子の化学的に活性な表面集団で構成されており、通常、特異的な 3次元構造特性ならびに比電荷特性を有する。立体構造エピトープと非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で立体構造エピトープに対する結合が失われるが非立体構造エピトープについては失われえないという点で区別される。MCP-1分子の線形配列の異なる部分からのアミノ酸が3次元空間内で近接して集まる場合に発生するMCP-1分子の立体構造折畳みの結果としてもたらされるタンパク質エピトープが内含される。

【0042】

「MCP-1」というのは、NCBI記録登録番号NP_002973の中で言及され MCP (単球走化性タンパク質)、SMC-CF (平滑筋細胞走化性因子)、LDCF (リンパ球由来走化性因子)、GDCF (神経膠腫由来単球走化性因子)、TDCF (腫瘍由来走化性因子)、HC11 (ヒトサイトカイン11)、MCAF (単球走化性および活性化因子)としてさまざまな形で知られている76個のアミノ酸配列を意味する。遺伝子記号は、ヒト染色体17上のJE遺伝子であるSCYA2であり、新規名称はCCL2である(ズロトニック、ヨシエ、2000年、Immunity第12号:121~127頁)。JEは、ヒトMCP-1/CCL2のマウス相同体である。

【0043】

本明細書で使用されている「ヒト抗体」という用語は、タンパク質の実質的にすべての部分(例えばCDR、フレームワーク、 C_L 、 C_H ドメイン(例えば C_H1 、 C_H2 、 C_H3)、ヒンジ、(V_L 、 V_H))がヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子配列の組換え事象からまたは成熟ヒト抗体配列から誘導されている抗体を意味する。ヒト単離抗体に加えて、かかるヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン生殖細胞系列遺伝子を有し免疫応答を開始する能力をもつトランスジェニックマウスを免疫化することによって得ることができ(ロンバーグ(Lonberg)ら、Int Rev Immunol第13巻(1):65~93頁(1995年)およびフィシュワルド(Fishwald)ら、Nat Biotechnol第14巻(7):845~851頁(1996年))、そうでなければ本明細書に記載されているようなヒト抗体レパートリライブラリから選択することができる。かかるヒト遺伝子配列の供給源は、ヒト抗体遺伝子(<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>)またはその翻訳産物のデータベースであるVBASEといったようなあらゆる適切なライブラリ内かまたはそのアミノ酸配列類似性に基づいた集団へと分類されたヒト抗体を示す<http://people.crysl.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>に見出すことができる。この定義の範囲に入るのは、1個もしくはそれ以上のヒト抗体配列からのフレームワーク領域および2つの異なるヒトまたは非ヒト供給源からのCDR領域を含む複合抗体またはヒト複合抗体の機能的フラグメントである。「ヒト抗体」の定義に入るのは、生殖細胞系列および再配置の両方のヒト抗体配列からのフレームワーク領域および2つの異なる供給源抗体からのCDR領域を含有する複合抗体またはヒト複合抗体の機能的フラグメントである。本開示に従ったヒト複合抗体またはその機能的フラグメントは、1個もしくはそれ以上のヒト抗体配列からのフレームワーク領域およびヒトまたは非ヒト抗体配列から誘導されたCDR領域を内含し、そうでなければ、完全に合成であってもよい。かくしてヒト抗体は、キメラまたはヒト化抗体とは全く異なっている。ヒト抗体が、機能的に再配置されたヒト免疫グロブリン(例えば重鎖および/または軽鎖)遺伝子を発現する能力をもつ非ヒト動物または原核または真核細胞により産生され得るということが指摘される。さらに、ヒト抗体が1本鎖抗体である場合、これは未変性ヒト抗体(native human antibodies)の中に見出されないリンカーペプチドを含んでなる可能性がある。例えば、Fvは、重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を接続する2~約8個のグリシンまたはその他のアミノ酸残基といったようなリンカーペプチドを含んでなり得る。かかるリンカーペプチドはヒト由来のものとみなされる。

【0044】

10

20

30

40

50

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された実質的に置換された配列部分を有するキメラ抗体である。ヒト化抗体は、大部分、レシピエントのCDR（超可変領域としても知られている相補性決定領域）残基が所望の特異性、親和性および能力をもつマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類といったような非ヒト種（ドナー抗体）からのCDR残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一部のケースでは、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基により置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体内に見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに高めるように行なわれる。一般に、ヒト化抗体は、超可変領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つそして標準的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含んでなることになる。ヒト化抗体は、場合により、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、標準的にはヒトIgG免疫グロブリンの少なくとも一部分を含んでなることになる。さらなる詳細については、ジョーンズ（Jones）ら、*Nature* 第321巻：522～525頁（1986年）；ライヒマン（Reichmann）ら、*Nature* 第332巻：323～329頁（1988年）；およびプレスタ（Presta）、*Curr. Op. Struct. Biol.* 第2巻：593～596頁（1992年）を参照のこと。

【0045】

本明細書で使用される抗体の K_d というのは、予め定められた抗原についての抗体、解離定数 K_D を意味し、特異的標的に対する抗体の親和性の尺度である。高親和性抗体は、予め定められた抗原について 10^{-8} M以下、より好ましくは 10^{-9} M以下、さらに一層好ましくは 10^{-10} M以下の K_D を有する。本明細書で使用される「 K_{dis} 」または「 K_D 」または「 K_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を意味するように意図されている。「 K_D 」は、「オフ速度（ K_{off} ）」とも呼ばれる解離速度（ k_2 ）と会合速度（ k_1 ）または「オン速度（ k_{on} ）」の比である。かくして K_D は k_2/k_1 または k_{off}/k_{on} に等しく、モル濃度（M）として表現される。そのため、 K_D が小さくなればなるほど結合は強くなる。 10^{-6} Mの K_D （または1マイクロM）は、 10^{-9} M（または1 nM）に比べて弱い結合を表わす。

【0046】

本明細書で使用される「～に対する特異性」、および「特異的結合」および「特異的に結合する」という用語は、その他の抗原またはタンパク質に対してよりも大きな親和性をもつ予め定められた抗原に対する抗体結合を意味する。標準的には、抗体は 10^{-7} M以下の解離定数（ K_D ）で結合し、予め定められた抗原以外の非特異的抗原（例えばBSA、カゼイン、またはその他のあらゆる特定されたポリペプチド）に対して結合するためのその K_D よりも少なくとも2分の1小さい K_D で、予め定められた抗原に対し結合する。「1抗原を認識する抗体」および「1抗原に特異的な抗体」という語句は、ここでは「1抗原に対し特異的に結合する抗体」または「抗原特異的抗体」例えばMCP-1特異的抗体、という用語と互換的に用いられる。

【0047】

1. 発明の抗体の調製

単離および/またはMCP-1タンパク質またはその一部分（合成ペプチドといった成分を含む）といったようなヒトMCP-1タンパク質またはそのフラグメントに対し特異的なヒト抗体の調製は、当該技術分野において既知のあらゆる適切な技術を用いて実施可能である。ヒト抗体は、当該技術分野において既知のさまざまな技術を用いて生産可能である。一実施形態においては、ヒト抗体は、1つのファージライブラリから選択され、ここでこのファージライブラリはヒト抗体を発現する（ヴォーガン（Vaughan）ら、*Nature Biotechnology* 第14巻：309～314頁（1996年）；シート（Sheets）ら、*PITAS (USA)* 第95巻：6157～6162頁（1998年））；フーゲンブームおよびウィンター（Hoogenboom and

10

20

30

40

50

Winter)、J. Mol. Biol. 第227巻: 381頁(1991年); マークス(Marks)ら、J. Mol. Biol. 第222巻: 581頁(1991年))。

【0048】

ヒト抗体は、内部で内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化される例えばマウスなどのトランスジェニック動物の中にヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって作ることでもある。例えば、機能的に再配置されたヒト免疫グロブリン重鎖トランス遺伝子および機能的再配置を受けることのできるヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座からのDNAを含んでなるトランス遺伝子を含んでなるトランスジェニックマウスを、ヒトMCP-1またはそのフラグメントで免疫化して、抗体の産生を惹起することができる。所望の場合、本明細書に記載されている通りおよび/または当該技術分野において既知の通りに、抗体産生細胞を単離し、ハイブリドーマまたはその他の不死化された抗体産生細胞を調製することができる。代替的には、抗体、特定された部分または変異体を、適切な宿主細胞内で、コーディング核酸またはその一部分を用いて発現することができる。

【0049】

適切な抗原での攻撃誘発(challenge)時点で、ヒト抗体産生が観察され、これは、遺伝子再配置、組立ておよび抗体レパートリを含めた全ての面でヒトにおいて見られるものと酷似している。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号明細書; 同第5,545,806号明細書; 同第5,569,825号明細書; 同第5,625,126号明細書; 同第5,633,425; 同第5,661,016号明細書中および、マークスら、Bio/Technology第10巻: 779~783頁(1992年); ロンバーグら、Nature第368巻: 856~859頁(1994年); モリソン(Morrison)、Nature第368巻: 812~813頁(1994年); フィシュワイルド(Fishwild)ら、Nature Biotechnology第14巻: 845~851頁(1996年); ニューベルガー(Neuberger)、Nature Biotechnology第14巻: 826頁(1996年); ロンバーグおよびヒューザー(Huezar)、Intern. Rev. Immunol. 第13巻: 65~93頁(1995年)といった科学的刊行物中に記載されている。代替的には、ヒト抗体は、標的抗原に対し向けられた抗体を産生するヒトBリンパ球の不死化を介して調製可能である(このようなBリンパ球は、個体から回収することもできるし、又インビトロで免疫化されていてもよい)。例えばコール(Cole)ら、「Monoclonal antibodies and Cancer Therapy」、アラン、R. リス(Alan R. Liss)、77頁(1985年); ボエルナー(Boerner)ら、J. Immunol. 第147巻(1): 86~95頁(1991年); および米国特許第5,750,373号明細書を参照のこと。抗体産生細胞は、問題の抗原で免疫化されたヒトまたはその他の適切な動物の末梢血または好ましくは脾臓またはリンパ節から得ることもできる。本発明の抗体、特定されたそのフラグメントまたは変異体をコードする異種または内因性の核酸を発現させるために、その他の任意の適切な宿主細胞を使用することも可能である。選択的培養条件またはその他の適切な既知の方法を用いて融合細胞(ハイブリドーマ)または組換え型細胞を単離し、限界希釈法または細胞選別或いはその他の既知の方法によりクローニングすることができる。所望の特異性をもつ抗体を産生する細胞を、適切な検定(例えばELISA)により選択することができる。

【0050】

1つのアプローチでは、適切な不死細胞系列(例えばSp2/0、Sp2/0-AG14、NSO、NS1、NS2、AE-1、L. 5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2SA3、Sp2MAI、Sp2SS1、Sp2SA5、U937、MLA144、ACTIV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH3T3、HL-60、MLA144、NAMA1WA、NEURO2Aなどといった(ただしこれらに限定されるわけではない)骨髄腫細胞系列またはヘテロ骨

10

20

30

40

50

髄腫、その融合産物またはそれから誘導されたあらゆる細胞または融合細胞または当該技術分野において既知の通りのその他のあらゆる適切な細胞系列、例えば www.atcc.org、www.lifetech.com、参照など）を、単離またはクローニングされた脾臓、末梢血、リンパ液、へんとう腺またはその他の免疫またはB細胞含有細胞、または内因性または異種核酸としてかまたは組換え型または内因性、ウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、は虫類、魚類、哺乳動物、ゲッ歯類、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ヒツジ、霊長類、真核生物、ゲノミックDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAまたはRNA、葉緑体DNAまたはRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、1本鎖、2本鎖または3本鎖、ハイブリッド形成されたものなどまたはそれらの任意の組合せのいずれかとして重鎖または軽鎖定常または可変またはフレームワークまたはCDR配列を発現するその他のあらゆる細胞といったような（ただしこれらに限定されるわけではない）抗体産生細胞と融合させることによって、ハイブリドーマが産生される。例えば全体が本明細書に参照により援用されているアウスベル、上掲書、およびコリガン、「Immunology」、上掲書、第2章を参照のこと。

【0051】

ヒトMCP-1に結合し、定義された重鎖または軽鎖可変領域を含んでなるヒト抗体は、ファージ表示法（カツベ（Katsube）Yら、Int J Mol Med、第1巻（5）：863～868頁（1998年））といったような適切な方法を用いて調製可能である。ペプチドまたはタンパク質ライブラリ（例えばバクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、RNA、cDNAなど、表示ライブラリ；例えば英国ケンブリッジシャーのケンブリッジ・アンチボディ・テクノロジーズ（Cambridge antibody Technologies）；デンマークMartinsreid/Planeeggのモルフォシス（MorphoSys）；英国スコットランド、アバディーンのパイオベーション（Biovation）；スウェーデンLundのパイオインベント（BioInvent）；ダイアックス（Dyax Corp.）、エンゾン（Enzon）、アフィマックス/バイオサイト（Affymax/Biosite）；カリフォルニア州バークレーのゾーマ（Xoma）；イクシス（Ixsys）。から入手可能なもの、例えば、欧州特許第368,684号明細書、PCT/GB第91/01134号明細書；PCT/GB第92/01755号明細書；PCT/GB第92/002240号明細書；PCT/GB第92/00883号明細書；PCT/GB第93/00605号明細書；米国特許第08/350260号明細書（5/12/94）；PCT/GB第94/01422号明細書；PCT/GB第94/02662号明細書；PCT/GB第97/01835号明細書；（CAT/MRC）；国際公開第90/14443号パンフレット；国際公開第90/14424号パンフレット；国際公開第90/14430号パンフレット；PCT/US94/1234号明細書；国際公開第92/18619号パンフレット；国際公開第96/07754号パンフレット；（スクリpps）；国際公開第96/13583号パンフレット、国際公開第97/08320号パンフレット（モルフォシス）；国際公開第95/16027号パンフレット（パイオインベント）；国際公開第88/06630号パンフレット；国際公開第90/3809号パンフレット（ダイアックス）；米国特許第4,704,692号明細書（エンゾン）；PCT/US第91/02989号明細書（アフィマックス）；国際公開第89/06283号パンフレット；欧州特許第371998号明細書；欧州特許第550400号パンフレット（ゾーマ）；欧州特許第229046号明細書；PCT/US91/07149号明細書（イクシス）；または参照（ただしこれらに限定されるわけではない）；または確率的に生成されたペプチドまたはタンパク質（米国特許第5723323、5763192、5814476、5817483、5824514、5976862号明細書、国際公開第86/05803号パンフレット、欧州特許第590689号明細書（イクシス、現在のアプライド・モレキュラー・エボリューション（Applied Molecular Evolution（AME））（各々全体が本明細書に参照により援用されている））から組換え型抗体を選択する方法か、またはトランスジェニック動物（例えばSCI

10

20

30

40

50

Dマウス、各々全体が本明細書に参照により援用されているグエン (Nguyen) ら、*Microbiol. Immunol.* 第41巻: 901~907頁 (1997年); サンドュー (Sandhu) ら、*Crit. Rev. Biotechnol.* 第16巻: 95~118頁 (1996年); エラン (Eren) ら、*Immunol.* 第93巻: 154~161頁 (1998年) の免疫化に依存している方法を含めた (ただしこれらに限定されるわけではない)、必要な特異性の抗体を産生または単離させるその他の適切な方法を使用することが可能である。

【0052】

特定のな実施形態

出願人らは、ファージ表示法ヒトF a bライブラリから出発して、ヒトM C P - 1に向かう所望の親和性、特異性および生物活性をもつヒト抗体を選択し作製する方法を例証した。要約すると、10回のパニング全てから17856のクローンがスクリーニングされ、1104の一次ヒットそして最終的に26のユニークF a bを導いた。

【0053】

天然発生のM C P - 1レセプターに結合する抗原保持能力を例証したユニークリガンドを提供するために、ヒトM C P - 1およびその類似体または「突然変異タンパク質 (mutins)」を化学的に合成し、選択、親和性および生物学的検定における特異的使用のために修飾した。初期固相パニングならびに抗体選択および親和性成熟検定のその他の態様においてヒトM C P - 1 I l e ⁴¹ およびヒトM C P - 1 T y r ⁴³ を使用し、ここでは、M C P - 1 突然変異タンパク質のビオチニル化バージョンすなわちI l e ⁴¹、L y s (ビオチン - P E G ₄) ⁶⁹ および (I l e ⁴¹、L y s (ビオチン - P E G ₄) ⁷⁵ (配列番号1) と同様に記述した。

【0054】

26個のユニークF a bのいずれも、特定された生物学的検定において所望のI C ₅₀ 値またはK_D < 0.5 nMとして測定された親和性を有していなかったことから、成熟が不可欠であった。親和性成熟候補をF a bとして選択し、それぞれのI g Gを成熟プロセスと並行して分析した。選択基準は、1) 全細胞レセプター結合検定における活性、2) カルシウム可動化検定における活性、3) ヒトM C P - 1に対する親和性、4) ヒトM C P - 1に対する特異性、および5) カニクイザルM C P - 1 (cyno MCP-1) に対する親和性および未変性M C P - 1に対する結合、であった。

【0055】

溶解状態のM C P - 1でのF a b捕捉モードでのバイアコア (BiaCore) 親和性測定は、成熟候補の等級づけのためにうまく行なわれ、親和性は49~406 nMの範囲内にあった。最高の親F a bは、50 nMの親和性を示し、これは、親和性成功基準に達するべく少なくとも100倍親和性を最適化しなくてはならないということを表わしていた。さらに、カニクイザルおよび未変性ヒトM C P - 1に対する結合は、F a b捕捉モードで検出でき、これは、成熟のための付加的な前提条件であった。カニクイザルM C P - 1に対する親和性は、ヒトM C P - 1の場合と同じ範囲内にあった。例えばグリコシル化といった潜在的修飾に起因して、抗体が合成または組換え型M C P - 1を認識するばかりでなく、内因的に発現されヒトP A N C - 1細胞上清から精製された未変性M C P - 1をも認識するということが示されなくてはならなかった。

【0056】

M C P - 1に対する特異性は、各々のケモカインを100 nMずつ添加し、結合シグナルを検出して、バイアコア内で抗体捕捉モードで測定された。成熟のための候補F a bの大部分は特異的であり、一方、一方は相同体ケモカインに対する幾分かの交叉反応性を示した。

【0057】

F a bの非常に重要な特徴は中和活性であり、複数の異なる検定がこの活性を分析するべくセットアップされた。¹²⁵I M C P - 1 T H P - 1細胞結合検定は最も感応性の高い検定であり、これは、最適化の後に特に重要であった。親F a bは、10~650 nM

10

20

30

40

50

の IC_{50} 値を示した。放射性リガンド結合検定の他に、その他の2次的な生物学的検定が、MCP-1の下流側シグナル伝達経路の異なるレベルで中和活性を立証するために計画された。

【0058】

単球の誘引は、MCP-1の主要な機能の1つであるが、最も高い確率で活性欠如、同時精製された因子または内毒素に起因して、親Fabは走化性検定内で働かず、従って、この検定で働くFabを獲得しようとする代りにそれぞれのIgGのみをテストすることで同意された。もう1つの下流側シグナル伝達事象は、細胞質内へのカルシウム放出である。実際、放射性リガンド結合検定内の中和活性を示した全てのFabが、 $0.1 \sim 3 \mu M$ の IC_{50} 範囲でTHP-1細胞内のMCP-1により誘発されたカルシウム可動化を阻害した。IgG形式への転換後、親Fabの生物学的活性は完全に保持されるということを示さなくてはならなかった。予想通り、それぞれのIgGは全て、放射性リガンド結合検定、カルシウム可動化検定、さらには走化性検定において活性を示し、最終的に全てのIgGsがFab形式で見られた活性を保持したこと、そしてさらにはMCP-1誘発型走化性を阻害したことを証明した。

【0059】

親和性成熟については、放射性リガンド結合検定内の $10 \sim 650 nM$ の範囲内の IC_{50} 値および $10 \sim 400 nM$ の範囲内の K_D をもつ7つの異なるFabがその特性に従って選択された。その後、これらを、ライブラリクローニングおよびその後の選択のため3つのグループに分けた。並行してL-CDR3およびH-CDR2最適化を実施した。高品質ライブラリが生成された。選択プロセスのために溶液パニングを使用し、抗原の削減、オフ速度選択および非常に長い洗浄工程により、選択のストリンジェンシーを増大させた。後続するスクリーニングプロセスについては、最適化された結合剤のハイスループット等級付けを可能にするバイオベリス(Bio Veris)スクリーニングが使用された。スクリーニングは、改良型結合剤の同定のためにきわめて効率良く機能にした。さらに、L-CDR3およびH-CDR2で最適化されたFabを同定することができ、MOR03471およびMOR03548誘導体のための交叉クローニングが可能となった。特に、MOR03471誘導体の交叉クローニングが非常に成功し、2つの最適化された出発Fabに比べてさらに100倍改善された親和性まで導いた。17個の最適化されたFabのうち、16個は、詳細な特徴づけのために選択され、最終的に全ての成功基準を満たした4つの結合剤が親MOR03471から誘導され、うち2つがL-CDR3のみの中で最適化され、2つが交叉クローニングに由来した。親和性成熟した候補分析および配列は、例3および4、表4～6および配列番号2～28の中で詳述されている。

【0060】

成熟の後、主として検出限界に達したために、最適化された結合剤の親和性をバイオコア内で分析することはできなかった。モルフォシス(Morpho Sys)では、バイオベリス技術と組合わせた溶解平衡滴定(SET)である、非常に感受性の高い K_D 決定方法が使用された。FabおよびIgGのための適切な適合モデルを用いて、1価の解離定数を計算することができた。親和性測定に加えて、この方法は、交叉反応性研究のために用いられた。最終候補の親和性は、バイオベリス内で測定されセントコア(Centocor)にてキネックス(Kinex)Aにより確認され、ヒトおよびカニクイザルMCP-1に対して $10 \sim 320 pM$ の範囲内であった。バイオベリスを用いた特異性テストは、テストされた全ての16 FabおよびIgGsについてヒトMCP-2に対する交叉反応性を全く示さなかった。いくつかのFabおよびIgGは、同様にヒトエオタキシン(Eotaxin)に対しても有意な交叉反応性を全く示さなかった。成功基準に従って、バイオコア抗体捕捉モードで $100 nM$ の相同体ヒトMCP-2、3、4および $100 nM$ のヒトエオタキシン1、2および3に対する結合無しとして特異性基準を定められた。バイオコアFab捕捉モードにおいて、全ての選択されたFabは、MCP-2およびエオタキシンとの異なった程度の交叉反応性を示した。IgGに比したFabの推定上のわずかに増大した不安定度およびケモカインの一般的な非特異的結合能力は、非特異的結合

に寄与した可能性がある。選択された I g G のうちのいくつかは、相同体ケモカインに対する有意な結合シグナルを全く示さず、バイアコア I g G 捕捉モードでの特異性成功基準を満たした。バイオベリスを用いた溶解平衡滴定実験においては、いくつかの F a b でさえ交叉反応性を全く示さなかった。バイアコア内で検出された M C P - 2 に対する F a b 結合活性が中和活性に形を変えるか否かを分析するために、セントコアで放射線リガンド全細胞結合検定が開発された。この検定内でテストされた F a b は、T h p - 1 細胞上での C C R 2 レセプターに対する 1 2 5 I 標識された M C P - 2 の結合の有意な阻害を全く示さなかった (I C ₅₀ 2 μ M)。

【 0 0 6 1 】

必要とされる M C P - 1 の量が 1 n g / m l と低いことから、放射性リガンド結合検定は、F a b については約 1 0 0 p M さらに I g G については 2 0 p M という検定 I C ₅₀ 10
限界で、このプロジェクトにおいて最も感応性の高い検定であった。親和性以外に、この検定における活性は、詳細な特徴づけのための最適化された結合剤の等級付けおよび選択のために用いられた。最適化の間の活性の全体的改善は、最高 1 0 0 0 倍の倍率であったが、最終的に、1 つの M O R 0 3 4 7 1 誘導 F a b、M O R 0 3 8 7 8 が 1 1 0 p M で最高の親和性を示した。テストされた全ての I g G は放射性リガンド結合検定において活性を保持した。4 つの最終的 I g G 候補、M O R 0 3 7 8 1、M O R 0 3 7 9 0、M O R 0 3 8 5 0 および M O R 0 3 8 7 8 の I C ₅₀ 値は、2 0 ~ 5 0 p M の範囲内にあり、F a b のそれぞれの活性に比べてわずかに優れてさえいた。改善された活性の 1 つの理由は、2 価の I g G が分子 1 個あたり 2 つの M C P - 1 を中和する (倍率 2 倍) というこ 20
にあり、I g G は純粋なスケールアップされた生産に由来し、従って、もう 1 つの理由は抗体の純度、安定性または活性にあったのかもしれない。二次的生物学検定として、M C P - 1 誘発型 C C R 2 レセプターの内在化の阻害を測定する F A C S ベースの検定の開発が成功した。最後に、検定は、I C ₅₀ の決定および等級付けさえ可能にした。最終的な 4 つの候補 F a b、M O R 0 3 7 9 0、M O R 0 3 8 5 0、M O R 0 3 7 8 1 および M O R 0 3 8 7 8 は、3 ~ 5 n M の範囲内で I C ₅₀ 値を示した。

【 0 0 6 2 】

合成または組換え型 M C P - 1 に対して単離された M C P - 1 抗体の活性を確認するためには未変性 M C P - 1 が必要であった。未変性 M C P - 1 が P A N C 1 上清から精製され、カルシウム放出の誘発のために使用された。最適化された F a b は、基準抗体 C 7 7 5 に比べて高い活性で、未変性 M C P - 1 誘発型カルシウム可動化の阻害を示した。M O R 0 3 5 4 8 由来の予め選択された F a b は全て、競合 E L I S A において M C P 1 に対する C 7 7 5 の結合を完全に阻害した。M O R 0 3 4 7 1 由来の予め選択された F a b は全て、E L I S A 内で部分的 (約 6 0 %) の競合を示し、エピトープが少なくとも重複していることを表わしていた。最終的に、4 つの抗体 M O R 0 3 7 8 1、M O R 0 3 7 9 0、M O R 0 3 8 5 0 および M O R 0 3 8 7 8 は、特異性基準および未変性 M C P - 1 の中和を含めた全ての成功基準を満たした。

【 0 0 6 3 】

抗体を生産するその他の適切な方法

当該技術分野で既知でありかつ / または本明細書に記載されている通り、本発明の抗体を産生するためのその他の方法が、ヒト抗体のレパートリを生産する能力を有している。かかる技術としては、リボソーム表示法 (ヘインズ (H a n e s) ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、第 9 4 巻 : 4 9 3 7 ~ 4 9 4 2 頁 (1 9 9 7 年 5 月) ; ヘインズら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、第 9 5 巻 : 1 4 1 3 0 ~ 1 4 1 3 5 頁 (1 9 9 8 年 1 1 月)) 号 ; 単一細胞抗体生成技術 (例えば、選択リンパ球抗体方法 (“ S L A M ”) (米国特許第 5 , 6 2 7 , 0 5 2 号明細書、ウェン (W e n) ら、J . I m m u n o l . 第 1 7 巻 : 8 8 7 ~ 8 9 2 頁 (1 9 8 7) ; バブコック (B a b c o o k) ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、第 9 3 巻 : 7 8 4 3 ~ 7 8 4 8 頁 (1 9 9 6 年)) ; ゲル微液滴とフローサイトメトリ (ポーウェル (P o w e l l) ら、B i o t e c h n o l . 第 8 巻 : 3 3 3 ~ 3 3 7 頁 (1 9 9 0 年) ; マサチ 40
50

ューセッツ州 Cambridge のワンセルシステムズ (One Cell Systems) ; グレイ (Gray) ら、J. Imm. Meth. 第 182 巻 : 155 ~ 163 頁 (1995 年) ; ケニー (Kenny) ら、Bio / Technol. 第 13 巻 : 787 ~ 790 頁 (1995 年) ; 「B-cell selection」スティーンベッカーズ (Steenbakkers) ら、Molec. Biol. Reports 第 19 巻 : 125 ~ 134 頁 (1994 年) ; ヨナク (Jonak) ら、Progress Biotech. 第 5 巻、In Vitro Immunization in Hybridoma Technology、ボアベック (Borrebaeck)、編、Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam、オランダ (1988 年) が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0064】

非ヒトまたはヒト抗体を工学処理するかまたはヒト化するための方法も同様に使用でき、当該技術分野において周知である。一般に、ヒト化されたまたは工学処理された抗体は、例えばマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類またはその他の哺乳動物といった（ただしこれらに限定されるわけではない）ヒト以外の供給源からの 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸残基を有する。これらのヒトアミノ酸残基は、標準的に既知のヒト配列の「インポート」可変、定常またはその他のドメインから取られる「インポート」残基と呼ばれることが多い。既知のヒト Ig 配列は当該技術分野において周知であり、任意の既知の配列であり得る。工学処理されたヒト化抗体の結合、立体配座および免疫原性減少を最適化するためのさまざまな戦略が、例えばプレスタ (Presta) ら、J. Immunol. 第 151 号 : 2623 ~ 2632 頁、1993 年 ; 国際公開第 2003/02019 号パンフレットおよび国際公開第 2005/080432 号パンフレット中などで記述されてきた。

20

【0065】

かかるインポートされた配列は、免疫原性を減少させるかまたは当該技術分野において既知の通り、結合、親和性、オン速度、オフ速度、結合力 (avidity)、特異性、半減期またはその他の適切な任意の特性を削減、増強または修飾するために使用することができる。一般に、可変および定常領域の非ヒト配列がヒトまたはその他のアミノ酸と置き換えられている一方で、非ヒトまたはヒト CDR 配列の一部分または全てが維持される。抗体は同様に場合により、抗原に対する高い親和性およびその他の有利な生物学的特性を保持してヒト化することもできる。この目的を達成するため、場合によりヒト化抗体を、親およびヒト化配列の 3 次元モデルを使用した親配列およびさまざまな概念ヒト化産物の分析プロセスによって調製することが可能である。3 次元免疫グロブリンモデルが一般に利用可能であり、当業者にとってなじみ深いものである。選択された候補免疫グロブリン配列の確率の高い 3 次元立体配座構造を例示し表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を検討することで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、標的抗原に対する親和性の増大といったような所望の抗体特性が達成されるような形で、コンセンサスおよびインポート配列から、FR 残基を選択し組合せることができる。一般に、CDR 残基は抗原結合に影響を及ぼすことに直接的にかつ最も実質的に関与している。本発明の抗体のヒト化または工学処理は、各々全体が本明細書に参照により援用されている、ウィンター (Winter) (ジョーンズ (Jones) ら、Nature 第 321 巻 : 522 頁 (1986 年) ; ライヒマン (Riechmann) ら、Nature 第 332 巻 : 323 頁 (1988 年) ; ヴァホーヤン (Verhoeyen) ら、Science、第 239 巻 : 1534 頁 (1988 年) ; シムス (Sims) ら、J. Immunol. 第 151 巻 : 2296 頁 (1993 年) ; ショティア (Chothia) およびレスク (Lesk)、J. Mol. Biol. 第 196 巻 : 901 頁 (1987 年) ; カーター (Carter) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第 89 巻 : 4285 頁 (1992 年) ; プレスタら、J. Immunol. 第 151 巻 : 2623 頁 (1993)、米国特許第 57

30

40

50

2 3 3 2 3 号明細書、同第 5 9 7 6 8 6 2 号明細書、同第 5 8 2 4 5 1 4 号明細書、同第 5 8 1 7 4 8 3 号明細書、同第 5 8 1 4 4 7 6 号明細書、同第 5 7 6 3 1 9 2 号明細書、同第 5 7 2 3 3 2 3 号明細書、同第 5 , 7 6 6 8 8 6 号明細書、同第 5 7 1 4 3 5 2 号明細書、同第 6 2 0 4 0 2 3 号明細書、同第 6 1 8 0 3 7 0 号明細書、同第 5 6 9 3 7 6 2 号明細書、同第 5 5 3 0 1 0 1 号明細書、同第 5 5 8 5 0 8 9 号明細書、同第 5 2 2 5 5 3 9 号明細書、同第 4 8 1 6 5 6 7 号明細書、国際出願 P C T / : U S 第 9 8 / 1 6 2 8 0 号明細書、同 U S 第 9 6 / 1 8 9 7 8 号明細書、同 U S 第 9 1 / 0 9 6 3 0 号明細書、同 U S 第 9 1 / 0 5 9 3 9 号明細書、同 U S 第 9 4 / 0 1 2 3 4 号明細書、英国特許第 8 9 / 0 1 3 3 4 号明細書、同第 9 1 / 0 1 1 3 4 号明細書、同第 9 2 / 0 1 7 5 5 号明細書 ; 国際公開第 9 0 / 1 4 4 4 3 号パンフレット、同第 9 0 / 1 4 4 2 4 号パンフレット、同第 9 0 / 1 4 4 3 0 号パンフレット、欧州特許第 2 2 9 2 4 6 号明細書 (その中に引用されている参考文献を含む) 中で記述されたものといったような (ただしこれらに限定されるわけではない) 任意の既知の方法を用いて実施可能である。

【 0 0 6 6 】

ヒト抗原に結合するヒト抗体のレパートリを産生できるトランスジェニックマウスは、既知の方法で生産可能である (例えば、各々その全体が本明細書に参照により援用されているロンバーグらに交付された米国特許第 5 , 7 7 0 , 4 2 8 号明細書、同第 5 , 5 6 9 , 8 2 5 号明細書、同第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号明細書、同第 5 , 6 2 5 , 1 2 6 号明細書、同第 5 , 6 2 5 , 8 2 5 号明細書、同第 5 , 6 3 3 , 4 2 5 号明細書、同第 5 , 6 6 1 , 0 1 6 号明細書および同第 5 , 7 8 9 , 6 5 0 号明細書 ; ヤコボビッツ (J a k o b o v i t s) ら、国際公開第 9 8 / 5 0 4 3 3 号パンフレット、ヤコボビッツら、国際公開第 9 8 / 2 4 8 9 3 号パンフレット、ロンバーグら、国際公開第 9 8 / 2 4 8 8 4 号パンフレット、ロンバーグら、国際公開第 9 7 / 1 3 8 5 2 号パンフレット、ロンバーグら、国際公開第 9 4 / 2 5 5 8 5 号パンフレット、クシエルラペイト (K u c h e r l a p a t e) ら、国際公開第 9 6 / 3 4 0 9 6 号パンフレット、クシエルラペイトら、欧州特許第 0 4 6 3 , 1 5 1 B 1 号パンフレット、クシエルラペイトら、欧州特許出願公開第 0 7 1 0 , 7 1 9 A 1 号明細書、スラニ (S u r a n i) ら、米国特許第 5 , 5 4 5 , 8 0 7 号明細書、ブラッグマン (B r u g g e m a n n) ら、国際公開第 9 0 / 0 4 0 3 6 号パンフレット、ブラッグマンら、欧州特許第 0 4 3 8 , 4 7 4 B 1 号パンフレット、ロンバーグら、欧州特許出願公開第 0 8 1 4 , 2 5 9 A 2 号明細書、ロンバーグら、英国特許第 2 , 2 7 2 , 4 4 0 A 号明細書、ロンバーグら、Nature、第 3 6 8 巻 : 8 5 6 ~ 8 5 9 頁 (1 9 9 4 年) 、 T a y l o r (テイラー) ら、Int. Immunol. 第 6 巻 (4) 5 7 9 ~ 5 9 1 頁 (1 9 9 4 年) 、グリーン (G r e e n) ら、Nature Genetics 第 7 巻 : 1 3 ~ 2 1 頁 (1 9 9 4 年) 、メンデス (M e n d e z) ら、Nature Genetics 第 1 5 巻 : 1 4 6 ~ 1 5 6 頁 (1 9 9 7 年) 、テイラーら、Nucleic Acids Research、第 2 0 巻 (2 3) : 6 2 8 7 ~ 6 2 9 5 頁 (1 9 9 2 年) 、ツアイヨン (T u a i l l o n) ら、Proc Natl Acad Sci USA、第 9 0 巻 (8) : 3 7 2 0 ~ 3 7 2 4 頁 (1 9 9 3 年) 、ロンバーグら、Int Rev Immunol 第 1 3 巻 (1) : 6 5 ~ 9 3 頁 (1 9 9 5 年) およびフィッシュワルドら、Nat Biotechnol 第 1 4 巻 (7) : 8 4 5 ~ 8 5 1 頁 (1 9 9 6 年) など (ただしこれらに限定されるわけではない)) 。一般に、これらのマウスは、機能的に再配置されているかまたは機能的再配置を受けることのできる少なくとも 1 つのヒト免疫グロブリン遺伝子座からの DNA を含んでなる少なくとも 1 つのトランス遺伝子を含んでなる。かかるマウスの体内の内因性免疫グロブリン遺伝子座を分断または欠失させて、内因性遺伝子によりコードされた抗体を産生する該動物の能力を無くすることができる。

【 0 0 6 7 】

類似のタンパク質またはフラグメントに対する特異的結合について抗体をスクリーニングすることは、ペプチド表示ライブラリを用いて都合よく達成可能である。この方法には、所望の機能または構造をもつ個々の成員について大きなペプチド収集物をスクリーニン

10

20

30

40

50

グすることも関与している。ペプチド表示ライブラリの抗体スクリーニングは、当該技術分野において周知である。表示されたペプチド配列の長さは3～5000またはそれ以上のアミノ酸、頻繁に5～100アミノ酸そして往々にして約8～25のアミノ酸であり得る。ペプチドライブラリを生成するための直接的化学合成方法に加えて、複数の組換え型DNA方法も記述されてきた。1つのタイプには、バクテリオファージまたは細胞の表面上のペプチド配列の表示が関与している。各バクテリオファージまたは細胞は、特定の表示されたペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含有する。かかる方法はPCT特許公開第91/17271号明細書、同第91/18980号明細書、同第91/19818号明細書および同第93/08278号明細書の中で記載されている。ペプチドのライブラリを生成するためのその他のシステムは、インビトロ化学合成および組換え型方法の両方の特徴を有している。PCT特許公開第92/05258号明細書、同第92/14843号明細書および同第96/19256号明細書を参照のこと。米国特許第5,658,754号明細書および同第5,643,768号明細書も参照のこと。ペプチド表示ライブラリ、ベクターおよびスクリーニングキットはインビトロジェン(Invitrogen)(カリフォルニア州Carlsbad)およびケンブリッジ・アンチボディー・テクノロジー(英国Cambridgeshire)といった供給業者から市販されている。例えばエンゾンに譲渡された米国特許第4704692号明細書、同第4939666号明細書、同第4946778号明細書、同第5260203号明細書、同第5455030号明細書、同第5518889号明細書、同第5534621号明細書、同第5656730号明細書、同第5763733号明細書、同第5767260号明細書、同第5856456号明細書；ダイアックスに譲渡された同第5223409号明細書、同第5403484号明細書、同第5571698号明細書、同第5837500号明細書；アフイマックスに譲渡された米国特許第5427908号明細書および同第5580717号明細書；ケンブリッジ・アンチボディー・テクノロジーに譲渡された米国特許第5885793号明細書；ジェンテックに譲渡された米国特許第5750373号明細書；ゾーマに譲渡された米国特許第5618920号明細書、同第5595898号明細書、同第5576195号明細書、同第5698435号明細書、同第5693493号明細書、同第5698417号明細書；コリガン、上掲書；アウスベル、上掲書またはサンプルック、上掲書を参照のこと。なお上述の特許および刊行物の各々は、その全体が本明細書に参照により援用されている。

【0068】

2. 発明の核酸

配列番号2～5および27～28のうちの少なくとも1つの連続するアミノ酸の少なくとも70～100%をコードするヌクレオチド配列、その特定されたフラグメント、変異体またはコンセンサス配列といったような本明細書に提供されている情報を用いて、少なくとも1つの抗-MCP-1抗体をコードする本発明の核酸分子を、本明細書に記載されている方法または当該技術分野で既知の通りの方法を使用して得ることができる。本発明の単離核酸分子には例えば、少なくとも1つの重鎖(例えば配列番号6～12、22および23)または軽鎖(例えば配列番号13～21および24～26)のCDR1、CDR2および/またはCDR3といった少なくとも1つのCDRの少なくとも1つの特定された部分といった(ただしこれに制限されるわけではない)1個もしくはそれ以上のイントロンを場合により伴う読取り枠(ORF)を含んでなる核酸分子；抗MCP-1抗体または可変領域のためのコーディング配列(例えば配列番号2～5、27および28)を含んでなる核酸分子；および、上記のものと実質的に異なる核酸配列を含んでなるものの、遺伝コードの縮重に起因して、本明細書に記載されている通りのおよび/または当該技術分野において既知のとおりの少なくとも1つの抗MCP-1抗体をなおもコードする核酸分子が含まれる。当然のことながら、遺伝コードは当該技術分野において周知である。かくして、本発明の特異的抗MCP-1抗体についてコードするこのような縮退核酸変異体を生成することは、当業者にとっては日常的な作業であると思われる。例えば、アウスベルら、前掲書を参照のこと。又かかる核酸変異体は本発明内に含まれている。

【 0 0 6 9 】

本明細書に記されているように、抗MCP-1抗体をコードする核酸を含んでなる本発明の核酸分子には、単独で抗体フラグメントのアミノ酸配列をコードするもの；全抗体またはその一部分についてのコーディング配列；1つの抗体、フラグメントまたは一部分についてのコーディング配列ならびに付加的配列、例えばスプライシングおよびポリアデニル化シグナルを含めた、転写、mRNAプロセッシングにおいて1つの役割を果たす転写された未翻訳配列（例えばリボソーム結合およびmRNAの安定性）といった非コーディング5'および3'配列を含む（ただしこれらに限定されるわけではない）付加的な非コーディング配列と共に、少なくとも1つのイントロンといったような前述の付加的なコーディング配列を伴うまたは伴わない、少なくとも1つのシグナルリーダーまたは融合ペプチドのコーディング配列；付加的な官能基を提供するもののような付加的なアミノ酸についてコードする付加的なコーディング配列、が含まれるがこれらに限定されるわけではない。かくして、抗体をコードする配列は、抗体フラグメントまたは部分を含んでなる融合された抗体の精製を容易にするペプチドをコードする配列といったようなマーカー配列に対して融合され得る。

10

【 0 0 7 0 】

本明細書に記載されている通りのポリヌクレオチドに対して選択的にハイブリッド形成するポリヌクレオチド：本発明は、選択的ハイブリダイゼーション条件下で本明細書に開示されているポリヌクレオチドにハイブリッド形成する単離核酸を提供する。かくして、本実施形態のポリヌクレオチドは、かかるポリヌクレオチドを含んでなる核酸を単離、検出および/または定量化するために使用可能である。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、寄託されたライブラリ内の部分的または全長クローンを同定、単離または増幅するために使用することができる。一部の実施形態においては、ポリヌクレオチドはゲノミックまたはcDNA配列単離されているが、またはその他の形でヒトまたは哺乳動物核酸ライブラリ由来のcDNAに対して相補的である。

20

【 0 0 7 1 】

好ましくは、cDNAライブラリは少なくとも80%の全長配列、好ましくは少なくとも85%または90%の全長配列そしてより好ましくは少なくとも95%の全長配列を含む。cDNAライブラリは、稀な配列の発現量を増大させるべく正規化され得る。低または中ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件が標準的に（但し排他的にではなく）、相補的配列に比べて低い配列同一性をもつ配列について利用される。中および高ストリンジェンシー条件は、より高い同一性をもつ配列のために場合により利用可能である。低ストリンジェンシー条件は、約70%の配列同一性をもつ配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オーソログまたはパラログ配列を同定するために利用可能である。

30

【 0 0 7 2 】

場合により、本発明のポリヌクレオチドは本明細書に記載されているポリヌクレオチドによってコードされた抗体の少なくとも一つの部分をコードすることになる。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドに対する選択的ハイブリダイゼーションのために利用可能な核酸配列を包含する。例えば、各々その全体が本明細書に参照により援用されている、アウスベル、上掲書；コリガン、上掲書を参照のこと。

40

【 0 0 7 3 】

核酸の構築：本発明の単離核酸は、当該技術分野において周知の通り、（a）組換え型方法、（b）合成技術、（c）精製技術またはその組合せを用いて作ることができる。

【 0 0 7 4 】

核酸を構築するための組換え型方法：RNA、cDNA、ゲノミックDNAまたはそのあらゆる組合せといったような本発明の単離核酸組成物は、当業者にとっては既知の任意の数のクローニング方法を用いて生物学的供給源から得ることができる。一部の実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下で選択的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドプローブが、cDNAまたはゲノミックDNAラ

50

イブラリ内の所望の配列を同定するために使用される。RNAの単離およびcDNAおよびゲノミックライブラリの構築は、当業者にとって周知の作業である（例えば、アウスベル、上掲書；またはサンプルック、上掲書を参照のこと）。

【0075】

核酸スクリーニングおよび単離方法：本明細書で開示されているもののような本発明のポリヌクレオチドの配列に基づいたプローブを用いて、cDNAまたはゲノミックライブラリをスクリーニングすることができる。同じまたは異なる生体内の相同な遺伝子を単離するべくゲノミックDNAまたはcDNA配列をハイブリッド形成するためにプローブを使用することができる。当業者であれば、検定中でさまざまな度合のハイブリダイゼーションストリンジェンシーを用いることができ、ハイブリダイゼーションまたは洗浄のいずれかの培地がストリンジェントであり得るということを認識するだろう。ハイブリダイゼーションのための条件がよりストリンジェントになるにつれて、2重鎖形成が起こるのにプローブと標的の間に必要な相補性度は高くなる。ストリンジェンシー度は、温度、イオン強度、pHおよびホルムアミドといったような部分的に変性する溶媒の存在のうちの1個もしくはそれ以上のものによって制御され得る。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば0%～50%の範囲内のホルムアミド濃度の操作などを通して反応物溶液の極性を変更することにより都合良く変動させられる。検出可能な結合のために必要とされる相補性（配列同一性）度は、ハイブリダイゼーション培地および/または洗浄培地のストリンジェンシーに従って変動することになる。相補性度は、最適には100%または70～100%またはその中の任意の範囲または値である。しかしながら、

10

20

【0076】

RNAまたはDNAの増幅方法は、当該技術分野において周知であり、本明細書中で紹介する教示および指針に基づいて過度の実験無く本発明に従って使用可能である。DNAおよびRNA増幅の既知の方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および関連する増幅プロセスが含まれるが、これらに限定されるわけではない（マリス（Mullis）ら、米国特許第4,683,202号明細書（1987年）；およびイニス（Innis）ら、「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」、Eds.、Academic Press Inc.、カリフォルニア州San Diego（1990年））。

30

【0077】

核酸を構築するための合成方法：本発明の単離核酸は、同様に、既知の方法による直接化学合成によっても調製可能である（例えば、アウスベルら、上掲書を参照のこと）。化学合成は一般に、相補的配列でのハイブリダイゼーションまたは鋳型として1本鎖を用いたDNAポリメラーゼでの重合によって2本鎖DNAへと転換可能である1本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。当業者であれば、DNAの化学合成は約100以上の塩基の配列に制限され得るものの、より短かい配列のライゲーションによりさらに長い配列を得ることができる、ということを認識するだろう。コーディング配列の化学的合成のための特に

40

【0078】

3. ベクターと発現系

本発明は、抗MCP-1抗体をコードする核酸を含有するかまたは、さまざまな抗体HCまたはLC遺伝子またはその一部分を含有するプラスミドを得るために使用することのできるベクター、好ましくは発現ベクターを提供する。本明細書で使用されている「ベクター」という用語は、連結されたもう1つの核酸を輸送する能力をもつ核酸分子を意味する。1つのベクタータイプは「プラスミド」であり、これは、付加的なDNAセグメントを中にライゲートできる円形の2本鎖DNAループを意味する。もう1つのタイプのベク

50

ターは、ウイルスゲノム内に付加的DNAセグメントをライゲートできるウイルスベクターである。本発明は同様に、本発明の単離核酸分子を内含するベクター、組換え型ベクターで遺伝的に工学処理されている宿主細胞、および当該技術分野において周知であるような組換え技術による少なくとも1つの抗MCP-1抗体の生産にも関する。例えば各々その全体が本明細書に参照により援用されているサンプルックら、上掲書；アウスベルら、上掲書、を参照のこと。

【0079】

抗体またはその抗体フラグメントの発現のためには、部分的または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを、遺伝子が転写および翻訳制御配列に対し作動的に連結されるような形で発現カセットまたはベクター内に挿入することができる。抗体をコードするカセットを、1つの構成体として組立てることができる。当該技術分野において既知の方法を用いて、構成体を調製することができる。より大きなプラスミドの一部として、構成体を調製することができる。このような調製は、適正な構成の選択およびクローニングを効率良く可能にする。構成体は、それらを残りのプラスミド配列から容易に単離できるような形でプラスミドまたはその他のベクター上の都合の良い制限部位の間に位置設定され得る。

【0080】

一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物といったような沈殿物内、またはDEAE-デキストランの荷電膜質との錯体の中に導入される。ベクターがウイルスである場合、それは適切なパッケージング細胞系列を用いてインビトロでパッケージングされ、その後宿主細胞内に形質導入され得る。宿主細胞内へのベクター構成体の導入は同様に、電気穿孔またはその他の既知の方法により行なうこともできる。かかる方法については、サンプルック、上掲書、第1～4および16～18章；アウスベル、上掲書、第1、9、13、15、16章といったように当該技術分野において記載されている。

【0081】

これに関連して、「作動的に連結された」という用語は、ベクター内部の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するその意図された機能に役立つような形で、抗体遺伝子が1つのベクター内にライゲートされることを意味するものと意図されている。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と相容性があるように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は別々のベクター内に挿入され得、そうでなければ、より標準的に、両方の遺伝子が同じ発現ベクター内に挿入される。抗体遺伝子は、標準方法により発現ベクター内に挿入される（例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が全く存在しない場合には平滑末端ライゲーション）。

【0082】

本明細書に記載されている抗体の軽鎖および重鎖可変領域は、VHセグメントがベクター内部でCHセグメントに対し作動的に連結され、VIセグメントがベクター内でCLセグメントに対し作動的に連結されるような形で所望のイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をすでにコードしている発現ベクター内に挿入することによって任意の抗体イソタイプの全長抗体遺伝子を作り上げるために使用可能である。付加的にまたは代替的に、組換え型発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが枠内で抗体鎖遺伝子のアミノ末端に連結されるような形でベクター内にクローニングされ得る。シグナルペプチドは免疫グロブリンシグナルペプチドまたは非相同シグナルペプチド（すなわち非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

【0083】

原核生物または真核生物宿主細胞のいずれかの中で発明の抗体を発現させることは理論的には可能であるが、真核細胞特に哺乳動物細胞は原核細胞よりも、適切に折畳まれ免疫学的に活性な抗体を組立て分泌する確率が高いことから、真核細胞内そして最も好ましくは哺乳動物宿主細胞内の抗体の発現が最も好ましい。

【0084】

一般に、哺乳動物発現ベクターは、(1)通常ウイルスプロモータまたはエンハンサ配列の形をしており広い宿主および組織範囲により特徴づけされる調節要素；(2)プラスミドベクター内部への抗体コーディング配列を含んでなるDNAフラグメントの挿入を促進する「ポリリンカー」配列および(3)mRNA転写産物のポリアデニル化およびイントロンスプライシングを相当する配列を含有することになる。プロモーターポリリンカー・ポリアデニル化部位のこの隣接する領域は、一般に転写単位と呼ばれる。ベクターは同様に、(4)大腸菌(E. coli)内の初期陽性形質転換体の選択を可能にする、抗生物質(例えばアンピシリン)に対する耐性を付与することの多い選択可能なマーカー遺伝子(例えばベータ・ラクタマーゼ遺伝子)；および(5)細菌および哺乳動物の両方の宿主中のベクターの複製を促進する配列をも含有する確率が高くなる。プラスミド複製起点が、大腸菌内での発現構成体の伝播のために内含され、Cos細胞内の過渡的発現のためには、SV40複製起点が発現プラスミド中に内含される。

【0085】

プロモータは、SV40プロモータ(例えば晩期または早期SV40プロモータ、CMVプロモータ(米国特許第5,168,062号明細書；同第5,385,839号明細書)、HSVtkプロモータ、pgk(ホスホグリセラートキナーゼ)プロモータ、EF-1アルファプロモータ(米国特許第5,266,491号明細書)、少なくとも1つのヒト免疫グロブリンプロモータから選択され得る。

【0086】

発現ベクターは好ましくは、ただし場合により、少なくとも1つの選択可能なマーカーを内含する。かかるマーカーには、例えばメトトレキサート(MTX)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR、米国特許第4,399,216号明細書；同第4,634,665号明細書；同第4,656,134号明細書；同第4,956,288号明細書；同第5,149,636号明細書；同第5,179,017号明細書、アンピシリン、ネオマイシン(G418)、ミコフェノール酸、または真核細胞培養のためのグルタミンシンセターゼ(GS、米国特許第5,122,464号明細書；同第5,770,359号明細書；同第5,827,739号明細書)耐性および大腸菌またはその他の細菌または原生生物中での培養のためのテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子(上述の特許はその全体が本明細書に参照として援用されている)が含まれるが、これらに限定されるわけではない。上述の宿主細胞についての適切な培地および条件は、当該技術分野において既知である。適切なベクターは、当業者にとって直ちに明白である。

【0087】

真核宿主細胞が利用される場合、ベクター内にポリアデニル化または転写ターミネータ配列が標準的に取込まれる。ターミネータ配列の一例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。写しの正確なスプライシングのための配列も同様に内含させることができる。スプライシング配列の一例としては、SV40由来のVP1イントロンがある((スプラグ(Sprague)ら、J. Virol. 第45巻：773~781頁(1983年))。付加的には、宿主細胞内の複製を制御するための遺伝子配列を、当該技術分野において既知の通りにベクター内に取込むことができる。同様に、重鎖分子の高い表面発現を回避するためには、膜貫通ドメイン変異体スプライスを無くする発現ベクターを使用する必要があるかもしれない。

【0088】

付加的な要素としては、エンハンサ、コザック配列およびRNAスプライシングのためのドナーおよびアクセプタ部位によりフランキングされた介在配列が含まれる。高効率の転写は、SV40由来の早期および晩期プロモータ、レトロウイルスからの長末端反復(LTR)例えばRSV、HTLV-I、HIV-I、およびサイトメガロウイルス(CMV)の早期プロモータで達成可能である。しかしながら、細胞要素も同様に使用可能である(例えばヒトアクチンプロモータ)。本発明を实践する上で使用するための適切な発現ベクターとしては例えば、pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN、またはpLNCX(カリフォルニア州Palo Altoのクローンテ

ック・ラブス (Clonetech Labs)、)、p cDNA3.1(+/-)、p cDNA/Zeo(+/-)またはp cDNA3.1/Hygro(+/-)(インビトロジェン)、PSVLおよびPMSG(スウェーデンUppsalaのファルマシア(Pharmacia))、pRSVcat(ATCC37152)、pSV2dhfr(ATCC37146)およびpBC12MI(ATCC67109)といったベクターが含まれる。

【0089】

代替的には、染色体内に組込まれた遺伝子を含有する安定した細胞系列の中で、抗体配列をコードする核酸を発現させることができる。dhfr、gpt、ネオマイシンまたはハイグロマイシンといったような選択可能なマーカーでの同時トランスフェクションにより、コードされた抗体を大量に発現するトランスフェクションを受けた細胞の同定および単離が可能となる。DHFR(ジヒドロ葉酸レダクターゼ)マーカーは、問題の遺伝子の数百さらには数千のコピーを担持する細胞系列を開発するのに有利である。もう1つの有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ(GS)である(マーフィー(Murphy)ら、Biochem. J. 第227巻: 277~279頁(1991年); ベビントン(Bebbington)ら、Bio/Technology第10巻: 169~175頁(1992年))。これらのマーカーを用いて、哺乳動物細胞は選択培地内で成長させられ、最高の耐性をもつ細胞が選択される。これらの細胞系列は、染色体内に組込まれた増幅された遺伝子を含有する。抗体の産生のためには、チャイニーズハムスタ卵巣(CHO)およびNSO細胞が用いられることが多い。

【0090】

本発明の抗体の生産において用いられるDNA構成体は、任意には少なくとも1つのインシュレータ配列を含む。「インシュレータ」、「インシュレータ配列」および「インシュレータ要素」は本明細書では互換的に使用される。インシュレータ要素は、その活動範囲内に置かれた遺伝子の転写を絶縁するものの、遺伝子発現をマイナスまたはプラスのいずれにも混乱させない制御要素である。好ましくは、インシュレータ配列は、転写されるべきDNA配列のいずれかの側に挿入される。例えば、インシュレータは、問題の遺伝子の3'末端でプロモータから少なくとも約1kb~5kb、プロモータから5'、約200bp~約1kbのところに位置づけされ得る。プロモータおよび問題の遺伝子の3'末端からのインシュレータ配列の距離は、問題の遺伝子の相対的サイズ、構成体中で用いられるエンハンサおよびプロモータに応じて、当業者により決定され得る。さらに、2つ以上のインシュレータ配列をプロモータから5'のところにまたはトランス遺伝子の3'末端に位置づけできる。例えば、プロモータから5'のところに2つ以上のインシュレータ配列を位置づけすることができる。トランス遺伝子の3'末端にあるインシュレータは、問題の遺伝子の3'末端または3'調節配列の3'末端例えば3'末翻訳領域(UTR)または3'フランキング配列に位置づけされ得る。

【0091】

適切な誘発性非融合大腸菌発現ベクターの例としては、pTrc(アマン(Amann)ら、(1988年)Gene第69巻: 301~315頁)およびpET11d(スタジア(Studier)ら、「Gene Expression Technology: Methods in Enzymology」、185、カリフォルニア州San DiegoのAcademic Press、(1990年)60~89頁)が含まれる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモータからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存している。pET11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されたウイルスRNAポリメラーゼ(T7gn1)により媒介されたT7gn10-lac融合プロモータからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV5プロモータの転写制御下でT7gn1遺伝子を宿す常在プロフィージからの宿主菌株BL21(DE3)またはHMS174(DE3)によって供給される。

【0092】

もう1つの実施形態においては、発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 *S. cerevisiae* 内での発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (バルダリ (Baldari) ら、(1987年) *EMBO J.* 第6巻: 229~234頁)、pMFA (クルジャン (Kurjan) およびヘルコヴィッツ (Herskowitz)、(1982年) *Cell*、第30巻: 933~943頁)、pJRY88 (シュルツ (Schultz) ら、(1987年)、*Gene*、第54巻: 113~123頁)、pYES2 (カリフォルニア州 San Diego のインビトロジェン・コーポレーション (Invitrogen Corporation)) および pPicZ (カリフォルニア州 San Diego のインビトロジェン・コーポレーション) がある。

【0093】

10

代替的には、発現ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターである。培養された昆虫細胞 (例えば Sf9 細胞) 内でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAc シリーズ (スミス (Smith) ら、(1983年) *Mol. Cell Biol. Biol.* 第3巻: 2156~2165頁) および pVL シリーズ (ラックロウ (Lucklow) および サマーズ (Summers) (1989年)、*Virology* 第170巻: 31~39頁) が含まれる。

【0094】

さらにもう1つの実施形態においては、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞内で本発明の核酸が発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (シード (Seed) (1987年)、*Nature* 第329巻: 840頁) および pMT2PC (カウフマン (Kaufman) ら、(1987年) *EMBO J.* 第6巻: 187~195頁) が含まれる。哺乳動物細胞内で使用される場合、発現ベクターの制御機能は往々にしてウイルス調節要素により提供される。例えば、一般的に使用されるプロモータは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40から誘導される。原核および真核の両方の細胞のために適したその他の発現系については、サンプルックら、上掲書の第16章および17章を参照のこと。

【0095】

20

もう1つの実施形態においては、組換え型哺乳動物発現ベクターは、リンパ腫細胞 (例えばマウス骨髄腫細胞) といったような特定の細胞型の中で優先的に核酸の発現を導く能力をもつ。特定の細胞型においては、核酸を発現するために組織特異的調節要素が使用される。組織特異的調節要素は当該技術分野において既知である。適切な組織特異的プロモータの制限的意味のない例としては、アルブミン・プロモータ (肝臓特異的; ピンカート (Pinkert) ら、(1987年)、*Genes Dev.* 第1巻: 268~277頁)、リンパ系特異的プロモータ (カラム (Calame) および イートン (Eaton) (1988年)、*Adv. Immunol.* 第43巻: 235~275頁)、特に、T細胞レセプターのプロモータ (ウィノト (Winoto) および バルチモア (Baltimore) (1989年)、*EMBO J.* 第8巻: 729~733頁) および免疫グロブリン (バネルジ (Banerji) ら、(1983年)、*Cell* 第33巻: 729~740頁; クイーン (Queen) および バルチモア (1983年)、*Cell* 第33巻: 741~748頁)、ニューロン特異的プロモータ (例えば、ニューロフィラメントプロモータ; バーン (Byrne) および ラッドル (Ruddle) (1989年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 第86巻: 5473~5477頁)、脾臓特異的プロモータ (エドランド (Edlund) ら、(1985年)、*Science*、第230巻: 912~916頁)、および乳腺特異的プロモータ (例えば、乳清プロモータ; 米国特許第4,873,316号明細書および欧州特許出願公開第264,166号明細書) が含まれている。例えば、マウス ホックス (hox) プロモータ (ケッセル (Kessel) および グラス (Gruss) (1990年) *Science* 第249巻: 374~379頁) および - フェトタンパク質プロモータ (カンペルス (Campes) および テイルマン (Tilghman) (1989年) *Genes Dev.* 第3巻: 537~546頁) などにより、発生学的に調節されているプロモータも包含されている。

30

40

50

【0096】

本発明はさらに、アンチセンス配向で発現ベクター内にクローニングされたDNA分子を含む組換え型発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、ポリペプチドをコートするmRNAに対しアンチセンスであるRNA分子の(DNA分子の転写による)発現を可能にするような形で調節配列に作動的に連結されている。さまざまな細胞型内でアンチセンスRNA分子の連続的発現を導くアンチセンス配向でクローニングされた核酸に作動的に連結された調節配列を選択することができる。例えば、アンチセンスRNAの構成性、組織特異的または細胞型特異的発現を導くウイルスプロモータおよび/またはエンハンサまたは調節配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、ベクターが導入される細胞型によって活性が決定され得る、内部で高効率調節領域の制御下でアンチセンス核酸が産生される弱毒化ウイルス、組換え型プラスミド、ファージミド(phagemid)の形をしている可能性がある。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の調節の論述については、ワイントローブ(Weintraub)ら、「Reviews - Trends in Genetics」、第1巻(1)、1986年)を参照のこと。

10

【0097】

骨髓腫細胞のクローニングおよび発現

cM-T412(その全体が参照により援用されている欧州特許第0511308号明細書)として知られているヒトCD4に対するキメラマウス/ヒトIgG1Kモノクローナル抗体が、トランスフェクションを受けた骨髓腫細胞内で高レベルに発現されることが観察された(ルーニー(Looney)ら、1992年、Hum Antibodies Hybridomas、第3巻(4):191~200頁)。培養条件を最適化するのに多大な努力を払うことなく、500mg/Lを超える生産レベル(一日細胞一個あたりのpgに基づく比生産性はわかっていない)が、1990年ペンシルバニア州Malvernのセントコール(Centocor, Inc)で容易に得られた。これらの発現ベクターの構成要素をベースとして、遺伝子プロモータ/転写開始核酸配列、5'未翻訳配列および翻訳開始核酸配列、シグナル配列をコードする核酸配列、シグナルイントロンおよびJ-Cイントロンのためのイントロン/エキソンスプライスドナー配列、およびJ-Cイントロンエンハンサ核酸配列を含めた、HCおよびLCクローニングにとって有用な抗体クローニングベクターが開発された。pUC19プラスミドであるプラスミドp139は、全マウスM-T412Abを分泌するC123ハイブリドーマ細胞からクローニングされた5.8kbのEcoRI-EcoRIゲノミックフラグメントを含有し、該フラグメントは、cM-T412HC遺伝子のV領域部分およびプロモータを含有する。LCV領域ベクター工学処理用の出発材料は、C123ハイブリドーマからクローニングされた3kbのHindIII-HindIIIゲノミックフラグメントを含有するpUCプラスミドであるプラスミドp39であった。このフラグメントはcM-T412LC遺伝子のV領域部分およびプロモータを含有する。P139およびp39から誘導された工学処理済みベクターは、1)V領域ベクター内の特異的に調製された制限部位間で問題の配列をコードするDNAをクローニングし、かくして、V領域コーディング配列がベクターコードされたシグナル配列のすぐ下流側ならびに遺伝子プロモータの一部分または全部の下流側に位置づけされることになる工程;および2)V領域ベクターからC領域ベクターまで適正な配位で挿入済み配列全体にわたるフラグメントを移送し、かくして、結果として得られたプラスミドが細胞内での発現に適した最終的発現プラスミドを構成することになる工程を伴う2段階プロセスにおいて哺乳動物宿主細胞内で発現するのに適したHCまたはLC遺伝子の適切な組立てを可能にするように設計された(スカロン(Scallion)ら、1995年、Cytokine第7巻(8):759~769頁)。

20

30

40

【0098】

CHO細胞内でのクローニングおよび発現

プラスミドpC4は、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC登録番号第37146号)の誘導體である。該プラスミドは、SV40早期プロモータの制御下でマウスDHFR遺伝子を含有する。これらのプラスミドでトランスフェクトされ、ジヒドロ葉酸活性が

50

欠如したチャイニーズハムスタの卵巣またはその他の細胞を、化学療法剤メトトレキサートで補足された選択培地（例えば、アルファマイナスMEM、メリーランド州Gaithersburgのライフ・テクノロジーズ（Life Technologies））の中で細胞を成長させることによって選択することができる。メトトレキサート（MTX）に対する耐性をもつ細胞内のDHFR遺伝子の増幅は、十分に立証されてきた（例えば、F.W.アルト（Alt）ら、J. Biol. Chem. 第253巻：1357～1370頁（1978年）；J.L.ハムリン（Hamlin）およびC.マー（Ma）、Biochem. et Biophys. Acta第1097巻：107～143頁（1990年）；およびM.J.ページ（Page）およびM.A.シンデナム（Sydenham）、Biotechnology第9巻：64～68頁（1991年）を参照のこと）。増大する濃度のMTX中で成長させられた細胞は、DHFR遺伝子の増幅の結果として標的酵素DHFRを過剰産生することにより、薬物に対する耐性を発生させる。第2の遺伝子がDHFR遺伝子に連結される場合、それは通常同時増幅され過剰発現される。当該技術分野においては、増幅された遺伝子1000コピー超を担持する細胞系列を発生させるためにこのアプローチを使用できることがわかっている。その後、メトトレキサートが引き抜かれた時点で、宿主細胞の1個もしくはそれ以上の染色体の中に組込まれた増幅された遺伝子を含む細胞系列が得られる。

【0099】

プラスミドpC4は、問題の遺伝子を発現するために、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復（LTR）の強いプロモータ（カレン（Cullen）ら、Molec. Cell. Biol. 第5巻：438～447（1985年））とヒトサイトメガロウイルス（CMV）の前初期遺伝子のエンハンサから単離されたフラグメント（ボシャート（Boshart）ら、Cell第41巻：521～530頁（1985年））を含む。該プロモータの下流側には、遺伝子の組込みを可能にするBamHI、XbaI、およびAsp718制限部位がある。これらのクローニング部位の後ろに、該プラスミドは、ラットプレプロインシュリン遺伝子の3'イントロンおよびポリアデニル化部位を含んでいる。発現のためには、ヒトb-アクチンプロモータ、SV40早期または晩期プロモータまたはHIVおよびHTLV Iなどのその他のレトロウイルスからの長末端反復といったその他の高効率プロモータを使用することもできる。哺乳動物細胞内で調節された形でMCP-1抗体を発現するためには、クローンテック社のテットオフ（Tet-Off）およびテットオン（Tet-On）遺伝子発現系および類似の系を使用することができる（M.ゴッセン（Gossen）およびH.ブジャール（Bujard）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA第89巻：5547～5551頁（1992年））。mRNAのポリアデニル化のためには、例えばヒト成長ホルモンまたはグロビン遺伝子からのその他のシグナルを使用することもできる。

【0100】

抗体産生用の宿主細胞

本発明の少なくとも1つの抗MCP-1抗体は、当該技術分野において周知の通りの細胞系列、混合細胞系列、不死化細胞または不死化細胞のクローン集団によって場合により産生され得る。例えば各々全体が本明細書に参照により援用されている、アウスベルら編、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons, Inc.、ニューヨーク州ニューヨーク（1987～2004年）；サンプルックら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor、ニューヨーク（1989年）；ハーロウおよびレン、「Antibodies, a Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク（1989年）；コリガンら編、「Current Protocols in Immunology」、John Wiley & Sons, Inc.、ニューヨーク（1994～2004年）；コリガンら、「Current Protocols in Protein Science」、John Wiley & Sons、

10

20

30

40

50

ニューヨーク州ニューヨーク（１９９７～２００４年）を参照のこと。

【０１０１】

生物薬剤学製品を生産するためには、組換え型ポリペプチドの効率の良い再生可能な発現の能力ある生産細胞系列が必要とされる。該細胞系列は安定していて確かなものである。この目的でさまざまな宿主細胞を利用することができる。細胞機構がいかにより生物療法製品の最終的物および組成物に影響を及ぼすかという複雑さを理解するにつれて、製品の生産および組成に対し必要な属性を付与することになる宿主細胞系列の選択はより明白なものとなる。

【０１０２】

連続的ゲノミックＤＮＡ配列から転写される大部分の遺伝子とは異なり、抗体遺伝子は、生殖細胞系内で広く分離され得る遺伝子セグメントから組立てられる。特に、抗体の可変（Ｖ）、多様性（Ｄ）および接合（Ｊ）／定常（Ｃ）領域をコードする３つのゲノミックセグメントの組合せにより、重鎖遺伝子が形成される。

10

【０１０３】

Ｖ領域をコードするものとＪ／Ｃ領域をコードするものという２つの遺伝子セグメントを接合することにより、機能的軽鎖遺伝子が形成される。重鎖およびカッパ軽鎖遺伝子座の両方が、１０００ｋｂをはるかに超えて広がると推定される数多くのＶ遺伝子セグメント（推定値は１００ｓと１０００ｓの間で変動する）を含む。これとは対照的に、ラムダ遺伝子座は、はるかに小さく、マウス内の染色体１６上で約３００ｋｂにわたることが示されてきた。それは、２つの可変遺伝子セグメントと４つの接合／定常（Ｊ／Ｃ）領域遺伝子セグメントから成る。機能的遺伝子の形成には、ＶおよびＪ／Ｃ要素の間の組換えが必要である。

20

【０１０４】

抗体が自然に生産されるＢ細胞の中では、再配置重鎖およびカッパ軽鎖遺伝子の両方の転写の制御がＶ領域の上流側の組織特異的プロモータおよびＪ－Ｃイントロン内にある組織特異的エンハンサの活性に共に左右される。これらの要素は相乗的に作用する。同様に第２のＢ細胞特異的エンハンサが、カッパ軽鎖遺伝子座内で同定されてきた。このさらなるエンハンサは、 C_{κ} の下流側の９ｋｂのところの位置設定されている。かくして、抗体発現遺伝子を不死化するハイブリドーマ方法は、親Ｂ細胞系統の内因性プロモータおよびエンハンサ配列に依存している。代替的には、本発明の核酸は、本発明の抗体をコードする内因性ＤＮＡを含有する宿主細胞内で（操作により）オン切換えすることにより宿主細胞中で発現され得る。かかる方法は、例えばその全体が本明細書に参照により援用されている米国特許第５，５８０，７３４号明細書、同第５，６４１，６７０号明細書、同第５，７３３，７４６号明細書および同第５，７３３，７６１号明細書中で記載されている通り、当該技術分野において周知である。

30

【０１０５】

人工ベクター内への抗体ゲノミックＤＮＡのクローニングは、抗体発現能力をもつ宿主細胞を作り上げるもう１つの方法である。しかしながら、強いプロモータの後ろでのモノクローナル抗体の発現は、高生産性細胞系列を同定しモノクローナル抗体のより高い収量を得る確率を増大させる。本発明の抗体は、例えば、当該技術分野において周知であるように（例えば、モリソン、Ｓ．（１９８５年）*Science* 第２２９巻：１２０２頁）組換え型ＤＮＡ技術および遺伝子トランスフェクション方法の組合せを用いて宿主細胞トランスフェクターの中で生産され得る。

40

【０１０６】

異なるさまざまな宿主細胞中の抗体を含む生物薬品のクローニングおよび発現のための系は周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、植物細胞、酵母およびバキュロウイルス系およびトランスジェニック植物および動物が含まれる。非相同ポリペプチド無傷グリコシル化タンパク質の発現のための当該技術分野において利用可能な哺乳動物細胞系列としては、チャイニーズハムスタ卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎細胞（ＢＨＫ）、ＮＳＯマウス黒色腫細胞および誘導された細胞系列、例

50

例えばSP2/0、YB2/0(ATCC CRL-1662)ラット骨髓腫細胞、ヒト胚腎臓細胞(HEK)、ヒト胚網膜細胞PerC.6細胞、hep G2細胞、BSC-1(例えばATCC CRL-26)および例えばバージニア州Manassasのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)、(www.atcc.org)から入手可能なその他の数多くのものが含まれる。一般的な好ましい細菌宿主細胞は、大腸菌である。

【0107】

非相同遺伝子の安定した発現のためには、CHO細胞、骨髓腫細胞、HEK293細胞、BHK細胞(BHK21、ATCC CRL-10)、マウスLtk-細胞およびNIH3T3細胞といったような哺乳動物細胞が用いられることが多かった。これとは対照的に、Cos(COS-1 ATCC CRL1650; COS-7、ATCC CRL-1651)およびHEK293といったような細胞系列が、組換え型タンパク質の過渡的な発現のために日常的に用いられる。

10

【0108】

本発明の組換え型抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞としては、その高い発現速度のため、SP2/0、YB2/0(ATCC CRL-1662)、NSOおよびP3X63.Ag8.653(例えば、SP2/0-Ag14)といったような骨髓腫細胞がある。特に、NSO骨髓腫細胞について使用するためのもう1つの好ましい発現系は、国際公開第87/04462号パンフレット、国際公開第89/01036号パンフレットおよび欧州特許第338,841号明細書において開示されているGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え型発現ベクターが哺乳動物宿主細胞内に導入された時点で、宿主細胞内での抗体の発現またはより好ましくは該宿主細胞が内部で成長させられる培地内への抗体の分泌を可能にするのに十分な時間宿主細胞を培養することによって、抗体が産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収可能である。

20

【0109】

抗体、その特定された部分または変異体の産生にとって有用な細胞培養の一例としては哺乳動物細胞がある。哺乳動物細胞系は、細胞の単層の形をとることが多いが、哺乳動物細胞の懸濁液またはバイオリアクタも同様に使用可能である。

【0110】

当該技術分野においては、無傷のグリコシル化タンパク質を発現する能力をもつ数多くの適切な宿主細胞系列が開発されており、これには例えば、バージニア州Manassasのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(www.atcc.org)から容易に入手可能なCOS-1(例えば、ATCC CRL1650)、COS-7(例えば、ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例えば、ATCC CRL-10)、CHO(例えば、ATCC CRL1610)およびBSC-1(例えば、ATCC CRL-26)細胞系、Cos-7細胞、CHO細胞、hep G2細胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293細胞、HeLa細胞など、が含まれる。好ましい宿主細胞としては、骨髓腫およびリンパ腫細胞といったようなリンパ由来の細胞が含まれる。特に好ましい宿主細胞はP3X63Ag8.653細胞(ATCC登録番号CRL-1580)およびSP2/0-Ag14細胞(ATCC登録番号CRL-1851)である。

30

40

【0111】

問題の遺伝子の増幅は、例えば薬物メトトレキサート(MTX)を用いた選択可能かつ増幅可能なマーカーDHFRの取込みによって可能になることから(R.J.カウフマン、1990年、Methods Enzymol.、第185巻:537~566頁)、高レベルのタンパク質産生のためには、CHO-K1およびDHFR-CHO細胞DG44およびDUK-B11(G.ウアラウブ(Ur laub)、L.A.チェイシン(Chasin)、1980年、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.第77巻、4216~4220頁)が使用される。高レベルで組換え型mAbsを産生するため

50

には、DHFR⁺ CHO細胞を使用するとうまくいく。DHFR⁺ CHOは、一日10⁶個の細胞あたり80～110mgまたは200mg超の速度でant-MCP-1抗体を産生し得る。例えばb-アクチンプロモータ、ヒトCMV MIEプロモータ、Adウイルス主要晩期プロモータ(MLP)、RSVプロモータおよびマウス白血病ウイルスLTRといったさまざまなプロモータが、これらのCHO細胞内でのH鎖およびL鎖の発現を得るために使用されてきた。mAb発現のための数多くのベクターが文献中で記述されており、ここでは、独立した選択可能/増幅可能なマーカーと共に2つの異なるプラスミドにより2つのIg鎖が提供されている。DHFRマーカーに連結されたH鎖およびNeo^rマーカーを伴うL鎖発現カセットなどの1つの抗体鎖またはその反対を含有するベクターを用いて、スピナーフラスコ内で7日1Lあたり最高180mgのヒト化mAbを得ることができる。初期選択およびその後の増幅のために用いられる方法は変えることができ、当業者にとって周知のものである。一般に、以下の工程を用いて、高レベルのmAb発現を得ることができる：すなわち、候補クローンの初期選択およびその後の増幅、同時選択(例えばH鎖およびL鎖発現ベクターの両方がDHFR発現単位を担持している場合)および増幅、異なる増幅可能マーカーを用いた同時増幅、および大量培養中の初期選択および増幅とそれに続く個々の高発現クローンを同定するための希釈クローニング。組込み部位がH鎖およびL鎖の発現および全体的mAb発現の効率に影響を及ぼし得ることから、2つのIg鎖発現単位が縦一列に置かれている単一のベクターが作り出された。これらのベクターは同様に、Neo^rおよびDHFR発現カセットといったような優勢選択可能マーカーを担持している。再考のためには、ガングリー(Ganguly)、S.およびA.シャッツマン(Shatzman)、「Expression Systems, mammalian cells」、1999年、John Wiley & Sons, Incによる「Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation」を参照のこと。

【0112】

コケット(Cockett)ら、(1990年、Bio/Technology第8巻、662～667頁は、CHO細胞中での非相同遺伝子の高レベル発現のためのGS系を開発した。CHO-K1細胞内への(hCMVプロモータの転写制御下での)cDNAおよび(SV40晩期プロモータの制御下での)GSミニ遺伝子を含有する発現ベクターのトランスフェクション(とそれに続く20mM～500mMのMSXでの選択)を用いて、DHFR-CHO系のものと比較可能な収率で本発明の抗体を発現するクローンを生成することができる。GS系については欧州特許第0,216,846号明細書、同第0,256,055号明細書および同第0,323,997号明細書および欧州特許出願第89303964.4号明細書に関連して、全体的にまたは部分的に論述される。

【0113】

制限的意味のない例としては、例えば誘発可能なプロモータを用いて、組換え型タンパク質を大量に提供するべく、組換え型タンパク質を発現するトランスジェニックタバコ葉が成功裡に用いられてきた。例えばクラマー(Cramer)ら、Curr. Top. Microbiol. Immunol.第240巻：95～118頁(1999年)およびその中で引用された参考文献を参照のこと。同様に、トランスジェニックトウモロコシを用いて、その他の組換え型系の中で産生されるかまたは天然の供給源から精製されたものと等価の生物活性で、商業的生産レベルで哺乳動物タンパク質が発現されてきた。例えば、フード(Hood)ら、Adv. Exp. Med. Biol.第464巻：127～147頁(1999年)およびその中で引用されている参考文献を参照のこと。タバコの種子およびジャガイモ塊茎を含めた1本鎖抗体(scFv's)といったような抗体フラグメントを含むトランスジェニック植物種子からも同様に大量に抗体が生産されてきた。例えばコンラッド(Conrad)ら、Plant Mol. Biol.第38巻：101～109頁(1998年)およびその中で引用されている参考文献を参照のこと。かくして、本発明の抗体は、既知の方法に従ってトランスジェニック植物を用いて生産することも

10

20

30

40

50

可能である。例えば、フィッシャー (Fischer) ら、*Biotechnol. Appl. Biochem.* 第30巻: 99~108頁 (Oct., 1999年)、マーら、*Trends Biotechnol.* 第13巻: 522~7頁 (1995年); マーら、*Plant Physiol.* 第109巻: 341~6頁 (1995年); ホワイトラム (Whitelam) ら、*Biochem. Soc. Trans.* 第22巻: 940~944頁 (1994年); およびその中で引用されている参考文献も参照のこと。同様に、抗体の植物発現について一般的には (ただし制限的な意味なく) 米国特許第5959177号明細書を参照のこと。上述の参考文献の各々はその全体が本明細書に参照により援用されている。

【0114】

10

5. 抗体の精製

プロテインA精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、親和性クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィおよびレクチンクロマトグラフィを含めた (ただしこれらに限定されるわけではない) 周知の方法により、組換え型細胞培養から、抗MCP-1抗体を回収し精製することができる。精製には高性能液体クロマトグラフィ (「HPLC」) を利用することもできる。例えば各々その全体が本明細書に参照により援用されているコリガン、*「Current Protocols in Immunology」* または *「Current Protocols in Protein Science」*、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク、(1997~2001年) の例えば、第1、4、6、8、9、10章を参照のこと。

20

【0115】

本発明の抗体には、天然に精製された生成物、化学合成手順の生成物、および例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含めた真核生物宿主から組換え技術により生産された生成物が含まれる。組換え生産手順において利用される宿主に応じて、本発明の抗体は、グリコシル化されていてもいなくてもよいが、グリコシル化抗体が好まれる。かかる方法については、その全てが本明細書中に参照により援用されている、サンプルック、上掲書、第17.37-17.42節; アウスベル、上掲書、第10、12、13、16、18および20章、コリガン、*「Protein Science」*、上掲書、第12-14章、といったような数多くの標準的実験室マニュアルの中で記載されている。

30

【0116】

6. 発明の抗体

本発明の方法および組成物において有用な抗MCP-1抗体 (抗-CCL-2抗体またはMCP-1抗体とも呼ばれる) は、場合により、MCP-1に対する高い親和性結合、MCP-1に対するきわめて特異的な結合、MCP-1と結びつけられた生物活性のうち1個もしくはそれ以上のものを阻害する能力そして場合によりかつ好ましくは低い毒性を有すること、によって特徴づけされ得る。

【0117】

本発明の抗体は、広範囲の親和性 (K_D) で、ヒトMCP-1と結合し得る。好ましい実施形態においては、本発明の少なくとも1つのヒトmAbが場合により高い親和性でヒトMCP-1を結合させる。例えば、ヒトmAbは、 $0.1 \sim 9.9$ (または任意の範囲またはその中の値) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} または任意の範囲またはその中の値といったような (ただしこれらに限定されるわけではない)、約 10^{-7} M以下の K_D でヒトMCP-1を結合させることができる。

40

【0118】

1抗原についての1抗体の親和性または結合力は、任意の適切な方法を用いて経験的に決定可能である (例えば、ベルゾフスキー (Berzofsky) ら、*「Fundamental Immunology」* 中の *「Antibody-Antigen Inte*

50

「r a c t i o n s」、Paul、W. E.、Ed.、Raven Press：ニューヨーク州ニューヨーク（1984年）；クビー（Kuby）、ジャニス（Janis）、「Immunology」、W. H. Freeman and Company：ニューヨーク州ニューヨーク（1992年）；および本明細書中に記載されている方法を参照のこと）。特定の抗体 - 抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件（例えば塩濃度、pH）下で測定された場合に変動し得る。かくして、親和性およびその他の抗原結合パラメータ（例えば K_D 、 K_a 、 K_d ）の測定は好ましくは、標準化された抗体および抗原の溶液および標準化された緩衝液例えば本明細書中に記述された標準溶液および緩衝液を用いて行なわれる。

【0119】

本発明の単離された抗体は、任意の適切なポリヌクレオチドによってコードされた本明細書で開示されている抗体アミノ酸配列または任意の単離または調製された抗体を含んでなる。好ましくは、ヒト抗体または抗原結合フラグメントはヒトMCP-1を結合させ、かくして、部分的または実質的に該タンパク質の少なくとも1つの生物活性を中和する。少なくとも1つのMCP-1タンパク質またはフラグメントの少なくとも1つの生物活性を部分的にまたは好ましくは実質的に中和する抗体またはその特定された部分または変異体は、該タンパク質またはフラグメントを結合させかくしてMCP-1のMCP-1レセプターに対する結合を通してかまたはその他のMCP-1依存性または媒介型機序を通して媒介される活性を阻害することができる。本明細書で使用される「中和抗体」という用語は、MCP-1依存性活性を約20～120%、好ましくは検定に応じて少なくとも約10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%以上だけ阻害できる抗体のことを意味する。MCP-1依存性活性を阻害する抗MCP-1抗体の能力は、好ましくは、本明細書に記載されている通りおよび/または当該技術分野において知られている通り、少なくとも1つの適切なMCP-1タンパク質またはレセプター検定によって査定される。本発明のヒト抗体は、あらゆるクラス（IgG、IgA、IgM、IgE、IgDなど）またはイソタイプのものであり得、カッパまたはラムダ軽鎖を含んでなることができる。一実施形態においては、ヒト抗体は例えばイソタイプ、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のうちの少なくとも1つといったIgG重鎖または画定されたフラグメントを含んでなる。このタイプの抗体は、トランスジェニックマウスまたは、本明細書に記載されているかつ/または当該技術分野において既知の通りの少なくとも1つのヒト軽鎖（例えば、IgG、IgAおよびIgM（例えば 1、 2、 3、 4））導入遺伝子を含むその他のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いることによって調製可能である。もう1つの実施形態においては、抗ヒトMCP-1ヒト抗体はIgG1重鎖およびIgG1軽鎖を含んでなる。

【0120】

本発明の少なくとも1つの抗体は、少なくとも1つのMCP-1タンパク質、そのフラグメント、一部分または任意の組合せに特異的な少なくとも1つの特定されたエピトープを結合させる。該少なくとも1つのエピトープは、タンパク質の少なくとも一部分を含んでなる少なくとも1つの抗体結合領域を含んでなり得、このエピトープは好ましくは、配列番号1の連続するアミノ酸の少なくとも1～3個のアミノ酸から特定された部分全体で構成されている。

【0121】

一般に、本発明のヒト抗体または抗原結合フラグメントは、少なくとも1つのヒト相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）または少なくとも1つの重鎖可変領域の変異体および少なくとも1つのヒト相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）または少なくとも1つの軽鎖可変領域の変異体を含んでなる抗原結合領域を含んでなることになる。制限的意味のない例としては、抗体または抗原結合部分または変異体は、配列番号9または12のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3および/または配列番号15～17、20または21のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3のうちの少なくとも1つを

10

20

30

40

50

含んでなることができる。特定の一実施形態においては、抗体または抗原結合フラグメントは、対応するCDR1、2および/または3のアミノ酸配列（例えば配列番号6～12および/または22、23および26）を有する少なくとも1つの重鎖CDR（すなわちCDR1、CDR2および/またはCDR3）の少なくとも一部分を含んでなる抗原結合領域を有することができる。もう1つの特定の実施形態においては、抗体または抗原結合部分または変異体は、対応するCDR1、2および/または3のアミノ酸配列（例えば配列番号13～21および/または24および25）を有する少なくとも1つの軽鎖CDR（すなわちCDR1、CDR2および/またはCDR3）の少なくとも一部分を含んでなる抗原結合領域を有することができる。好ましい実施形態においては、抗体または抗原結合フラグメントの3つの重鎖CDRおよび3つの軽鎖CDRは、本明細書に記載されている通りのFab MOR0336、MOR03464、MOR03468、MOR03470、MOR03471、MOR03473、MOR03548のうちの少なくとも1つのものの対応するCDRから誘導されたアミノ酸配列およびVH3抗体から誘導された重鎖フレームワーク領域（配列番号2）およびカッパ型抗体から誘導された軽鎖フレームワーク領域（配列番号4）を。かかる抗体は、従来の技術を用いて抗体のさまざまな部分（CDRおよびフレームワーク）を化学的に接合させることによってかまたは、組換え型DNA技術の従来の技術を用いて抗体をコードする核酸分子を調製し発現させることによってか、またはその他の適切な任意の方法を用いることによって調製可能である。

【0122】

抗MCP-1抗体は、フレームワーク領域内に画定されたアミノ酸配列を有する重鎖または軽鎖可変領域のうちの少なくとも1つを含んでなり得る。例えば、好ましい実施形態において、抗-MCP-1抗体は、場合により配列番号2または3のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの重鎖可変領域および/または場合により配列番号4または5のアミノ酸配列を有する少なくとも1つの軽鎖可変領域のうちの少なくとも1つを含んでなる。

【0123】

抗体のクラスまたはイソタイプ（IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM）は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる定常領域によって付与される。ヒトIgGクラスの中には、最高から出発して最低まで血清中のその天然の存在度の順に命名されたIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4という4つのサブクラスまたはサブタイプが存在する。IgA抗体は、IgA1およびIgA2という2つのサブクラスとして見出される。本明細書で使用されるような「イソタイプスイッチング」という用語も、IgGサブクラスまたはサブタイプの間での変更を意味している。

【0124】

本発明は同様に、本明細書に記載されているアミノ酸配列と実質的に同じである配列内のアミノ酸を含む抗体、抗原結合フラグメント、免疫グロブリン鎖およびCDRにも関する。好ましくは、このような抗体または抗原結合フラグメントおよびかかる鎖またはCDRを含んでなる抗体は、高い親和性（例えば約 10^{-9} M以下の K_D ）で、ヒトMCP-1を結合させることができる。本明細書に記載されている配列を実質的に同じであるアミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換ならびにアミノ酸欠失および/または挿入を含んでなる配列を内含する。保存的アミノ酸置換というのは、第1のアミノ酸のものと類似した化学および/または物理的特性（例えば電荷、構造、極性、疎水性/親水性）をもつ第2のアミノ酸による第1のアミノ酸の置き換えを意味する。保存的置換には、リジン（K）、アルギニン（R）およびヒスチジン（H）；アスパラギン酸（D）およびグルタミン酸（E）；アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、トレオニン（T）、チロシン（Y）、K、R、H、DおよびE；アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、プロリン（P）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、システイン（C）およびグリシン（G）；F、WおよびY；C、SおよびTという群の中に入るもう1つのアミノ酸による1つのアミノ酸の置き換えが含まれる。

【0125】

本発明の抗MCP-1抗体は、ヒト生殖系列遺伝子配列から誘導され、VH1A、VH1B、VH2などと呼称されたファミリに配列親似性によっておよびカッパまたはラムダサブグループとして軽鎖により分類される可変領域についてクナピック(Knapik)ら、米国特許第6828422号明細書中で教示されているかまたは本明細書で特定されている通りの人間による操作または天然の突然変異のいずれかに由来する、1個もしくはそれ以上のアミノ酸置換、欠失または付加を内含し得る。これらの配列および本発明において使用可能なその他の配列としては、本明細書で教示されている通り本発明のIg誘導されたタンパク質の中でその一部分を使用することのできる、重鎖および軽鎖可変および定常ドメイン配列、フレームワーク、サブドメイン、領域および置換の例を示す、全体が本明細書に参照により援用されている2004年6月21日出願のPCT公報国際公開第05/005604号パンフレットおよび米国特許出願第10/872,932号明細書の図1~42にさらに描かれている通り、表1に提示された立体配置が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0126】

【表2】

表1. ヒト抗体立体配置

		領域						
		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
重鎖可変領域		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
軽鎖可変領域		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IgA1、IgA2、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4	定常領域	CH1	ヒンジ1-4	CH2	CH3			
SIgA、IgM		CH1	ヒンジ1-4	CH2	CH3	J-鎖		
IgE		CH1		CH2	CH3	CH4		

【0127】

当業者が行なうと思われるアミノ酸置換の数は、上述のものを含めた数多くの要因により左右される。一般的に言うと、任意の与えられた抗MCP-1抗体、フラグメントまたは変異体についてのアミノ酸置換、挿入または欠失の数は、本明細書で規定されているように、1~30またはその中の任意の範囲または値といったように40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1を超えないものとなる。

【0128】

機能上不可欠である本発明の抗MCP-1抗体内のアミノ酸は、部位特異的突然変異誘発またはアラニン走査突然変位誘発といったような当該技術分野において既知の方法により同定可能である(例えば、アウスベル、上掲書、第8、15章;カニンガム(Cunningham)およびウェルズ(Well's)、Science第244巻:1081~1085頁(1989年))。後者の手順は、分子内のすべての残基において単一アラニン突然変異を導入する。次に、結果として得られた突然変異体分子が、例えば(ただしこれに制限されるわけではない)少なくとも1つのMCP-1中和活性といったような生物活性についてテストされる。抗体結合にとってきわめて重要である部位も又、結晶化、核磁気共鳴または光親和性標識といったような構造分析によって同定可能である(スミス(Smith)ら、J.Mol.Biol.第224巻:899~904頁(1992年)およびデボス(de Vos)ら、Science第255巻:306~312頁(1992年))。

【0129】

本発明の抗 M C P - 1 抗体は、配列番号 2 ~ 5 および 2 7 ~ 2 8 のうちのいずれか 1 つのものの連続するアミノ酸のうちの 5 個乃至全てのアミノ酸から選択された少なくとも 1 つの部分、配列または組合せを含むことができるが、これらに限定されるわけではない。

【0130】

抗 M C P - 1 抗体はさらに、場合により、配列番号 2 7 および 2 8 のうちの少なくとも 1 つの配列番号の 1 つのポリペプチドを含んでなる。一実施形態においては、免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列またはその一部分は、抗 - M C P - 1 抗体の結合特異性を変えない保存的置換を除いて、配列番号 2 7 ~ 2 8 の少なくとも 1 つの対応する鎖のアミノ酸配列に対する約 1 0 0 % の同一性を有する。例えば、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 または 5 の配列と比較可能であるか、そうでなければ、重鎖のアミノ酸配列を配列番号 2 または 3 と比較することができる。好ましくは、アミノ酸同一性は、当該技術分野で既知の通り、適切なコンピュータアルゴリズムを用いて決定される。

【0131】

当業者であれば認識するように、本発明には、本発明の少なくとも 1 つの生物活性ある抗体が含まれている。生物活性ある抗体は、未変性（非合成）内因性または関連するおよび既知の抗体のものの少なくとも 2 0 %、3 0 % または 4 0 % そして好ましくは少なくとも 5 0 %、6 0 % または 7 0 %、かつ最も好ましくは少なくとも 8 0 %、9 0 % または 9 5 % ~ 1 0 0 % の比活性を有する。酵素活性および基質特異性の検定および定量化措置の方法は、当業者にとって周知であり、本明細書中に記載されている。

【0132】

もう 1 つの態様においては、本発明は、有機部分の共有結合付着により修飾される本明細書に記載されている通りのヒト抗体および抗原結合フラグメントに関する。かかる修飾は、改善された薬学速度論的特性（例えば増大したインビボ血清半減期）をもつ抗体または抗原結合フラグメントを生成することができる。有機部分は、線形または有枝親水性重合体基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であり得る。特定の実施形態においては、該親水性重合体基は、約 8 0 0 ~ 約 1 2 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有することができ、ポリアルカングリコール（例えばポリエチレングリコール（P E G）、ポリプロピレングリコール（P P G））、炭水化物重合体、アミノ酸重合体またはポリビニルピロリドンであり得、脂肪酸または脂肪酸エステル基は、約 8 個 ~ 約 4 0 個の炭素原子を含むことができる。

【0133】

本発明の修飾済み抗体および抗原結合フラグメントは、抗体に対し直接または間接的に共有結合される 1 個もしくはそれ以上の有機部分を含んでなることができる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントに結合した各々の有機部分は、独立して、親水性重合体基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であり得る。本明細書で使用されている「脂肪酸」という用語は、モノカルボン酸およびジカルボン酸を包含する。本明細書で使用されている「親水性重合体基」という用語は、オクタン中よりも水中でより溶解度が高い有機重合体を意味する。例えば、ポリリシンは、オクタン中よりも水中でさらに溶解度が高い。かくして、ポリリシンの共有結合付着により修飾された抗体が、本発明により包含されている。本発明の抗体を修飾するのに適した親水性重合体は、線形または有枝であり得、たとえばポリアルカングリコール（例えば、P E G、モノメトキシ - ポリエチレングリコール（m P E G）、P P G など）、炭水化物（例えば、デキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖類など）、親水性アミノ酸の重合体（例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリアスパラギン酸塩など）、酸化ポリアルカン（例えば、酸化ポリエチレン、酸化ポリプロピレンなど）およびポリビニルピロリドンを内含する。好ましくは、本発明の抗体を修飾する親水性重合体は、別の分子の実体として約 8 0 0 ~ 約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有する。例えば、P E G_{5 0 0 0} および P E G_{2 0 , 0 0 0}（なおここで下付き文字はダルトン単位の重合体の平均分子量である）が使用可能である。親水性重合体基は、1

個乃至約6個アルキル、脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換可能である。脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換される親水性重合体は、適切な方法を用いることによって調製可能である。例えば、アミン基を含む重合体を脂肪酸または脂肪酸エステルのカルボン酸塩にカップリングさせることができ、脂肪酸または脂肪酸エステル上の（例えばN、N-カルボニルジイミダゾールで活性化された）活性化カルボン酸塩を重合体上のヒドロキシル基にカップリングさせることができる。

【0134】

本発明の抗体を修飾するのに適した脂肪酸および脂肪酸エステルは飽和可能であり、そうでなければ1個もしくはそれ以上の不飽和単位を含有し得る。本発明の抗体を修飾するのに適した脂肪酸には、例えばn-ドデカン酸塩（ C_{12} 、ラウリン酸塩）、n-テトラデカン酸塩（ C_{14} 、ミリスチン酸塩）、n-オクタデカン酸塩（ C_{18} 、ステアリン酸塩）、n-エイコサン酸塩（ C_{20} 、アラキドン酸塩）、n-ドコサン酸塩（ C_{22} 、ベヘン酸塩）、n-トリアコンタン酸塩（ C_{30} ）、n-テトラコンタン酸塩（ C_{40} ）、cis-9-オクタデカン酸塩（ C_{18} 、オレイン酸塩）、全てのcis-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸塩（ C_{20} 、アラキドン酸塩）、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸、などが含まれる。適切な脂肪酸エステルには、線形または有枝低級アルキル基を含むジカルボン酸モノエステルが含まれる。低級アルキル基は1個乃至約12個、好ましくは1～約6個の炭素原子を含み得る。

【0135】

1個もしくはそれ以上の修飾剤との反応などにより適切な方法を用いて、修飾済みヒト抗体および抗原結合フラグメントを調製することができる。本明細書で使用される「修飾剤」という用語は、活性化基を含んでなる適切な有機基（例えば親水性重合体、脂肪酸、脂肪酸エステル）を意味する。「活性化基」というのは、適切な条件下で第2の化学基と反応しかくして修飾剤と第2の化学基の間に共有結合を形成することのできる化学部分または官能基である。例えば、アミン反応性活性化基は、トシラート、メシラート、ハロ（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NHS）などといったような求電子基を内含する。チオールと反応し得る活性化基は、例えばマレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロベンゼン酸チオール（TNB-チオール）などを内含する。アミンまたはヒドラジド含有分子に対しアルデヒド官能基をカップリングさせることができ、アジド基が、3価のリン基と反応してホスホルアミダートまたはホスホルイミド連結を形成することができる。分子中に活性化基を導入するための適切な方法が、当該技術分野において既知である（例えばハーマンソン（Hermanson）、G. T.、*Bioconjugate Techniques*、Academic Press：カリフォルニア州San Diego（1996年）を参照のこと）。有機基（例えば親水性重合体、脂肪酸、脂肪酸エステル）に対して直接、或いはリンカー部分例えば2価の $C_1 - C_{12}$ 基（なおここで1個もしくはそれ以上の炭素原子を酸素、窒素または硫黄といったようなヘテロ原子で置き換えることができる）を通して、活性化基を結合させることができる。適切なリンカー部分としては例えば、テトラエチレングリコール、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ および $CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ が含まれる。リンカー部分を含む修飾剤は例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）の存在下でモノ-Boc-アルキルジアミン（例えばモノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン）を脂肪酸と反応させて遊離アミンと脂肪酸カルボキシラートの間のアミド結合を形成することによって、生産可能である。Boc保護基を、トリフルオロ酢酸（TFA）での処理により生成物から除去し、記載されている通りもう1つのカルボン酸塩にカップリングされ得る一級アミンを露出させることができ、そうでなければこれを無水マレイン酸と反応させ、結果として得られた生成物を環化させて脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成することができる（例えばその教示全体が本明細書に参照により援用されている、トンプソン（Thompson）ら、国際公開第92/16221号パンフレッ

10

20

30

40

50

トを参照のこと)。

【0136】

本発明の修飾された抗体は、修飾剤とヒト抗体または抗原結合フラグメントを反応させることによって生産可能である。例えば、PEGのNHSEステルといったアミン反応性修飾剤を利用することによって、有機部分を非部位特異的に抗体に結合させることができる。抗体または抗原結合フラグメントのジスルフィド結合(例えば鎖内ジスルフィド結合)を還元させることによって、修飾済みヒト抗体または抗原結合フラグメントを調製することもできる。このとき、還元された抗体または抗原結合フラグメントをチオール反応性修飾剤と反応させて、本発明の修飾された抗体を産生させることが可能である。本発明の抗体の特異的部位に結合された有機部分を含んでなる修飾済みヒト抗体および抗原結合フラグメントを、逆タンパク質分解(フィッシュ(Fisch)ら、Bioconjugate Chem. 第3巻: 147~153頁(1992年);ワーレン(Werlen)ら、Bioconjugate Chem. 第5巻: 411~417頁(1994年);クマラン(Kumaran)ら、Protein Sci. 第6巻(10): 2233~2241頁(1997年);イトウ(Itoh)ら、Bioorg. Chem. 第24巻(1): 59~68頁(1996年);カベラス(Capellas)ら、Biotechnol. Bioeng. 第56巻(4): 456~463頁(1997年))およびハーマンソン、G.T.、「Bioconjugate Techniques」、Academic Press: カリフォルニア州San Diego(1996年)に記載されている方法といったような適切な方法を用いて調製することが可能である。

10

20

【0137】

7. 抗MCP-1抗体に対する抗イディオタイプ抗体

モノクローナルまたはキメラ抗-MCP-1抗体に加えて、本発明は同様に、本発明のかかる抗体に特異的な抗イディオタイプ(抗-Id)抗体にも向けられている。抗Id抗体は、一般にもう1つの抗体の抗原結合領域と会合されたユニーク決定基を認識する抗体である。抗Idは、抗体またはそのCDR含有領域を伴うId抗体の供給源と同じ種および遺伝子型(例えばマウス株)の動物を免疫化することによって調製可能である。免疫化された動物は、免疫化抗体のイディオタイプ決定基を認識しこれに応答し、抗Id抗体を産生する。抗Id抗体は同様に、さらにもう1つの動物の体内で免疫応答を誘発し、いわゆる抗-抗-Id抗体を産生するための「免疫原」としても使用可能である。

30

【0138】

8. さらに治療活性ある成分を含んでなる抗体組成物

組成物は、場合によりさらに、皮膚病薬、抗炎症薬、鎮痛剤、腎臓作用薬(例えばアンギオテンシンレセプター遮断薬(ARB)またはアンタゴニスト)、抗感染症薬、心臓血管(CV)系作用薬、中枢神経系(CNS)薬、自律神経系(ANS)薬、呼吸管薬、消化(GI)管作用薬、ホルモン薬、体液または電解質平衡作用薬、血液製剤、抗新生物薬、免疫調節薬、眼科耳鼻科薬、局所作用薬、栄養薬などのうちの少なくとも1つから選択された少なくとも1つの化合物またはタンパク質を有効量含んでなることができる。かかる薬物は、各々について本明細書で提示されている処方、適応症、用量決定および投与方法を含め、当該技術分野において周知のものである(例えば、各々その全体が本明細書に参照により援用されている「Nursing 2001 Handbook of Drugs」、第21版、ペンシルバニア州SpringhouseのSpringhouse Corp.、2001年;「Health Professional's Drug Guide 2001」、シャノン(Shannon)、ウィルソン(Wilson)、スタング(Stang)編、ニュージャージー州Upper Saddle RiverのPrentice-Hall, Inc.;「Pharmacotherapy Handbook」、ウェルズら編、コネチカット州StamfordのAppleton & Lange、を参照のこと)。

40

【0139】

本発明の抗-MCP-1抗体組成物は、さらにその変調、治療または療法を必要として

50

いる細胞、組織、器官、動物または患者に対する少なくとも1つの抗MCP-1抗体を含んでなり、場合によりさらに、少なくとも1つのTNFアンタゴニスト（例えば制限的な意味なく、TNF化学物質またはタンパク質アンタゴニスト、TNFモノクローナルまたはポリクローナル抗体またはフラグメント、可溶性TNFレセプター（例えばp55、p70またはp85）またはそのフラグメント、融合ポリペプチド、または小分子TNFアンタゴニスト例えばTNF結合タンパク質IまたはII（TBP-1またはTBP-II）、ネレリモンマブ、インフリキシマブ、エンテラセプト、CDP-571、CDP-870、アフエリモマブ、レネルセプトなど）、抗リウマチ剤（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、オーロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン）、筋肉弛緩剤、睡眠薬、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、鎮痛薬、麻酔剤、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤（例えば、アミノグリコシド、抗真菌薬、駆虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロsporin、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、その他の抗菌剤）、乾癬治療薬、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連作用剤、ミネラル、栄養薬、甲状腺作用剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳薬、制吐薬、抗潰瘍薬、便秘薬、抗凝血剤、エリスロポイエチン（例えば、エポエチンアルファ）、フィルグラスチム（例えば、G-CSF、ニューボゲン（Neupogen））、サルグラモスチム（GM-CSF、ロイキン（Leukine））、慢性閉塞性肺疾患（COPD）作用薬、抗線維症剤、予防接種、免疫グロブリン、免疫抑制薬（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲンレセプター調節物質、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、代謝拮抗物質、分裂抑制剤、放射性医薬品、抗うつ薬、抗躁薬、精神病治療薬、抗不安薬、催眠剤、交換神経様作用薬、興奮剤、ドネペジル、タクリン、喘息治療薬、ベータアゴニスト、吸引ステロイド薬、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは類似体、ドルナーゼアルファ（プルモザイム（Pulmozyme））、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択された少なくとも1つのものをさらに含んでなる組成物または薬学組成物（医薬組成物（pharmaceutical composition））を任意の適切な量および有効量のうちの少なくとも一方を含んでなり得る。かかるサイトカインの制限的意味のない例としては、IL-1～IL-29のいずれかが含まれるが、これらに限定されるわけではない。適切な投与量は、当該技術分野において周知である。例えばその各々の参考文献各々の全体が本明細書に参照により援用されている、ウェルズら編、「Pharmacotherapy Handbook」第2版、コネチカット州StamfordのAppleton and Lange、（2000年）；「PDR Pharmacopoeia」、Tarascon Pocket Pharmacopoeia、2000」、豪華版、Tarascon Publishing、カリフォルニア州Loma Linda（2000年）、を参照のこと。

【0140】

このような抗癌または抗感染薬は同様に、本発明の少なくとも1つの抗体と含合、結合、同時処方または同時投与される毒素分子をも内含することができる。毒素は場合により、選択的に病的細胞または組織を殺すように作用することができる。病的細胞は癌またはその他の細胞であり得る。かかる毒素は、例えばリシン、ジフテリア毒素、毒液毒素または細菌毒素のうちの少なくとも1つから選択された毒素の少なくとも1つの機能的細胞毒性ドメインを含んでなる精製済みまたは組換え型毒素または毒素フラグメントであり得るが、これらに限定されるわけではない。毒素という用語は同様に、結果として死をもたらす可能性のある毒素ショックを含め、ヒトおよびその他の哺乳動物の体内で任意の病的状態をひき起こし得る任意の天然発生型、突然変異型または組換え型細菌またはウイルスにより産生される内毒素および外毒素の両方を内含する。かかる毒素は、腸管毒素産生大腸菌易熱性腸管毒素（LT）、耐熱性腸管毒素（ST）、赤痢菌細胞毒素、アエロモナス腸管毒素、毒素性ショック症候群毒素-1（TSST-1）、ブドウ球菌腸管毒素A（SE

10

20

30

40

50

A)、B (S E B) または C (S E C)、連鎖球菌腸管毒素などを内含し得るが、これらに限定されるわけではない。かかる細菌には腸管毒素産生大腸菌 (E T E C)、腸管出血性大腸菌 (例えば、0 1 5 7 : H 7 血清型菌株)、ブドウ球菌種 (例えば、黄色ブドウ球菌、化膿性ブドウ球菌)、赤痢菌種 (例えば、志賀赤痢菌、箕田赤痢菌、C 群赤痢菌および D 群赤痢菌)、サルモネラ菌種 (例えば、サルモネラ・チフィ (チフス菌)、サルモネラ・コレラシス、サルモネラ・エンテリティディス (腸炎菌))、クロストリジウム種 (例えば、クロストリジウム・パーフリンジエンス、クロストリジウム・ディフィシル、クロストリジウム・ボツリナム (ボツリヌス菌))、カンフロバクター種 (例えば、カンフロバクター・ジェジュニ、カンフロバクター・フェタス)、ヘリコバクター種、(例えば、ヘリコバクターピロリ)、アエロモナス種 (例えば、アエロモナス・ソブリア、アエロモナス・ヒドロフィラ、アエロモナス・カビエ)、プレシオモナス・シゲロイデス、エルシニア・エンテロコリチカ、ビブリオ種 (例えば、ビブリオ・コレレ、ビブリオ・パラヘモリティカス (腸炎ビブリオ))、クレブシエラ種、シュードモナス・アエルギノサ (緑膿菌) および連鎖球菌、といった種の菌株が含まれるが、これらに限定されるわけではない。例えば、その内容全体が本明細書に参照により援用されている例えば、スタイン (Stein) 編、「INTERNAL MEDICINE」、第3版、1 ~ 13 頁、Little, Brown and Co., ボストン、(1990年); エヴァンズ (Evans) ら編、「Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control」、第2版、239 ~ 254 頁、Plenum Medical Book Co., ニューヨーク (1991年); マンデル (Mandell) ら、「Principles and Practice of Infectious Diseases」、第3版、Churchill Livingstone、ニューヨーク (1990年); ベルコフ (Berkow) ら編、「The Merck Manual」、第16版、Merck and Co., ニュージャージー州 Rahway、1992年; ウッド (Wood) ら、FEMS Microbiology Immunology、第76巻: 121 ~ 134 頁 (1991年); マラック (Marrack) ら、Science、第248巻: 705 ~ 711 頁 (1990年) を参照のこと。

【0141】

本発明の抗 MCP - 1 抗体化合物、組成物または組合せはさらに、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝液、塩、親油性溶媒、防腐剤、アジュバントなどといった (ただしこれらに限定されるわけではない) 任意の適切な補助作用物質のうちの少なくとも1つを含んでなり得る。製薬学的に受容可能な助剤が好ましい。かかる無菌溶液の制限的意味のない例およびその調製方法は、ジェンナラ (Gennaro) 編、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第18版、Mack Publishing Co. (ペンシルベニア州 Easton) 1990年といったように (ただしこれらに限定されるわけではない)、当該技術分野において周知である。当該技術分野において周知の通りまたは本明細書に記載されている通りの抗 - MCP - 1 抗体、フラグメントまたは変異体組成物の投与様式、溶解度および / または安定性に適した製薬学的に受容可能な担体を、日常的に選択することができる。

【0142】

当該組成物において有用な製薬学的賦形剤および添加剤には、単独でまたは組合せた形で1 ~ 99.99 重量%または体積%を構成する、単独でまたは組合せた形で存在し得るタンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物 (例えば、単糖類、2 糖類、3 糖類、4 糖類およびオリゴ糖; 導体化された糖、例えばアルジトール、アルドン酸、エステル化糖など; および多糖類または糖重合体を含む糖) が含まれるが、これらに限定されるわけではない。タンパク質賦形剤の例としては、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン (HSA)、組換え型ヒトアルブミン (rHA)、ゼラチン、カゼインなどが含まれる。緩衝能力においても機能しうる代表的なアミノ酸 / 抗体構成要素としては、アラニン、グリシン、アルギニン、ペタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、シス

ティン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルタームなどが含まれている。1つの好ましいアミノ酸はグリシンである。

【0143】

本発明において使用するのに適した炭水化物賦形剤としては、例えば単糖類例えばフルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなど；2糖類、例えばラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど；多糖類、例えばラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、でんぷんなど；およびアルジトール、例えばマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルピトール（グルシトール）、ミオイノシトールなどが含まれる。本発明において使用するための好ましい炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロースおよびラフィノースである。

10

【0144】

抗MCP-1抗体組成物は同様に、緩衝液またはpH調整剤を内含し得る。標準的には、緩衝液は有機酸または塩基から調製された塩である。代表的緩衝液には有機酸塩例えばクエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸またはフタル酸の塩；トリス、塩酸トロメタミンまたはリン酸緩衝液が含まれる。当該組成物中で使用するための好ましい緩衝液は、クエン酸といったような有機酸塩である。

【0145】

付加的には、本発明の抗MCP-1抗体組成物は、ポリビニルピロリドン、フィコール（重合体糖）、デキストラート（例えば、シクロデキストリン、例えば2-ヒドロキシプロピル-___-シクロデキストリン）、ポリエチレングリコール、着香剤、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、静電防止剤、界面活性剤（例えば、ポリソルバート、例えば「トウイーン20」および「トウイーン80」）、脂質（例えば、リン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、およびキレート剤（例えば、EDTA）といったような重合体賦形剤/添加剤を内含することができる。

20

【0146】

本発明に従った抗MCP-1抗体、部分または変異体組成物の中で使用するために適したこれらのおよび付加的な既知の製薬学的賦形剤および/または添加剤は、例えばその開示全体が本明細書に参照により援用されている「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」、第19版、William 30
s & Williams、(1995年)、および「Physician's Desk Reference」、第52版、Medical Economics、ニュージャージー州Montvale(1998年)に列挙されている通り、当該技術分野において既知のものである。好ましい担体または賦形剤材料は、炭水化物（例えば糖類およびアルジトール）および緩衝液（例えばクエン酸塩）または重合体剤である。

30

【0147】

9. 処方物

上述の通り、本発明は、製薬学的に受容可能な処方物中に少なくとも1つの抗-MCP-1抗体を含む、薬学または獣医学での使用に適した安定した処方物を提供する。

【0148】

40

上述の通り、本発明は、包装材料および場合により水性希釈剤中の規定の緩衝液および/または防腐剤を伴う少なくとも1つの抗-MCP-1抗体の溶液を含んでなる少なくとも1つのバイアルを含んでなる製造品において、前記包装材料が、かかる溶液を1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72時間以上の期間にわたり保持できることを記したラベルを含んでなる、製造品を提供している。本発明はさらに、包装材料、凍結乾燥された少なくとも1つの抗MCP-1抗体を含んでなる第1のバイアルおよび規定の緩衝液または防腐剤の水性希釈剤を含んでなる第2のバイアル含んでなる製造品において、前記包装材料が、患者に対し水性希釈剤中で少なくとも1つの抗MCP-1抗体を復元して24時間以上の期間にわたり保持され得る溶液を形成するように指示するラベルを含んでなる、製造品を含んでなる。

50

【 0 1 4 9 】

本発明の製品中の少なくとも1つの抗MCP-1抗体の範囲には、湿潤/乾燥系内にある場合、復元した時点で約1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約1000 mg/ml の濃度を生み出す量が含まれているが、さらに低いおよび高い濃度も操作可能であり、これは意図された送達ビヒクルによって左右され、例えば溶液処方物は経皮パッチ、肺、経粘膜または浸透圧またはマイクロポンプ方法とは異なることになる。

【 0 1 5 0 】

水性希釈剤は場合により、さらに、製薬学的に受容可能な防腐剤を含んでなる。好ましい防腐剤には、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ジヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、またはそれらの混合物から成る群から選択されるものが含まれる。処方中で使用される防腐剤の濃度は、抗菌効果を生み出すのに十分な濃度である。かかる濃度は選択された防腐剤により左右され、当業者により容易に決定される。

【 0 1 5 1 】

その他の賦形剤例えば等張性剤、緩衝剤、酸化防止剤、防腐剤エンハンサを場合によりそして好ましくは希釈剤に添加することができる。グリセリンといったような等張性剤が、既知の濃度で一般に使用される。改善されたpH制御を提供するべく、好ましくは生理的に寛容された緩衝液が添加される。処方物は、約pH4 ~ 約pH10といった広範囲のpHそして好ましくは約pH5 ~ 約pH9の範囲、最も好ましくは約6.0 ~ 約8.0の範囲を網羅し得る。好ましくは、本発明の処方物は約6.8 ~ 約7.8の間のpHを有する。好ましい緩衝液には、リン酸緩衝液、最も好ましくはリン酸ナトリウム、特にリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。

【 0 1 5 2 】

場合により、凝集を削減するべく処方物または組成物に対して他の添加剤、例えば以下のような製薬学的に受容可能な溶解剤、トウイーン20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）、トウイーン40（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミタート）、トウイーン80（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレアート）、プルロニックF68（ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロック共重合体）およびPEG（ポリエチレングリコール）または非イオン性界面活性剤、例えばポリソルバート20または80またはポロキサマー184または188、プルロニック（登録商標）ポリル、その他のブロック共重合体およびキレート化剤、例えばEDTAおよびEGTAを添加することができる。これらの添加物は、処方物を投与するためにポンプまたはプラスチック容器が使用される場合に特に有用である。製薬学的に受容可能な界面活性剤の存在は、タンパク質が凝集する性向を軽減させる。

【 0 1 5 3 】

本発明の処方物は、所望の濃度でタンパク質を提供するのに十分な量で少なくとも1つの抗MCP-1抗体および緩衝溶液を混合する工程を含んでなるプロセスによって調製され得る。当業者であれば、このプロセスの変形形態を認識するものと思われる。例えば、構成要素の添加順序、付加的な添加剤が使用されるか否か、処方物が調製される濃度およびpHは、全て、使用される投与手段および濃度について最適化され得る因子である。

【 0 1 5 4 】

請求対象の処方物は、患者に対して溶液としてかまたは、水性希釈剤中の選択された塩および水、防腐剤および/または賦形剤、好ましくは、リン酸緩衝液および/または生理食塩水の入った第2のバイアルを用いて復元される凍結乾燥された少なくとも1つの抗MCP-1抗体のバイアルを含んでなるデュアルバイアルとして提供され得る。シングル溶液バイアルまたは復元を必要とするデュアルバイアルのいずれも、何回でも再利用可能であり、単一回または多数回の患者治療サイクルに充分であり得、かくして現在利用可能なものにさらに便利な治療処方計画を提供することができる。

【 0 1 5 5 】

ここで請求されている製造品は、即刻乃至は24時間以上の期間にわたる投与にとって有用である。従って、ここで請求されている製造品は患者に対し多大な利点を提供する。本発明の処方物は、場合により、約2～約40の温度で安全に貯蔵され得、長時間にわたりタンパク質の生物活性を保持し、かくして、該溶液が6、12、18、24、36、48、72または96時間以上の期間にわたり保持されかつ/または使用され得ることを示す包装ラベルの貼付を可能にする。保存希釈剤が使用される場合には、かかるラベルに最高1～12ヵ月、半年、1.5年および/または2年までの使用を内含することができる。

【0156】

請求対象の製品は、水性希釈剤の入った第2のバイアルを用いて戻される凍結乾燥した少なくとも1つの抗MCP-1抗体のバイアルを含む2重バイアルまたは透明溶液を薬局、診療所またはその他のかかる機関および施設に提供することによって、患者に対し間接的に提供され得る。この場合、透明溶液は最高1リットルまたはさらにはそれ以上のサイズを有し、大きなタンクが提供され、そこから薬局または診療所が、少なくとも1つの抗体溶液のより小さい部分を1回または多数回取出してより小さなバイアルに移し、顧客および/または患者に提供する。

【0157】

これらのシングルバイアルシステムを含んでなる認定されたデバイスとしては、例えばベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson(ニュージャージー州Franklin Lakes、www.bectondickenson.com)、ディセトロニック(Disetronic)(スイスBurgdorf、www.disetronic.com; バイオジェクト(Bioject)、オレゴン州Portland、(www.bioject.com); ナショナル・メディカルプロダクツ(National Medical Products)、ウェストン・メディカル(Weston Medical)(英国Peterborough、www.weston-medical.com)、メディジェット・コープ(Medi-Ject Corp)(ミネソタ州Minneapolis、www.mediject.com)が製造または開発したBD Pens、BD Autojector(登録商標)、Humaject(登録商標)、NovoPen(登録商標)、B-D(登録商標)Pen、AutoPen(登録商標)、および OptiPen(登録商標)、Genotropin Pen(登録商標)、Genotronorm Pen(登録商標)、Humatro Pen(登録商標)、Reco-Pen(登録商標)、Roferon Pen(登録商標)、Biojector(登録商標)、Iject(登録商標)、J-tip Needle-Free Injector(登録商標)、Intraject(登録商標)、Medi-Ject(登録商標)といったような溶液の送達用ペンインジェクタデバイスがある。2重バイアルシステムを含んでなる認定されたデバイスとしては、Humatro Pen(登録商標)といったような復元された溶液の送達用のカートリッジの中で凍結乾燥された薬物を復元するためのペン-インジェクタシステムがある。

【0158】

ここで請求されている製品には、包装材料が含まれる。包装材料は、規制機関により必要とされる情報に加えて、製品を使用できる条件を提供している。本発明の包装材料は、水性希釈剤中で少なくとも1つの抗MCP-1抗体を復元して溶液を形成し、2バイアル湿潤/乾燥製品については2～24時間以上の期間に該溶液を使用する指示を、患者に対して提供している。シングルバイアル溶液製品については、該ラベルは、2～24時間以上の期間にわたりかかる溶液を使用できるということを指示している。ここで請求されている製品はヒト用薬学製品用途に有用である。

【0159】

抗MCP-1抗体を安定化するその他の処方物または方法は結果として、前記抗体を含む凍結乾燥粉末の透明な溶液以外のものをもたらし得る。非透明溶液としては、微粒子懸濁液を含んでなる処方物があり、かかる微粒子は、ミクロスフェア、微小粒子、ナノ粒子

10

20

30

40

50

、ナノスフェアまたはリポソームとしてさまざまな形で知られる、可変的寸法の構造内に抗MCR-1抗体を含有する組成物である。活性薬剤を含有するこのような比較的均質で基本的に球形の微粒子処方物は、米国特許第4,589,330号明細書中で教示されている活性薬剤および重合体を含有する水相と非水相を接触させその後非水相を蒸発させて水相からの粒子の合体をひき起こすことによって形成可能である。連続溶媒中に分散した重合体および活性薬剤を含有する第1の相を用い、米国特許第4,818,542号明細書中に教示されているような凍結乾燥または希釈-抽出-沈殿により懸濁液から前記溶媒を除去することで多孔質微小粒子を調製することができる。このような調製物のための好ましい重合体は、ゼラチン、寒天、でんぷん、アラビノガラクトン、アルブミン、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(-カプロラクトン、ポリ(-カプロラクトン-CO-乳酸)、ポリ(-カプロラクトン-CO-グリコール酸)、ポリ(-ヒドロキシ酪酸)、酸化ポリエチレン、ポリエチレン、ポリ(アルキル-2-シアノアクリレート)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリアミド、ポリ(アミノ酸)、ポリ(2-ヒドロキシエチルDL-アスパルトアミド)、ポリ(エステル尿素)、ポリ(L-フェニルアラニン/エチレングリコール/1,6-ジイソシアナートヘキサン)およびポリ(メチルメタクリレート)から成る群から選択された天然または合成の共重合体または重合体である。特に好ましい重合体は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(-カプロラクトン、ポリ(-カプロラクトン-CO-乳酸)、およびポリ(-カプロラクトン-CO-グリコール酸)といったポリエステルである。重合体および/または活性薬剤を溶解させるのに有用な溶媒としては水、ヘキサフルオロイソプロパノール、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、ヘキサン、ベンゼンまたはヘキサフルオロアセトンセスキ水和物がある。第2の相で活性薬剤含有相を分散させるプロセスには、ノズル内のオリフィスに前記第1相を圧力で強制的に通過させて液滴形成に作用する工程が含まれていてよい。

【0160】

乾燥粉末処方物は、例えば水性または非水性溶媒を除去するための1個もしくはそれ以上の工程が後続する結晶質組成物の沈殿または蒸発による溶媒抽出または噴霧乾燥といったような凍結乾燥以外のプロセスの結果として得ることもできる。噴霧乾燥された抗体調製物の調製は、米国特許第6,019,968号明細書中で教示されている。抗体ベースの乾燥粉末組成物は、抗体の溶液またはスラリーそして場合により賦形剤を呼吸用乾燥粉末を提供するための条件下で溶媒中で噴霧乾燥させることによって生産可能である。溶媒には、容易に乾燥可能な水およびエタノールといったような極性化合物が含まれていてよい。抗体安定性は、乾燥用気体として窒素を使用することによってかまたは窒素ブランケット下といったような酸素不在下での噴霧乾燥手順を実施することによって増強させることができる。もう1つの比較的乾燥した処方物は、国際公開第9916419号パンフレット中で教示されているようなヒドロフルオロアルカン高圧ガスを標準的に含んでなる懸濁培地中に分散させられた複数の有孔微細構造の分散である。安定化された分散は、計量式吸入器を用いて患者の肺に投与され得る。噴霧乾燥された薬剤の商業的製造において有用な機器は、ブッチ株式会社(Buchi Ltd.)またはニロ株式会社(Niro Corp)により製造されている。

【0161】

本明細書に記載されている安定または保存処方物または溶液のいずれかの中の少なくとも1つの抗MCP-1抗体は、本発明に従って、SCまたはIM注入;経皮、肺内、経粘膜、インプラント、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプまたは当該技術分野において周知の通りの当業者により評価されているその他の手段を含めたさまざまな送達方法を介して、患者に投与され得る。

【0162】

10. 治療的応用

本発明は同様に、本発明の少なくとも1つのMCP-1抗体を用いて、本明細書に記載されているようにまたは当該技術分野において既知の通り、細胞、組織、器官、動物また

10

20

30

40

50

は患者の体内の少なくとも1つのMCP-1関連疾患を変調させるかまたは治療するための方法をも提供している。本発明は同様に、悪性疾患、代謝性疾患、免疫または炎症性関連疾患、心臓血管疾患、感染性疾患または神経系疾患のうちの少なくとも1つを含めた（ただしこれらに限定されるわけではない）、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つのMCP-1関連疾患を変調させるかまたは治療するための方法をも提供している。

【0163】

かかる身体条件は、細胞粘着および/または血管形成により媒介される疾病または身体条件から選択されるが、これらに限定されるわけではない。かかる疾病または身体条件には、免疫障害または疾患、心臓血管障害または疾患、感染性、悪性および/または神経系障害または疾患またはその他の既知のまたは特定されたMCP-1関連身体条件が含まれる。特に、抗体は、血管形成が関与する疾病例えば眼疾患および腫瘍性疾患、再狭窄といった組織再形成およびある種の細胞型の増殖特に上皮および扁平上皮細胞癌の治療にとって有用である。特別な適応症としては、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、癌転位、関節リウマチ、糖尿病性網膜症および黄斑変性症の治療における使用が含まれる。本発明の中和抗体は同様に、例えば骨粗しょう症において見られる、または一部の腫瘍によるPTHrP過剰発現の結果もたらされる、望ましくない骨吸収または骨分解を防止または治療するためにも有用である。抗体は同様に、特発性肺線維症、糖尿病性腎症、肝炎および肝硬変といったようなさまざまな線維症の治療においても有用であり得る。

【0164】

かくして、本発明は、本発明の少なくとも1つのMCP-1抗体を用いて、当該技術分野において既知のまたは本明細書に記載されている通りに、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つのMCP-1関連疾患を変調または治療するための方法を提供している。特別な指摘については以下に論述する。

【0165】

肺疾患

本発明は同様に、肺炎；肺膿瘍；粉塵、ガスまたは飛沫の形をした作用物質を原因とする職業性肺疾患；喘息、閉塞性繊維性細気管支炎、呼吸不全、過敏性肺炎（外因性アレルギー性肺炎）、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症および薬物反応を含む肺の過敏性疾患；成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、グッドパスチャー症候群、慢性閉塞性気道疾患（COPD）、特発性間質性肺疾患、例えば特発性肺線維症およびサルコイドーシス、剥離性間質性肺炎、急性間質性肺炎、呼吸細気管支炎関連間質性肺疾患、気質性肺炎を伴う特発性閉塞性細気管支炎、リンパ球性間質性肺炎、ランゲルハンス細胞肉芽腫症、特発性肺ヘモジデリン沈着症；急性気管支炎、肺胞タンパク症、気管支拡張症、胸膜疾患、無気肺、嚢胞性線維症および肺腫瘍、および肺栓塞症のうちの少なくとも1つを含む（ただしこれらに限定されるわけではない）、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの悪性疾患を変調または治療するための方法をも提供している。

【0166】

悪性疾患

本発明は同様に、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、B-細胞、T-細胞またはFAB ALL、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、有毛細胞白血病、骨髄異形成症候群（MDS）、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カポジ肉腫、直腸結腸癌腫、膵臓癌腫、腎臓細胞癌腫、乳癌、鼻咽頭癌腫、悪性組織球増殖症、腫瘍随伴症候群/悪性高カルシウム血症、充実性腫瘍、腺癌腫、扁平上皮細胞癌腫、肉腫、悪性黒色腫、特に転移性の黒色腫、血管腫、転移性疾患、癌関連骨吸収、癌関連骨痛などのうちの少なくとも1つを含む（ただしこれらに限定されるわけではない）、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの悪性疾患を変調または治療するための方法をも提供している。

【0167】

免疫関連疾患

本発明は同様に関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身発症性若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、胃潰瘍、血清反応陰性関節症、骨関節炎、炎症性大腸疾患、潰瘍性大腸炎、全身性紅斑性狼瘡、抗リン脂質症候群、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、特発性肺線維症、全身性血管炎／ヴェーゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、精巣炎／精管切除後再疎通術、アレルギー性／アトピー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、湿疹、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎、移植、臓器移植拒絶反応、移植片対宿主病、全身性炎症反応症候群、敗血症候群、グラム陽性菌敗血症、グラム陰性菌敗血症、培養陰性敗血症、真菌性敗血症、好中球減少性発熱、尿路性敗血症、髄膜炎菌血症、外傷／出血、火傷、電離放射線曝露、急性膀胱炎、成人呼吸窮迫症候群、関節リウマチ、アルコール性肝炎、慢性炎症性病理、サルコイドーシス、クローン病病理、鎌状赤血球貧血、糖尿病、ネフローゼ、アトピー性疾患、過敏反応、アレルギー性鼻炎、花粉症、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、喘息、蕁麻疹、全身性アナフィラキシー、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小板減少症、任意の臓器または組織の移植片拒絶反応、腎臓移植拒絶反応、心臓移植拒絶反応、肝臓移植拒絶反応、膵臓移植拒絶反応、肺移植拒絶反応、骨髄移植片（BMT）拒絶反応、皮膚同種移植片拒絶反応、軟骨移植片拒絶反応、骨移植片拒絶反応、小大腸移植片拒絶反応、胎児胸腺移植片拒絶反応、副甲状腺移植片拒絶反応、任意の臓器または組織の異種移植片拒絶反応、同種移植片拒絶反応、抗－レセプター過敏性反応、グレーブス（バゼドウ）病、レーノー病、B型インスリン抵抗性糖尿病、喘息、重症筋無力症、抗体媒介性細胞毒性、III型過敏反応、全身性紅斑性狼瘡、P
OEMS症候群（多発性ニューロパシー、臓器巨大症、内分泌障害、モノクローナル高ガンマグロブリン血症および皮膚変化症候群）、多発性ニューロパシー、臓器巨大症、内分泌傷害、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、皮膚変化症候群、抗リン脂質症候群、天疱瘡、強皮症、混合結合組織病、特発性アディソン病、真性糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、血管炎、MI後心臓切開症候群（post-MI cardiomy syndrome）、IV型過敏性、接触皮膚炎、過敏性肺炎、同種移植片拒絶反応、細胞内生物に起因する肉芽腫、薬物感受性、代謝性／特発性、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、-1-アンチトリプシン欠損症、糖尿病性網膜症、橋本甲状腺炎、骨粗鬆症、視床下部-下垂体-副腎軸評価、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、家族性血球貪食性リンパ組織球増殖症、皮膚病状態、乾癬、脱毛症、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎臓不全、血液透析、尿毒症、毒性、子癇前症、OKT3療法、抗CD3療法、サイトカイン療法、化学療法、放射線療法（例えば、無力症、貧血、悪液質など、ただしこれらに限定されるわけではない）、慢性サリチル酸中毒などのうちの少なくとも1つを含む（ただしこれらに限定されるわけではない）、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの免疫関連疾患を変調または治療するための方法をも提供している。例えば、各々その全体が参照により援用されているメルクマニユアル、第12～17版、Merck & Company、ニュージャージー州Rahway（1972年、1977年、1982年、1987年、1992年、1999年）、薬物療法便覧、ウェルズら編、第2版、Appleton and Lange、コネチカット州Stamford（1998年、2000年）を参照のこと。

【0168】

心臓血管疾患

本発明は同様に、心筋気絶症候群、心筋梗塞、うっ血性心不全、脳卒中、虚血性脳卒中、出血、動脈硬化症、アテローム硬化症、再狭窄、糖尿病性アテローム硬化疾患、高血圧、動脈性高血圧、腎血管性高血圧、失神、ショック、心臓血管系の梅毒、心不全、肺性心、原発性肺高血圧、心臓不整脈、心房異所性拍動、心房粗動、心房細動（持続性または発作性）、灌流後症候群、心肺バイパス炎症性応答、無秩序または多病巣性の心房性頻脈、規則的狭QRS頻脈、特異的不整脈、心室細動、ヒス束不整脈、房室ブロック、脚ブロック、心筋虚血性疾患、冠動脈疾患、狭心症、心筋梗塞、心筋症、拡張型うっ血性心筋症、

拘束型心筋症、心臓弁膜症、心内膜炎、心膜疾患、心臓腫瘍、大動脈および末梢大動脈瘤、大動脈解離、大動脈の炎症、腹大動脈およびその分岐部の閉塞、末梢血管障害、閉塞性動脈障害、末梢アテローム硬化疾患、閉塞性血栓血管炎、末梢動脈機能障害、レーノー現象および疾患、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈疾患、静脈血栓症、静脈瘤、動静脈瘻、リンパ水腫、脂肪性浮腫、不安定狭心症、再灌流傷害、ポストポンプ症候群 (post pump syndrome)、虚血性再灌流傷害などのうちの少なくとも1つを含む (ただしこれらに限定されるわけではない)、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの心臓血管疾患を変調または治療するための方法をも提供している。かかる方法は、場合により、少なくとも1つの抗MCP-1抗体を含んでなる有効量の組成物または薬学組成物を、かかる変調、治療または療法を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に対し投与する工程を含んでなる。

10

【0169】

神経系疾患

本発明は同様に、神経変性疾患、多発性硬化症、片頭痛、エイズによる認知症、脱髄疾患、例えば多発性硬化症および急性横断性脊髄炎；錐体外路および小脳疾患、例えば皮質脊髄系の病変；基底核の疾患または小脳疾患；多動性障害、例えばハンチントン舞踏病および老年舞踏病；薬物誘発型運動障害、例えばCNSドーパミンレセプターをブロックする薬剤によって誘発されるもの；運動減退障害、例えばパーキンソン病；進行性核上性麻痺；小脳の構造的病変；脊柱小脳変性、例えば脊髄性運動失調症、フリードライヒ失調症、小脳皮質変性、多系統変性症 (メンセル、デジェリン・トーマス、シャイ・ドレガーおよびマチャド・ジョセフ)；全身性疾患 (レフサム病、無リポタンパク血症、運動失調、毛細血管拡張症およびミトコンドリア多系統疾患)；脱髄性コア障害 (demyelinating core disorders)、例えば多発性硬化症、急性横断性脊髄炎；および運動単位、例えば脊髄性筋萎縮症 (前角細胞変性、例えば萎縮性側索硬化症、乳児脊髄性筋萎縮症および若年性脊髄性筋萎縮症)；アルツハイマー病；中年期ダウン症候群；びまん性レビー小体病；レビー小体型の老年性認知症；ウエルニッケ・コルサコフ症候群；慢性アルコール中毒；クロイツフェルト・ヤコブ病；亜急性硬化性全脳炎、ハレルフォルデン・スパッツ病；およびボクサー認知症などのうちの少なくとも1つを含む (ただしこれらに限定されるわけではない)、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの神経系疾患を変調または治療するための方法をも提供している。かかる方法は、場合により、少なくとも1つのTNF抗体または特定された部分または変異体を含んでなる有効量の組成物または薬学組成物を、かかる変調、治療または療法を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に対し投与する工程を含んで成ることができる。例えば、メルクマニユアル、第16版、Merck & Company、ニュージャージー州Rahway (1992年)を参照のこと。

20

30

【0170】

線維性身体条件

上述の身体条件および疾病に加えて、本発明は同様に肝臓線維症 (アルコール性肝硬変、ウイルス性肝硬変、自己免疫性肝炎を含むがこれらに限定されるわけではない)；肺線維症 (強皮症、特発性肺線維症を含むがこれらに限定されるわけではない)；腎臓線維症 (強皮症、糖尿病性腎炎、糸球体腎炎、ループス腎炎を含むがこれらに限定されるわけではない)；皮膚線維症 (強皮症、肥厚性およびケロイド瘢痕、火傷を含むがこれらに限定されるわけではない)；骨髄線維症；神経線維腫症；線維腫；腸線維症；および外科手術の結果としての線維化付着といったようなさまざまな病因の線維性身体条件を変調または治療するための方法をも提供している。

40

【0171】

本発明は同様に、胸部、腹部、頭蓋または口腔外科手術を含めた外科手術に付随する肉体的損傷または外傷のうちの少なくとも1つを含む (ただしこれらに限定されるわけではない)、または創傷が非感染創、挫傷、切創、裂創、非穿通創、開放創、穿通創、穿孔創、穿刺創、感染創、栓塞および皮下創からなる群から選択されている、または創傷が虚血

50

性潰瘍、褥瘡、瘻孔、重度の咬傷、熱傷および採取部位創からなる群から選択されている、または創傷がアフタ創、外傷またはヘルペス関連創である、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの創傷、外傷または組織傷害またはそれらから生じるか、もしくはそれらに関連する慢性身体条件を変調または治療するための方法をも提供している。ドナー部位創傷は、例えば移植に関連して、体の一部分から体のもう1つの部分への硬組織の除去に関連して発生する創傷である。このような手術の結果としての創傷はきわめて苦痛が激しく、従って治癒の改善は非常に価値のあることである。創傷線維症も同様に、創傷領域に最初に侵入する細胞が好中球とそれに続くマクロファージにより活性化された単球であることから、抗MCP-1抗体療法に適している。マクロファージは、それらも病原体の食作用お

10

よび組織残屑の片付けを担当することから、効率の良い創傷治癒にとって不可欠であると考えられている。さらにこれらは、後続する治癒プロセスの事象に関与する数多くの因子を放出する。マクロファージは、コラーゲンの産生を開始させる線維芽細胞を誘引する。ほぼ全ての組織修復プロセスが早期結合組織形成を含み、このおおよび後続するプロセスの刺激が組織の治癒を改善させるが、結合組織およびコラーゲンの過剰産生は、非弾性の低酸素組織として特徴づけられる線維性組織を導く可能性がある。本発明の抗MCP-1抗体は、創傷治癒のかかる続発症を変調、治療または予防するための方法において使用可能である。

【0172】

本発明の当該抗体は、心臓移植片といったような移植された器官、組織または細胞の慢性的拒絶の少なくとも1つの症候を変調または治療するための方法において使用することもできる。

20

【0173】

抗MCP-1抗体のその他の治療的使用

本発明は同様に、細菌性、ウイルス性および真菌性感染、HIV感染/HIVニューロパシー、髄膜炎、肝炎(A、BまたはC型など)、敗血症性関節炎、腹膜炎、肺炎、咽頭蓋炎、大腸菌0157:h7、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解性血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア症、ハンセン病、毒素性ショック症候群、連鎖球菌筋炎、ガス壊疽、ヒト型結核、細胞内トリ型結核菌、ニューモシスティスカリニ肺炎、骨盤炎症性疾患、精巣炎/副睾丸炎、レジオネラ、ライム病、インフルエンザa、エプス

30

【0174】

本発明のあらゆる方法が、かかる変調、治療または療法を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に対して、少なくとも1つの抗MCP-1抗体を含んでなる有効量の組成物または薬学組成物を投与する工程を含んでなることができる。かかる方法は場合によりさらに、少なくとも1つのTNFアンタゴニスト(例えばTNF抗体またはフラグメント、可溶性TNFレセプターまたはフラグメント、その融合タンパク質または小分子TNFアンタゴニスト、ただしこれらに限定されるわけではない)、抗リウマチ剤(例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、オーロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン)、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、鎮痛薬、睡眠薬、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋遮断薬、抗菌薬(例えば、アミノグリコシド、抗真菌薬、駆虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、その他の抗菌薬)、乾癬治療薬、コルチコステロイド(デキサメタゾン)、アナボリックステロイド(テストステロン)、糖尿病関連作用剤、ミオネラル、栄養薬、甲状腺作用薬、ビタミン、カルシ

40

50

ウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳薬、制吐薬、抗潰瘍薬、便秘薬、抗凝血剤、エリスロポイエチン（例えば、エポエチンアルファ）、フィルグラスチム（例えば、G-CSF、ニューボゲン）、サルグラモスチム（GM-CSF、ロイキン）、予防接種、免疫グロブリン（リツキシマブ）、免疫抑制薬（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、生殖ホルモンアンタゴニスト（フルタミド、ニルタミド）、ホルモン放出調節因子（ロイプロリド、ゴセレリン）、ホルモン補充薬、エストロゲンレセプター調節物質（タモキシフェン）、レチノイド（トレチノイン）、トポイソメラーゼ阻害剤（エトポシド、イリノテカン）、細胞毒（ドキソルビシン）、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤（カルボプラチン）、ナイトロジェンマスタード（メルファレン、クロラブシル）、ニトロソウレア（カルムスチン、エストラムスチン）、代謝拮抗物質（メトトレキサート、シタラビン、フルオロウラシル）、分裂抑制剤（ビンクリスチン、タキソール）、放射性医薬品（イオジン131-トシツモマブ）、放射性増感剤（ミソニダゾール、チラパザミン）、抗うつ薬、抗躁薬、精神病治療薬、抗不安薬、催眠薬、交換神経様作用薬、興奮剤、ドネベジル、タクリン、喘息治療薬、ベータアゴニスト、吸引ステロイド薬、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは類似体、ドルナーゼアルファ（ブルモジム）、サイトカイン（インターフェロン-2、IL2）またはサイトカインアンタゴニスト（インフリキシマブ）から選択された少なくとも1つをできる。適切な投薬量は当該技術分野において周知である。例えば、各々全体が本明細書に参照により援用されている、ウェルズら編、「Pharmacotherapy Handbook」第2版、Appleton and Lange、コネチカット州Stamford（2000年）；「PDR Pharmacopoeia、Tarascon Pocket Pharmacopoeia、2000」、豪華版、Tarascon Publishing、カリフォルニア州Loma Linda（2000年）、を参照のこと。

【0175】

腫瘍性疾患の治療のための特殊な組合せは、アルキル化剤、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、抗生物質、代謝拮抗物質、ホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、免疫調節剤などといったような抗腫瘍薬を、前後および/または同時に投与することによる同時投与または組合せ療法を含んでなる。転移性悪性黒色腫およびその他の腫瘍性疾患で使用するためには、好ましい組合せは、デカルバジン、インターフェロン、インターロイキン-2、テモゾロミド、シスプラチン、ビンブラスチン、メシル酸イマチニブ、カルムスチン、パクリタキセルなどと共に抗体を同時投与することにある。転移性黒色腫のためには、デカルバジンが好ましい。

【0176】

11. 投薬量と投与方法

本発明の方法は、かかる変調、治療または療法を必要とする細胞、組織、器官、動物または患者に対して少なくとも1つの抗MCP-1抗体を含んでなる有効量の組成物または薬学組成物を投与する工程を含んでなる、MCP-1媒介型障害を治療するための方法を含んでなり得る。かかる方法は、かかる疾病または障害を治療するための同時投与または組合せ療法を場合によりさらに含んでなり、ここで前記少なくとも1つの抗MCP-1抗体、その特定された部分または変異体の投与工程はさらに、前後および/または同時に、腎臓作用薬、皮膚病薬、抗血管形成薬、抗感染症薬、心臓血管（CV）系作用薬、中枢神経系（CNS）薬、自律神経系（ANS）薬、呼吸管薬、消化（GI）管作用薬、ホルモン薬、体液または電解質平衡のための作用薬、血液製剤、抗新生物薬、免疫調節薬、眼科耳鼻科薬、局所作用薬、栄養薬など、少なくとも1つのTNFアンタゴニスト（例えば、TNF抗体またはフラグメント、可溶性TNFレセプターまたはフラグメント、その融合タンパク質、または小分子TNFアンタゴニスト、ただしこれらに制限されない）、抗リウマチ剤（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、オーロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン）、筋肉弛緩剤、睡眠薬、非ステロイド系抗炎症薬（NS

A I D)、鎮痛薬、麻酔剤、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋遮断薬、抗菌薬（例えば、アミノグリコシド、抗真菌薬、駆虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、その他の抗菌薬）、乾癬治療薬、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連作用剤、ミネラル、栄養薬、甲状腺作用薬、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳薬、制吐薬、抗潰瘍薬、便秘薬、抗凝血剤、エリスロポイエチン（例えば、エポエチンアルファ）、フィルグラスチム（例えば、G - C S F、ニューボゲン）、サルグラモスチム（G M - C S F、ロイキン）、予防接種、免疫グロブリン、免疫抑制薬（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン補充作用薬、エストロゲンレセプター調節物質、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、代謝拮抗物質、分裂抑制剤、放射性医薬品、抗うつ薬、抗躁薬、精神病治療薬、抗不安薬、催眠薬、交換神経様作用薬、興奮剤、ドネペジル、タクリン、喘息治療薬、ベータアゴニスト、吸引ステロイド薬、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは類似体、ドルナーゼアルファ（プルモジム）、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択された少なくとも1つのものを投与することを含んでなる。かかる薬物は、本明細書に提示されている各々についての処方、適応症、用量決定および投与を含めて、当該技術分野において周知である（例えば各々その全体が本明細書に参照により援用されている「Nursing 2001 Handbook of Drugs」、第21版、Springhouse Corp.、ペンシルバニア州Springhouse、2001年；「Health Professional's Drug Guide 2001」、シャノン、ウィルソン、スタン編、Prentice - Hall、Inc、ニュージャージー州Upper Saddle River；「Pharmacotherapy Handbook」、ウェルズら編、Appleton & Lange、コネチカット州Stamford、を参照のこと）。

【0177】

標準的には、病的状態の治療は、組成物の中に含まれているものの比活性に応じて合計で1用量あたり患者の体重1kgあたり平均して少なくとも約0.01~500ミリグラムの少なくとも1つの抗MCP-1抗体の範囲、好ましくは、単回または多数回投与あたり患者の体重1kgにつき平均して少なくとも約0.1~100ミリグラムの抗体の範囲となる有効量または投薬量の少なくとも1つの抗MCP-1抗体組成物を投与することによって行なわれる。代替的には、有効な血清濃度は、単回または多数回投与あたり0.1~5000μg/mlの血清濃度を含むことができる。適切な投薬量は医療従事者にとって既知であり、当然のことながら、特定の疾病状態、投与対象の組成物の比活性および治療対象の特定の患者によって左右されることになる。一部のケースでは、所望の治療量を達成するためには、反復投与すなわち特定の監視されたまたは計量された用量の反復的な個々の投与を提供することが必要であり得、この場合、個々の投与は、所望の日用量または効果が達成されるまで反復される。

【0178】

好ましい用量としては、場合により、投与1回、体重1kgあたり0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99および/または100~500mgまたはその任意の範囲、値または分散(fraction)、または単回または多数回投与あたり0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.

5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500および/または5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ またはその任意の範囲、値または分散の血清濃度を達成するための用量が含まれ得る。

10

【0179】

代替的には、投与された投薬量は、特定の作用物質の薬力学的特性およびその投与様式および投与経路；レシピエントの年齢、健康状態および体重；症候の内容および範囲、同時治療の種類、治療の頻度、および所望の効果といったような既知の因子に応じて変動し得る。通常、活性成分の投薬量は、体重1キログラムあたり約0.1～100ミリグラムであり得る。所望の結果を得るためには、持続放出形態でまたは投与一回あたり1キログラムにつき通常0.1～50、好ましくは0.1～10ミリグラムが有効である。

20

【0180】

制限的な意味のない例としては、ヒトまたは動物の治療は、単回用量、注入量または反復用量を用いて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40日目のうちの少なくとも1つの日に、又、代替的にまたは付加的には1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51または52週目のうちの少なくとも1つの週、又、代替的にまたは付加的には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20年のうちの少なくとも1つの間、またはそのいずれかの組合せで、一日あたり体重1kgにつき0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90または100mgといった0.1～100mg/kgの1回または周期的投薬量の本発明の少なくとも1つの抗体として、提供可能である。

30

【0181】

内部投与に適した剤形（組成物）は一般に、一単位または一容器あたり約0.001～約500ミリグラムの活性成分を含有する。これらの薬学組成物においては、活性成分は通常、組成物の合計重量に基づいて約0.5～99.999重量%の量で存在することになる。

40

【0182】

非経口投与のためには、抗体を、製薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと合わせた状態のまたはそれと別途供給される溶液、懸濁液、エマルジョン、粒子、粉末、または凍結乾燥された粉末として処方され得る。かかるビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および1～10%のヒト血清アルブミンがある。リポソームおよび非水性ビヒクル例えば固定油も同様に使用可能である。ビヒクルまたは凍結乾

50

燥された粉末は、等張性（例えば塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性（例えば緩衝液および防腐剤）を維持する添加剤を含有し得る。処方物は、既知のまたは適切な技術により滅菌される。適切な製薬学的担体は、この分野での標準的参考テキストである「Remington's Pharmaceutical Sciences」、A. オソール編の最新版の中で記載されている。

【0183】

代替的投与

本発明に従った少なくとも1つの抗MCP-1抗体を製薬学的に有効な量だけ投与するために数多くの既知のおよび開発された投与様式を本発明に従って使用することができる。以下の記述では肺投与が用いられているが、本発明に従ってその他の投与様式を使用して、適当な結果を得ることもできる。本発明のMCP-1抗体は、担体中で、溶液、エマルジョン、コロイドまたは懸濁液としてまたは乾燥粉末として、吸入によるかまたは当該技術分野の範囲内のまたは当該技術分野で既知の本明細書に記載したその他の様式による投与に適したさまざまなデバイスおよび方法のいずれかを用いて送達可能である。

【0184】

非経口処方物および投与

非経口投与のための処方は、一般的賦形剤として滅菌水または生理食塩水、ポリアルキレングリコール例えばポリエチレングリコール、植物性油、水素化ナフタリンなどを含有し得る。注射用の水性または油性懸濁液は、既知の方法に従って、適切な乳化剤または加湿剤および懸濁剤を使用することによって調製可能である。注入剤は、溶媒中の無菌注射溶液または懸濁液または水溶液といった非毒性で経口投与不能の希釈剤であり得る。使用可能なビヒクルまたは溶媒としては、水、リンガー溶液、等張食塩水などが許容される。通常の溶媒または懸濁溶媒としては、無菌不揮発性油を使用することができる。これらの目的では、天然または合成のまたは半合成の脂肪油または脂肪酸；天然または合成または半合成のモノまたはジまたはトリグリセリドを含めた、あらゆる種類の不揮発性油および脂肪酸を使用することができる。非経口投与は当該技術分野において既知であり、これには当該技術分野において周知の通りの従来の注射手段、ガス加圧式無針注入デバイスまたはレーザー穿孔機デバイスが含まれるがこれらに限定されるわけではない（例えば全体が本明細書に参照により援用されている米国特許第5,851,198号明細書および米国特許第5,839,446号明細書に開示されている材料および方法、これらに限定されるわけではない）。

【0185】

代替的送達

本発明はさらに、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹内、関節包内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、液嚢内、胸郭内、子宮内、膀胱内、病巣内、ポアラス、腔内、直腸、口腔内、舌下、鼻腔内、または経皮手段による少なくとも1つの抗MCP-1抗体の投与に関する。少なくとも1つの抗MCP-1抗体組成物を、特に液体溶液または懸濁液の形での非経口（皮下、筋肉または静脈内）またはその他のあらゆる投与に使用するため；クリームまたは座薬といった（ただしこれらに限定されるわけではない特に半固体形態での腔内または直腸内投与で使用するため；錠剤またはカプセルの形での（ただしこれらに限定されるわけではない）口腔内または舌下投与のため；または粉末、点鼻薬、またはエアロゾルまたは一部の作用物質の形で（ただしこれらに限定されるわけではない）鼻腔内で；または皮膚構造を修飾するかまたは経皮パッチ内の薬物濃度を増大させるためジメチルスルホキシドといったような化学的エンハンサを伴う（全体が本明細書に参照により援用されているユンギンガー（Junginger）ら、「Drug Permeation Enhancement」；シエ（Hsieh）、D.S.編、59～90頁（Marcel Dekker, Inc., New York 1994年、）または皮膚上へのタンパク質およびペプチドを含有する処方の塗布（国際公開第98/53847号パンフレット）または電気穿

孔といった過渡的輸送経路を作り出すかまたはイオントフォレーシスといったように皮膚を通して荷電薬物の易動性を増大させるための電界の適用、またはソノフォレーシスといったような超音波の適用（米国特許第4,309,989号明細書および同第4,767,402号明細書）を可能にする酸化剤を伴うゲル、軟こう、ローション、懸濁液またはパッチ送達系といった（ただしこれらに限定されるわけではない）ように経皮的に投与するために、調製することができる（上述の刊行物および特許はその全体が本明細書に参照により援用されている）。

【0186】

肺 / 鼻腔内投与

肺投与のためには、好ましくは少なくとも1つの抗-MCP-1抗体組成物が、肺または洞の下気道に達するのに有効な粒度で送達される。本発明に従うと、少なくとも1つの抗MCP-1抗体は、吸入される治療薬の投与のため当該技術分野において既知のさまざまな吸入または鼻腔内デバイスのいずれかにより送達可能である。患者の洞腔または肺胞内にエアロゾル化した処方物を被着させる能力のあるこれらのデバイスには、計量式吸入器、ネブライザ、乾燥粉末発生器、噴霧器などが含まれる。当該技術分野においては、抗体の肺または鼻腔内投与を導くのに適したその他のデバイスも知られている。このようなデバイスは全てエアロゾル中の抗体送り出しのための投与に適した処方物を使用することができる。かかるエアロゾルは、溶液（水性および非水性の両方）または固体粒子のいずれかで構成され得る。Ventolin（登録商標）計量式吸入器のような計量式吸入器は推進剤ガスを使用し、標準的に、吸息中の作動を必要とする（例えば、国際公開第94/16970号パンフレット、国際公開第98/35888号パンフレットを参照のこと）。例えばTurbuhalerTM（アストラ（Astra））、Rotahaler（登録商標）（グラクソ（Glaxo））、Diskus（登録商標）（グラクソ）、SpirosTM吸入器（デュラ（Dura））、インヘイル・テラプティックス（Inhale Therapeutics）により市販されているデバイス、およびSpinhaler（登録商標）パウダー吸入器（ファイソンズ（Fisons））といったような乾燥粉末吸入器は、混合粉末の呼気作動を用いる（米国特許第4668218号明細書（アストラ）、欧州特許第237507号明細書（アストラ）、国際公開第97/25086号パンフレット（グラクソ）、国際公開第94/08552号（デュラ）、米国特許第5458135号明細書（インヘイル）、国際公開第94/06498号パンフレット（ファイソンズ）はその全体が本明細書に参照により援用されている）。AERxTMアラダイム（Aradigm）、Ultravent（登録商標）ネブライザ（マリנקロッド（Mallinckrodt））、およびAcorn II（登録商標）ネブライザ（マークエスト・メディカル・プロダクツ（Marquest Medical Products））（米国特許第5404871号明細書、アラダイム、国際公開第97/22376号パンフレット）といったネブライザ（以上の参考文献はその全体が本明細書に参照により援用されている）は、溶液からエアロゾルを生成するのに対し、計量式吸入器、乾燥粉末吸入器、などは小粒子エアロゾルを生成する。市販の吸入デバイスのこれらの特異的例は、本発明の実施に適した特定のデバイスを代表するものとして意図されており、本発明の範囲を制限するものとして意図されていない。好ましくは、少なくとも1つの抗MCP-1抗体を含む組成物は、乾燥粉末吸入器または噴霧器によって送達される。本発明の少なくとも1つの抗体を投与するための吸入デバイスには複数の望ましい特長が存在する。例えば、吸入デバイスによる送達は、有利には信頼性が高く、再現可能でありかつ精確である。吸入デバイスは場合により、うまく呼吸できるように例えば約10 μm未満、好ましくは約1 ~ 5 μmの小さな乾燥粒子を送達することができる。

【実施例】

【0187】

実施例1：制限的な意味のない例としてファージ表示法を用いたMCP-1に特異的なMCP-1抗体の生成

出願人らは、C775と呼ばれかつ出願人の同時係属特許出願である米国特許出願第1

10

20

30

40

50

1 / 1 7 0 4 5 3 号明細書（それぞれ重鎖および軽鎖可変領域についてのこの出願の配列番号 7 および 8）および関連する出願の中で記載されているマウス抗ヒト MCP - 1 抗体の望ましい治療特性について、以前に示した。当該研究努力の目標は、ヒトケモカイン MCP - 1 の生物活性を中和し類似の属性を提示する HuCAL GOLD（登録商標）からの少なくとも 1 つのヒト抗体を同定することにあった。C 7 7 5 抗体ひいては所望のヒト抗 MCP - 1 抗体の属性を、以下に概略的に示した成功基準により定義づけした。

少なくとも 1 つの治療用抗体のための成功基準：

- 固相形式でヒト MCP - 1 に結合する；
- 相同タンパク質ヒト MCP - 2、3、4 およびヒトエオタキシン 1、2、および 3 に対する 1 0 0 nM での結合の欠如として特異性が定義づけされる。
- Thp - 1 細胞上のそのヒトレセプター CCR 2 に対するヒト MCP - 1 結合を阻害し、IC₅₀ の値は基準 Fab C 7 7 5 の場合より低い。
- THP - 1 細胞のヒト MCP - 1 媒介型走化性を阻害し、IC₅₀ の値は基準 Fab C 7 7 5 の場合よりも低い。
- 定量的検定において基準 Fab C 7 7 5 に匹敵する効力で、または定性的イエス/ノー基準として、第 2 の生物学的検定（例えば Ca²⁺ 可動化または CCL - 2 誘発されたレセプター内在化）におけるヒト MCP - 1 媒介型活性を阻害する。
- K_d < 0.5 nM でヒト MCP - 1 に結合する。
- K_D < 2 0 nM、好ましくは < 1 0 nM で、カニクイザル MCP - 1 に結合する；
- 匹敵する効力で未変性ヒト MCP - 1 および化学合成されたヒト MCP - 1 生物活性を阻害する。
- 比較器としての C 7 7 5 の全長 IgG 形態に基づいて、IgG としての Fab の再工学的処理の後基準 1 ~ 8 を保持する。

【0188】

選択プロセスの要約

HuCAL GOLD（登録商標）を用いて異なるパニングを実施し、1 7 8 5 6 個のクローンをスクリーニングし、結果として 1 1 0 4 の一次ヒットを得た。最終的に、ELISA において合成ヒト MCP - 1 を結合する 2 6 のユニーク Fab を同定した。これらのうち、カニクイザルおよび未変性ヒト MCP - 1 に対する親和性、生物活性、特異性および結合に従って、親和性成熟について 7 個の異なる Fab を選択した。親 Fab の親和性は、1 0 ~ 4 0 0 nM の範囲内にあり、放射性リガンド結合検定における IC₅₀ 値は、1 0 ~ 6 0 0 nM であった。

【0189】

材料および方法

DNA 制限および修飾酵素ならびにポリメラーゼを、インビトロジェン（米国カリフォルニア州 Carlsbad）、ニューイングランド・バイオラプス（New England Biolabs）（米国マサチューセッツ州 Beverly）、ロシュ・ダイアグノステクス（Roche Diagnostics）（ドイツ、Mannheim）および MBI フェルメンタス（リトアニア、Vilnius）から購入した。フラグメント特異的で POD コンジュゲートされたヤギ抗ヒト IgGF（ab'）₂ は、ジャクソンズ（Jacksons）（米国ペンシルバニア州 West Grove）により供給され、Fd フラグメント特異的なヒツジ抗ヒト IgG 抗体はザ・バインディング・サイト（The Binding Site）（英国 Birmingham）により供給され、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされたストレプトアビジン（ZyMAXTM グレード）はザイメド・ラボラトリーズ（Zymed Laboratories）（米国カリフォルニア州 San Francisco）によりコンジュゲートされた。組換え型ヒトケモカイン、hMCP - 1、2、3、4 および hエオタキシン 1、2 および 3（R アンド D システムズ（R&D systems））試薬、リガンドおよび抗体：ヒト MCP - 1 特異的 mAb 2 7 9、（R アンド D システムズ）；合成 hMCP - 1（バイケム（Bachem））；mAb 1 マウス抗 hCCR 2 ピオチン（R アンド D システムズ）；ヒトガンマ

グロブリン (ジャクソンズ・イムノ・リサーチ (Jackson Immuno Research)) ; マウスガンマグロブリン (ジャクソンズ・イムノ・リサーチ) ; mAb mIgG2b イソタイプ制御ビオチン (RアンドDシステムズ) ; ストレプトアビジン - PE (BDファルミゲン (Pharmingen)) ; Versene (インビトロジェン) ; PBS (インビトロジェン) ; FCS (PAN) ; V底ウェル平板 (グレイナー (Greiner)) ; およびU底ウェル平板 (ナンク (Nunc)) 。

【0190】

MCP - 1 ポリペプチドおよび類似体の調製

出願人の同時係属出願である米国仮特許出願第60/682620号明細書およびクラスジンスキー (Kruszynski) ら、2006年、J Peptide Sci. 第12巻: 25 ~ 32頁内で記載されている通りの生物活性をもつ、単離された全長かつ成熟 (76個のアミノ酸) し適正に折畳まれ場合により修飾されたヒトMCP - 1および変異体を提供するための、段階的な固相ペプチド合成および親和性精製。未変性表面トポロジーおよびペプチド主鎖構造を示すように設計された変異体は、A40S、V41IおよびF43Yを内含する。化学合成は同様に、レセプター結合に関与しないリジンのイプシロンアミノ基を用いたヒトMCP - 1の部位特異的ビオチニル化のための方法を提供しており、そうでなければK69およびK75における表面活性は構造内で無秩序化される (米国仮特許出願第60/682620号明細書およびクラスジンスキーら、2006年、J Peptide Sci. 第12巻: 354 ~ 360頁)。4つのエチレンオキシ単位 (PEG₄) の親水性スペーサが、リジン残基の - アミノ基とビオチンの間に挿入された。ビオチンアミドから末端カルボシルまでの鎖長は19.2である。スペーサは、溶解度を増大させストレプトアビジンコンジュゲートを結合させるのに十分なスペーサ長を提供するように選択された。MCP - 1および変異体の配列は、配列番号1に記されている。変異体は、THP - 1細胞内でCa²⁺可動化を誘発する能力を保持するものと判定された。スクリーニング、確立および親和性判定において並列してビオチン・Lys⁶⁹およびビオチン・Lys⁷⁵ MCP - 1を比較し、有意な差異は全く観察されなかった。バイアコアを用いて、35個の最適化したFabをMCP - 1 Ile⁴¹、Lys (ビオチン - PEG₄)⁶⁹およびMCP - 1 Ile⁴¹上で分析し、並行してLys (ビオチン - PEG₄)⁷⁵をストレプトアビジンチップ上で固定化した。一般に、MCP - 1 K69およびK75上での測定された親和性は比較可能なものであった。

【0191】

ファージFabライブラリ

ファージミドライブラリは、HuCAL (登録商標) の概念 (クナビックら、2000年) に基づくものであり、ファージ表面上でFabを提示するためにCys DisplayTM 技術を用いている (ローニング (Loehning)、2001年)。該ライブラリは、小外皮タンパク質pIIIに対する融合としてM13バクテリオファージ上に提示された約10¹⁰個のユニークFabをコードする。選択のため、HuCAL GOLD (登録商標) 抗体 - ファージを、異なるVHマスター遺伝子を含む3つのプールに分割した。さらに、1つのプール (VH1 - 6) 中で全ライブラリを使用した。各パニングのために2 × 10¹³個のHuCAL GOLD (登録商標) 投入ファージを使用した。それぞれヒトMCP - 1類似体1 (V41I、Ile⁴¹) および類似体 - 2 (F43Y、Tyr⁴³) についての3回のパニングラウンドおよび1 - 2 - 1および2 - 1 - 2の順での類似体に対する2つの交互パニングを含め、4つの異なるパニング戦略を適用した。

【0192】

固相パニング

4 で一晚、Maxisorp (登録商標) ウェル (ナルゲン・ヌンク (Nalgen Nunc、ニューヨーク州Rochester) 上でPBS中50 μg/ml、pH 7.4でヒトMCP - 1類似体 - 1 (V41I) または類似体 - 2 (F43Y) の100 μlのアリコート直接コーティングした。コーティングされたウェルを洗浄し、5%のMPBS (PBS、5%の低脂肪粉乳) で遮断した。1ウェルあたり100 μlの遮断した

10

20

30

40

50

HuCAL GOLD (登録商標) ファージを室温で2時間添加した。複数の洗浄工程の後、結合したファージを10分間室温でインキュベートしたpH8.0の10mMのトリス/HCl中の100 μ lの20mM DTTによって溶出させた。中相大腸菌TG1 (ストラタジーン、オランダ、Amsterdam) を感染させるために該溶出液を使用し、記載されている通りに(クレブス(Krebs)ら、2001)ファージミドを増幅させた。

【0193】

中和Fab分子を結果としてもたらすヒトMCP-1類似体-1(V41I)および類似体-2(F43Y)に対する半溶解パニング。溶解状態のHuCAL GOLD (登録商標) ファージと共に2つのビオチニル化されたヒトMCP-1誘導体、V41I、K69-PEG-ビオチンまたはV41I、K75-PEG-ビオチン(配列番号1)をインキュベートしその後Reacti-Bindのニュートラビジン(Nutravidin)でコーティングされたポリスチレンマイクロタイター平板ストリップ(PERBIO)にファージ抗原複合体を捕捉することにより、半溶解パニングを実施した。パニングのためには、1.5ml入りのエッペンドルフ管を4でPBSO/Nで1対1希釈したケミブロック(ケミコンインターナショナル)で遮断させた。翌日、Reacti-BindTMニュートラビジン(ピアース(Pierce)、米国イリノイ州Rockford)マイクロタイター平板ストリップ(結合能力:25Pmolesビオチン/ウェル; PERBIO)を、ニュートラビジン結合剤の数を削減するための2回の予備吸着工程に必要な2 \times 300 μ l PBSで洗い流した。100 μ lの50%ケミブロッカー(ケミコン)、0.05%トウイン20(シグマ)中のHuCAL GOLD (登録商標) ライブラリからの1ウェルあたり2 \times 10¹³個のファージを添加し、穏やかに振とうさせながら室温で1時間遮断させた。2回目の予備吸着工程のために、ファージ溶液を新しいReacti-Bindニュートラビジンがコーティングされたポリスチレンマイクロタイター平板ストリップに移し、穏やかに振とうしながら室温で1時間インキュベートした。その後、予備吸着したファージおよびビオチニル化抗原(ビオチニル化のためには3:1のビオチン対抗原比:200nMの最終濃度)を予め遮断した1.5mlのエッペンドルフ管に添加し、回転ホイール上で室温で1時間インキュベートした。並行して、2 \times 300 μ lのPBSでさらなるReacti-Bind Nutravadinコーティングされたポリスチレンマイクロタイター平板ストリップを洗い流し、1時間PBSで1:1希釈した300 μ lのケミブロッカーで遮断させ、1 \times 300 μ lのPBSで洗浄した。マイクロタイター平板ストリップ内に1ウェルあたり100 μ lのビオチン-抗原-ファージ複合体をピペットでとり、穏やかに振とうしながら室温で一時間インキュベートした。複数の洗浄工程の後、10分間室温でインキュベートさせたpH8.0の10mMのトリス/HCl中で110 μ lの20mMのDTTにより結合したファージを溶出させた。溶出液は、中相大腸菌TG1 (ストラタジーン、オランダAmsterdam) を感染させるために使用され、記載されている通りに(クレブスら、2001年)ファージミドを増幅させた。

【0194】

選択されたFabフラグメントのサブクローニングおよびミクロ発現。可溶性Fabの急速な発現を促進するため、XbaIおよびEcoRIを介して発現ベクターpMORPH (登録商標) \times 9_{__}FH内に、選択されたHuCAL GOLD (登録商標) ファージのインサートをコードするFabをサブクローニングした。FabフラグメントはC末端FLAGTMタグ((プリケット(Prickeett)ら、1989年)そして第2のC末端タグとして6 \times His-タグ(チェン(Chen)ら、1994年))を担持している。TG1-F⁻単クローンの形質転換後、HuCAL (登録商標) - Fabフラグメントを含有するペリプラズム抽出物の発現および調製が、先に記述された通り((ラウエンベルガー(Rauchenberg)ら、2003年))に実施された。

【0195】

上述の通りに、ヒトMCP-1類似体 1 (V41I) についての固相形式結合検定を

10

20

30

40

50

実施した。遮断の後、ペリプラズム抽出物を添加した。ヤギ抗ヒトIgG、F(ab')₂フラグメント特異的抗体と共にインキュベートすることにより、Fab-フラグメントの検出を実施した。

【0196】

4 で16時間pH7.4のPBS中で希釈させた0.5μl/mlのビオチニル化hMCP-1類似体-1(V41I)または類似体-2(F43Y)20μlでコーティングしたReacti-BindTMニュートラビジンTM384ウェル平板(ピアース、米国イリノイ州Rockford)を用いて、固定化したビオチニル化hMCP-1V41Iについてのスクリーニングを実施した。室温で1時間、TBS中の1%BSA、0.05%のトゥイーン20(シグマ(Sigma)、米国ミズーリ州St. Louis))で遮断した後、ペリプラズム抽出物を添加した。ヤギ抗ヒトIgG、F(ab')₂フラグメント特異的抗体とのインキュベーションにより、Fab-フラグメントの検出を実施した。

10

【0197】

4 で16時間pH7.4のPBS中で1:1000希釈させた20μlのヒツジ抗ヒトIgG、Fdフラグメント特異的抗体でMaxisorp(ヌンク(Nunc)、米国ニューヨーク州Rochester)384ウェル平板をコーティングすることにより、ビオチニル化hMCP-1類似体-1(V41I)での溶液相スクリーニングを実施した。室温で2時間、TBS中の3%のBSA、0.05%のトゥイーン20(シグマ(Sigma)、米国ミズーリ州St. Louis))で遮断させた後、ペリプラズム抽出物を添加した。その後、捕捉されたHuCAL(登録商標)-FabフラグメントをTBS中の0.2μg/mlのビオチニル化hMCP-1類似体-1(V41I)に結合させ、これをアルカリホスファターゼにコンジュゲートされたストレプトアビジンでのインキュベーションとそれに続くAtto-Plus蛍光基質(ロシュ・ダイアグノステックス、ドイツ、Mannheim)の添加により検出した。535nmの蛍光放射を、430nmの励起で記録した。

20

【0198】

生物活性検定

細胞培養

加湿されたインキュベータの中で37℃、5%CO₂で標準化された条件下で全ての細胞を培養した。標準培地内で、CCR2を発現する細胞を成長させた。さらに、2mMのL-グルタミン1.5g/Lの重炭酸ナトリウム、4.5g/Lのグルコース、10mMのHEPESおよび1.0mMのピルビン酸ナトリウムを含有するRPMI90%;10%のウシ胎児血清(FBS;Vitacell RPMI20-2001、ATCC、バージニア州Manassas)の中で37℃、5%CO₂で、4~8×10⁵細胞/mLの密度で、THP-1細胞(ヒト急性単球性白血病細胞)を培養させた。

30

【0199】

放射性リガンド結合検定。ミリポア(Millipore)フィルタ平板、(マサチューセッツ州Bedfordのミリポア(Millipore))内で競合検定を実施した。異なる濃度の組換え型ヒト(rh)MCP-1(279-MC、RアンドDシステムズ、ミネソタ州Minneapolis)または合成タンパク質と合わせて¹²⁵I-MCP-1(1ng/ml;パーキンエルマ・ライフサイエンス(Perkin Elmer Life Science)、マサチューセッツ州Boston)と共に1×10⁶個のTHP-1細胞/ウェルをインキュベートした。RPMI培地1640(インビトロジェン、ニューヨーク州Grand Island)および0.1%のBSAから成る結合緩衝液中で全ての試薬を希釈させた。競合を室温で1時間進行させ、150μl/ウェルの洗浄緩衝液(結合緩衝液+1MのNaCl)で3回ウェルを洗浄した。Wallac Wizard 1470自動ガンマ計数器(パーキンエルマ・ライフサイエンス、マサチューセッツ州Boston)を用いてフィルタ上の放射能を計数した。変動する用量の組換え型または合成MCP-1のいずれかによる¹²⁵I-MCP-1のCCR2に対

40

50

する結合の阻害百分率を計算した。阻害百分率値を次にグラフパッド・プリズム (Graphpad Prism) プログラム内にインポートし、最低値 = 0 および最高値 = 100 の定数および可変勾配を伴う S 字形用量 - 応答曲線を用いてプロットした。

【0200】

カルシウム可動化検定。非接着性細胞のためのメーカーのプロトコルに従って FLEX stationTM Ca²⁺ プラス検定キット (モレキュラー・デバイーズ (Molecular Devices)、カリフォルニア州 Sunnyvale) および FLEX stationTM (モレキュラー・デバイーズ (Molecular Devices)、カリフォルニア州 Sunnyvale) を用いて、96 ウェル形式で、Ca²⁺ 可動化検定を実施した。ピーク RFU 値を、分析のグラフパッド・プリズム内にインポートした。

10

【0201】

MCP-1 誘発型 CCR2 レセプター内在化 FACS 検定。リガンド濃度 (合成 MCP-1 の EC50、約 100 ng/ml) およびインキュベーション時間 (1 時間後に最大の内在化が発生した) の最適化の後、異なる濃度の抗体を添加することにより IC50 を判定した。培養した CCR2 発現細胞を PBS で洗浄し、37 °C で約 10 分間ヴェルシオン (Versene) (インビトロジェン) で切り離した。細胞の全ての遠心分離工程は約 200 × g で行なわれた。細胞を FACS 緩衝液 (PBS / 3 % FCS) で 2 回洗浄し、計数し、生存率について検査した (トリパンブルー)。96 V 底ウェル平板 (グレイナー) に、1 ウェルにつき 100 μl 中約 2.5 × 10⁵ 個の細胞を充てんし、氷上に置いた。96 U 底ウェル平板 (ヌンク (Nunc) の中で、細胞培地 (MEME) 中に抗体を希釈させて、約 200 μg/ml から 0.001 μg/ml までのトリプリケート試料を得た。異なる濃度の抗体を室温で 10 分間、100 ng/ml の最終濃度の合成 MCP-1 (Bachem) と共に予備インキュベートさせた。細胞を、予備インキュベートした 100 μl の MCP-1 / 抗体混合物と共に再懸濁させ、レセプター内在化のためインキュベータ内で 37 °C で 1 時間インキュベートさせた。内在化の後、細胞を一回 180 μl の低温 FACS 緩衝液で洗浄したが、さらなる内在化を防ぐため全ての後続工程について平板を氷上に保たなくてはならない。FACS 緩衝液内で 1 : 10 の割合でピオチニル化マウス抗-hCCR2 mAb (R アンド D システムズ) を希釈した。対照としてマウス IgG2b イソタイプピオチン mAb (R アンド D システムズ) も同様に FACS 緩衝液内で 1 : 10 に希釈した。10 μg/ml の最終濃度のヒトおよびマウスガンマグロブリンの 1 : 1 混合物 (ジャクソンズ・イムノ・リサーチ) を、抗-hCCR2 および対照 mAb の両方に添加して Fc-レセプターを遮断した。細胞を 50 μl の抗-CCR2 / ガンマグロブリンミックス (または対照 IgG2b / ガンマグロブリンミックス) の中に再懸濁させ、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を 2 回 180 μl の FACS 緩衝液で洗浄し、50 μl の 1 : 400 の希釈ストレプトアビジン-PE (BD ファーミゲン (Pharmingen)) 内で再懸濁させ、暗所で氷上に 4 °C で 1 時間インキュベートした。180 μl の FACS 緩衝液で 2 回、細胞を洗浄し、100 μl の 2 % PFA / PBS 中で再懸濁させ、固定のため 4 °C で一晩貯蔵した (代替的には、PFA 固定無しの直接的測定が可能である)。FACS 測定のために、細胞を 200 μl の FACS 緩衝液で再懸濁させ、少なくとも 5000 個の細胞を各々計数した。

20

30

40

【0202】

親和性検定

K_D 判定用溶解平衡滴定 (SET) 方法およびバイオベリスを用いた交叉反応性研究。溶解状態の親和性判定を基本的に文献中で記載されている通りに実施した (フリゲ (Friguet) ら、1985 年)。SET 方法の感度および精度を改善するために、それを従来の ELISA から ECL ベースのバイオベリス技術に移した (ハーネル (Haenele) ら、2005 年、Analytical Biochemistry 中に公表受諾されたもの)。メーカーの指示に従って、1 mg/ml のヤギ抗-ヒト (Fab)₂ またはヤギ抗マウス IgG、Fc フラグメント特異的抗体 (ジャクソンズ・イムノ・リサーチ

50

を、BV-tagTMNHS-Ester (バイオベリス・ユアロップ (Bioveris Europe)、英国オックスフォードシャーWitney) で標識した。検定緩衝液として0.5%のBSAおよび0.02%のTween 20を伴うpH 7.4のPBSでポリプロピレンマイクロタイター平板内で実験を実施した。4th段階で未標識抗原を希釈した。ヒトおよびカニクイザルMCP-1については10 pM ~ 40 nMの濃度範囲そして交叉反応性コントロール (エオキシシおよびMCP-2) については40 pM ~ 160 nMの濃度範囲を選択した。抗原無しのウェルを用いてS_{max}値を判定した。100 pMのFabまたはIgG (75 μLの最終体積中の濃度) の添加後、混合物を室温で2時間インキュベートした。その後、抗ヒトFabについて1:4000または抗マウスIgGについて1:2000の最終希釈物中の0.25 μg/mlのビオチニル化MCP-1 (K69) およびBV-tag標識された検出抗体でコーティングされた25 μLのDynabeads (0.4 mg/mlのM-280ストレプトアビジン、DYNAL、Hamburg) の混合物を1ウェルにつき添加した。室温でエッペンドルフ振とう器 (700 rpm) 上で30分間インキュベートした後、M-384シリーズ (登録商標) ワークステーション (バイオベリス・ユアロップ) を用いて電気化学発光シグナルを検出した。カスタマイズされた適合モデルを応用するOrigin 5.0 (Microcal) ソフトウェア (Fabについてはハーネルら、2005年、Analytical Biochemistry中に公表受諾されたもの; IgGについてはピーラー (Piehler) ら、1997年に従う) で、データを評価した。

【0203】

直接コーティングされた抗原についてのバイアコアK_D判定。速度定数K_{on}およびK_{off}を、バイアコア3000計器 (バイアコア (Biacore)、スウェーデンUppsala) を用いて共有結合により固定化されたMCP-1に結合するそれぞれのFabの段階希釈物で判定した。共有結合性抗原固定化のためには、標準時EDC-NHSアミンカップリング化学が用いられた。反応速度測定を、1.5 ~ 500 nMのFab濃度範囲を用いて20 μL/分の流速でPBS (136 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、10 mMのNa₂HPO₄、1.76 mMのKH₂PO₄ pH 7.4) 中で行なった。各濃度についての注入時間は1分でありそれに3分間の解離段階が続いた。再生のためには、5 μLの10 mMのHClを使用した。BIA評価ソフトウェア3.1 (バイアコア) を用いて全てのセンソグラムを適合させた。Biotin-K69ヒトMCP-1およびカニクイザルMCP-1についてのバイアコアK_D判定。ストレプトアビジンチップ表面に対してビオチン-K69ヒトMCP-1およびビオチニル化カニクイザルMCP-1をコーティングし、CM5チップに対し直接カニクイザルMCP-1をコーティングした。標準的方法を用いてFabの結合をテストした。

【0204】

抗体捕捉モードでのバイアコアK_D判定。CM5チップ (流速5 μL/分) 上で抗-h Fab (s. 3.15) を用いて500 nMでFabを捕捉し、各類似体 (MCP1、2、3、4およびエオタキシ、エオタキシ-2および3) の溶液を注入した。全てのサイトカインに担体を含まず、親和性判定のための検体として15 ~ 500 nM (最適化前の親Fabについて) の濃度範囲で使用された。BIA評価ソフトウェアを用いて、センサグラムを分析した。バイアコアの検出限界に達したため最適化された結合剤について抗体捕捉モードでのMCP-1に対するバイアコア親和性判定は不可能であった。

【0205】

Fabの特異性分析のためには、捕捉検定を用いる表面プラズモン共鳴を使用した (バイアコア3000、スウェーデンUppsala)。Fabを捕捉し、さまざまなタンパク質 (MCP-2、-3、-4およびエオタキシ-1、-2および3) を検体として使用した。CM5チップ (バイアコア、スウェーデン) を、標準的EDC-NHSアミンカップリング化学を用いて4フローセル全てについて、6500 ~ 8000 RUの抗-F(ab)₂ (ダイアナノヴァ (Dianova)、Affipure F(ab)₂ フラグメントヤギ抗-ヒトIgG、F(ab)₂ フラグメント特異的; 10 mM酢酸塩緩衝液、

pH 4.5) でコーティングした。フローセル 2 ~ 4 を、特異的抗 - MCP - 1 Fab で捕捉した (10 µl / ml の流速で 20 µl の 500 nM Fab、結果としての捕捉密度 300 ~ 400 RU)。Fab の捕捉後、100 nM の濃度でケモカインを注入した (20 µl、流速 20 µl / 分、PBS pH 7.4)。小さなアリコートでケモカインを貯蔵し、測定のためには、最大 1 回の凍結 - 解凍サイクルで解凍されたばかりの材料のみを使用した。抗 Fab / Fab 相互作用および Fab 特異的相互作用、MCP - 1 のオフ速度により刺激される複数のオフ速度の組合せを避けるために、抗 Fab / Fab 相互作用の解離を判定するべく緩衝液を注入した。達成した緩衝液センサーグラムを特異的なものから減算した。応答単位は、表面上への捕捉抗体の量に正規化した。

【0206】

抗体捕捉モード内での未変性 MCP - 1 に対する結合。上述の通りの方法を使用した。PANC 1 上清から未変性 MCP - 1 を精製し、結合分析のために使用した。Fab 捕捉モードでの未変性 MCP - 1 に対する結合は、検出限界をはるかに上回っていたが、未変性 MCP - 1 の適正な濃度を覆い隠す抽出物中の不純物のせいで、真の親和性測定は不可能であった。

【0207】

IgG への変換

全長 IgG を発現する目的で、ヒト IgG 1、ヒト IgG 4、キメラヒト / マウス IgG 1 および IgG 2a について Fab 発現ベクターから適切な pMorph__hIg ベクターへと、重鎖 (VH) および軽鎖 (VL) の可変ドメインフラグメントをサブクローニングした。制限酵素 EcoRI、MfeI、BipI を pMorph__hIgG 1.1、pMorph__hIgG 4.1、pMorph__mIgG 1.1 または pMorph__mIgG 2a.1 への VH ドメインフラグメントのサブクローニングのために、そして EcoRV、BsiWI を pMorph__hIg__1、pMorph__hIg__1、pMorph__mIg__1 または pMorph__mIg__1 ベクターへの VL ドメインフラグメントのサブクローニングのために、それぞれ使用した。結果としての IgG 構成体は C N T O において発現させられた。

【0208】

結果

Maxisorp 平板に直接コーティングされた hMCP - 1 (41I) および hMCP - 1 (43Y) 上で固相パニングを実施した。各々 3 つの選択ラウンドを含む 4 つの異なるパニング戦略を応用した。発現ベクター pMORPHx9__Fab__FH 内へのサブクローニングの後、直接コーティングされた hMCP - 1 (41I) およびビオチニル化 hMCP - 1 について、固相スクリーニングを実施した。合計 8832 個のクローンを一次スクリーニングにおいて分析し、983 の一次ヒットを得た。最終的に 5 個のユニーク Fab を同定したが、5 つの Fab 全てが細胞検定内で MCP - 1 を中和せず、Maxisorp に対する直接的コーティングが、中和エピトープの立体配座または少なくともアクセス可能性を損う可能性があることを表わしていた。

【0209】

溶解状態の HuCAL GOLD (登録商標) ファージと共にビオチニル化されたヒト MCP - 1 類似体 - 1 (V41I) および類似体 - 2 (F43Y) をインキュベートし続いて記載されている通り、ファージ抗原複合体を捕捉して、半溶解パニングを実施した。それぞれビオチニル化ヒト MCP - 1 タンパク質類似体 - 1 (V41I) および類似体 - 2 (F43Y) (交互パニング無し) に対する 3 ラウンドのパニングを含む 2 つの異なる主パニング戦略を応用した。合計 9024 のクローンを一次スクリーニングにおいて分析し、121 の一次ヒットを得、最終的に 18 個のユニーク結合剤が明らかとなった。ビオチニル化ヒト MCP - 1 タンパク質類似体 - 1 (V41I) についてのパニングからの 192 クローンの LumineX ベースの再スクリーニングにより、9 つの付加的な一次ヒットおよび 3 つの付加的なユニーク結合剤が導かれ、Lumirex スクリーニングが捕捉スクリーニングに対する適切な代替的スクリーニング方法であることを示している。半

10

20

30

40

50

溶解パニングから合計 21 のユニーク結合剤が同定され、そのうち 14 の結合剤が中和活性を示した。HuCAL GOLD (登録商標) からの中和 Fab は全て、このパニングに由来していた。

【0210】

HuCAL GOLD (登録商標) Fab の特徴づけ

ユニーク Fab を発現させ、さらなる特徴づけのために精製した。バイアコアにより hMCP-1 結合親和性を決定し、1) ¹²⁵I CCL-2 の Thp-1 細胞に対する結合の阻害、および 2) Thp-1 細胞中の hMCP-2 誘導型 Ca²⁺ 可動化の阻害という検定の中で Fab を特徴づけした。細胞ベースの検定において中和活性を示した Fab をさらに、1) 合成カニクイザル hMCP-2 に対する結合；2) 結合特異性のための hMCP-2 ファミリー関連ヒトケモカインに対する結合 (すなわち MCP-2、3、4 およびエオタキシン 1、2、3)；および 3) 合成 hMCP-2 ペプチドを用いて選択された Fab が未変性 hMCP-2 を確実に認識するようにするための未変性ヒト hMCP-2 に対する結合、についてテストした。付加的な親和性成熟のために、最適な特性をもつ 7 つの Fab を選択した。

【0211】

親和性成熟のために選択された Fab の特性は表 2 にまとめられている。親和性成熟のために選択された 7 つの Fab は、ライブラリクローニングおよび選択のため 3 つのグループに割当てられた。L-CDR3 および H-CDR2 最適化が並行して実施された。軽および重可変鎖の並行な最適化は、さらなる改良型抗体さえも生成するべく交叉クローニングを介して改良型重鎖および軽鎖を組合せ潜在的な可能性を作り出した。

【0212】

【表 3】

表2、親和性成熟のために選択されたFab候補の要約

Fab 名称	グループ	Kd MCP-1 (nM)	放射性リガ ンド結合 IC ₅₀ (nM)	Ca ²⁺ 可動化 IC ₅₀ (nM)	特異性	Kd カニクイ ザル [nM]	未変性 MCP-1 結合	配列グループ Hc Lc
MOR 03336	1	60 ± 33	114	526	MCP-1	170 ± 42	あり	VH3 / VL-λ3
MOR 03464	1	75 +/- 50	105	1340	MCP-1、2	175 ± 49	あり	VH3 / VL-λ3
MOR 03468	1	ND	255	2000	MCP-1	550 ± 14	未検出	VH1B / VL-λ3
MOR 03470	1	46 +/- 1	645	2100	MCP1	145 ± 92	あり	VH1B / VL-λ3
MOR 03471	2	94 +/- 6	180	1256	MCP-1	465 ± 106	あり	VH1A / VL-κ3
MOR 03473	2	175 +/- 20	184	2900	MCP-1	478 ± 95	あり	VH1A / VL-κ3
MOR 03548	3	42	11	124	MCP-1、Eo	54 ± 8	あり	VH3 / VL-λ3

【0213】

実施例 2：FABS からの高親和性 MCP-1 特異的抗体の評価

指摘した通り、親和性成熟のための候補の選択は、遊離 Fab 形式の候補について実施された。選択基準は、放射性リガンド結合検定における活性、Ca²⁺ 可動化検定における活性、バイアコアにより測定されるヒト MCP-1 に対する親和性、ヒト MCP-1 に対する特異性、カニクイザル MCP-1 に対する親和性およびバイアコア内で検出された未変性 MCP-1 に対する結合であった。親 Fab をグループ化するための付加的な基準は、ELISA における C775 競合であり、可変重鎖および軽鎖のフレームワークファミリーに基づいていた。特に走化性検定における IgG としての成熟候補の特徴づけを、成熟選択プロセスと並行して実施した。

【0214】

成熟のため選択された7つのF a bは、3つの異なる配列クラスに入った。1つのクラス(グループ1、表2)では、F a b 0 3 3 3 6、0 3 4 6 4、0 3 4 6 8および0 3 4 7 0が、2つの異なる重鎖フレームワークの1つと共にV₃軽鎖フレームワークを有していた。F a b 0 3 3 3 6および0 3 4 6 4はV H 3重鎖フレームワークを有し、F a b 0 3 4 6 8および0 3 4 7 0は、V H 1 B重鎖フレームワークを有していた。F a bの第2のクラス(グループ2、表2)0 3 4 7 1および0 3 4 7 3は、V H 1 A重鎖フレームワークおよびV₃軽鎖フレームワークを有していた。F a b 0 3 5 4 8は、第1のクラス内のF a bのうちの2つ(V H 3、V₃)と同じ重鎖および軽鎖フレームワークを有していたが、例外的に強力な生物活性およびエオタキシンとの結合交叉反応性を有していたことから別々に維持された(グループ3、表2)。本明細書で使用されている可変領域配列分類の完全な記述については、全体が本明細書に参照により援用されている米国特許第6 8 2 8 4 2 2号明細書を参照のこと。後者の成熟の最終目的は、特異性を増大させながらC C L - 2に対する0 3 5 4 8の親和性を改善することにあった。

【0 2 1 5】

成熟の前に、カニクイザルおよび未変性ヒトM C P - 1に対する親和性ではなくこれらに対する結合のみがバイアコアF a b捕捉モードで判定された。7つの親F a bは全て、成熟のための前提条件であるカニクイザルおよび未変性 - M C P - 1の両方に対する結合を示した。

【0 2 1 6】

親I g Gの結合特異性

7つの親F a b全てのI g G 1への転換後、I g G形態について交叉反応性研究を反復した。エオタキシン3はセンサーチップ上でデキストラン表面に非特異的に結合し、この非特異的結合はカルボキシルメチルデキストランを添加することにより競合させて取除くことができた。その他のケモカインのデキストラン表面に対する非特異的結合も可能であったことから、全てのバイアコア特異性検定においてカルボキシルメチルデキストランを添加した。F a bとは対照的に、2つのI g GがヒトM C P - 1に対する有意な結合を全く示さず、興味深いことに、全ての成功基準を満たした4つの最終結合剤全てが1つの親F a bから来ていた。

【0 2 1 7】

表面上の捕捉抗体の量により、M C P - 1の結合シグナル(応答単位)を正規化した。すなわちモル結合比 = (結合した抗原のR U / 抗原のMW) × (m A bのMW / 表面上に捕捉されたm A bのR U)であり、0.5未満のモル結合比が有意でないものと予想された。4つのI g Gが、M C P - 1に対して0.5超のそして、全相同体ケモカインに対し0.5未満の正規化された結合比を示し、従って、I g Gレベルで特異的と称された。1つのI g Gも同様に、F a bレベルですでに検出されたエオタキシンおよびM C P - 2に対する幾分か結合を示したが、この交叉反応性はI g Gレベルで削減された。M O R 0 3 4 6 8 I g Gのデータは示されていない。

【0 2 1 8】

T H P - 1細胞(C N T O)に対するI^{1 2 5} M C P - 1結合の阻害

I g G 1形式での親結合剤の中和活性を最初に放射性リガンド結合検定においてテストした。無関係のヒトI g G 1を添加することによりT H P - 1細胞上のF Cレセプターを遮断した後、全ての親I g GについてM C P - 1結合の阻害を検出することができた。4つのI g Gが、基準I g G C 7 7 5の範囲内のI C₅₀値でT H P - 1細胞に対する放射性標識されたヒトM C P - 1の阻害を示した。

【0 2 1 9】

カルシウム可動化(C N T O)の阻害

全ての親I g Gは、T H P - 1細胞内でM C P - 1誘発型のカルシウム可動化を阻害した。4つのI g Gが、基準I g G C 7 7 5に比べて高い抗体濃度でM C P - 1誘発型のカルシウム可動化の阻害を示した。

【0 2 2 0】

M C P - 1 誘発型走化性 (C N T O) の阻害

親 F a b を走化性検定においてテストすることができなかったことから、M C P - 1 誘発型走化性の阻害を I g G 形式でテストした。テストされた親 I g G は全て走化性検定において活性であり、4 つの I g G は基準 I g G C 7 7 5 に比べて高い抗体濃度で M C P - 1 誘発型走化性の阻害を示した。

【 0 2 2 1 】

実施例 3 : L - C D R 3 / H - C D R 2 カセットの並行交換による選択された F A B の親和性成熟

親和性成熟プロセスの要約

第 1 の成熟ラウンドにおいて、L - C D R 3 最適化および H - C D R 2 最適化が並行して実施された。各々の F a b クラスからの DNA を、成熟ライブラリ構築のためにプールした。各々の DNA プールについてランダム化された配列によりもとの重鎖 C D R 2 および軽鎖 C D R 3 配列を置き換え、結果として 6 つの新しいライブラリすなわち 3 つのランダム化された H - C D R 2 と 3 つのランダム化された L - C D R 3 ライブラリを得た。6 つのライブラリの各々の多様性は、 10^8 超のユニーク F a b であった。ニュートラビジンがコーティングされたプラスチックウェル上で捕捉されたビオチンペプチドの溶液パニングまたはパニングのいずれかのために、合成 C C L - 2 - 4 1 I ビオチン - K 6 9 ペプチドを使用した。6 つのライブラリの各々をさまざまな条件下でパニングして、緩慢なオフ速度 (すなわち長時間洗浄、削減された抗原濃度) で F a b について富化させた。溶液および半溶解パニングを含めた 3 6 の並行パニングを実施した。抗原濃度の削減、オフ速度選択および長期洗浄の結果、ストリンジェントパニング条件が得られた。パイオベリス (前 I G E N) 電気化学発光 (E C L) ベースのプラットフォームを用いて、親和性スクリーニングを実施し、改善された親和性での高生産性親和性等級付けおよび F a b 分子の同定が可能となった。

【 0 2 2 2 】

H 1 A および H 1 B の重鎖 H - C D R 2 ライブラリとしての親和性成熟用ライブラリを別々にクローニングし、7 つの異なる可変領域ライブラリをクローニングした。その後 2 つの H 1 A および H 1 B ライブラリを選択に先立ちプールし、6 つの選択ライブラリを得た。ライブラリサイズは、 $10^8 \sim 8 \times 10^9$ の範囲内であった。理論的多様性の 0 . 6 2 5 倍がなおも網羅されていた M O R 0 3 5 4 8 3 L - C D R 3 ライブラリを除いて、全てのライブラリについて全ての理論的多様性が網羅された。無作為に取り上げたクローンの配列決定により、ライブラリの品質管理を実施した。配列の 7 5 中 7 1 (9 5 %) が適正で多様であったが、7 5 の配列のうち 4 つについて、フレームシフトが検出された。全ての親 F a b の誘導体がそのそれぞれのライブラリ内で発見された。

【 0 2 2 3 】

選択された抗体フラグメントの親和性および生物活性を増大させるために、フレームワーク領域が恒常的に保たれる一方で、トリヌクレオチド誘導突然変異誘発 (ヴィルネカス (V i r n e k a e s) ら、1994 年) を用いたカセット突然変異誘発により並行して L - C D R 3 および H - C D R 2 領域を最適化した。親和性成熟のためのクローニングに先立ち、全ての親 F a b フラグメントを対応する発現ベクター (p M O R P H (登録商標) $\times 9$ _ F H) から X b a I / E c o R I を介して C y s D i s p l a y ^{T M} ベクター p M O R P H (登録商標) 2 5 _ L H C 内に移送した。H - C D R 2 最適化のためのライブラリクローニングと干渉する 1 つの B s s H I I 部位の除去により、H u C A L G O L D (登録商標) 表示ベクター p M O R P H (登録商標) 2 3 _ L H C から p M O R P H (登録商標) 2 5 _ L H C を作り出した。親 F a b フラグメントのプールの L - C D R 3 を最適化するために、結合剤プールの軽鎖 (4 0 5 b p) の定常領域、L - C D R 3 およびフレームワーク 4 を B p i I / S p h I により除去し、定常ドメインおよびフレームワーク 4 と共に多様化された L - C D R 3 s のレパートリで置き換えた。この L - C D R 3 カセットの設計、合成およびクローニングについては、別途記述する予定である (原稿準備中) 。5 μ g の結合剤プールベクターを、多様化された L - C D R 3 s を担持するインサー

10

20

30

40

50

トフラグメントの3倍モル余剰分でライゲートさせた。第2のライブラリセットにおいては、結合するフレームワーク領域が定常に保たれる一方で、H - C D R 2 (X h o I / B s s H I I) を多様化させた。クローニング効率を監視するために、親H - C D R 2をダミーで置き換えてから、多様化したH - C D R 2カセットを中にクローニングした。4 m lの大腸菌T O P 1 0 F細胞内で7つの異なるライブラリのライゲーション混合物を電気穿孔させ(インビトロジェン、米国カリフォルニア州C a r l s b a d)、 $1 \times 10^8 \sim 8 \times 10^9$ 個の独立したコロニーを生成した。このライブラリサイズは、理論的多様性を確実に網羅した。ライブラリの増幅を、前述の通りに実施した(ラウヘンベルガーら、2003年)。品質管理のため、単一のクローンを無作為に取上げ、配列決定した(セキサーブ(SequiServe)、ドイツ、V a t e r s t e t t e n)。

10

【0224】

親和性成熟のためのヒトビオチン - K 6 9 M C P - 1 (V 4 1 I) に対する半溶解パニング

最適化ライブラリから取返した 1×10^{13} 個のファージを、レアクティ・バインド・ニュートラビジン(Reacti-Bind Neutravidin)でコーティングされたポリスチレンマイクロタイター平板ストリップ上に2回予備吸着させ、その後ケミ・ブロッカー(Chemi BLOCKER)で遮断した(ケミコン(Chemicon)、米国カリフォルニア州T e m e c u l a)。予備吸着させたファージおよび異なる濃度のビオチンK 6 9 M C P - 1 ($0.02 \sim 50$ nM)を溶解状態で22℃で1.5時間インキュベートし、その後、レアクティ・バインド・ニュートラビジンでコーティングされたポリスチレンマイクロタイター平板ストリップ(PERBIO)に対しファージ-抗原複合体を捕捉した。22℃での洗浄工程を、12時間まで延長させた。10 mMのトリス/HCl、pH 8.0中の20 mMのDTTによる溶出および各々のパニングラウンド間のファージミッド増幅を、上述の通り行なった。

20

【0225】

親和性成熟のためのヒトビオチン - K 6 9 M C P - 1 (V 4 1 I) に対する溶液パニング

上述の通りの親和性成熟ライブラリから取返した 1×10^{13} 個のファージをケミブロッカー(ケミコン、米国カリフォルニア州T e m e c u l a)、0.05%トゥイーン20(シグマ、米国ミズーリ州S t . L o u i s)で遮断し、トゥイーン20無しでケミブロッカーにより遮断されたダイナビーズ(Dynabeads)(登録商標)M - 280ストレプトアビジン(ダイナル・バイオテック、ノルウェーO s l o)上で2回予備吸着させた。抗原の削減を3回のパニングラウンド中に適用し、ビオチン - K 6 9 M C P - 1の濃度は0.01から5 nMまでの範囲内であった。ビオチニル化抗原に結合されたファージを捕捉するために、遮断されたD y n a b e a d s (登録商標)および磁気粒子分離装置、M P C - E (ダイナル・バイオテック、ノルウェーO s l o)を使用した。洗浄工程(ラウヘンベルガーら、2003年)、10 mMのトリス/HCl、pH 8.0中の20 mMのDTTによる溶出および各々のパニングラウンド間のファージミッド増幅を上述の通りに行なった。さらに、パニングストリンジェンシーを、オフ速度選択(ホーキンス(Hawkins)ら、1992年)および長時間洗浄工程(最高6時間)によりさらに増大させた。

30

40

【0226】

3312個のクローンをスクリーニングし、7つの親F a bのうちの4つに由来する85の最適化されたF a bを同定した。L - C D R 3およびH - C D R 2の両方において最適化されたF a bを同定し、2つの異なる親クローンの誘導体について、改良型軽鎖および重鎖の交叉クローニングを実施し、最高100倍の親和性(K_D)のさらなる改善を導いた。約1 - 10 nMで推定された K_D をもつ上位結合剤(約100個)を配列決定して、41個のユニークな改良型F a bの同定を導いた。改良型結合剤の大部分は、グループI I I (03548)に由来していた。グループIおよびグループI Iにおいて付加的なスクリーンを行なって、これらの成熟群においてより改良されたF a bを同定した。29の付加的なクラスIおよびI Iの結合剤を同定した。全体として、7個の親F a bのうち

50

の5つに由来する87個のユニークFabを成熟プロセスにおいて同定した。表3は、成熟パニングの結果をまとめたものである。

【0227】

【表4】

表3: MCP-1に対する改善された結合を有するFabの選択のまとめ

グループ	親クローン	改良型 L-CDR3	改良型 H-CDR2	
1	03336	-	14	
1	03470	-	2	
1	03464	-	1	
1	03468	-	-	
2	03471	23	1	
2	03473	-	-	
3	03548	11	35	
	合計改良 Fabs	34	63	87

10

【0228】

親クローン03741および03548のH-CDR2またはL-CDR3のいずれかの中に、成熟したFab内のアミノ酸変化が位置づけされていた。Fabの最良の軽鎖CDR3と最良の改良型重鎖CDR2の交叉クロニングを次に実施して、さらに高い親和性をもつFabを生成しようと試みた。約36の交叉クローンが生成された。全てのユニークFab配列を同様に、N-連結されたグリコシル化部位の予測についてスクリーニングした。重鎖CDR2内のグリコシル化のためのNISコンセンサス配列をもつわずかなFabを同定した。これらのFabをさらなる特徴づけから除外した。合計84のFabを発現させ、モルフォシス(Morphosys)で精製し、生物学的特徴づけのためセントコール(Centocor)に移した。

20

【0229】

バイアコアを用いた親和性測定のための感度限界には、最適化Fabで達した。従って、ECLベースの溶解平衡滴定(SET)により、親和性の値を判定した(ハーネルら、2004年、Analytical Biochemistry中での公表に提出されたもの)。親和性成熟の後、約10pMの K_D が達成され、値をKinexAを用いて確認した。放射性リガンド検定におけるFab結合は、110pMの IC_{50} を達成した。かくして、MCP-1親和性および結合反応速度の両方が、親Fabに比べて最高1000倍まで改善した。4つの最適化Fabは、9つの全ての成功基準を満たした。2つはL-CDR3最適化Fabであり、2つはL-CDR3およびH-CDR2の最適化鎖から成る交叉クローンであった。4個は全てIgG1に転換され、放射性リガンド結合検定において20pMの最良の IC_{50} および10pMの最良の K_D で、全てのテスト対象検定において活性を保持した。1つの付加的な交叉クローンMOR03899は、FabではなくIgG1として全ての成功基準を満たした。成功基準を満たした全ての結合剤は、MOR03471親Fab(配列番号2、4)から誘導されていた。ユニークFab、MOR03790は、表4Dおよび配列番号6、7、9、13、14および16内で記されている重鎖および軽鎖可変領域配列を含みMOR03471に基づく動物モデル内でのインビボ評価、スケールアップ製造開発、およびIgG産生のため選択された。

30

40

【0230】

親和性成熟中のバイオベリススクリーニング

ECLベースのハイスループット親和性スクリーニングバイオベリス検定により、親和性改良型Fabクローンを同定した。ヒット選択後、4つのサブクローンを同じ方法で確立した。

【0231】

親和性成熟のためのパニング戦略

50

合計で36個の異なるパニングを実施した。ストレプトアビジンビーズに対するファージ-抗原複合体の捕捉を伴うビオチン-K69MCP-1(V41I)に対する18回の溶液パニング。抗原濃度の削減、オフ速度選択および長時間洗浄により、選択プロセス中のストリンジェンシーを増大させた。さらに、ビオチン-K69MCP-1に対する18回の半溶解パニングを実施し、ニュートラビジン平板にファージ-抗原複合体を捕捉した。これらのパニングにおいては、抗原の削減および長い洗浄によりストリンジェンシーを増大させた。

【0232】

親和性成熟についてのバイオベリスクリーニング

成熟パニングにおいてと同様バイオベリスペースのスクリーニングのためにも、抗原ビオチン-K69MCP-141Iを使用した。改良型結合剤の同定のために、スクリーニングが非常に効率良く機能した。36のパニング条件の各々について、92のクローンをスクリーニングし、結果として3312のスクリーン済みクローンが得られた。合計して85の異なるユニーク最適化結合剤を同定した。3つのグループ全てから最適化Fabを発見した。さらに、L-CDR3およびH-CDR2の中で最適化したFabを同定することができ、MOR03471およびMOR03548誘導体と呼称されたFabについての交叉クローニングが可能となった。46個の最適化FabがMOR03548に由来し、H-CDR2最適化に由来したFabのうち35個が、11L-CDR3で最適化されたFabに比べ高い親和性および活性を示した。しかしながら親MOR03471も同様に、この成熟において非常にうまく最適化されており、23個のFabがL-CDR3内で、又1個がH-CDR2内で最適化された。7個の親Fabのうちの4個から改良型Fabが由来し、このことは各々の親結合剤が異なる最適化潜在性を有することを表わしていた。最終的に、全ての成功基準を満たす4つのFabが、MOR03471に由来し、2つがL-CDR3のみにおいて最適化され、交叉クローニングからの2つがL-CDR3およびH-CDR2において最適化された。

【0233】

最適化されたFab分子の交叉クローニング

HuCAL(登録商標)技術のモジュラー構造は、クローニング工程において2つの最適化された鎖を組合せるだけで、同じ親クローンから誘導された最適化Fabの最適化軽鎖および重鎖の急速な交叉クローニングを可能にする。交叉クローニングは、付加的な成熟ラウンド無くさらに改善された抗体を得る潜在性をもつ高速方法である。一方では、2個のL-CDR3最適化MOR03548誘導体を6個のH-CDR2最適化MOR03548と交叉クローニングさせて、12個の交叉クローンを導いた。他方では、22個のL-CDR3最適化MOR03471を1つの利用可能なH-CDR2最適化MOR03471クローンと交叉クローニングさせた。このプロジェクトにおいては、交叉クローニングは成功し、2つの異なるMOR03471由来の交叉クローン、MOR03850およびMOR03878を導き、これらは最終的に全ての成功基準を満たした。

【0234】

16個の予備選択された抗体の詳細な特徴づけ

親和性スクリーニングから同定された85個の最適化Fabおよび付加的な34個の交叉クローン(以上参照)が結果として、全ての利用可能な検定によっても全ては特徴づけされなかった合計119個の異なるユニークな最適化Fabをもたらした。従って、16の最適化Fabを、放射性リガンド結合阻害におけるそのIC₅₀、カルシウム放出検定における活性、CDR中のNグリコシル化部位の欠如(表4AおよびB)および親和性に従って予備選択した。さらなる詳細な特徴づけには、特異性試験、未変性MCP-1に対する結合およびその中和、ヒトおよびカニクイザルMCP-1に対する親和性、走化性検定における活性および全ての転換済みIgG1の特徴づけが含まれていた。

【0235】

最適化Fabを表わすクローンは、表4A-Cに示された配列によって表わされており、ここで、クローンMOR03471親FabはVH3xC₃フレームワークを有し

、MOR03548はVH1A x ラムダ3 フレームワークを有する。所望の物理化学属性（CDR中のN - グリコシル化部位無し）および親和性および生物活性の最適化された特性をもつ17個の選択されたFabは、使用されたフレームワーク（VH3およびVH1A）内で、いくつかのユニークCDR配列、およびHC - CDR2およびLC CDR3配列間の代表的コンセンサス配列、ならびにより一般的に全てのHC - CDR1間のコンセンサスを示す。これらのコンセンサス配列は、表4C - 4Eおよび配列番号2 ~ 26に示されている。

【0236】

【表5】

表4A: 17個の選択された結合剤の重鎖CDR配列

親	MOR #	VH 型	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03471 誘導体 (L-CDR3)	3781	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIPIFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 誘導体 (L-CDR3)	3790	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIPIFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 誘導体 (L-CDR3)	3791	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIPIFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471xクローン(3822x3797)	3849	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471xクローン(3822x3819)	3850	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471xクローン(3822x3794)	3878	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471xクローン(3822x3788)	3885	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471xクローン(3822x3876)	3899	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03548 誘導体 (L-CDR3)	3744	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (L-CDR3)	3747	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3753	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYTTSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3754	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATTYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3755	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3757	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWTNYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3758	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWTGYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3832	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSNYATSYAAGVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3836	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF

【0237】

10

20

【表 6】

表4B: 17個の選択された結合剤の軽鎖CDR配列

親	MOR #	VL 型	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03471 誘導体 (L-CDR3)	3781	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIELWSF
MOR03471 誘導体 (L-CDR3)	3790	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIQLHSF
MOR03471 誘導体 (L-CDR3)	3791	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYIDISPM
MOR03471 xクローン(3822x3797)	3849	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISHPQ
MOR03471 xクローン(3822x3819)	3850	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYITYPPF
MOR03471 xクローン(3822x3794)	3878	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISFPA
MOR03471 xクローン(3822x3788)	3885	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISQPV
MOR03471 xクローン(3822x3876)	3899	VL-K3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIFYPN
MOR03548 誘導体 (L-CDR3)	3744	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QTYDRFSSTA
MOR03548 誘導体 (L-CDR3)	3747	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYDRFSSTG
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3753	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3754	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3755	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3757	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3758	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3832	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS
MOR03548 誘導体 (H-CDR2)	3836	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRP	QSYTAQSSAS

【0238】

【表 7】

表4C: 抗MCP-1V領域についてのコンセンサス配列

配列 番号	wV- 領域	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	VH1A	QVELVQ SGAE VKKPGS SVKV SCKAS	<u>GGTFSS</u> <u>YGIS</u>	WVRQAPG QGLE	<u>WMGXIXPXXG</u> <u>XXXYAQKFQG</u>	RVTTADEST STAYMELSSL RSED TAVYYC AR	<u>YDGIYGELDF</u>	WGQGLTVTVSS
3	VH3	QVQLVE SGGG LVQPGG SLRL SCAAS	<u>GFTFRSY</u> <u>GMS</u>	WVRQAPG KGLE	<u>WVSNIRSDGS</u> <u>YTYADSVKG</u>	RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAED TAVYYC AR	<u>FEFTPWTYFDF</u>	WGQGLTVTVSS
4	カッパ3	DIVLTQS PAT LSLSPG ERAT LSC	<u>RASQSV</u> <u>SDAYLA</u>	WYQQKPG QAPR	<u>LLIYDASSRAT</u>	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC	<u>XQYIXXXX</u>	FTFGGGTKVEIK
5	ラムダ3	DIELTQP PSV SVAPGQ TARI SC	<u>SGDNLG</u> <u>KKYV Y</u>	WYQQKPG QAPV	<u>LVIYDDNRP</u>	GIPERFSGSN SGNTATLTIS GTQAED EADY YC	<u>QXYXXXSSXX</u>	FGGGTKLTVL

【0239】

【表 8】

表4D: 抗MCP-1ユニークCDR

V-領域	CDR	配列番号	Fab 名称	配列
VH1A	CDR1	6	全MOR03471	GGTFSSYGIS
VH1A	CDR2	7	3781、3790、CNT0 888	WMGGIPIFGTANYAQKFQG
VH1A	CDR2	8	3899	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG
VH1A	CDR3	9	全MOR03471	YDGIYGELDF
VH3	CDR1	10	全MOR03548	GFTFRSYGMS
VH3	CDR2	11	3744、3747	WVSNIIRDGS YTYADSVKG
VH3	CDR3	12	全MOR03548	FEFTPWTYFD F
カッパ3	CDR1	13	全MOR03471	RASQSVSDAYLA
カッパ3	CDR2	14	全MOR03471	LLIYDASSRA T
カッパ3	CDR3	15	3781	HQYIELWSF
カッパ3	CDR3	16	3790、CNT0888	HQYIQLHSF
カッパ3	CDR3	17	3899	HQYIFYPN
ラムダ3	CDR1	18	全MOR03548	SGDNLGKKYV Y
ラムダ3	CDR2	19	全MOR03548	LVYDDNRP S
ラムダ3	CDR3	20	3744	QTYDRFSSTA
ラムダ3	CDR3	21	3747	QSYDRFSSTG

10

【 0 2 4 0 】

【表 9】

表4E: 抗MCP-1CDR領域コンセンサス配列

CDR	配列番号	配列	変異体
VH1A-CDR2	22	WMGXIXPXXG XXXYAQKFQG	X4 = A, G X6 = I, N X8 = I, L X9 = A, F X11 = H, T X12 = A, T X13 = H, N
VH3-CDR2	23	WVSSEHKWX XYXTXYAAXV KG	X10 = S, T X11 = G, N X13 = A, T X15 = G, S, T X19 = G, S
Lk-CDR3	24	XQYIXXXX	X1 = H, Q X5 = D, E, F, Q, S, T X6 = Q, L, I, H, T, F X7 = W, H, S, P X8 = A, N, Q, V, P-F, P-M, S-F
Lλ-CDR3	25	QXYXXXSSXX	X2 = S, T X4 = D, T X5 = A, R X6 = F, Q X9 = A, T X10 = A, G, S
HC-CDR1	26	GXTFXSYGXS	X2 = F, G X5 = S, R X9 = I, M

20

30

40

【 0 2 4 1 】

【表 10】

表5: 選択された抗体の親和性のまとめ

K_D [nM]	MOR3757	MOR3781	MOR3790	MOR3850	MOR3878	MOR3899
Fab BioVeris rh MCP-1 n=2	0.008 / 0.02	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.14	0.81 ± 0.18
Fab BioVeris cyno MCP-1 n=2	0.01 / 0.07	0.004 / 0.01	0.06 ± 0.02	0.04	0.32 ± 0.04	0.49 ± 0.04
Fab KinexA bt-K69 h MCP-1 (CNTO)	0.0067	0.0089	0.075	0.02	ND	ND
IgG1 BioVeris rh MCP-1 n=2	ND	0.02	0.07 ± 0.03 n=3	0.011 ± 0.005 n=3	0.27 ± 0.06	0.34 ± 0.05
IgG1 BioVeris cyno MCP-1 n=2	ND	0.016 ± 0.008	0.06 ± 0.01 n=3	0.021 ± 0.015 n=3	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.06

10

20

【0242】

バイオコアにより測定された未変性MCP-1に対する結合

未変性MCP-1に対する結合をバイオコアFab捕捉モードでテストし、選択された全てのFabは未変性MCP-1に対する結合を示した。特に、最適化されたFabでバイオコア内での K_D 決定についての検出限界に達したことから、親和性判定および特異性確認のための代替的方法を使用しなかった。

【0243】

IgG転換

詳細な特徴づけのために選択された全ての最適化FabをIgG1形式に転換させ、さらに4つのFabをIgG4形式にサブクロニングした。テスト対象のヒトIgG4の異なる検定における活性および発現データはそれぞれのIgG1のものと同じ位優れていた。

30

【0244】

バイオベリスを用いた溶解平衡滴定

敏感な K_D 判定のための代替的方法として、バイオベリス技術を用いた溶解平衡滴定 (SET) を実施した。FabおよびIgGのための適切な適合モデルを用いて一価の解離定数を計算した。この方法は、親和性測定および交叉反応性研究に適していた。バイオベリスを用いた溶解平衡滴定 (SET) により全ての選択された16の結合剤を分析し (表5および表6)、これらの親和性値を最終的親和性値とみなした。FabおよびIgGとしてのMOR03757、MOR03781、MOR03790、MOR03850、MOR03878、およびIgGとしてのMOR03899を含めた複数の結合剤が、0.5 nM未満であるヒトMCP-1および20 nM未満であるカニクイザルMCP-1に対する親和性成功基準を満たした。ヒトMCP-1に対する最良の親和性はFabのレベルで20~40 pMであり、IgGのレベルで10~20 pMであった (表5)。カニクイザルMCP-1に対する最良の親和性は、Fabレベルで10~40 pMであり、IgGレベルで20 pMであった (表6)。

40

【0245】

バイオベリスを用いた特異性試験

親和性以外にも特異性特にエオタキシンおよびMCP-2に対する交叉反応性をバイオ

50

ペリスを用いて溶解平衡滴定 (SET) において分析した。テスト対象の選択された 16 個の Fab および 15 個の IgG (16 個の選択された IgG のうちの 1 つは利用不可能であった) について、ヒト MCP-2 に対する交叉反応性は全く検出不可能であった。ヒト MCP-1 と同様、ヒト MCP-2 は主として CCR2 レセプターに結合し、一方ヒトエオタキシンは大部分 CCR3 レセプターに結合する。バイオペリスで MOR03744、MOR03747、MOR03790 および MOR03781 Fab および IgG についてはヒトエオタキシンに対する交叉反応性は全く検出不可能であり、一方 MOR03850 を含めた 12 個の選択された結合剤は、Fab または IgG 形式でエオタキシンに対する幾分かの交叉反応性を示した (データ示さず)。

【0246】

バイアコア抗体捕捉モード (CNTO) での最適化抗体の特異性

選択された IgG で特異性評価を実施した。バイアコア内で、捕捉された最適化抗体に対して 100 nM のヒト MCP-1、ヒト MCP-2、3、4 およびヒトエオタキシン 1、2 および 3 を添加した。MOR03790、MOR03791、MOR03747、MOR03850、MOR03744、MOR03849、MOR03878、MOR03885、MOR3899 および MOR03781 IgG は、相同体ケモカインに対する有意な結合シグナルを全く示さず、特異性成功基準を満たした (表 6)。

【0247】

MCP-2 に結合する Fab は、Thp-1 細胞 (CNTO) に対する 125 IMCP 2 結合を阻害しない。バイアコア内で検出されたエオタキシンおよび MCP-2 に対する Fab 結合活性が中和活性の形をとったか否かを分析するために、セントコールにおいて放射性リガンド全細胞結合検定を開発した。I¹²⁵ MCP-2 は、Thp-1 細胞に対する優れた結合を示し、結合は、MCP-1 特異的基準抗体 C775 の添加によってではなく未標識 MCP-2 の添加によって阻害された。結果は、結合 / 中和特異性をテストするための重要な機能的検定を提供した。レセプター結合検定においては 1 ng / ml の MCP-1 が使用されたのに対し、MCP-2 標識 (MCP-2 labeling) が活性の損失をひき起こした可能性があるため、この検定では約 100 ng / ml の MCP-2 が必要であった。MOR03754 は、Thp-1 細胞上の CCR2 レセプターに対する 125 I 標識された MCP-2 結合の有意な阻害を全く示さなかった (IC₅₀ 2 μM)。

【0248】

成熟した Fab は、THP-1 細胞 (CNTO) に対する I¹²⁵ MCP-1 結合を強力に阻害する。必要とされる MCP-1 が 1 ng / ml と少量であるため、この検定は、Fab については約 100 pM そして IgG についてはさらに 20 pM (表 5) という検定 IC₅₀ 限界で、このプロジェクト中最も感度の高い検定であった。最適化の後、Fab は、基準 Fab C775 より低い IC₅₀ で Thp-1 細胞上のそのヒトレセプター CCR2 に対するヒト MCP-1 結合を阻害することになった。親 MOR03471 Fab は 180 nM の IC₅₀ を示し、最適化 MOR03471 Fab 誘導体 (180 pM の MOR03781、260 pM の MOR03790、160 pM の MOR03850、110 pM の MOR03878 および 130 pM の MOR03899) は、最高 1000 倍の倍率で最適化中に活性の全体的改善を示した。この検定はこのプロジェクトにおいて利用可能な最も感度の高い生物学的検定であったが、この検定においてさえ、最適化結合剤は検定限界に達したように思われた。

【0249】

成熟した IgG は THP-1 細胞 (CNTO) に対する I¹²⁵ MCP-1 結合を強力に阻害する。無関係のヒト IgG 1 を添加することによる Fc レセプター結合部位の遮断は、放射性リガンドの結合およびカルシウム可動化検定にとって重要であった。テストされた全ての IgG 1 は放射性リガンド結合検定における活性を保持した。最適化された MOR03781 の IC₅₀ 値は 20 pM であり、MOR03790 については 30 pM、MOR03850 については 50 pM、MOR03878 については 30 pM そして MOR03899 については 50 pM であった。MCP-1 誘発型 CCR2 レセプター内在化

10

20

30

40

50

の阻害 FACS 検定の開発。レセプター内在化検定は、THP-1 細胞よりも高いCCR2 発現を示すCCR-2 を発現する細胞を用いて実施され、より優れた信号対雑音比を導いた。第1に合成ヒトMCP-1 を検定内で滴定してEC₅₀ 値を決定した。MCP-1 についてのEC₅₀ 値は116 ng/ml であることがわかった。従って、さらなるFACS 検定のためには100 ng/ml (約11 nM) のMCP-1 を選択した。さらに、完全な内在化を得るための最適なインキュベーション時間を37 で評価した。大部分の内在化は最初の30分以内に発生した。従って、全ての後続する検定においては、1時間のインキュベーション時間を用いた。IC₅₀ の判定を可能にするように、検定をうまく開発した。MCP-1 誘発型レセプター内在化を阻害するために用いられる0.001 ~ 200 µg/ml の間のFabまたはIgGの活性および等級付けを測定した。選択された最適化結合剤は、MCP-1 誘発型レセプター内在化の優れた阻害を示した(データは示さず)。Fabの2つの異なるバッチを並行してテストし、再現性が実証された。

10

【0250】

Fabを用いた内在化検定に関しては、MOR03790については5 nMのIC₅₀ を、MOR03850については4 nM、MOR03781については7 nM、MOR03878については5.3 nM、そしてMOR03899については3.3 nMのIC₅₀ を検出した(表6)。MOR03781 IgG1も同様に7 nMを示し、これは、IgG転換の後活性が保持されたことを表わしていた。

【0251】

カルシウム可動化(CNTO)の阻害

20

MCP-1 は、フルオロフォアの助けを借りて検出できるTHP-1 細胞内のカルシウム可動化を誘発する。最適化された抗体は、カルシウム可動化の強力な阻害を示し、4つの最終候補MOR03781、MOR03790、MOR03850およびMOR03878 Fabは、18 ~ 28 nMのIC₅₀ 値を示した。それぞれのIgGは又活性を保持し、1 IgGにつき2つのMCP-1 分子を中和するその能力のため約6 ~ 10 nMのわずかに優れたIC₅₀ 値さえ示した。ここでも又、約10 nMで検定限界に達したように思われた。

【0252】

未変性MCP-1 誘発型カルシウム可動化の阻害

PANC1 上清から未変性MCP-1 を精製し、カルシウム放出の誘発のために使用した。最適化Fabは、基準抗体C775に比べてさらに高い活性で、未変性MCP-1 誘発型カルシウム可動化の阻害を示した。ここでも又、検定限界には約10 ~ 20 nMの未変性MCP-1 で達するように思われた。

30

【0253】

走化性阻害

潜在的非特異性効果に起因して、親Fabを走化性検定においてテストすることはできなかったが、成熟後はテスト対象の最適化Fab全てが特異的に走化性を阻害し、これは活性の増大によるものであると考えられた。テスト対象の全ての最適化IgGは走化性検定において活性であった。検定は半定量的であることから、適切なIC₅₀ 値は全く判定できなかった。

40

【0254】

基準抗体C775での結合競合。MOR03548由来の全ての予め選択されたFabは、競合固相形式でC775のMCP1に対する結合を完全に阻害した。7つのMOR03471由来の予め選択されたFabは全て、この検定において部分的(約60%)競合を示した。

【0255】

要約データ

【表 1 1】

表6:合格基準を満たしたAbsのプロファイル

	基準	MOR3790k	MOR3850k	MOR3781k	MOR3878k	MOR3899k
成功基準	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG	Fab gG
# 1, 6 MCP-1 Kd<0.5 nM IGEN	65 -	0.12 0.07	0.04 0.01	0.03 0.02	0.32 0.27	(0.81) 0.34
# 2 MCP-1特異性 パイアコア(IgG)	なし なし	(MCP-2/Eo) なし	(MCP-2/Eo) なし	(MCP-2/Eo) なし	(MCP-2/Eo) なし	(MCP-2/Eo) なし
# 3 ¹²⁵ I MCP-1 阻害 IC50< C775	35.6 25.6	0.26, 0.03	0.16 0.05	0.18 0.02	0.11 0.03	0.13 0.05
# 4 走化性の阻害	あり あり	あり 検出不能	あり 検出不能	あり 検出不能	あり 検出不能	あり 検出不能
# 5 Ca ²⁺ 可動化の阻害 IC50 < C775	71.5 62.3	25.02 4.26	28.42 9.47	21.8 10.9	20.24 6.7	17.54 5.85
# 7 カニクイザルMCP-1 Kd<10 nM	検出不能 検出不能	0.06 0.06	0.04 0.01	0.01 0.02	0.32 0.23	0.49 0.36
# 8 未変性MCP-1誘発型 Ca ²⁺ の阻害	あり, 検出不能	あり, 検出不能	あり 検出不能	あり 検出不能	あり 検出不能	あり 検出不能
長時間測定-1 C775競合	あり あり	部分的 検出不能	部分的 検出不能	部分的 検出不能	部分的 検出不能	部分的 検出不能
長時間測定-2 CCR2内在化阻害	65 検出不能	5 検出不能	4 検出不能	7 7	5.3 検出不能	3.3 検出不能

【 0 2 5 6 】

実施例 4 : 治療候補の選択

最終治療候補、C N T O 8 8 8 の選択と生成

その軽鎖 C D R 3 配列 (表 4 B および D、配列番号 1 5 および 1 6) のみが異なっている 2 つの m A b s、3 7 8 1 および 3 7 9 0 は、検定においてほぼ同一の生物学的活性を示した。潜在的 H L A クラス I I 結合ペプチドを同定し、候補が H L A 結合エピトープに関して有意に異なっているか否かを判定するためにインシリコ免疫原性分析を実施した。分析は、m A b 3 7 9 0 が免疫原性について m A b 3 7 8 1 より低い潜在性を示すことを予測した。この分析そして表 6 に示したその他の生化学的および生物学的分析に基づいて、重鎖 V H 1 A フレームワーク領域 (配列番号 2) および重鎖 C D R 領域、配列番号 6、7、および 9 ; および軽鎖 カッパ 3 フレームワーク (配列番号 4) および C D R 領域、配列番号 1 3、1 4 および 1 6 を含んでなる 3 7 9 0 を最終的な治療用 m A b として選択した。

【 0 2 5 7 】

m A b 3 7 9 0 の N - 末端配列は、クローニング中に導入されたアミノ酸変化に起因してヒト生殖細胞系列配列からの一定の変動。さらに、アミノ酸コドン (すなわち、D N A 配列) は原核細菌細胞内での偏向された最大発現であった。生殖細胞系列配列に対する不完全な N - 末端アラインメントを修正し、高度に発現されたヒトタンパク質において好まれるものに対するコドン偏向を変更するように M A b D N A を再合成した。配列修飾された 3 7 9 0 m A b は、それぞれ配列番号 2 7 および 2 8 の重鎖および軽鎖可変領域配列

を含んでなるC N T O 8 8 8として呼称され、以下に(C D R sに下線付き)、ここで重鎖のN - 末端残基は、Q V Q (G l n - V a l - G l n)でありかつ/または軽鎖はE I V (G l u - I l e - V a l)である。

【 0 2 5 8 】

C N T O 8 8 8 重鎖可変配列 (配列番号 : 2 7)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y G I S W V R Q
A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A
Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R Y Y D G I Y G E L D F W G Q G T L V T V S S

C N T O 8 8 8 軽鎖可変 (配列番号 : 2 8)

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

【 0 2 5 9 】

C N T O 8 8 8 の生化学的および生物物理化学的特徴づけ

C N T O 8 8 8 は、完全ヒト I g G 1 カップ抗体である。該配列中には、予測された N - 連結型グリコシル化部位は全く存在しない。C N T O 8 8 8 (H E K 2 9 3 細胞中で過渡的に発現され、タンパク質 A 親和性クロマトグラフィにより精製されたもの) の生化学的および生物物理学的特性を、結合親和性 (K d) および特異性について、S D S - P A G E、サイズ排除クロマトグラフィ (S E C)、質量スペクトル (M S) およびバイアコアにおいて特徴づけした。S D S - P A G E では、未変性 C N T O 8 8 8 は、約 1 5 0 k D a で単一バンドとして移動する。還元され / アルカリ化された I g G は、約 6 0 k D a および 3 3 k D a で 2 バンドとして移行する。C N T O 8 8 8 のサイズ排除クロマトグラフィは、I g G が、レミケード I g G 対照 (データ示さず) について測定されたものと同じ溶出体積で単一峰として溶出することを実証した。最終的に、M S 分析は C N T O 8 8 8 が 1 4 7 , 0 0 0 D a の質量を有することを示した (データ示さず)。バイアコア分析は、ヒトおよびカニクイザル C C L - 2 に対する C N T O 8 8 8 結合親和性 (K d) が、それぞれ 3 0 および 1 0 p M であることを実証した。C N T O 8 8 8 は、C C L - 2 関連ケモカイン、すなわち M C P - 2、3、4 および エオタキシン 1、2 および 3 に対し バイアコア内での検出可能な結合を示さなかった。

【 0 2 6 0 】

C N T O 8 8 8 のインビトロ特徴づけ

C N T O 8 8 8 の生物活性を、細胞ベースの様々な検定中で評価した。全ての成功基準検定において評価された過渡的に発現された C N T O 8 8 8 は、親 m A b 3 7 9 0 と区別不能である活性を有していた (表 5)。

【 0 2 6 1 】

実施例 5 : 抗 M C P - 1 抗体のクローニングおよび発現

C N T O 8 8 8 プラスミド p 2 8 4 4 および p 2 8 8 2 を伴う E . c o l i のアリコートは、それぞれ抗体重鎖および軽鎖を含有する。プラスミド p 2 8 4 4 は、抗 - C D 4 重鎖プロモータの下で C N T O 8 8 8 コーディング領域の最適化重鎖コーディング配列を含有し、プラスミド p 2 8 8 2 は、抗 - C D 4 軽鎖プロモータの下で C N T O 8 8 8 コーディング領域の最適化軽鎖を含有する。両方の構成体共、g p t 選択遺伝子を内含して、M H X (ミコフェノール酸、ヒポキサンチンおよびキサンチン) に対する化学的耐性を与えている。各々のプラスミドを精製し、特徴づけし、定量しかつ配列決定した。

【 0 2 6 2 】

C 4 6 3 A 宿主細胞系列の指数関数培養由来の細胞、化学的に規定された組成培地 (C D - ハイブリドーマ) 中での成長に適応させた S p 2 / 0 誘導体を、線形化された p 2 8 4 4 および p 2 8 8 2 で同時電気穿孔した。4 8 時間後、細胞を 1 倍の M H X (ミコフェノール酸 0 . 5 m g / L、ヒポキサンチン 2 . 5 m g / L および キサンチン 5 0 m g / L) に曝露した。選択から 3 日後に、細胞生存率は 1 3 % 未満に低下し、この時点で約 9 0

、000個の生存細胞をメチルセルロース中に平板固定した。細胞を8～13日間乱さない状態でインキュベートし、その後Halo手順を用いてスクリーニングし、24-ウェル平板中に採取した。培養を膨張させ、24-ウェル過成長滴定量を得た。

【0263】

最高の親細胞系列(C1262A)は、70mg/Lの24-ウェル過成長滴定量および振とうフラスコ中(CD-ハイブリドーマ 培地中)で108.5mg/Lの滴定量を有していた。この親細胞系列C1262Aを、振とうフラスコ中でのさらなる評価のために選択した。C1262Aを、開発細胞バンク(Development Cell Bank (DCB))生成のため細胞バンキンググループ(Cell Banking Group)に提出した。C1262A:DCB;02SEP04と呼称されたたDCBからの細胞を、マイコプラズマおよび不稔性についてテストし陰性であった。(大豆ペプトンの添加を伴う)振とうフラスコ中におけるC1262A細胞からのさらなる調査研究の支援を目的としたCNT0888の生産は、230mg/Lの滴定量に達し、2Lの培養から366mgの精製CNT0888を生み出した。並行して、C1262A細胞の付加的な9-L培養により、初期精製および処方物開発用の約2gの粗製CNT0888材料が生産された。

10

【0264】

親細胞系列、C1262Aを、Halo手順を用いてサブクローニングし、5つの高生産性サブクローン細胞系列を生み出した。最良のサブクローン細胞系列(4D5)は、150.5mg/Lの24-ウェル過成長滴定量および振とうフラスコ中(CD-ハイブリドーマ中)の167mg/Lの滴定量を有していた。このサブクローンされた細胞系列を、C1262Bとコード化した。

20

【0265】

実施例6: CNT0888でのヒト膵臓腫瘍の治療

本研究は、(ヒト腫瘍由来細胞が生成した)腫瘍MCP-1の遮断が、マウス異種移植片中での腫瘍成長を抑制するか否かを調査するものである。腫瘍並びに宿主MCP-1相同体、JE、成長における役割および悪性疾患の進行を測るために、抗-ヒトMCP-1および抗-マウスJE抗体の両方を、インビボでのヒト膵臓腫瘍の成長を抑制する能力についてテストした。

【0266】

30

BxPC-3膵臓腫瘍を有するマウスを、ヒトIgG1定常領域に融合された可変領域配列(配列番号27および28)含んでなるCNT0888と呼称されたヒト抗-ヒトMCP-1抗体で処理した。CNT0888のインビボ活性を、宿主効果の阻害に最も効果的であることがわかった以前にテストされたマウス抗体と比較するために、CNT0888およびマウス抗-ヒトMCP-1(C775)の両方を抗-muJE(C1142)と組合せて投与した。最終的な腫瘍重量の測定に基づくと、ヒト(CNT0888)およびマウス(C775)の抗-ヒトMCP-1Mabsは両方共、腫瘍成長を有意に阻害した。

【0267】

材料および方法

40

BxPC-3はヒト膵臓癌由来細胞である。エンゲルブレスホルムスワム(Engelbreth-Holm-Swarm (EHS))腫瘍から調製されたマトリゲル(Matrigel)TMは、ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)(0.2EU/mg、マサチューセッツ州Bedford)から入手した。

【0268】

C775は、マウス抗-ヒトMCP-1Mabであり、C1142はラット/マウスキメラ抗-マウスJE抗体であり、ラット可変およびマウス定常領域の両方が出願人の同時係属特許出願である米国特許出願第11/170453号明細書および関連出願中で記載されている。対照抗体cVaMは、C1142およびC775についてのイソタイプ対照として役立つラット可変およびマウス定常領域からなるラット/マウスキメラIgG_{2a}

50

kである。臨床グレードのヒトIgGをベケット・アポテキャリー（Beckett Apothecary）およびペンシルバニア州Sharon Hillのホーム・ヘルス・ケア社（Home Health Care, Inc）から入手し、これはCNTO 888のための対照として役立っている。

【0269】

本研究では、チャールス・リバー（Charles River）（ノースカロライナ州Raleigh）から入手した雌のSCIDマウス（生後6～8週目）を使用した。マウスを、フィルタートップのプラスチックケージ内に集団収容し、加圧殺菌食および水を供給した。

【0270】

B×PC-3細胞を、10%のFBSを含有するRPMI 1640培地（完全培地）中で培養した。研究開始の48時間前に細胞を1：3に分割した。研究当日に、単一細胞懸濁液を生成するために細胞をトリプシン処理し、トリプシンを中和するために該細胞懸濁液を10体積の完全培地で洗浄した。細胞を遠心沈降させ、無血清RPMI中で再懸濁させた。マトリゲルTMを一晩4℃で解凍した。等体積のマトリゲルTM溶液およびB×PC-3細胞を混合することによってマトリゲルTM・腫瘍細胞懸濁液を調製した。癌細胞懸濁液の最終濃度は5mg/mLマトリゲルTM中5×10⁶細胞/mLであった。

【0271】

0日目に、80匹の雌SCIDマウスに0.2mLのB×PC-3細胞懸濁液を皮下移植した。0.2mLの細胞懸濁液は、1×10⁶のB×PC-3細胞および1.0mgのマトリゲルTMを含有していた。マトリゲルTMの重合を避けるために低温のシリンジを使用した。

【0272】

【表12】

表7. 抗一腫瘍研究設計

グループ 番号	1グループ あたりの動物数	治療(腹腔内)
1	10	PBS
2	10	cVaM + huIgG (各抗体20 mg/kg)
3	10	C775 + C1142 (各抗体20 mg/kg)
4	10	CNTO888 + C1142 (各抗体2 mg/kg)
5	10	CNTO888 + C1142 (各抗体20 mg/kg)

【0273】

全ての動物を、研究の開始時および研究中は週に1回計量した。ひとたび腫瘍の成長が観察されたならば（3.0mm³）、キャリバを用いてミリメートル単位（mm）で2次元（長さおよび幅）で腫瘍を測定した。腫瘍の成長ついてマウスを観察し、[長さ×幅×幅]/2、の公式に基づいて腫瘍の体積（mm³）を計算した。

【0274】

腫瘍細胞の移植後14日目に、約50mm³の平均腫瘍体積を有するマウスを5つのグループにランダム化した（n=10/グループ）。治療（表7）を14日目に開始し、研究の残りの期間、治療を週に2回投与した（14日目に治療を開始した後52日間）。研究の残りの期間、週に1回腫瘍を測定した。研究の終了時点で、CO₂窒息によりマウスを安楽死させた。腫瘍を切除し、デジタル天秤上で秤量し、固定した。腫瘍をデジタルカメラを用いて撮影した。50日目に、グループ3内の1匹のマウスが研究指針に基づく許容可能な限度を超過する腫瘍を有しており、これを屠殺した。この動物の体積および重量は最終分析に内含されている。

【0275】

腫瘍の重量に関して、データを標準線形モデルおよび分散分析 (ANOVA) を介して分析した。別途指示のある場合を除いて、全てのテストおよび比較について 0.05 未満の P-値が有意と見なされた。等分散および正規分布形状の根底にある前提がより良く満たされることから、対数目盛りを用いた。腫瘍をもたないマウスについての半ダースのゼロ値を、小スプライン補間値 (0.007240538) で置き換え、これによりデータ構造の破壊なく対数目盛り中において統計分析が容易になった。

【0276】

腫瘍体積に関しては、反復測定モデルを、一次自己相関共分散構造を仮定したデータに適合させた。時間プロファイルにおける傾向の曲率を柔軟にモデリングするために、自然スプラインを使用した。各時間点でグループ間における一対比較を行った。計算は、Rソフトウェア環境で実施した。

10

【0277】

結果

PBSおよびcVam/huIgGの両方の負の対照グループが、51日後に約350 mm³に達する類似の腫瘍成長を示した。このことは、不適切な抗体による抗体治療が腫瘍成長を阻害しないことを表している。3つのテストグループ (C775 / C1142 およびCNT0888 / C1142) における腫瘍の成長が負の対照グループよりも緩慢であったが、このことは抗-CCL2 / 抗-JE治療が腫瘍の成長に対してインパクトをもつことを表していた。C775 / C1142 およびCNT0888 / C1142 (2 mg / kg) グループは、18日目から研究終了まで腫瘍体積によって測定されるように、PBS対照グループに比較して有意な腫瘍の阻害を示した。CNT0888 / C1142 (20 mg / kg) グループは、PBS対照グループと比較して、18日目から39日目まで有意な阻害を示した。

20

【0278】

51日目の研究終了時点で腫瘍重量を得た (表8)。PBSグループ1 (マウス1匹)、C775 / C1142 グループ3 (マウス3匹) およびCNT0888 / C1142 グループ4 (マウス2匹) には腫瘍のないマウスがいた。腫瘍重量を比較した場合、CNT0888テストグループは各々、PBS対照グループに比較して腫瘍重量の有意な削減を示した (表8)。2 mg / kg で投薬されたCNT0888 / C1142 グループにおける阻害百分率は、80% (P = 0.006) であったが、一方20 mg / kg で投薬されたCNT0888 / C1142 グループについては、阻害は68% (P = 0.046) であった。C775 / C1142 グループも同様に腫瘍成長の有意な阻害を示した (P = 0.004)。腫瘍体積対腫瘍重量の結果の統計的解釈に見られた差異はおそらく、動物から切除された腫瘍秤量の精確さに比較して、キャリパによる腫瘍の体積測定が不精確であることに起因すると思われる。

30

【0279】

【表 13】

表8. 最終的な腫瘍重量

動物番号	PBS	cVaM+Hu IgG	C775+C1142	CNT0888+C1142*	CNT0888+C1142
1	0	0.142	0	0.089	0.116
2	0.34	0.349	0.075	0	0.13
3	0.368	0.302	0	0.04	0.028
4	0.239	0.667	0.032	0.123	0.13
5	0.386	0.268	0.273	0.198	0.453
6	0.222	0.178	0.018	0.065	0.059
7	0.926	0.531	0.044	0.196	0.058
8	0.484	0.485	0.307	0.128	0.029
9	0.564	0.302	0	0	0.024
10	0.459	0.28	1.328	0.031	0.356
平均					
腫瘍重量 (g)	0.399	0.350	0.208	0.087	0.138
SD	0.244	0.163	0.410	0.073	0.148

10

【0280】

集合的に、これらの結果は、確立された B x P C - 3 モデルにおいて、M C P - 1 およびマウス J E の遮断が腫瘍の成長を有意に阻害していること、および C N T O 8 8 8 が抗 - 腫瘍活性を有することを表している。

20

【0281】

以上の記述および実施例中で特に記されたものとは別な形で本発明を実施できるということは明白であろう。

【0282】

以上の教示に照らして、本発明の数多くの修正および変形形態が可能であり、従ってこれらは、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

【0283】

参考文献

【表 1 4 - 1】

Abraham R., Buxbaum, S. Link, J., Smith, R., Ventì, C., Darsley, M. (1996). Determination of Binding Constants of Diabodies directed against Prostate-specific Antigen using Electrochemiluminescence-based Immunoassays. *J. Mol. Recognit.*, 9(3-6):456-61.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA

Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP 3rd, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF, Strieter RM. (2001). Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 108(4):547-56.

10

Boder, E. T., Midelfort, K. S., Wittup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS* 97, 20, 10701-10705

Carnevale KA, Cathcart MK. (2003). Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem.* 278(28):25317-22.

Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. (2003). Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(6):748-55.

20

Chen, B.P., Hal, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994

Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881

30

【表 1 4 - 2】

- Conti P, DiGiacchino M. (2001). MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22(3):133-7.
- Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets.* 7(1):35-48.
- Ernst CA, Zhang YJ, Hancock PR, Rutledge BJ, Corless CL, Rollins BJ. (1994). Biochemical and biologic characterization of murine monocyte chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains. *J Immunol.* 152(7):3541-9.
- Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., & Goldberg M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol. Meth.* 77, 305-319.
- Frisch C., Brocks B., Ostendorp R., Hoess A., von Ruden T., and Kretzschmar T. (2003). From EST to IHC: human antibody pipeline for target research. *J Immunol Methods* 275, 203-212.
- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 103(6):773-8.
- Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration (accepted for publication in *Analytical Biochemistry*)
- Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, Krstenansky J, Lee S, McCarley D, Mulkins M, Wong B, Pease J, Mizoue L, Mirzadegan T, Polsky I, Thompson K, Handel TM, Jarnagin K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38(40):13013-25.
- Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(3):308-17.
- Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Diehl F, Freedman R, McCarley D, Polsky I, Ping-Tsou A, Kosaka A, Handel TM. (1999). Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry.* 38(49):16167-77.
- Jimenez-Sainz MC, Fast B, Mayor F Jr, Aragay AM. (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol.* 64(3):773-82.

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- Kretzschmar, T. and von Rüden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13:598-602.
- Leonard EJ, Yoshimura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1. *Immunol Today*, 11: 97-101.
- Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- Losy J, Zaremba J. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke*. 32(11):2695-6.
- Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260: 359-368
- Mahad DJ, Ransohoff RM. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*. 15(1):23-32.
- McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol*. 86(1):20-9.
- Nagy ZA, Hubner B, Löhning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf B, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. (2002). Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med* 8(8):801-7.
- Nakamura M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Ishida Y, Fujii C, Kondo T, Inoue M, Mukaida N. (2004). hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther*. 11(1):1-7.
- Neumark E, Sagi-Assif O, Shalmon B, Ben-Baruch A, Witz IP. (2003). Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNFalpha cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. *Int J Cancer*. 106(6):879-86.

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(3):534-9.

Nokihara H, Yanagawa H, Nishioka Y, Yano S, Mukaida N, Matsushima K, Sone S. (2000). Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 15;60(24):7002-7.

10

Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 22(4):773-8.

Piehler, J, Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G (1997). Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Meth.* 201, 189-206.

Prickett, KS, Amberg DC, Hopp TP (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques.* 7(6):580-9

20

Rauchenberger,R., Borges,E., Thomassen-Wolf,E., Rom,E., Adar,R., Yaniv,Y., Malka,M., Chumakov,I., Kotzer,S., Resnitzky,D., Knappik,A., Reiffert,S., Prassler,J., Jury,K., Waldherr,D., Bauer,S., Kretzschmar,T., Yayon,A., and Rothe,C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194-38205

Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.*2(3):242-56.

Rosé CE Jr, Sung SS, Fu SM. (2003). Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 10(3-4):273-88.

30

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 96(1):34-40.

Sarau HM, Rush JA, Foley JJ, Brawner ME, Schmidt DB, White JR, Barnette MS. (1997). Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and CCR2) on EoL-3 cells: a model system to examine the role of chemokines in cell function. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(1):411-8.

Sartipy P, Loskutoff DJ. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(12):7265-70.

40

【表 1 4 - 5】

- Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. Weiner, Marks, J. D. (1996a). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., Marks, J. D. (1996b). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551-567
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766
- Seli E, Selam B, Mor G, Kayisli UA, Pehlivan T, Arici A. (2001). Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause.* 8(4):296-301.
- Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 62(4):1160-70.
- Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. (2001). Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 108(3):375-81.
- Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. (2003). Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278(47):46654-60.
- Tenouchi H, Miki C, Ohmori Y, Kobayashi M, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N, Kusunoki M. (2004). Serum monocyte chemoattractant protein-1 in patients with postoperative infectious complications from gastrointestinal surgery for cancer. *World J Surg.* 28(2):130-6.
- Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 154(1):45-51.
- Voss, S. and Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982
- Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H. (2003). Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(11):1996-2001.

10

20

30

40

【表 1 4 - 6】

Yang, W., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., Barbas III, C. F. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392-403

Yoshimura T, Leonard EJ. (1999). Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol.*, 145(1):292-7.

Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP. (2003). Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell.* 4(3):191-6.

10

【配列表】

0004975020000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100149010

弁理士 星川 亮

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(74)代理人 110000741

特許業務法人小田島特許事務所

(72)発明者 ダス, アヌク

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8 7 ウェイン・スクールレーン 4 1 5

(72)発明者 スイート, レイモンド

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 1 0 ブリンマウア・オークスプリングスロード 7 0 0

(72)発明者 ツイ, ピング

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 1 2 パーウイン・パーウイン - パオリロード 1 2 3 7

(72)発明者 バルドロフ, ミヒヤエル

ドイツ 8 1 3 7 5 ムニヒ・シエトベーク 2 アー

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 0 2 6 4 0 (WO, A 2)

国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 6 7 6 9 (WO, A 2)

国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 4 9 2 1 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 3 9 9 1 3 (US, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

Science Direct

CA/REGISTRY(STN)