

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6215707号
(P6215707)

(45) 発行日 平成29年10月18日(2017.10.18)

(24) 登録日 平成29年9月29日(2017.9.29)

(51) Int.Cl.	F I					
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28	Z N A			
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A			
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15				
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19				
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21				

請求項の数 31 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-542608 (P2013-542608)	(73) 特許権者	598176569
(86) (22) 出願日	平成23年12月7日(2011.12.7)		キヤンサー・リサーチ・テクノロジー・リ
(65) 公表番号	特表2014-513519 (P2014-513519A)		ミテッド
(43) 公表日	平成26年6月5日(2014.6.5)		C A N C E R R E S E A R C H T E C
(86) 国際出願番号	PCT/GB2011/052421		H N O L O G Y L I M I T E D
(87) 国際公開番号	W02012/076883		イギリス・イーシー1ヴィー・4エーディ
(87) 国際公開日	平成24年6月14日(2012.6.14)		ー・ロンドン・セント・ジョン・ストリー
審査請求日	平成26年12月5日(2014.12.5)		ト・407・エンジェル・ビルディング
(31) 優先権主張番号	1020738.9	(74) 代理人	110001070
(32) 優先日	平成22年12月7日(2010.12.7)		特許業務法人SSINPAT
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ヘゲマン, ウルス ビート
(31) 優先権主張番号	61/420,370		ノルウェー エヌー0870 オスロ,
(32) 優先日	平成22年12月7日(2010.12.7)		ベルグスリア 27
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CCR4抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトCCケモカイン受容体4 (CCR4) に結合し、マクロファージ由来ケモカイン (MDC) および/または胸腺および活性化制御ケモカイン (TARC) のCCR4への結合を阻害することができ、かつ血小板の凝集を引き起こさない、3つの可変重鎖 (V_H) CDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域および3つの可変軽鎖 (V_L) CDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む抗体であって、前記V_H CDRおよびV_L CDRが下記(a) ~ (c) いずれかの組み合わせである抗体:

(a) 配列番号1のアミノ酸配列を有するV_H CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を有するV_H CDR2、配列番号20のアミノ酸配列を有するV_H CDR3、配列番号22のアミノ酸配列を有するV_L CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するV_L CDR2および配列番号24のアミノ酸配列を有するV_L CDR3;

(b) 配列番号1のアミノ酸配列を有するV_H CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を有するV_H CDR2、配列番号3のアミノ酸配列を有するV_H CDR3、配列番号4のアミノ酸配列を有するV_L CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するV_L CDR2および配列番号6のアミノ酸配列を有するV_L CDR3;

(c) 配列番号1のアミノ酸配列を有するV_H CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を有するV_H CDR2、配列番号3のアミノ酸配列を有するV_H CDR3、配列番号17のアミノ酸配列を有するV_L CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を有するV_L CDR2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するV_L CDR3。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体であって、前記抗体が、配列番号 39 の配列を持つ V_H ドメイン、および/または、配列番号 40 の配列を持つ V_L ドメインを持つ抗体。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の抗体であって、前記抗体が完全にヒト抗体である抗体。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、前記抗体が I g G 抗体である抗体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の抗体であって、前記 I g G 抗体は I g G₁ 抗体である抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、前記抗体が変化したグリコシル化パターンを持つ抗体。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の抗体であって、前記抗体の F c 領域に結合した N グリコシド結合複合型糖鎖全部の少なくとも 10、20、30、40、50、60、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または少なくとも 99% が、前記糖鎖の還元末端の N アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、抗体の抗原結合断片である抗体。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の抗体であって、前記抗体の抗原結合断片は、F a b'、F a b、F (a b')₂、T a n d A b、F v、s c F v、d s F v、d s s c F v、直鎖型抗体、ミニボディ、ディアボディ、二重特異性抗体断片、バイボディ、トリボディ、s c ディアボディ、B i T E (B i s p e c i f i c T - c e l l E n g a g e r : 二重特異性 T 細胞結びつけ抗体)、D V D (D u a l V a r i a b l e D o m a i n : 二重可変ドメイン) I g、S I P (S m a l l I m m u n o P r o t e i n : 小免疫タンパク質)、S M I P (S m a l l M o d u l a r I m m u n o P h a r m a c e u t i c a l : 小さいモジュラー免疫医薬)、または D A R T (D u a l A f f i n i t y R e T a r g e t i n g : 二重親和性再標的化) である抗体。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、前記抗体が、少なくとも治療薬または診断薬に結合している抗体。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の抗体であって、前記治療薬または診断薬は、放射線治療薬、化学治療薬、抗血管新生薬剤、アポトーシス誘導薬剤、抗チューブリン薬、抗細胞薬剤または細胞傷害性薬剤、ステロイド、サイトカインアンタゴニスト、サイトカイン発現阻害剤、ケモカインアンタゴニスト、ケモカイン発現阻害剤、抗炎症性コルチコステロイド、N S A I D、凝固剤、または抗ウイルス薬剤である抗体。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の抗体であって、前記抗ウイルス薬剤は、ヌクレオシド、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤からなる群より選択される抗体。

【請求項 13】

少なくとも請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、薬学的に許容可能な組成物。

【請求項 14】

リポソーム組成物またはナノパーティクル組成物である、請求項 13 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

少なくとも第2の治療薬をさらに含む、請求項13または14に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列領域を含む核酸分子。

【請求項 17】

前記ヌクレオチド配列領域が配列番号111および/もしくは112のヌクレオチド配列を持つ、請求項16に記載の核酸分子。

【請求項 18】

請求項16または17に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

10

【請求項 19】

請求項16または17に記載の核酸分子または請求項18に記載の発現ベクターを含む宿主細胞またはウイルス。

【請求項 20】

少なくとも第1容器に、

- (a) 請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体；
- (b) 請求項13～15のいずれか1項に記載の組成物；
- (c) 請求項16または17に記載の核酸分子；
- (d) 請求項18に記載の発現ベクター；および/または
- (e) 請求項19に記載の宿主細胞もしくはウイルス

20

を含むキット。

【請求項 21】

抗体を作製する方法であって、

(a) 請求項19に記載の宿主細胞を前記のコードされる抗体の発現に効果的な条件下で培養すること；および

(b) 前記の発現した抗体を前記宿主細胞から得ることを含む方法。

【請求項 22】

CCR4を検出または測定するインビトロ方法であって、CCR4を含むことが知られている、または、CCR4を含むことが疑われている試料を請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体と、前記CCR4と前記抗体の間の複合体を形成させるのに有効な条件下で接触させ、そして、そのようにして形成された前記複合体を検出または測定することを含む方法。

30

【請求項 23】

CCR4の発現もしくは活性に関連する病気の治療、画像化もしくは診断に使用される、または、動物でのCCR4発現に関連する免疫抑制の低下に使用される薬物の製造における、請求項1～12の何れか1項に記載の抗体の使用。

【請求項 24】

前記病気はCCR4が介在する疾患またはCCR4⁺細胞の異常増殖を特徴とする疾患である、請求項23に記載の抗体の使用。

40

【請求項 25】

前記病気は癌、炎症性疾患、免疫疾患または感染症である、請求項24に記載の抗体の使用。

【請求項 26】

前記病気は、(a) アレルギー性疾患、(b) 炎症性腸疾患、(c) 膣炎、(d) 乾癬および炎症性皮膚疾患、(e) 脈管炎、(f) 脊椎関節障害、(g) 強皮病、(h) 喘息および呼吸器アレルギー性疾患、(i) 自己免疫疾患、(j) 移植片拒絶反応、(k) アテローム性硬化症、筋炎、T細胞介在性神経変性病、多発性硬化症、脳炎、髄膜炎、肝炎、腎炎、敗血症、サルコイドーシス、アレルギー性結膜炎、耳炎、キャスルマン病、静脈洞炎、LPS誘導性内毒素ショック、ベーチェット症候群および痛風からなる、抑制さ

50

れるべき望ましくない炎症性反応を含む他の疾患、(1)乳癌、大腸直腸癌、食道癌、胃癌〔gastric_cancer〕、肝細胞癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌、腎臓癌、膵臓癌、子宮頸部癌、脳癌、前立腺癌、胃癌〔stomach_cancer〕、成人性T細胞白血病/リンパ腫(ATL)、末梢T細胞リンパ腫、分類不能びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、B細胞性慢性リンパ性白血病、菌状息肉腫およびセザリー症候群からなる癌、ならびに(m)ウイルス感染症、から選択される、請求項25に記載の抗体の使用。

【請求項27】

前記病気は、全身性アナフィラキシー、過敏症、薬品アレルギー、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)、刺虫アレルギー、食物アレルギー；クローン病、潰瘍性大腸炎、回腸炎、腸炎；皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹、掻痒症；アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、慢性閉塞性肺疾患、過敏性肺疾患；関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、I型糖尿病、糸球体腎炎；同種移植片拒絶反応、移植片対宿主病；エプスタイン・パール・ウイルス(EBV)感染症およびHIV感染症から選択される、請求項26に記載の抗体の使用。

10

【請求項28】

請求項23～27のいずれか1項に記載の抗体の使用であって、前記薬物の使用が動物でのCCR4発現に関連する疾患の診断であり、そして、前記薬物の使用が、

(a)動物を前記抗体と接触させる工程；ならびに、場合により、

(b)前記動物における抗体抗原複合体の存在および/または量および/または位置を測定または検出する工程；ならびに、場合により、

20

(c)前記動物における抗体抗原複合体の存在および/または量を対照と比較する工程

を含む、抗体の使用。

【請求項29】

前記動物でのCCR4量の増加が腫瘍細胞またはウイルス感染細胞の診断的特徴である、請求項28に記載の診断に使用される、薬物の製造のための前記抗体の使用である、請求項28に記載の抗体の使用。

【請求項30】

前記ウイルス感染細胞は、エプスタイン・パール・ウイルスおよびHIVから選択されるウイルスにより感染されている、請求項29に記載の抗体の使用。

30

【請求項31】

CCR4の発現もしくは活性に伴う病気の治療、またはCCR4発現に関連する免疫抑制の低下に使用される、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体を含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

本発明は抗体、CCR4生物学および関連の治療法の分野に全般的に関連する。より詳細には、本発明はCCR4に結合する抗体を提供する。そのような抗CCR4抗体は、腫瘍中の血管の画像化、癌の治療、ウイルスや他の感染症、および炎症性疾患や免疫疾患の治療などのCCR4と関連する疾患や病気での診断用途および治療用途を有する。本発明の抗体ベースの組成物および方法はまた免疫複合体および他の治療用配合物の使用、キットおよび方法にまで及ぶ。

40

【背景技術】

【0002】

背景

800を超えるメンバーをもって、Gタンパク質共役受容体(GPCR)はシグナル伝達に関わる細胞表面分子の最大のファミリーを成し、ヒトのゲノムによってコードされる

50

総遺伝子の2%超を占める。GPCRスーパーファミリーのメンバーは、3つの細胞内ループと3つの細胞外ループによって連結された細胞外N末端、細胞内C末端および7回膜貫通(TM)らせんという共通の膜トポロジーを共有する。それらが共有するトポロジー上の構造に基づいて、GPCRは7回膜貫通(7TM)受容体とも称される。これらの受容体は、神経伝達、内分泌腺および外分泌腺からのホルモンおよび酵素の放出、免疫反応、心筋および平滑筋の収縮と血圧調節を含む、重要な生理的機能を制御する。それらの機能不全が、最も蔓延しているヒトの疾患のいくつかの原因となる。GPCRが癌の進行と転移に重要な役割を持つことを示す実験データおよび臨床データが現れつつある。したがって、いくつかのGPCRが抗癌薬の適切な標的であり得る可能性がある。

【0003】

ケモカインは、特に、癌、ウイルスの感染、喘息およびアレルギー性疾患、ならびにリウマチ性関節炎やアテローム性硬化症などの自己免疫病理を含む、様々な疾患における免疫性および炎症性反応で重要な役割を果たす。これらの小分泌性分子は拡大しつつある、保存的な4個のシステインモチーフを特徴とする8~14kDaのタンパク質のスーパーファミリーである。

【0004】

ケモカインの作用は、Gタンパク質共役受容体のサブファミリーによって仲介されることが研究によって示されており、そのサブファミリーの中の一員はケモカイン(C-Cモチーフ)受容体4またはCCケモカイン受容体4(CCR4)と命名されている受容体である。CCR4の特異的なリガンドには胸腺および活性化制御ケモカイン(TARC)(CCCL17としても知られる)ならびにマクロファージ由来ケモカイン(MDC)(CCCL22としても知られる)というケモカインが含まれる。CCR4はRANTES、MCP-1およびMIP-1に結合することもでき、そして、これらのリガンドに応答したCCRシグナル伝達もまた報告されている。

【0005】

CCR4は特にT細胞走化性機能および食細胞の炎症部位への遊走において重要であると考えられている。CCR4はヘルパーT細胞2型(Th2)細胞および制御性T(Treg)細胞で優先的に発現するが、他の健康な細胞または組織では限定的な発現しか起こらない。

【0006】

腫瘍細胞、特に成人性T細胞白血病/リンパ腫細胞はCCR4について陽性であり得る。腫瘍細胞によるCCR4の発現は皮膚の関与と関連がある。ある種のT細胞悪性腫瘍は通常皮膚に位置する。例えば、高レベルのCCR4が皮膚T細胞リンパ腫病変に見いだされる。

【0007】

ある種の固形腫瘍がCCR4を発現することも最近発見された(国際公開第WO2009/037454号)。CCR4の発現は固形腫瘍、特に、子宮頸部、食道、腎臓、脳、乳腺、卵巣、前立腺、胃および膵臓の癌の癌形成における初期の事象であると考えられている。したがって、血液癌の細胞および非血液癌の細胞の両方がCCR4を発現することができる。結果として、抗CCR4抗体を使用してこれらの癌を診断、モニターそして治療することができる。

【0008】

さらに、CCR4は正常免疫および腫瘍免疫で重要な役割を有する。CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)のかなりの部分がCCR4陽性である(Baatar et al, 2007b)。これらのTregは様々な機序を介して免疫反応を抑制するが、それらは腫瘍特異的免疫を抑制することができることが示されている。支質、腫瘍それ自体または流入領域リンパ節に浸潤するTregの数の増加は様々な癌での治療効果の悪化と相関がある。Treg活性の減少により内在性の抗腫瘍免疫性が上昇し、免疫系による抗腫瘍介入の有効性が上昇することがマウスモデルでの研究により示されている。結果として、Treg機能の抑制が腫瘍の免疫療法での有望な戦略となる。その抑制はTregの殺滅(除去)

10

20

30

40

50

、それらのサプレッサー機能への干渉、それらの輸送パターンの変更またはそれらの分化の改変によって達成され得る。

【0009】

CCR4⁺T細胞白血病/リンパ腫の患者の小集団では、腫瘍細胞それ自体がT_{reg}細胞として機能し、宿主の抗腫瘍免疫反応に直面して腫瘍が生存する原因となる。他の種類の癌では、腫瘍細胞と腫瘍微小環境がMDCとTARCを産生し、そして、MDCとTARCがCCR4⁺T_{reg}細胞をその腫瘍に誘引し、そこでそれらは宿主の免疫反応から腫瘍が免れるのに好適な環境を作り出す。以下の癌を有する患者の末梢血でT_{reg}のより高い発生頻度が報告されている：乳癌、大腸直腸癌、食道癌、胃癌、肝細胞癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌および膵臓癌。T_{reg}細胞が腫瘍にとって好適な環境を作り出すことが報告されている。したがって、CCR4とMDCなどのそのリガンドとの間の相互作用を妨げることが癌、特に上記の癌の治療または予防に有用であり得るであろう。SCIDマウスモデルにおいて、ヒトMDC/CCCL22に対する抗体によって、移植されたヒト卵巣腫瘍へのヒトT_{reg}細胞の浸潤を妨げることができたと報告されている。ヒトの固形腫瘍に存在するT_{reg}細胞が、腫瘍成長および転移の鈍化の原因となり得る免疫エフェクター反応が生じることを妨げると考えられている。したがって、CCR4に対する中和性MAb（モノクローナル抗体）の使用による、腫瘍塊でのT_{reg}細胞の殺滅および/またはT_{reg}細胞の腫瘍部位への遊走の阻止が固形腫瘍に対する免疫反応の増強をもたらすことになり得るし、従来 of 細胞傷害性治療法および抗ホルモン性治療法への補助手段として機能し得る。

10

20

【0010】

ヒトの死因全てのうち約13%は癌が原因である。米国癌協会によると、2007年には世界で760万人の人々が癌のために死亡しており、そのため、さらなる抗癌治療薬への強い、そして、緊急の必要性が残されている。

【0011】

炎症および免疫障害にCCR4が役割を果たすことが示されている。Th2細胞および好塩基球は肺および皮膚でのアレルギー反応に重要な細胞である。アレルギーで刺激された喘息患者の気管支生検組織でのCCR4発現T細胞の存在と気道上皮細胞でのCCR4リガンド（MDC、TARC）の同時発現について記載する多数の報告がある（Panina-Bordignon et al, 2001）。CCR4⁺T細胞はまた、アトピー性皮膚炎の患者で多数発見されており、その疾患が改善すると顕著なCCR4⁺T細胞の減少が観察される。アレルギーでの刺激の前に抗体でCCR4をブロックすることによって、気道のアレルギー性炎症ならびに肺でのTh2サイトカインレベルが低下することが喘息のヒト化SCIDマウスモデルを使用して示された。ブロッキング抗体の肺送達を介したCCR4⁺T細胞の除去は喘息患者にとって適切な治療オプションであり得る。CCR4ブロッキング抗体の皮膚への標的型送達もまたアトピー性皮膚炎の魅力的な治療法であり得る。

30

【0012】

アレルギー性喘息では、高レベルのアレルゲン特異的なIgEの存在は、一般的に吸い込まれた環境中のアレルゲンに対する異常なTh2細胞免疫反応の反映である。喘息は、Th2リンパ球と好酸球の浸潤およびTh2ケモカインの産生を特徴とする。入ってくる外来の抗原を常にサンプリングする樹状細胞（DC）によってアレルゲンがT細胞に提示される。DCによって適切に活性化されると、罹患した気道に存在するアレルゲン特異的リンパ球が、白血球の血管外湧出、杯細胞過形成および気管支過敏症（BHR）をさらに制御するTh2サイトカインであるインターロイキン（IL）-4、IL-5およびIL-13を産生する。DCが産生したTARCとMDCが誘因性CCR4を介して、Th1細胞ではなく、Th2細胞の選択的遊走を誘導する（Perros et al, 2009）。アレルギーでの刺激後の気管支肺胞洗浄液（BAL）におけるCD4⁺T細胞と好酸球の数、Th2サイトカインの産生および気道過敏性が抗TARC抗体での処理により低下することが喘息のマウスモデルで示された（Kawasaki et al, 2

40

50

001)。対照的に、CCR4欠損マウスは気道の炎症とBHRに対する何の防御も示さなかった (Chvatcko et al, 2000)。アレルゲンでの刺激の前に抗体でCCR4をブロックすることによって、気道のアレルギー性炎症ならびに肺でのTh2サイトカインレベルが低下することが喘息のヒト化SCIDマウスモデルを使用して示された (Perros et al, 2009)。これらのデータは、CCR4の妨害が、ヒトでのアレルギー性炎症の抑制にとって、実現可能な戦略であることを示す。

【0013】

T_{reg}細胞は樹状細胞(DC)を抑制し、それによって疾患、特に、感染症および癌の発生と進行を促進することができる。それ故、T_{reg}細胞による樹状細胞の抑制を妨害することが可能である抗CCR4抗体はワクチンのアジュバントとして、特に腫瘍ワクチン接種または感染症に対するワクチン接種におけるアジュバントとして有用であり得る。したがって、抗CCR4抗体はワクチンの治療効果を向上することができ、とりわけ、ワクチン誘導性免疫反応を増強する。

10

【0014】

CCR4結合化合物がマウスでのアレルギー性炎症に効能を示すことが報告されている (Purandare et al, 2007, Burdi et al, 2007)。TARCによって誘導される腹膜への白血球のCCR4依存性のリクルートがほぼ90%抑制されたように、CCR4結合化合物が妥当な力価をインビボで有することが報告されている。ヨコヤマとその同僚たちが、マウスモデルでの過敏症の低下に有効であることがインビボで判明した、CCR4を標的とするキナゾリン誘導体を発表した (Yokoyama et al, 2008b)。この化合物の誘導体は経口投与によって同様のインビボマウスモデルで有効であることが判明した (Yokoyama et al, 2009)。近年、一群の科学者たちがインシリコモデリングアプローチを用いて多数のCCR4アンタゴニストを同定してきている (Bayry et al, 2008; Davies et al, 2009)。その筆者らは、モデル化されたCCR4に化合物をドッキングすることによって、膜貫通領域内に結合することができる分子を発見した。16種の化合物がCCR4-CEM細胞のCCR4介在性遊走を抑制した。CCR4アンタゴニストが結核菌へのワクチンおよびB型肝炎へのワクチンとのアジュバント機能についてインビボで試験されると、細胞性免疫反応と液性免疫反応の両方について免疫原性の上昇が観察された。観察された効果はT_{reg}活性の阻害が原因であるとされた (Bayry et al, 2008; Davies et al, 2009)。T_{reg}細胞のかなりの部分がCCR4陽性であるという事実は当技術分野において周知である (Baatar et al, 2007b)。観察された効果が(例えば、ウイルス、細菌、マイコバクテリウムまたは原生動物などの寄生生物が原因の)感染症に対するワクチン接種という関係ばかりか、癌ワクチンという関係でも有用であると考えられている。

20

30

【0015】

これらの化合物のアジュバントとしての効能の理由はCCR4介在性シグナル伝達を遮断することによるT_{reg}の阻害に基づくので、CCR4へ拮抗的に結合する抗体は同様に作用すると予想される。低分子薬と比較した、抗体の薬理学的な利点は当技術分野において周知である。協和発酵による抗CCR4抗体KW-0761は当技術分野において公知である。しかしながら、この抗体はADCCによってのみ効果的であり、CCR4受容体を介したリガンド介在性シグナル伝達を妨害しない。それ故、本発明に記載される抗体はそれらのT_{reg}を介した免疫反応の調節において明らかに優れていることが期待される。

40

【0016】

臨床上の用途でT_{reg}が調節される別の適用例は癌の治療である。T_{reg}は腫瘍特異的免疫性を抑制することができ、それらの数の増加はいくつかの癌で予後不良および疾患の進行と相関する。T_{reg}活性の低下が内在性の抗腫瘍免疫性を押し上げ、能動的免疫介入の有効性を増大させることがマウスモデルでの研究により示されている。結果として、T_{reg}機能の抑制がヒトの癌の免疫療法において考慮に値する戦略となる (Curriel, 2008; Ruter et al, 2009)。この抑制はT_{reg}の調節によっても

50

、それらを直接殺滅することによっても達成され得る。

【0017】

このアプローチの例は、CD25のような T_{reg} の他の表面を標的とする化合物により、当技術分野において記述されている。ダクリズマブ（ゼナパックス（登録商標）；Roche）およびバシリキシマブ（シムレクト（登録商標）；Novartis）は、自己免疫疾患、移植、およびHTLV-1誘発性成人性T細胞リンパ腫/白血病（Church, 2003）を含む癌での使用について承認された抗ヒトCD25抗体である。デニロイキンジフチトクス（オンタック（登録商標）、DAB389IL-2；Ligand Pharmaceuticals Inc.）は、ジフテリア毒素の活性ドメインをヒトIL-2に融合した組換えタンパク質である。1998年にFDAは皮膚T細胞白血病/リンパ腫の治療にデニロイキンジフチトクスを承認しているが（Olsen et al, 2001）、それらは通常 $CD4^+CD25^+$ である。デニロイキンジフチトクスはIL-2受容体にターゲットされるが、エンドサイトーシスによりCD25を介して内部に取り込まれると主張されている。腎臓細胞癌の患者でデニロイキンジフチトクスが腫瘍ワクチンの免疫原性を向上させるという証拠もある（Dannull et al, 2005）。さらに、デニロイキンジフチトクスが黒色腫で T_{reg} の数と機能を低下させ、黒色腫特異的な免疫性を向上させることが報告された（Mahnke et al, 2007）。

10

【0018】

癌治療または癌ワクチンの効果の改善のために標的とされる T_{reg} 上の他の分子にはGITR（グルココルチコイド誘導性腫瘍ネクローシス因子受容体関連遺伝子）（Levings et al, 2002）、ヒト T_{reg} を含む様々な哺乳類細胞で広範に発現するToll様受容体（TLR）（Yang et al, 2004, Rutter et al, 2009）および細胞傷害性Tリンパ球抗原-4（CTLA-4；CD152）（Sutmuller et al, 2001）が含まれる。現在では抗CTLA-4モノクローナル抗体治療法の第II相および第III相臨床試験が黒色腫で行われているところであり、他の種類の腫瘍で第I相および第II相試験が行われている。2つのヒトモノクローナル抗体、すなわち、イピリムマブ（MDX-010；Bristol Myers Squibb/Medarex）およびトレメリムマブ（tremelimumab）（CP-675,206；Pfizer）が研究中である。

20

30

【0019】

特に次の障害、すなわち、成人性T細胞白血病/リンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、分類不能びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、B細胞性慢性リンパ性白血病、エプスタイン・バー・ウイルス（EBV）感染症、菌状息肉腫（成熟型T細胞リンパ腫）、セザリー症候群（菌状息肉腫の異型）、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ABPA）、喘息、LPS誘導性内毒素ショック、アレルギー性炎症、多発性硬化症（MS）などのT細胞介在性神経変性病、乾癬、キャスルマン病およびリウマチ性関節炎（RA）などの自己免疫疾患にCCR4が関係するとされている。

【0020】

それらの複雑な構造のため、GPCRは特異的な抗体を産生させるのが「難しい標的」であると考えられている。それらは溶解した細胞の膜画分から容易に精製することもできないし、正しく折り畳まれた可溶性タンパク質として様々な発現系で組換え技術により作製されることもできない。発明者らの知識によれば、これまで、ファージディスプレイを用いて抗GPCR抗体を作製しようとする他の研究者の公知の試み全てが成功していないことが分かっている。

40

【0021】

GPCRに対する抗体の作製に関わる困難がHoogenboom et al., 1999において提示されている。さらに、Sui et al. (2003)は、GPCRケモカイン受容体CXCR4に対するヒト抗体を得る試みに関わる困難を説明し、ス

50

テップバック選択を組み合わせたパスマインダー法を用いても特異的な抗体を同定することができなかったことを報告している。したがって、GPCRの分野では、特異的な抗体の作製は未だ大きな課題である。

【0022】

ヒトCCR4と反応する1G1という名称のマウスモノクローナル抗体がBD Pharmingenより市販されている。免疫蛍光染色にこの抗体を使用することができるが、その抗体は中和性抗体ではない。

【0023】

KM2760という名称のCCR4に対するキメラ抗体がIshida et al., 2006で開示されている。この抗体はCCR4のそのリガンドであるMDCまたはTARCへの結合を妨げないことを筆者らは報告している。

10

【0024】

CCR4を認識するその他の抗体の同定は治療オプションの数を拡大する点で有益であるということを筆者らは認識している。特に、CCR4のそのリガンドの1つ以上への結合を妨げる抗体がさらなる治療手段を提供するであろう。

【0025】

発明者らはまた、免疫学的な観点から忍容性が良好なヒトの治療用の治療薬の開発が有利であると認識している。この点に関し、ヒト抗体は一般に、ヒト治療法での使用に少なくとも3点の潜在的な利点を有する。第一に、ヒト免疫系はその抗体を外来物と認識しないであろう。第二に、ヒト循環系での半減期は天然のヒト抗体と同様であり、より少量で少ない頻度の用量が投与されることを可能にする。第三に、エフェクター部分がヒトのものであるので、ヒト免疫系の他の部分とよく相互作用する。

20

【0026】

それ故、当分野は、長期投与を含む、CCR4に関わる障害を持つ患者の安全で効果的な治療に使用され得る抗CCR4抗体を未だ欠き、そのような抗体の開発を挑戦的なものとしている。

【0027】

とりわけ、CCR4に対するヒト抗体の要求が存在する。ヒト抗体は一般に利点を示すことが認識されているが、ヒトの治療で成功する候補とするのに十分に高い親和性や適切な機能特性を有するヒト抗体の開発は決して簡単ではないことが知られている。このことは、それらの複雑で膜貫通という性質のため、GPCRにずっとよく当てはまる。

30

【0028】

CCR4とMDCおよび/またはTARCなどのそのリガンドの1つ以上との間の結合を妨げることができる抗CCR4抗体への強い必要性も依然として存在する。

【発明の概要】

【0029】

本発明の説明

本発明は、腫瘍、ウイルス感染症、ならびに炎症性障害または免疫障害など、CCR4⁺細胞が関与している他の疾患および病気の安全かつ有効な治療に使用する新規治療用組成物および方法を提供することで、先行技術に存在する一定の限界を克服する。本発明は、CCR4、好ましくはCCR4の細胞外ドメインのエピトープに結合する抗体、特にヒト抗体に基づくものである。そのような抗体は、腫瘍、ウイルス感染症、ならびに炎症性または免疫疾患などのCCR4⁺細胞が関与している他の疾患および病気の治療に有効である。本発明の組成物および方法は、この特定のカテゴリーの抗体を使用する免疫複合体および組み合わせの使用にも及ぶものである。

40

【0030】

本発明の特別な利点は、提供される抗体がMDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することである。このことは、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害しない、医療分野における先行の抗体とは対照的である。

【0031】

50

発明者らは、CCR4に結合するCCR4特異的抗体を調製した。例えば、この抗体はCCR4⁺細胞、具体的にはCCR4を導入したHEK293T細胞、CCR4を導入したDT40細胞およびCCR4を天然に発現しているCCRF-CEM細胞、ならびにCCR4を発現している次の細胞、すなわち、Hut78細胞（皮膚T細胞リンパ腫、ATCC寄託番号TIB-161）、786-O細胞（ヒト腎細胞癌、ATCC寄託番号CRL-1932）、MCF-7細胞（ヒト乳房腺癌、ATCC寄託番号HTB-22）、KatoIII細胞（ヒト胃癌、ATCC寄託番号HTB-103）、L-428細胞（非ホジキンリンパ腫、DSMZ寄託番号ACC197）およびA-498細胞（ヒト腎細胞癌、DSMZ寄託番号ACC55）に結合する（実施例2を参照のこと）。ここで重要な事は、CCR4⁻細胞、すなわちCCR4を発現していない細胞には、この抗体が有意に結合しないことである。したがって、本明細書で開示する抗体は、CCR4に特異的に結合し、本明細書で論じる病気の診断や治療に有効な候補となる。

10

【0032】

CCR4の細胞外ドメインにあるエピトープに結合する本発明の好ましい抗体分子、ならびにそれらの相補性決定領域(CDR)を含む抗体のV_HおよびV_Lドメインのアミノ酸配列および/またはDNA配列を、本明細書に挙げる様々な配列番号で示す。

【0033】

したがって本発明は、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる抗体を提供する。前記抗体は、好ましくは単離された抗体である。前記抗体がヒト抗体であることもまた好ましい。好ましくは、前記抗体はCCR4の細胞外ドメインにあるエピトープに結合する。CCR4は好ましくはヒトCCR4である。したがって、「CCR4への結合」への言及はいずれも、「CCR4の細胞外ドメインにあるエピトープへの結合」という好ましい実施形態を含む。

20

【0034】

したがって本発明は、好ましくはヒトCCR4の細胞外ドメインにあるエピトープに結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる単離されたヒト抗体を提供する。

【発明を実施するための形態】**【0035】**

一実施形態において本発明は、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる抗体であって、本明細書に開示の表に挙げた重鎖CDR配列のうちの1つを含む少なくとも1つの重鎖CDR、および/または本明細書で開示の表に挙げた軽鎖CDR配列のうちの1つを含む少なくとも1つの軽鎖CDRを含む抗体を提供する。前記抗体は、好ましくは少なくとも2つ、または3つの重鎖CDRおよび/または軽鎖CDRを含み、CDRはそれぞれ、本明細書で開示の表に挙げた対応する配列を含む。

30

【0036】

一実施形態において本発明の抗体は、配列番号1、2、3、4、5および6；もしくは1、2、3、17、5および6；もしくは1、2、20、22、5および24；もしくは26、27、20、22、5、24、または前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列からなる群より選択される1つ以上の、例えば少なくとも2つ、3つ、4つまたは5つ、好ましくは6つのCDRを含む。

40

【0037】

一実施形態において抗体は、配列番号1もしくは26の重鎖CDR1、配列番号2もしくは27の重鎖CDR2および配列番号3もしくは20の重鎖CDR3、もしくは前述の配列番号のいずれかに実質的に相同な配列、ならびに/または配列番号4、17もしくは22の軽鎖CDR1、配列番号5の軽鎖CDR2および/もしくは配列番号6もしくは24の軽鎖CDR3、もしくは前述の配列番号のいずれかに実質的に相同な配列を含む。

【0038】

したがって一実施形態において抗体は、配列番号26の重鎖CDR1、配列番号2の重

50

鎖 C D R 2 および配列番号 2 0 の重鎖 C D R 3 を含む。好ましくは、前記抗体はさらに、本明細書に示す配列から選択される軽鎖 C D R を含む。

【 0 0 3 9 】

一実施形態では、本明細書に開示した抗体の重鎖 C D R 1 はいずれも配列 S Y A X S を有し、ここで X はいずれのアミノ酸であってもよく（配列番号 1 1 9）、好ましくは M または I であり（配列番号 1 2 0）；および / または本明細書に開示した抗体の重鎖 C D R 2 はいずれも配列 G I I P I F G T X N Y A Q K F Q G を有し、ここで X はいずれのアミノ酸であってもよく（配列番号 1 2 1）、好ましくは V、I または A であり（配列番号 1 2 2）；および / または本明細書に開示した抗体の重鎖 C D R 3 はいずれも配列 R X₁ G X₂ X₃ F D Y を有し、ここで X はそれぞれ独立していずれのアミノ酸であってもよく（配列番号 1 2 3）、好ましくは、X₁ は R または G であり、および / または X₂ は S または A であり、および / または X₃ は Y または K であり、最も好ましくは、X₁ は R または G であり、および X₂ は S または A であり、および X₃ は Y または K であり（配列番号 1 2 4）；および / または本明細書に開示した抗体の軽鎖 C D R 1 はいずれも配列 S G S T S N I G S H Y V X を有し、ここで X はいずれもアミノ酸であってもよく（配列番号 1 2 5）、好ましくは F、S または V であり（配列番号 1 2 6）；および / または本明細書に開示した抗体の軽鎖 C D R 2 はいずれも配列番号 5 の配列を有し；および / または本明細書に開示した抗体の軽鎖 C D R 3 はいずれも配列 A V W D X X X X G W V を有し、ここで X はそれぞれ独立していずれのアミノ酸であってもよく（配列番号 1 2 7）、好ましくは、X₁ は A または D であり、および / または X₂ は K または T であり、および / または X₃ は Y または L であり、および / または X₄ は R または S であり、より好ましくは、X₁ は A または D であり、および X₂ は K または T であり、および X₃ は Y または L であり、および X₄ は R または S である（配列番号 1 2 8）。

【 0 0 4 0 】

このことは、本明細書に開示した V_H、V_L、s c F v および I g G 配列に対して適用される。したがって C D R 配列を含む本明細書に開示した配列はいずれも、表 1 ~ 9 に挙げた対応する C D R 配列の代わりに、好ましくは配列番号 1 1 9 ~ 1 2 8 のうちの 1 つ以上を含む。

【 0 0 4 1 】

特に好ましい一実施形態において抗体は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 の重鎖 C D R 2 および配列番号 3 もしくは 2 0 の重鎖 C D R 3 を含む。好ましくは、前記抗体はさらに、配列番号 4、1 7 もしくは 2 2 の軽鎖 C D R 1、配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 および / または配列番号 6 もしくは 2 4 の軽鎖 C D R 3、または前述の配列番号のいずれかに実質的に相同な配列を含む。

【 0 0 4 2 】

一実施形態において抗体は、配列番号 2 6 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 7 の重鎖 C D R 2 および配列番号 2 0 の重鎖 C D R 3 を含む。好ましくは、前記抗体はさらに、配列番号 4、1 7 もしくは 2 2 の軽鎖 C D R 1、配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 および / または配列番号 6 もしくは 2 4 の軽鎖 C D R 3、または前述の配列番号のいずれかに実質的に相同な配列を含む。

【 0 0 4 3 】

一実施形態において抗体は、配列番号 4、1 7 または 2 2 の軽鎖 C D R 1、配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 および配列番号 6 または 2 4 の軽鎖 C D R 3 を含む。好ましくは、前記抗体はさらに、配列番号 1 もしくは 2 6 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 もしくは 2 7 の重鎖 C D R 2 および / または配列番号 3 もしくは 2 0 の重鎖 C D R 3、または前述の配列番号のいずれかに実質的に相同な配列を含む。

【 0 0 4 4 】

一実施形態において抗体は、配列番号 4 または 1 7 の軽鎖 C D R 1、配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 および配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 を含む。好ましくは、前記抗体はさらに、配列番号 1 もしくは 2 6 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 もしくは 2 7 の重鎖 C D R 2 および / ま

10

20

30

40

50

たは配列番号3もしくは20の重鎖CDR3、または前述の配列番号のいずれかに実質的に相異なる配列を含む。

【0045】

一実施形態において抗体は、配列番号22の軽鎖CDR1、配列番号5の軽鎖CDR2および配列番号24の軽鎖CDR3を含む。好ましくは、前記抗体はさらに、配列番号1もしくは26の重鎖CDR1、配列番号2もしくは27の重鎖CDR2および/または配列番号3もしくは20の重鎖CDR3、または前述の配列番号のいずれかに実質的に相異なる配列を含む。

【0046】

ある特に好ましい抗体は、配列番号1の重鎖CDR1ドメイン、配列番号2の重鎖CDR2ドメイン、および配列番号3の重鎖CDR3ドメインを含み；ならびに、配列番号4の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号6の軽鎖CDR3ドメインを含む。

10

【0047】

ある特に好ましい抗体は、配列番号1の重鎖CDR1ドメイン、配列番号2の重鎖CDR2ドメイン、および配列番号3の重鎖CDR3ドメインを含み；ならびに、配列番号17の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号6の軽鎖CDR3ドメインを含む。

【0048】

ある最も好ましい抗体は、配列番号1の重鎖CDR1ドメイン、配列番号2の重鎖CDR2ドメイン、および配列番号20の重鎖CDR3ドメインを含み；ならびに、配列番号22の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号24の軽鎖CDR3ドメインを含む。

20

【0049】

特に好ましい抗体は、配列番号26の重鎖CDR1ドメイン、配列番号27の重鎖CDR2ドメイン、および配列番号20の重鎖CDR3ドメインを含み；ならびに、配列番号22の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号24の軽鎖CDR3ドメインを含む。

【0050】

さらなる実施形態において本発明は、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる抗体であって、3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む抗体を提供し、ここで前記重鎖可変領域は、

30

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖可変(V_H)CDR1、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および

(iii) 配列番号3のアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含み；および/または前記軽鎖可変領域は、

(i) 配列番号4、17または22、好ましくは4または17のアミノ酸配列を有するV_LCDR1、

(ii) 配列番号5のアミノ酸配列を有するV_LCDR2、および

(iii) 配列番号6または24、好ましくは6のアミノ酸配列を有するV_LCDR3を含む。

40

【0051】

さらなる実施形態において本発明は、CCR4に結合し、かつ、MDCのCCR4への結合を阻害することができる抗体であって、3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む抗体を提供し、ここで前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖可変(V_H)CDR1、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列を有するV_HCDR2、および

(iii) 配列番号20のアミノ酸配列を有するV_HCDR3を含み；および/または

50

軽鎖可変領域は、

- (i) 配列番号 4、17 または 22、好ましくは 22 のアミノ酸配列を有する V_L CDR 1、
- (i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V_L CDR 2、および
- (i i i) 配列番号 6 または 24、好ましくは 24 のアミノ酸配列を有する V_L CDR 3 を含む。

【0052】

さらなる実施形態において本発明は、CCR4 に結合し、かつ、MDC の CCR4 への結合を阻害することができる抗体であって、3 つの CDR を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域とおよび 3 つの CDR を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域を含む抗体を提供し、

10

- ここで前記重鎖可変領域は、
- (i) 配列番号 26 のアミノ酸配列を有する重鎖可変 (V_H) CDR 1、
- (i i) 配列番号 27 のアミノ酸配列を有する V_H CDR 2、および
- (i i i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を有する V_H CDR 3 を含み；および/または前記軽鎖可変領域は、
- (i) 配列番号 4、17 および 22、好ましくは 22 のアミノ酸配列を有する V_L CDR 1、
- (i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V_L CDR 2、および
- (i i i) 配列番号 6 または 24、好ましくは 24 のアミノ酸配列を有する V_L CDR 3 を含む。

20

【0053】

本発明のある特に好ましい実施形態は、CCR4 に結合し、かつ、MDC および/または TARC の CCR4 への結合を阻害することができる抗体であって、配列番号 29、31、33、35、37、39、41、43 もしくは 45 のアミノ酸配列またはそれらに実質的に相同な配列を有する V_H ドメイン、および/または配列番号 30、32、34、36、38、40、42、44 もしくは 46 のアミノ酸配列またはそれらに実質的に相同な配列を有する V_L ドメインを含む抗体を提供する。

【0054】

好ましくは、前記 V_H ドメインは 3 つの重鎖 CDR を含み、および/または前記 V_L ドメインは 3 つの軽鎖 CDR を含む。より好ましくは、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、好ましくは 3 つの軽鎖 CDR 配列は、本明細書に開示した軽鎖 CDR 配列から選択され、および/または少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、好ましくは 3 つの重鎖 CDR 配列は、本明細書に開示した重鎖 CDR 配列から選択される。

30

【0055】

したがって、一実施形態において前記 V_H ドメインは、配列番号 29、31、33 もしくは 35 の配列またはそれらに実質的に相同な配列を有し、ならびに、配列番号 1 の重鎖 CDR 1 ドメイン、配列番号 2 の重鎖 CDR 2 ドメイン、および配列番号 3 の重鎖 CDR 3 ドメインを含む。

【0056】

一実施形態において前記 V_H ドメインは、配列番号 37、39、41 または 43 の配列またはそれらに実質的に相同な配列を有し、ならびに、配列番号 1 の重鎖 CDR 1 ドメイン、配列番号 2 の重鎖 CDR 2 ドメイン、および配列番号 20 の重鎖 CDR 3 ドメインを含む。

40

【0057】

一実施形態において前記 V_H ドメインは、配列番号 45 の配列またはそれらに実質的に相同な配列を有し、ならびに、配列番号 26 の重鎖 CDR 1 ドメイン、配列番号 27 の重鎖 CDR 2 ドメイン、および配列番号 20 の重鎖 CDR 3 ドメインを含む。

【0058】

一実施形態において前記 V_L ドメインは、配列番号 30 もしくは 34 の配列またはそれらに実質的に相同な配列を有し、ならびに、配列番号 4 の軽鎖 CDR 1 ドメイン、配列番

50

号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号6の軽鎖CDR3ドメインを含む。

【0059】

一実施形態において前記VLドメインは、配列番号32もしくは36の配列またはそれらに実質的に相同な配列を有し、ならびに、配列番号17の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号6の軽鎖CDR3ドメインを含む。

【0060】

一実施形態において前記VLドメインは、配列番号38、40、42、44もしくは46の配列またはそれらに実質的に相同な配列を有し、ならびに、配列番号22の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号5の軽鎖CDR2ドメイン、および配列番号24の軽鎖CDR3ドメインを含む。

【0061】

抗体は上で詳しく論じたVL配列およびVH配列のいずれの組み合わせであってもよいが以下の組み合わせが好ましい。

配列番号29またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインと配列番号30またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号31またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号32またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号33またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号34またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号35またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号36またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号37またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号38またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号39またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号40またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号41またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号42またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号43またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号44またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

配列番号45またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号46またはそれらに実質的に相同な配列のアミノ酸配列を有するVLドメイン。

【0062】

一層さらなる実施形態において本発明は、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる抗体であって、配列番号47（前記抗体は本明細書においては208 scFvとも呼ばれる）、配列番号48（前記抗体は本明細書においては306 scFvとも呼ばれる）、配列番号49（前記抗体は本明細書においては308 scFvとも呼ばれる）、配列番号50（前記抗体は本明細書においては406 scFvとも呼ばれる）、配列番号51（前記抗体は本明細書においては501 scFvとも呼ばれる）、配列番号52（前記抗体は本明細書においては503 scFvとも呼ばれる）、配列番号53（前記抗体は本明細書においては601 scFvとも呼ばれる）、配列番号54（前記抗体は本明細書においては603 scFvとも呼ばれる）、もしくは配列番号55（前記抗体は本明細書においては803 scFvとも呼ばれる）のアミノ酸配列を含む抗体、またはCCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる抗体であって、前述した配列の任意の断片もしくは上述した配列のいずれかに実質的に相同な配列を含む抗体を提供する。

【0063】

本発明は、モノクローナル抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803によって例示され、その一本鎖型を表1、2、3、4、5、6、7、8および9に示す（それぞれ、配列番号47、48、49、50、51、21、5

10

20

30

40

50

3、54および55)。完全長IgG型の抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803も作成し、その配列をそれぞれ、表10～18に示した。208、306、308、406、501、503、601、603および803抗体のCDRドメイン、V_HおよびV_Lドメインを表1～9に示す。これらのCDRドメインおよび/またはV_Hおよび/またはV_Lドメイン(またはそれらに実質的に相同な配列)を含む抗体が本発明の好ましい態様である。

【0064】

本発明の好ましい実施形態は、配列番号47を含むまたは配列番号47からなる208抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号56でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号48を含むまたは配列番号48からなる306抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号57でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号49を含むまたは配列番号49からなる308抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号58でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号50を含むまたは配列番号50からなる406抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号59でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号51を含むまたは配列番号51からなる501抗体のscFv型であり、この抗体は好ましくは配列番号60でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号52を含むまたは配列番号52からなる503抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号61でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号53を含むまたは配列番号53からなる601抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号62でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号54を含むまたは配列番号54からなる603抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号63でコードされている。本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号55を含むまたは配列番号55からなる803抗体のscFv型であり、この抗体は、好ましくは配列番号64でコードされている。

【0065】

他の好ましい実施形態は、208、306、308、406、501、503、601、603および803抗体のIgG型、好ましくは完全長IgG型である。これらの抗体のIgG1型が最も好ましい。

【0066】

したがって、本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号67(アミノ酸)の重鎖および/または配列番号68(アミノ酸)の軽鎖を含む、完全長IgG抗体である。配列番号65でコードされている重鎖、および/または配列番号66でコードされている軽鎖を含むIgG抗体もまた好ましい。

【0067】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号71(アミノ酸)の重鎖および/または配列番号72(アミノ酸)の軽鎖を含む完全長IgG抗体である。配列番号69でコードされている重鎖および/または配列番号70でコードされている軽鎖を含むIgG抗体もまた好ましい。

【0068】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号75(アミノ酸)の重鎖および/または配列番号76(アミノ酸)の軽鎖を含む完全長IgG抗体である。配列番号73でコードされている重鎖および/または配列番号74でコードされている軽鎖を含むIgG抗体もまた好ましい。

【0069】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号79(アミノ酸)の重鎖および/または配列番号80(アミノ酸)の軽鎖を含む完全長IgG抗体である。配列番号77でコードされている重鎖および/または配列番号78でコードされている軽鎖を含むIgG抗体もまた好ましい。

【0070】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号 83 (アミノ酸) の重鎖および/または配列番号 84 (アミノ酸) の軽鎖を含む完全長 I g G 抗体である。配列番号 81 でコードされている重鎖および/または配列番号 82 でコードされている軽鎖を含む I g G 抗体もまた好ましい。

【0071】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号 87 (アミノ酸) の重鎖および/または配列番号 88 (アミノ酸) の軽鎖を含む完全長 I g G 抗体である。配列番号 85 でコードされている重鎖および/または配列番号 86 でコードされている軽鎖を含む I g G 抗体もまた好ましい。

【0072】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号 91 (アミノ酸) の重鎖および/または配列番号 92 (アミノ酸) の軽鎖を含む完全長 I g G 抗体である。配列番号 89 でコードされている重鎖および/または配列番号 90 でコードされている軽鎖 (実質的に同一の重鎖および 2 本の実質的に同一の軽鎖) を含む I g G 抗体もまた好ましい。

【0073】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号 95 (アミノ酸) の重鎖および/または配列番号 96 (アミノ酸) の軽鎖を含む完全長 I g G 抗体である。配列番号 93 でコードされている重鎖および/または配列番号 94 でコードされている軽鎖を含む I g G 抗体もまた好ましい。

【0074】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列番号 99 (アミノ酸) の重鎖および/または配列番号 100 (アミノ酸) の軽鎖を含む完全長 I g G 抗体である。配列番号 97 でコードされている重鎖および/または配列番号 98 でコードされている軽鎖を含む I g G 抗体もまた好ましい。

【0075】

当然のことながら、完全長 I g G 抗体は、2 本の実質的に同一の重鎖と 2 本の実質的に同一の軽鎖を含む。

【0076】

本発明の抗体は、KM2160、KM3060、KM2760 および KW-0761 を含む既知の抗 CCR4 抗体ファミリーとは異なるエピトープに結合し得ると考えられている。KM2160 抗体は、CCR4 のペプチド断片に対して生じ、ヒト CCR4 (欧州特許第 1270595 号明細書) の N 末端から数えて 2 ~ 29 番目に位置するアミノ酸領域に存在するエピトープを認識するマウス抗体である。KM2760 は、同じ結合特性を有する抗体のキメラである (欧州特許第 1270595 号明細書)。抗体 KM3060 は、KM2760 と同一であるが、高度にフコシル化されている (Niwa et al. 2004, Cancer Research 64, 2127-2133)。KW-0761 は、ヒト化した KM2760 である (Ishida et al. Annals of Oncology 2008, vol 19, supplement 4, 513)。

【0077】

KM2760 は CCR4 と TARC または MDC の相互作用を阻害しないことが報告されており (Ishida et al. 2006, Cancer Research 66 (11), pp 5716-5722)、このことは、同等の抗体である KM3060 var (KM3060 に相当するが、別の宿主で発現させたことから異なる糖プロファイルを有する可能性がある) を用いた出願人の発見と一致する。一方、本発明の抗体が CCR4 と MDC 相互作用や CCR4 と TARC の相互作用を阻害することが分かった (実施例 3 を参照のこと)。このことは、本発明の抗体が、KM2160、KM3060、KM2760 および KW-0761 を含む先行技術ファミリーとは別のエピトープに結合することを強く示唆している。

【0078】

さらに、CCR4への結合について、抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803が互いに競合することが分かった。このことは、これらの抗体が同一の、同様のまたは少なくとも重なり合ったエピトープに結合することを示している。これらの抗体はどれも、KW-0761とはCCR4への結合の点で競合せず、このことは、KW-0761が別のエピトープに結合することを示している（実施例4）。

【0079】

また、本発明の抗体は、市販されている抗CCR4抗体である1G1とは別のエピトープに結合し得るとも考えられている。BD Pharmingenはこの抗体に関する技術データシートで、この抗体が中和抗体ではないことを公表している。対照的に、本発明の抗体は、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる。このことは、本発明の抗体が1G1抗体とは別のエピトープに結合することを強く示唆している。

10

【0080】

実質的に相同な配列のある特定の例は、開示したアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%または95%同一な配列である。ある特定の実施形態では、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる本発明の抗体は、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44または46のアミノ酸配列と少なくとも約70%、75%、80%または85%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、97%または98%および最も好ましくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の領域を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域；および/または配列番号29、31、33、35、37、39、41、43または45のアミノ酸配列領域を含む少なくとも1つの重鎖可変領域を含む。

20

【0081】

ある特定の実施形態では、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害することができる本発明の抗体は、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43または45のアミノ酸配列と少なくとも約70%、75%、80%または85%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、97%または98%および最も好ましくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の領域を含む少なくとも1つの重鎖可変領域；および/または配列番号30、32、34、36、38、40、42、44または46のアミノ酸配列領域を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む。

30

【0082】

実質的に相同な配列の他の好ましい例は、開示したアミノ酸配列に保存的アミノ酸置換を含む配列である。好ましくは、実質的に相同な配列は、V_Hドメイン全体にわたって、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下の変化したアミノ酸を含み、および/またはV_Lドメイン全体にわたって、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下の変化したアミノ酸を含む。そのような実施形態では、変化したアミノ酸（もしあれば）はいずれも、フレームワーク領域のみに見られる。

40

【0083】

いくつかの実施形態では、実質的に相同な配列は、開示したFR領域の一方または両方に、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下の変化したアミノ酸を含む。したがって好ましくは、実質的に相同な配列は、本明細書に開示した重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、重鎖FR4、軽鎖FR1、軽鎖FR2、軽鎖FR3、および/または軽鎖FR4に、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個以下の変化したアミノ酸を含む。

【0084】

軽鎖FR1を含む、本明細書に開示した配列のいずれかに実質的に相同な好ましい配列

50

は、軽鎖FR1の1番目のアミノ酸(セリン)が、別のアミノ酸、好ましくはグルタミン(Q)で置換されており、および/または軽鎖FR1の2番目のアミノ酸(チロシン)が別のアミノ酸、好ましくはセリン(S)に置換されている配列である。したがって、配列番号12、21または25に実質的に相同な好ましい配列は、これらの置換の好ましくは一方を、より好ましくは両方を有し、最も好ましくはSYの代わりにQSのアミノ酸で始まる。配列番号12、21または25を含むいずれの配列も、好ましくはこれらの置換の一方または両方を含む。したがって、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44または46、47~55、67、71、75、79、83、87、91、95または99に実質的に相同な好ましい配列は、FR1の1番目のSの代わりに別のアミノ酸、好ましくはQ、および/またはFR1の2番目のYの代わりに別のアミノ酸、好ましくはSを含む。したがって、配列番号12の好ましいホモログは、 $X_1X_2VLTQPSPA$ SGTPGQSVTISCであり、Xはそれぞれ独立していずれのアミノ酸であってもよく(配列番号129)、好ましくは、 X_1 はQ、および/または X_2 はSである(配列番号130)。配列番号21の好ましいホモログは、 $X_1X_2VLTQQPSPA$ SGTPGQSVTISCであり、Xはそれぞれ独立していずれのアミノ酸であってもよく(配列番号131)、好ましくは、 X_1 はQ、および/または X_2 はSである(配列番号132)。

【0085】

このことは、本明細書に開示したVL、scFvおよびIgGの配列に必要な変更を加えて適用される。したがって、FR1配列を含む本明細書に開示したいずれの配列も、好ましくは、表1~9に挙げた対応するFR1配列の代わりに配列番号129~132のうちの1つ以上を含む。

【0086】

実質的に相同な配列の他の好ましい例は、開示したCDR領域の1つ以上に、変更したアミノ酸を1つ、2つ、3つまたは4つまで、好ましくは1つまたは2つまで含む配列である。

【0087】

そのような実施形態の全てにおいて、そのような変更は保存的アミノ酸置換であっても非保存的アミノ酸置換であっても、またはその両方であってもよく、好ましくは、変更は保存的アミノ酸置換である。したがって一実施形態では、変更したアミノ酸は全て、保存的置換である。

【0088】

本明細書で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似した側鎖をもつ別のアミノ酸残基で置き換わっている置換である。類似した側鎖をもつアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において定義されており、それらには、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、グリシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β -分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。

【0089】

相同性はいかなる適切な方法で評価することもできる。しかしながら、配列間の相同性の程度を決定するには、配列の多重アラインメントを作成するコンピュータープログラム、例えばClustal W(Thompson et al., 1994)が有用である。必要に応じて、Clustal WアルゴリズムをBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff and Henikoff, 1992)および10のギャップ開始ペナルティーおよび0.1のギャップ拡張ペナルティーと共に使用することができ、その結果、一方の配列の全長の少なくとも50%がアラインメントに含まれる状態で、2つの配列間の一致が最も高くなる。配列をアラインメントさせるために使用す

10

20

30

40

50

ることができる他の方法は、2つの配列間の一致が最も高くなるように、かつ、2つの配列間で同一のアミノ酸の数が決定されるようにSmith and Waterman (1981)によって改変された、Needleman and Wunsch (1970)のアラインメント方法である。2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージを計算するための他の方法は、当技術分野で一般的に認知されており、そして、それらには、例えば、Carillo and Lipton (1988)に記載されるもの、およびComputational Molecular Biology, Lesk, ed. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projectsに記載されるものが含まれる。

10

【0090】

一般に、そのような計算にはコンピュータプログラムが使用される。配列を比較し、配列対を整列させるプログラム、例えばALIGN (Myers and Miller, 1988)、FASTA (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990)およびgapped BLAST (Altschul et al., 1997)、BLASTP、BLASTN、またはGCG (Devereux et al., 1984)もまたこの目的にとって有用である。さらに、European Bioinformatics instituteのDaliサーバーは、タンパク質配列の構造に基づくアラインメントを提供している (Holm, 1993; 1995; 1998)。

20

【0091】

基準点を設けることで、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性、配列同一性などを有している本発明に従う配列がALIGNプログラムを初期設定パラメーターと共に用いて (例えば、GENESTREAMネットワークサーバー、IGH、モンペリエ、フランス、で利用可能) 決定され得る。

【0092】

用語「実質的に相同」とは、本発明のタンパク質または核酸分子と実質的に同じ機能を、実質的に同じ方法で実行する、本発明のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列の修飾型または化学的均等物も含む。

30

【0093】

いずれの実質的に相同な抗体も、CCR4に、好ましくは問題の抗体によって認識されるのと同じCCR4のエピトープ、例えば、本明細書に記載の本発明のCDRドメインまたは本発明のV_HおよびV_Lドメインによって認識されるものと同じエピトープまたは同じ抗原に対する特異的な結合能を保持しているものとする。当技術分野で周知の、かつ、記載されている方法、例えばエピトープマッピングまたは結合アッセイ、例えば競合アッセイ、ELISAアッセイまたはBIACOREアッセイを用いる方法によって、同じエピトープ/抗原に対する結合を容易に試験することができる。したがって、抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803それぞれと同じ結合特性を持つ他の抗体や抗体断片の同定に結合アッセイを使用できることを、当業者は理解する。以下に例示するように、そのような他の抗体の同定に競合結合アッセイを使用することができる。以下に記載する方法は、適切な競合アッセイのうちのただ1つの例である。当業者は他の適切な方法や変異型を知る。

40

【0094】

好ましくは、いかなる実質的に相同な抗体も、抗体の機能、例えば本明細書の他の場所で定義した抗体の機能を保持するものとする。機能特性の保持は、当技術分野で周知の、かつ、記載されている方法で容易に試験することができる。

【0095】

いくつかの実施形態において実質的に相同な配列は、本明細書に開示した配列と比較して、以下の部位のうちの1つ以上を欠損している。

50

- 脱アミド化および/またはグリコシル化などの翻訳後修飾を受けやすい配列；
- タンパク質分解を受けやすい配列；および/または
- ヒトMHCクラスII受容体、すなわちT細胞エピトープに結合することができる配列。

【0096】

例えば、脱アミド化やグリコシル化などの翻訳後修飾やタンパク質分解に対する抗体配列の感受性、および/またはヒトMHCクラスII受容体への結合を判定するために、インシリコ試験を実施してもよい。ヒトMHCクラスII受容体への結合は、ヒトにおいてT細胞応答を引き起こす場合があるため、潜在的なT細胞エピトープを特定することは有用であり得る。翻訳後調節もしくはタンパク質分解を受けやすい部位であるか、またはT細胞エピトープだと推定されたアミノ酸またはペプチド配列をその後、修飾して感受性を変化させてもよい。したがって、実質的に相同な配列はそのような修飾を1つ以上含んでいてもよい。

10

【0097】

T細胞エピトープに関する試験には例えば、iTOPE(商標)(Antitope、ケンブリッジ、英国)と呼ばれるプログラムが含まれ得る。iTope(商標)は、ペプチドの34MHCクラスII対立遺伝子への結合をモデル化する、分子モデル化技術である。ペプチド結合に対する個々のアミノ酸の貢献度を各対立遺伝子について決定することができ、これによって、MHCクラスIIの結合溝と相互作用する9mer配列の正確な位置に関する情報が提供される。

20

【0098】

あるいはまたはそれに加えて、抗体の可変領域中のT細胞エピトープを同定し、そして、共通モチーフを同定するためにBLAST検索によってデータを調べることができるTCED(T細胞エピトープデータベース)プログラム(Antitope、ケンブリッジ、英国)を使用して配列を解析してもよい。

【0099】

標準的な技法を用いてエピトープマッピングを行うことができる。例えば、エピトープを同定し、定義付けるための以下の方法を本明細書で説明する。CCR4のアミノ酸配列は既に分かっているため、エピトープマッピング、例えばPepsicanアッセイを使用したエピトープマッピングに合成ペプチドを使用することができる。部位特異的突然変異生成もまた、エピトープマッピングの強力なツールであり、免疫複合体の形成における単一のアミノ酸の役割を評価するために利用することができる。タンパク質フットプリント法は、エピトープが抗体-抗原複合体として結合しているとき、エピトープは切断から保護されるという事に依存する。酵素免疫抗体法(ELISA)および血液凝集反応およびスロットブロット法もまた、エピトープマッピングに使用することができる。非直鎖状エピトープをマッピングするために抗体と抗原の結晶化を用いることができる。そのような方法を実施するためのプロトコルは広く利用可能であり、当業者は、エピトープマッピングの適切な別の方法を知る。

30

【0100】

フローサイトメトリーを使用した競合アッセイを行う前に、被検抗体の一部を、例えばビオチン化することで標識しなければならない。ビオチン化産物の機能性(細胞結合特性の保持)と、一定数のCCR4⁺細胞に対して最大に近い結合を示す本発明のビオチン化抗体(Ab1)の最小濃度を決定する。対数増殖期の培養細胞から、合計10⁶個の細胞を回収し、様々な濃度の抗体と、適切な期間、適切な温度で、例えば1時間、4でインキュベートする。細胞を洗浄し、適切な検出抗体と共に、適切な期間、適切な温度で、例えばさらに1時間、4でインキュベートする。洗浄した後、細胞をフローサイトメトリーで分析する。各被検抗体について、抗体濃度に対する蛍光強度の中間値(MFI)をプロットすることにより、データから飽和曲線を作成する。

40

【0101】

競合アッセイのため、上述のようにCCR4⁺細胞を調製し、一定の濃度の標識化(ビ

50

オチン化)抗体 (bio-Ab1) と様々な濃度の標識していない競合抗体との混合物で CCR4⁺細胞を2組処理することができる。一定の濃度とは、一定数の腫瘍細胞に対して妥当な蛍光シグナルを生成する、上述のように決定した抗体の最小濃度である。理想的には、ナノモルの単位のこの一定の濃度は、平衡時の処理抗体の親和性 (K_D) より低い。この場合、記載される方法を使用して、競合抗体の親和性を推定することができる (Schodin and Kranz, 1993, J Biol Chem 268: 25755-7)。抗体混合物を、標的細胞と共に、適切な期間、適切な温度で、例えば1時間、4℃でインキュベートする。細胞を洗浄し、FITCで標識したストレプトアビジンと共にインキュベートすることで、ビオチン化抗体の細胞結合を明らかにする。それぞれの被検試料について測定した蛍光の中間値 (bio-Ab1 + Ab2) からバックグラウンドの蛍光 (PBS-5%FCS) を引いた後、各Ab2濃度「c」の阻害 (%) を、
$$\text{阻害}(\%) = (1 - \text{MFI}^{\text{bio-Ab1+Ab2}} / \text{MFI}^{\text{bio-Ab1}}) \times 100$$
 の式にしたがって計算する。

10

【0102】

全ての実施形態において、実質的に相同な配列を含む抗体は、CCR4に結合する機能とMDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害する機能を保持している。

【0103】

本発明の他の実施形態は、CCR4に結合し、かつ、MDCおよび/またはTARCのCCR4への結合を阻害する機能を有する結合タンパク質であって、本発明の抗体、本発明のV_HまたはV_Lドメイン、または本発明のCDRの1つ以上を含む結合タンパク質を提供する。好ましい実施形態では、そのような結合タンパク質は抗体である。

20

【0104】

本発明の好ましい抗体は、3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域とおよび3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む。これらのCDRの例示的な配列と好ましい配列を本明細書に記載する。

【0105】

本明細書で使用する場合、略語「CCR4」は、特段の指定のない限りまたは科学的用語法から明かでない限り、CCケモカイン受容体4 (CD194としても知られている) を意味する。CCR4は遊離しているCCR4、例えば組換えたまたは精製したCCR4であってもよいが、好ましくは天然の状態で、例えば細胞表面上に存在する。

30

【0106】

本発明の抗体または結合タンパク質はまた、CCR4の断片に、具体的には、細胞外ドメインを含むもしくは細胞外ドメインからなる断片に結合することもでき、またはCCR4もしくはCCR4断片を含むものに結合することができる。実際に、本発明の抗体のエピトープはCCR4の細胞外ドメインに局在している。

【0107】

「CCR4」はいずれの型のCCR4をも、具体的には、哺乳類に種を越えて保存されているCCR4を指す。したがって、本発明の抗体または抗体断片は例えば、ヒト、サル (例えばカニクイザル)、ウシ (ウシ科)、マウス、ラット、ハムスター、フェレット、モルモットおよび/またはウサギのCCR4に結合し得る。好ましくは、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトCCR4に結合する。したがって、特段の指定のない限り、「CCR4」に関する本明細書中の言及はいずれも、「ヒトCCR4」を意味するとみなされ得る。特に好ましい実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトおよびサル (例えばカニクイザル) のCCR4に結合する。他の好ましい実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトおよびマウスのCCR4に結合する。他の好ましい実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒト、サル、モルモットおよびマウスのCCR4に結合する。いくつかの好ましい実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトおよびサルのCCR4に結合するが、マウスのCCR4には結合しない。他の好ましい実施形態では

40

50

、本発明の抗体または抗体断片は、ヒトおよびサルのCCR4に結合するがマウスのCCR4には結合せず、例えばヒトおよびサルのCCR4のみに結合する。

【0108】

本発明の抗体がヒトおよびサルのCCR4に結合すること、および本発明の抗体がマウスのCCR4に結合する能力も有することが実施例で示されている。

【0109】

本明細書で使用する場合、本発明の抗体または抗体断片に関する「CCR4に結合する」または「抗CCR4」という用語は、以下に示す事柄の1つ以上が可能な、好ましくは以下に示す事柄の2つ以上が可能な、最も好ましくは以下に示す事柄の全てが可能な抗体または抗体断片を意味する。

(a) 細胞の表面上に発現しているCCR4に結合する。これは例えばフローサイトメトリーまたは免疫組織化学で評価される。

(b) 構造依存性の(例えば非直鎖状の)CCR4エピトープに結合する。これは例えば非還元条件下でのウェスタンブロットによるCCR4への結合によって評価される。

(c) 遊離しているCCR4、例えば組み換えによって固相担体上で発現しているCCR4に結合する。これは例えば、ELISAアッセイまたはBIACoreアッセイで評価される。

(d) 少なくともヒトCCR4に、より好ましくはヒトおよびサルのCCR4に、もしくはヒトおよびマウスのCCR4に、最も好ましくはヒト、サルおよびマウスのCCR4に結合する、またはヒトおよびサルのCCR4に結合するがマウスCCR4には結合しない

(e) 本明細書の他の部分でも論ずるように説明したように、ヒトのCCR4に10nM以下の結合親和性(Kd)で、好ましくは5nM以下、より好ましくは3nM以下または2nM以下、最も好ましくは1nM以下の結合親和性で結合する。

(f) 本明細書の他の部分でも論ずるように、同程度の親和性で、例えば10nM以下、好ましくは5nM以下、より好ましくは3nM以下または2nM以下、例えば1nM以下のKdで、ヒトおよびサルのCCR4に、またはヒトおよびマウスのCCR4に結合する、好ましくはヒトおよびサルのCCR4に結合するがマウスCCR4には結合しない。

(g) 本明細書の他の部分で説明するように、CCR4⁺細胞のADCCを誘導する。

(h) CCR4の、少なくともMDCおよび/またはTARCへの、好ましくはMDCおよびTARCへの、または好ましくは、少なくともMDCおよび/もしくはTARCとRANTES、MCP-1およびMIP-1 から選択される1つ以上への結合を阻害する

(i) インビボで抗腫瘍効果を誘導する。

(j) 腫瘍をもつ動物に投与すると、腫瘍に局在する。

(k) CCR4⁺細胞のCDCを誘導する。

(l) CCR4リガンドに対するCCR4介在性の細胞応答を阻害する。好ましくはCCR4リガンドに応答した、細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を阻害する。

(m) CCR4リガンド(MDCおよび/またはTARCなど)に対する、CCR4⁺細胞の走化性を抑制する。

【0110】

CCR4⁺細胞への結合に関して、本発明の抗体はCCR4⁺細胞に結合するが、CCR4⁻細胞には有意に結合しないことと理解されるべきである(実施例2に示す)。

【0111】

「CCR4⁻細胞に有意に結合しない」という用語は、CCR4⁻細胞に対する抗体のいかなる結合も、前記抗体の治療または診断目的での使用を妨げるものではないことと理解される。したがって、「有意でない」CCR4⁻細胞への結合は、CCR4⁻細胞に対する抗体の結合が1つ以上のCCR4⁺細胞に対する結合よりも弱いことを意味する。そのため、わずかに正常な細胞との交差反応が生じる可能性があるが、このレベルの結合は「バックグラウンド」結合と見なされる。治療または診断の目的では、治療または診断目的で使

10

20

30

40

50

用する際に抗体が接触する可能性のあるいずれのCCR4⁺細胞とよりも、1つ以上の型のCCR4⁺細胞と抗体がより強く結合しなければならないということが、主な課題である。

【0112】

本発明の抗体は、「CCR4特異的」とも称され得る。「CCR特異的」という用語は、CCR4を発現している細胞に対する抗体の結合が十分に特異的で、前記抗体を治療または診断目的で使用することができることと解釈されるべきである。標的のCCR4⁺細胞に対する結合強度を1つ以上の型のCCR4⁺細胞、例えば野生型（すなわちCCR4で形質転換していない）HEK293T細胞またはDT40細胞に対する結合強度を比較することで、当業者は、任意の所定の抗体がCCR4特異的かどうかを容易に決定することができる。

10

【0113】

CCR4⁺細胞と比較したCCR4⁺細胞への結合を、例えばフローサイトメトリーを使用して評価してもよいことを当業者は理解し、適切な例を実施例2で記述する。

【0114】

当技術分野で周知の免疫組織化学技術を利用して、細胞または試料に対する抗体の結合を点数化してもよい。そのような技術を使用して、特定の抗体の特異性を試験しても、または組織試料中のCCR4の発現を検出してもよい。簡単に説明すると、例えば、陽性対照（CCR4陽性であることが分かっている細胞）と陰性対照（CCR4陰性であることが分かっている細胞）を含むヒト組織の高密度アレイ上で、抗体を試験することができる。メンブレンの染色強度を4段階（0、1、2、3）の目視検査で評価することができる。好ましい抗体は、CCR4⁺の組織に対して低いまたは高い点数、好ましくは高い免疫組織化学的な点数を示す。

20

【0115】

CCR4抗体のCCR4陽性細胞株（CCRF-CEM）に対する結合が、ヒト血清の濃度を上昇させても阻害されないことが実施例で示される。したがって本発明の抗体は、好ましくは、血清が存在してもCCR4に結合することができ、その結合は血清によって有意には阻害されない。

【0116】

実施例2で試験した、様々なCCR4⁺細胞株に対する本発明の抗CCR4抗体の結合プロファイルは、いくつかのCCR4⁺細胞株に対する結合が、他のCCR4⁺細胞株に対する結合よりも強いことを示している。例えば、L-428に対する結合はCCRF-CEMに対する結合よりも弱い。理論に捉われるつもりはないが、このことは、L-428がCCR4のリガンドであるTARCを分泌しているため、CCR4結合部位をめぐって、本発明の抗CCR4抗体がそのリガンドと競合しているためであると考えられている（実施例3を参照のこと）。そのため、CCR4リガンドを分泌しない細胞を用いて、CCR4への結合が最もよく分析される。

30

【0117】

本発明の抗CCR4抗体の結合プロファイルは、KW0761の結合プロファイルと異なる。理論に捉われるつもりはないが、このことは、これらの抗体のエピトープ結合部位が異なるためであると考えられる（実施例4に概要を示す）。KW0761はCCR4とTARCの結合を阻害しないため、KW0761はL-428から分泌されたTARCとは競合しない。

40

【0118】

さらに、EC50値を決定した（データは示さない）。EC50値は細胞株ごとに多様であり、このことは、細胞表面でのCCR4の発現が、それぞれの細胞型によって異なるためであると考えられる。

【0119】

種間での交差反応性を、既知の方法、例えば、ヒトCCR4と別の種に由来するCCR4でそれぞれ形質転換した細胞を使用するフローサイトメトリーによって評価することが

50

できる。適切なアッセイを実施例 8 に示す。実施例 8 では、本発明の抗体がヒト、サル、およびマウスの CCR4 に結合可能であることを示している。

【0120】

CCR4 のそのリガンドである TARC および MDC への結合を、抗体 208、306、308、406、501、503、601、603 および 803 が阻害可能であることを示した（実施例 3）。したがって、本発明の抗体は、好ましくは、CCR4 がその 1 種以上のリガンドに結合するのを阻害することができる。好ましくは、少なくとも MDC に対する結合が阻害される。より好ましくは、MDC および TARC に対する結合が阻害される。いくつかの実施形態では、CCR4 の TARC への結合が阻害される。本明細書に開示したいずれの態様の実施形態では、本発明の抗体は、MDC および / または TARC の CCR4 への結合を阻害することができる。

10

【0121】

リガンドの CCR4 への「結合の阻害」とは、抗体が存在する場合のリガンドの CCR4 に対する結合が、抗体が存在しない場合の結合と比較して、少なくとも 20、30、または 40%、より好ましくは少なくとも 45、50、55、60、65、70 または 75%、さらに好ましくは少なくとも 80% 低下することを意味する。リガンドの CCR4 に対する結合が、少なくとも 85、90 または 95% 低下する実施形態も考えられる。別の見方では、まずリガンドを CCR4 と接触させ、その後抗体を加えると、リガンドは、抗体の CCR4 への結合を阻害することができる。

【0122】

抗体がリガンドの CCR4 への結合を阻害することができるか否かを決定するためのアッセイはよく知られており、好適なアッセイを実施例 3 で説明する。簡単に説明すると、CCR4⁺細胞に Alexa647 で標識した MDC-SNAP を加えてまたは加えずにインキュベートし、次いで抗体を加えた。MDC 複合体の存在下でのブレインキュベーションにより、抗体の CCR4 への結合が低下することになった。特に、MDC（または適切な MDC 複合体）を加えてブレインキュベートされた CCRF-CEM 細胞（CCR4 を天然に発現している）への抗体の結合が阻害された。

20

【0123】

リガンドの CCR4 への結合を、抗体が阻害することができるか否かを決定するための別のアッセイとしては、標識したリガンド、例えば放射製標識したリガンドまたはビオチン化リガンドの使用、およびフローサイトメトリーを使用した解析が挙げられる。

30

【0124】

MDC に関して、この因子が CCR4 以外の少なくとも 1 つの GPCR 受容体と高い親和性で結合可能であることに注意されたい。例えば、MDC が GPCR 受容体 D6 と結合することが報告されており（Graham, 2009; Locati et al., 2005）、このことが結合アッセイの結果に影響を及ぼす可能性がある。

【0125】

本発明の抗体は、好ましくは、CCR4 リガンドに応答した CCR4 介在性の細胞応答を阻害することができる。具体的には、CCR4 リガンドに応答した細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を阻害することによって、CCR4 リガンドに応答した CCR4 介在性の細胞応答を阻害することができる。

40

【0126】

具体的には抗体は、好ましくは、CCRF-CEM 細胞（ATCC CCL-119）での MDC 誘発性カルシウム流動および / または TARC 誘発性カルシウム流動を阻害できるものである。適切なアッセイ法は既知であり、例を実施例 5 で説明する。

【0127】

他の好ましい特徴としては、本発明の抗体を投与してもインビボで有意な毒性がないこと、および他の副作用がインビボで有意でないことが挙げられる。

【0128】

いくつかの実施形態において抗体は、CCR4 リガンド（MDC または TARC など）

50

へのCCR4⁺細胞の走化性を抑制し得る。このことを実施例6で示した。

【0129】

いくつかの実施形態において抗体は、CCR4⁺細胞の補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導し得るが、他の実施形態では、抗体はCDCを誘導することができない。いくつかの実施形態では、抗体はCCR4⁺細胞のアポトーシスを誘導し得るが、他の実施形態では抗体はアポトーシスを誘導することができない。いくつかの実施形態において抗体は、CCR4に結合するとCCR4⁺細胞の内部に取り込まれ得るが、他の実施形態では、有意な内部移行は起こらない。

【0130】

アポトーシスの誘導は、よく知られている標準的な方法、例えば、アネキシンV染色を調べる方法によって評価することができる。簡単に説明すると、細胞を抗体と共に適当な期間、例えば24時間インキュベートしてもよく、細胞を回収し、アネキシンVで染色した後、FACS解析(例えばEasyCyteを利用して)でその効果を測定することができる。

10

【0131】

CDCの誘導は、よく知られている標準的な方法、例えば、アラマーブルーなどの酸化還元色素の取り込みと代謝に基づく生存細胞の相対数を測定する方法を用いて評価することができる。適切なアッセイが、H Gazzano - Santoro et al. J Immunol Methods. 1997, 28; 202(2): 163-71に開示されている。

20

【0132】

当業者は、内部移行を試験する適切な方法、例えばフローサイトメトリーまたは共焦点顕微鏡で温度差蛍光標識(temperature-differential fluorescence labeling)を使用する方法を知っている。適切なアッセイの例としては、pH感受性色素(CypHer5Eなど)で標識した二次抗体があり、これは(細胞の外側で見られるような)塩基性のpHでは最低限の蛍光しか発しないが、(細胞の内側で見られるような)酸性のpHでは最も強い蛍光を発する。

【0133】

走化性の抑制は、標準的な方法、例えばトランスウェルアッセイを使用して評価することができる。簡単に説明すると、走化性を示すことができ、かつ、CCR4を発現する細胞を、1つのチャンバー内で抗体と接触させる。適当な大きさの細孔をもつ膜フィルターで第一のチャンバーとしきられている別のチャンバーにCCR4のリガンド(例えばMDC)を入れる。抗体の存在下での走化性と抗体の非存在下での走化性を比較することで、細胞のリガンドへの遊走(走化性)に及ぼす抗体の効果を決定する。実施例6で適切な方法を説明する。

30

【0134】

CCR4「リガンド」という用語は、CCR4の天然のリガンド(例えばMDC、TARC、RANTES、MCP-1および/またはMIP-1)を含み、これらは天然に生産されたものであっても、組換えによって発現させたものであっても、または研究室内で合成したものであってもよい。

40

【0135】

「CCR4⁺細胞」は、細胞表面にCCR4を、好ましくは、少なくとも実質的に野生型構造のCCR4を発現している細胞を意味する。CCR4⁺細胞は天然でCCR4陽性であってよく、または組換えCCR4を発現する形質転換体であってよい。CCR4⁺には特に、固形腫瘍細胞、血液系腫瘍の細胞および/またはT_H17が含まれる。CCR4⁺細胞の、特にインビトロアッセイ用の好ましい例としては、CCRF-CEM、L-428、Hut78、786-O、A498およびKatoIIIが挙げられる。

【0136】

したがって、本発明を踏まえると様々な抗CCR4抗体を作成することができ、かつ、本明細書の他の部分で論じた任意の障害、特に癌、免疫疾患、炎症性障害および感染の治

50

療を含む様々な実施形態において使用することができる。

【0137】

本願全体を通して使用されるように、用語「1つ(a)」および「1つ(an)」は、上限が具体的に示されている例を除き、参照されている要素または工程の「少なくとも1つ」、「少なくとも第一の」、「1つ以上」または「複数」を意味するものとして使用される。そのため、本明細書で使用する場合、1つの「抗体」は、「少なくとも第一の抗体」を意味する。当業者は、任意の単一の薬剤の量と同様に、利用可能な限度および組み合わせのパラメーターを、本開示を考慮することで理解する。

【0138】

本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つの本発明の抗CCR4抗体またはその抗原結合断片を含む組成物である。

10

【0139】

本明細書で定義した本発明の抗体またはその一部分もしくは断片をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはそれらに実質的に相同な核酸分子は本発明のさらなる態様を形成する。表に開示した核酸配列が好ましい。

【0140】

好ましい核酸分子は、配列番号47(好ましくは配列番号56もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号48(好ましくは配列番号57もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号49(好ましくは配列番号58もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号50(好ましくは配列番号59もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号51(好ましくは配列番号60もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号52(好ましくは配列番号61もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号53(好ましくは配列番号62もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)、配列番号54(好ましくは配列番号63もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)または配列番号55(好ましくは配列番号64もしくはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)に示すアミノ酸配列をコードしている配列を含む。

20

【0141】

他の好ましい核酸分子は、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43もしくは45、またはそれらに実質的に相同なアミノ酸配列(好ましくは配列番号101、103、105、107、109、111、113、115もしくは117のそれぞれ、またはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)を有する重鎖可変領域(VH)をコードしている配列、および/または、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44もしくは46、またはそれらに実質的に相同なアミノ酸配列(好ましくは配列番号102、104、106、108、110、112、114、116もしくは118のそれぞれ、またはそれらに実質的に相同な配列でコードされている)を有する軽鎖可変領域(VL)をコードしている配列を含む。

30

【0142】

以下の組み合わせをコードしている核酸がより好ましい。配列番号29と30;または配列番号31と32;または配列番号33と34;または配列番号35と36;または配列番号37と38;または配列番号39と40;または配列番号41と42;または配列番号43と44;または配列番号45と46。以下の組み合わせを含む核酸分子もまた好ましい。配列番号101と102;または配列番号103と104;または配列番号105と106;または配列番号107と108;または配列番号109と110;または配列番号111と112;または配列番号113と114;または配列番号115と116;または配列番号117と118。

40

【0143】

前述のように、軽鎖のFR1領域は1番目と2番目の位置にQとSの残基を含んでいてもよい。したがって好ましい核酸配列は、1番目と2番目の位置にQとSの残基を含む、VL503(配列番号40)に実質的に相同なVLをコードする配列を含むかまたはそのよ

50

うな配列からなる核酸配列であり、配列番号40と比べた変化に下腺が引かれている以下に示す配列を好ましくは有する：

C A A A G C G T G C T G A C T C A G C C A C C C T C A G C G T C T G G G A C C C
C C G G G C A G A G C G T C A C C A T C T C T T G T T C T G G A A G C A C C T C
C A A C A T C G G A A G T C A T T A T G T G G T C T G G T A C C A G C A G C T C
C C A G G A A C G G C C C C C A G A C T C C T C A T C T A T A G G A A T C A T C
A G C G G C C C T C A G G G T C C C T G A C C G A C T C T C T G G C T C C A A
G T C T G G C A C C T C A G C C T C C C T G G C C A T C G G T G G G C T C C G G
T C C G A G G A T G A G G C T G A T T A T T A C T G T G C A G T G T G G G A T G
A C A C C C T G A G T G G C T G G G T G T T C G G C G G A G G G A C C A A G C T
G A C C G T C C T A (配列番号133)。

10

【0144】

他の好ましい核酸分子は、I g G型の本発明の抗体、例えば、実施例1に記載されるようなもの、またはマウスキメラ型の本発明の抗体をコードしている配列を含む。

【0145】

先に示したように、本発明によって包含される他の核酸分子は本発明のヒト抗体の一部または断片をコードしている核酸分子、例えば、抗体の重鎖可変領域(VH)をコードしている核酸分子または抗体の軽鎖可変領域(VL)をコードしている核酸分子である。他の好ましい核酸分子としては、本発明の抗体の重鎖をコードしている核酸分子(例えば、配列番号65、69、73、77、81、85、89、93もしくは97などの、それぞれ、配列番号67、71、75、79、83、87、91、95もしくは99をコードしている核酸分子、またはそれらに実質的に相同な配列)または抗体の軽鎖をコードしている核酸分子(例えば、配列番号66、70、74、82、86、90、94もしくは98などの、それぞれ、配列番号68、72、76、80、84、88、92、96もしくは100をコードしている核酸分子、またはそれらに実質的に相同な配列)がある。

20

【0146】

したがって、本明細書で定義する本発明の抗体の断片、またはそれらに実質的に相同な配列、またはそのような断片をコードしている配列を含む核酸分子は、本発明のさらなる態様を形成する。

【0147】

核酸配列との関連で本明細書において使用される場合、「実質的に相同な」という用語は、開示したアミノ酸配列または核酸配列に少なくとも70%または75%、好ましくは少なくとも80%、より一層好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する配列を含む。したがって、本発明の実質的に相同な核酸配列は、本発明の配列に塩基の変化(付加、置換、挿入または欠失)が一つまたは複数入った配列を含む。

30

【0148】

好ましくは、本発明の抗体は、I g G型の場合に、CCR4に対する結合親和性が高く、例えばそれら抗体の結合親和性(Kd)は、 1×10^{-8} Mの範囲または 1×10^{-9} M以下の範囲となり得る。そのような親和性を有する抗体は、治療に有用であることが確立されている範囲の親和性をもつということが重要である。好ましくは、本発明の抗体はI g G型の場合に、Kdが30 nM、20 nM、15 nMまたは10 nM未満、より好ましくは10、9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5または1 nM未満、最も好ましくは0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2または0.1 nM未満に相当する、CCR4への結合親和性を有する。

40

【0149】

いかなる適切な方法を使用してKdを決定してもよいが、好ましくは、様々な濃度の被検抗体を様々な濃度の抗原(CCR4)に対してインビトロで試験し、例えばラインウィーバー・バーク法を用いて飽和曲線を生成するか、または、B I A c o r e 1000

50

Evaluationソフトウェアに入っている1:1結合モデルのような市販の結合モデルソフトウェアを使用してKdを決定する。CCR⁺細胞に対するIgGの力価測定から、ソフトウェアPrism(GraphPad、サンディエゴ、カリフォルニア)の「一部位特異的結合」モデルを使用して、Kd値を算出することができる。

【0150】

Kd値の決定に関しては、実験条件が見かけの結合親和性に影響を及ぼすことから、標的(例えばCCR4)を発現している細胞を使った結合実験から得た見かけのKd値が親和性の絶対的な指標を示しているとは見なすことができないことを、当業者は理解している。例えば、CCR4の発現レベルは細胞を培養した条件に依存する可能性があり、ならばに、細胞型の違いによっても変わる可能性がある。その結果、一連の実験の間に得られた見かけのKd値同士を比較するのが最もよく、ある一連の実験の間に得られたKd値と別の実験で得られたKd値を比較することは、特に実験条件が著しく異なる場合には、常に適切だとは限らない。

10

【0151】

あるいは、細胞表面保持アッセイ(Adams et al., 1998, Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. Br J Cancer 77: 1405-12; Le Gall et al., 1999, Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. FEBS Lett 453: 164-8)を実行することによって、CCR4陽性細胞表面での解離定数や抗体半減期を決定することができる。後者の方法の方が、治療条件下のヒト患者の本当の状況をより適切に模倣することができる。

20

【0152】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体はヒトCCR4およびサルCCR4の両方に結合し得る。そのような種間の交差反応性、具体的にはヒトと前臨床段階動物モデルとして一般的に使用されている種との間のそのような交差反応性は、前臨床研究から臨床利用へのより効果的な転換を可能とするので、利点であり得る。例えば、使用された特定の動物モデルに存在する天然のCCR4と交差反応する抗体を有するということは、このモデルでの結果がヒト患者での状況を反映している可能性が高く、それによって、例えば、行われる投与のより正確な評価が可能となり、そして、どのような潜在的に関連する、または、問題となる副作用でも特定する見込みが増すことを意味する。例えば、本発明の抗体がヒトCCR4およびサルCCR4の両方に結合する能力を有するということは、そのような抗体を前臨床毒性試験で試験して、その治療の有害事象を評価し、そして、適切な耐用量を見つけることができることを意味する。

30

【0153】

さらに、ヒトCCR4およびマウスCCR4の両方に結合できるということは、マウスモデル、例えば、免疫適格マウスを使用するマウス同系モデルにおいてそのような本発明の抗体によって示された結果が、ヒト対象での抗体の活性を表している可能性がより高いことを意味する。これは、ヒトCCR4には結合できるがマウスCCR4には結合できない抗体は、マウスモデル内でヒトの腫瘍細胞が発現しているCCR4には結合するが、内在性のマウスCCR4には結合できないためである。これは、その腫瘍が発現しているCCR4と内在性のCCR4が存在するであろうヒト患者の状況とは言うまでもなく異なる。

40

【0154】

このことは特に、マウスCCR4とヒトCCR4に対する抗体の親和性が類似している場合について言える。

【0155】

50

そのような状況に欠点があるとすれば、ヒトCCR4には結合するがマウスCCR4には結合しないか、またはマウスCCR4に対する親和性が著しく低い抗体は、免疫不全マウス（例えば、ヌードマウスもしくはSCIDマウス）のヒト腫瘍異種移植モデルでは良好に機能するかもしれないが、より多くのCCR4が存在するヒト系では、同じような成績によってこれが反映されることはないかもしれないということである。言い換えれば、ヒトCCR4には結合できるがマウスCCR4には結合できない抗体によるマウス異種移植片系での抗腫瘍効果は、臨床における実際よりも良く見える可能性があるということである。対照的に、ヒトCCR4とマウスCCR4の両方に結合できる抗体を用いて作業する場合、抗体はマウスモデル系に存在する全ての型のCCR4に結合し、かつ、抗体がヒトに投与される時の状態をより表している可能性がある。これは特に、マウスCCR4とヒトCCR4に対する抗体の親和性が類似している場合について言える。

10

【0156】

好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒトCCR4とサルCCR4に、またはヒトCCR4とマウスCCR4に同程度の親和性で、例えば10nM以下または5nM以下、より好ましくは3nM以下または2nM以下、最も好ましくは1nM以下のKdで結合する。

【0157】

「同程度の親和性」とは、ヒトCCR4と他の目的の種（例えば、サルまたはマウス）のうちの1種以上に対する抗体の結合親和性が同等である、例えば、係数の違いが20以下であるという意味でもある。より好ましくは、結合親和性の係数の違いは15未満、より好ましくは10未満、最も好ましくは5、4、3または2未満である。

20

【0158】

しかしながら他の実施形態では、本発明の抗体は、サルCCR4に結合しない場合も、および/またはマウスCCR4に結合しない場合もある。

【0159】

本発明の抗体はCCR4に結合する。したがって、本発明の抗体または結合タンパク質を使用して、CCR4を、具体的にはCCR4⁺細胞をインビボまたはインビトロで検出することができる。例えば、CCR4は特定の腫瘍細胞で発現するため、本発明の抗体または結合タンパク質を使用して、インビボまたはインビトロで腫瘍細胞を検出することができる。加えて、抗体がCCR4⁺細胞に局在する能力を有するということは、本発明の抗体が、CCR4⁺細胞が存在している体の部位を標的とし、抗体がその標的部位で作用することができることを意味している。具体的には、抗体がCCR4⁺腫瘍細胞に局在する能力を有するということは、本発明の抗体が体のCCR4⁺腫瘍細胞が発現している部位を標的とし、抗体がその標的部位で作用することを意味している。

30

【0160】

例えば抗体は、抗CCR4⁺細胞効果それ自体を誘導する可能性がある。すなわち裸の抗体として、例えばADCCを活性化するまたは誘導することによって、抗CCR4⁺細胞効果を誘導する可能性がある。裸の抗体として作用するこの能力は長所である。あるいは、またはこれに加えて、抗体は、さらなる治療分子、例えば本明細書に記載の毒素または他の抗癌分子または抗炎症剤に複合体化されることによって、抗CCR4⁺細胞効果を誘導することができる。

40

【0161】

本発明の抗体は、好ましくは、CCR4⁺細胞の抗体依存性細胞傷害（ADCC）を引き起こす能力を有する。ADCCは、当技術分野で良く知られている方法によってインビトロで試験することができる。例えば、ヒトPBMC存在下でのCCR4⁺細胞株（CCRF-CEM）の殺滅を試験してもよい。例えば、クロム-51放出アッセイを用いることができる。したがって本発明の抗体はインビトロで、例えば、少なくとも10%、15%、20%、22%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%のCCR4⁺細胞の殺滅を、例えばヒトPBMC存在下で誘導する可能性がある。ADCCはいくつかの用途において、特にいくつかの治療用途で有利になる。したがって

50

、好ましい実施形態において抗体は、CCR4⁺細胞、好ましくはCCR4⁺腫瘍細胞および/またはCCR4⁺Th2細胞のADCCを誘導することができる。いくつかの実施形態では、抗体介在性ADCCはPBMC存在下におけるものであるが、PBMCが存在しない場合の抗体介在性ADCCの実施形態も考えられる。本発明の抗体がCCR4⁺細胞のADCCを誘導できることを、実施例9に示した。結果は、本発明の抗CCR4抗体が、標的とした3種全ての細胞株について、ヒトPBMC存在下でADCCを誘導することができることをはっきりと示している。CCRF-CEM細胞で試験した場合、抗体503のEC50が5.3pMであり、KW0761のEC50が315pMであることが分かった。加えて、本発明の抗CCR4抗体は、単離したT_{reg}細胞についてADCCを誘導しようとした場合に、同等の最大殺滅活性を示した。

10

【0162】

本発明の抗体は、好ましくは、そのようなレベルのADCCを達成するのに必要な抗体濃度の点においても、適切な能力をもつことが示される。したがって、CCR4⁺細胞、例えばCCRF-CEM細胞のインビトロでの50%細胞溶解濃度(EC₅₀)に必要な抗体濃度は、好ましくは700ng/ml、650ng/ml、620ng/ml、600ng/ml、550ng/ml、500ng/ml、450ng/ml、400ng/ml、350ng/ml、300ng/ml、250ng/ml、200ng/ml、150ng/ml、100ng/ml、90ng/ml、80ng/ml、70ng/ml、60ng/ml、50ng/ml、46ng/ml、40ng/ml、35ng/ml、30ng/ml、25ng/ml、20ng/ml、15ng/ml、10ng/ml、9ng/ml、7ng/ml、5ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/mlまたは0.25ng/ml未満である。

20

【0163】

上述した能力は、好ましくは適切な対照レベルと比較した場合に、測定可能なまたは有意なレベルで、より好ましくは統計的に有意なレベルで観察される。

【0164】

様々な提供源から調製したPBMC(エフェクター細胞)は、非特異的なおよび特異的な腫瘍細胞の溶解度、ならびにEC50値に関して、著しく多様なADCCを示す可能性があることに注意されたい。この現象は、Naundorf et al., 2002に説明されている。

30

【0165】

ヒトIgG1は、Fc領域に結合した2本のN結合型オリゴ糖鎖を有する糖タンパク質である。このオリゴ糖は、核となるフコースを含むもしくは含まないトリマンノシルコア構造、二つに分岐しているN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、および構造の多様性をもたらす末端シアル酸からなる、二分岐型の複合体である。ヒト血清IgGと治療用の抗体の両方が、高度にフコシル化されていると、通常、良く知られている。

【0166】

いくつかの例では、ヒトIgG1サブクラスのオリゴ糖の状態を操作することによって、ADCCが亢進されることが報告されている。具体的には、脱フコシル化が、いくつかの抗体のADCC活性を高めることが分かっている(Niwa et al., 2004)。したがって、好ましい実施形態において本発明の抗体は、タンパク質が産生されている/発現している間に、および/または産生された/発現した後に、インビトロで修飾され、特定のグリコシル化パターン、特に、抗体の治療上の使用に有用なグリコシル化パターンを生じる。好ましくは、前記特定のグリコシル化パターンは、フコースベースのグリコシル化の低下または欠如であり、それは、好ましくは、抗体がADCCを誘導する能力を高める。したがって、好ましい実施形態において本発明の抗体は、特定のグリコシル化パターン、好ましくは前記抗体のADCCを誘導する能力を向上させる特定のグリコシル化パターンを有する。本発明の抗体は、脱フコシル化されている抗体であるか、またはフコシル化されていない抗体であることが好ましい。

40

50

【0167】

脱フコシル化抗体または非フコシル化抗体の好適な調製方法を当業者は分かっている。例えば、I型 - マンノシダーゼの選択的阻害剤であり、産生中の分子のフコシル化を低減させるキフネンシン（例えば100 ng/ml）存在下で抗体を産生することによって達成することができる。オリゴ糖部分のフコシル化に必要なタンパク質を1つ以上欠損している好適な宿主細胞、例えばフコース転移酵素欠損宿主細胞、を使用して脱フコシル化抗体を産生することができる。好適な宿主細胞の例としては、細胞内糖ヌクレオチド、すなわちGDP - フコースの合成に関わる酵素の活性および/またはN - グリコシド結合複合糖鎖中でフコースの1位が還元末端のN - アセチルグルコサミンの6位と結合を介して結合している糖鎖の修飾に関わる酵素の活性が低下または欠如している細胞が挙げられる。そのような酵素の例としては、GMD（GDP - マンノース - 4, 6 - デヒドラーゼ）、F_x（GDP - ケト - 6 - デオキシマンノース - 3, 5 - エピメラーゼ, 4 - レダクターゼ）、GFPP（GDP - L - フコースホスホリラーゼ）を含む、GDP - フコースの合成に関わる酵素が挙げられる。

10

【0168】

実施例2に記載したように、脱フコシル化した抗体306、406および503を、I型 - マンノシダーゼの選択的阻害剤であり、細胞培養中での産生中にIgGのフコシル化を停止させるキフネンシンを加えて産生した。

【0169】

「脱フコシル化」とは、Fc領域に結合しているN - グリコシド結合複合糖鎖全体の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20、30、40、50、60、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%が、フコースがその糖鎖の還元末端のN - アセチルグルコサミンと結合していない糖鎖であることを意味する。「非フコシル化」とは、抗体中にフコースが有意なレベルで含まれないことを意味する。

20

【0170】

いくつかの抗体は、結合した細胞の中に移行することができる。したがって、本発明のいくつかの実施形態では、抗体は内部移行することができる。抗体分子に結合した他の薬剤はいずれも、抗体分子と共に内部移行するため、この特徴は、免疫複合体で使用する場合に特に有用である。他の実施形態では、有意な内部移行は認められない。

30

【0171】

CCR4が血小板で発現していること、およびそのリガンドであるMDCとTARCが血小板凝集を引き起こすことが分かっている。IgG分子には2つのリガンド結合部位があり、2本のアームがそれぞれ別の血小板上にあるCCR4と結合することができる場合に、CCR4を認識することができるIgGが血小板間で交差反応する可能性があるため、このことが問題となる可能性がある。インビボでは血小板凝集が生じる場合がある。医療用途では特に、抗体が有意な血小板凝集を引き起こさないことが要求される。血小板凝集は、既知の方法でアッセイすることができる。本発明の抗体が血小板凝集に及ぼす影響を実施例11に記載したように試験した。本質的には、抗体を単離した血小板のみと、または良く知られている凝集誘導物質であるADP（Varon and Spectre
「Antiplatelet agents」 Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 267 - 72, 2009）も加えてインキュベートした。抗CCR4抗体の血小板への結合を観察したが、抗体は血小板凝集については影響を及ぼさなかった。抗体は凝集を引き起こさなかったが、血小板凝集（例えばADPで誘導した血小板凝集）を阻害もしなかった。したがって、抗体は血小板凝集に関しては、何ら有意な影響を及ぼさない。

40

【0172】

上述のように、T_{reg}を含む、あるPBLはCCR4を発現するため、本発明のいくつかの実施形態において抗体は、PBLに、好ましくはT_{reg}および/またはTh2細胞に結合することができる。これによってT_{reg}細胞を枯渇させることができるため、この特

50

徴は特に免疫治療において有利である。

【0173】

以下の組成物、免疫複合体、医薬品、組み合わせ、混合物、キット、第一のおよび第二の医学的用途、ならびに本発明に係る全ての方法に関する説明では、「抗体」および「免疫複合体」という用語、または抗体結合領域もしくはその断片は、別段の記載のない限り、または科学用語から明かでない限り、抗CCR4抗体の範囲、特に208、306、308、406、501、503、601、603および803の抗体を指す。

【0174】

本明細書で使用する場合、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は広く、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などのヒト抗原結合ドメインを含む、いずれもの免疫学的な結合剤または分子を指す。重鎖定常ドメインの型に応じて、全ての抗体は5つの主要なクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMのうちの1つに分類される。本発明の抗体もこれらのクラスのうちのいずれか1つ分類され得る。これらのクラスのうちのいくつかはさらに、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのサブクラスまたはイソタイプに分けられる。免疫グロブリンのそれぞれのクラスに対応する、重鎖定常ドメインはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、および μ と呼ばれている。それぞれのクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造や三次元配置については良く知られている。

【0175】

本発明において抗原結合領域よりも抗体全体が使用される場合には一般に、IgGおよび/またはIgMが好ましい。なぜならば、生理学的な条件においてはIgGおよび/またはIgMが最も一般的な抗体であり、かつ、それらが研究室で最も容易に作成できるからである。IgG1抗体が特に好ましい。

【0176】

哺乳類の抗体の「軽鎖」は、定常ドメインのアミノ酸配列と可変ドメインのフレームワーク領域のいくつかのアミノ酸に基づいて、2つの明確に異なる型、カッパ(κ)とラムダ(λ)に分類される。本発明の抗体では本質的に、 κ または λ 軽鎖定常領域どちらが好ましいかといった違いはない。

【0177】

当業者が理解するように、用語「抗体」に包含される免疫学的な結合剤には、全ての抗体、二量体抗体、三量体抗体および多量体抗体；二重特異性抗体；キメラ抗体；組換えおよび改変抗体ならびにその断片を含む、全ての抗体およびその抗原結合断片が含まれる。

【0178】

したがって、「抗体」という用語は、抗原結合領域を有するいずれの抗体様分子をも指すのにも使われ、かつ、この用語は、抗原結合ドメインを含む抗体断片を含む。抗原結合ドメインには、Fab'、Fab、F(ab')₂、単一ドメイン抗体(DAB)、TandAb二量体、Fv、scFv(一本鎖Fv)、dsFv、ds-scFv、Fd、直鎖型抗体、ミニボディ、ディアボディ、二重特異性抗体断片、パイボディ、トリボディ(scFv-Fab融合体、それぞれ、二重特異性または三重特異性)；一本鎖二重特異性抗体；カッパ(ラムダ)ボディ(scFv-CL融合体)；二重特異性T細胞結びつけ抗体(Bispecific T-cell Engager、BiTE)(細胞を引きつけるためにscFvとscFvが一行に並んでいる)；二重可変ドメイン(dual variable domain、DVD)-Ig(二重特異性形態)；小免疫タンパク質(small immunoprotein、SIP)(ミニボディの一種)；SMIP(「小さいモジュラー免疫医薬(small modular immunopharmaceutical)」scFv-Fc二量体；DART(二本鎖安定化二重特異性抗体「二重親和性再標的化(Dual Affinity ReTargeting)」)；1つ以上のCDRを含む小抗体模倣物などが含まれる。

【0179】

抗体を利用した様々なコンストラクトおよび断片を調製および使用するための技術は当技術分野で周知である(参照することにより具体的に本明細書に組み入れられる、Kab

10

20

30

40

50

a t e t a l . , 1 9 9 1 を参照のこと。)。特に、ディアボディについては欧州特許第 4 0 4 , 0 9 7 号明細書および国際公開第 9 3 / 1 1 1 6 1 号にさらに記載があり、直鎖型抗体については Z a p a t a e t a l . (1 9 9 5) でさらに記載されている。

【 0 1 8 0 】

標準的な技術によって抗体を断片化することができる。例えば、抗体をペプシンで処理することによって、 $F(a b')_2$ 断片を生成することができる。生じた $F(a b')_2$ 断片を処理してジスルフィド架橋を還元し、 $F a b'$ 断片を生成することができる。パイロリン消化によって $F a b$ 断片の形成を誘導することができる。 $F a b$ 、 $F a b'$ および $F(a b')_2$ 、 $s c F v$ 、 $F v$ 、 $d s F v$ 、 $F d$ 、 $d A b$ 、 $T a n d A b$ 、 $d s - s c F v$ 、二量体、ミニボディ、ディアボディ、二重特異性抗体断片および他の断片はまた、組換え技術によって合成することも、または化学的に合成することも可能である。抗体断片の製造方法は、当技術分野で知られており記述されている。例えば、B e c k m a n e t a l . , 2 0 0 6 ; H o l l i g e r & H u d s o n , 2 0 0 5 ; L e G a l l e t a l . , 2 0 0 4 ; R e f f & H e a r d , 2 0 0 1 ; R e i t e r e t a l . , 1 9 9 6 ; Y o u n g e t a l . , 1 9 9 5 のそれぞれは有効な抗体断片の作製をさらに説明し、そしてそれを可能にする。

10

【 0 1 8 1 】

抗体または抗体断片を天然に製造することも、または全体的もしくは部分的に合成することも可能である。したがって抗体は、いかなる適切な供給源、例えば組換えた供給源に由来するものであっても、および/またはトランスジェニック動物もしくはトランスジェニック植物、または $I g Y$ 技術を使用して卵で産生したものであってもよい。したがって、抗体分子をインビトロまたはインビボで産生することができる。

20

【 0 1 8 2 】

好ましくは、抗体または抗体断片は、3つのCDRドメインを含む抗体軽鎖可変領域(V_L)と、3つのCDRドメインを含む抗体重鎖可変領域(V_H)を含む。前記 V_L および V_H は通常、抗原結合部位を形成する。

【 0 1 8 3 】

「 $F v$ 」断片とは、完全な抗原認識部位と結合部位を含む、最小限の抗体断片である。この領域は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインが密接に、非共有的に結合した二量体を有する。この配置では、それぞれの可変ドメインの3つの超可変領域(CDR)が相互作用し、 $V_H - V_L$ 二量体表面にある抗原結合部位を規定している。6つの超可変領域(CDR)が集合して、抗体に対する抗原結合特性を付与している。

30

【 0 1 8 4 】

しかしながら抗原への結合には、抗体の軽鎖可変ドメイン由来の3つのCDRと重鎖可変ドメイン由来の3つのCDRの存在が必要ではないことが当技術分野では充分に実証されている。したがって、上述の従来型の抗体断片よりも小さいコンストラクトが有効であることが分かっている。

【 0 1 8 5 】

例えば、ラクダ化抗体(Hamers - Casterman et al . , 1 9 9 3 ; A r b a b i G h a h r o u d i e t a l . , 1 9 9 7) は多数の抗原結合レパートリーを有するが、軽鎖が欠損している。また、 V_H ドメインのみ(Ward et al . , 1 9 8 9 ; D a v i e s a n d R i e c h m a n n , 1 9 9 5) または V_L ドメインのみ(van den Beucken et al . , 2 0 0 1) を含む単一ドメイン抗体から得られた結果は、これらのドメインが許容可能な高い親和性で抗原と結合可能であることを示している。したがって、3つのCDRは効果的に抗原に結合する。

40

【 0 1 8 6 】

また、CDRは1つでもまたは2つでも抗原に効果的に結合可能であることが分かっている。第一の例として、異種タンパク質(GFPなど)に挿入された V_H のCDR3領域がその異種タンパク質に抗原結合能を付与すること(Kiss et al . , 2 0 0 6

50

; Nicaise et al., 2004) を示すことで例示されているように、単一のCDRを異種タンパク質に挿入し、その異種タンパク質に抗原結合能を付与することができる。

【0187】

さらに、2つのCDRが効果的に抗原に結合することができ、さらに、親抗体が有する特性よりも優れた特性を付与することも分かっている。例えば、親抗体(V_H CDR1およびV_L CDR3領域)由来の2つのCDRが親分子の抗原認識特性を保持し、かつ、より優れた腫瘍貫通性を有することが示されている(Qiu et al., 2007)。天然の親抗体に類似した形でCDRが位置するように、これらのCDRドメインと適切なリンカー配列(例えば、V_H FR2由来のリンカー配列)を結合させると、抗原認識がより良くなった。したがって、適切なフレームワーク領域によって、親抗体で見られる配座を維持するように配置された2つのCDRドメイン(好ましくは1つはV_Hドメイン由来で、もう1つはV_Lドメイン由来であり、より好ましくは、2つのCDRドメインうちの一方はCDR3ドメインである)を含む抗原結合抗体模倣物の構築が可能であることが当技術分野では知られている。

10

【0188】

このように、本発明の好ましい抗体は6つのCDR領域(軽鎖由来の3つ、および重鎖由来の3つ)を含んでいるが、6つより少ない数のCDR領域を含む抗体、および1つもしくは2つと少ない数のCDR領域を含む抗体も本発明に包含される。加えて、重鎖のみまたは軽鎖のみに由来するCDRを有する抗体もまた考えられる。

20

【0189】

CCR4に結合する本発明の好ましい抗体は、3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域とおよび3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、本明細書に開示した配列を有する重鎖CDRを含む。

【0190】

特定の重鎖CDR領域と共に使用するのに好ましい軽鎖CDR領域を、本明細書の他の場所に記載する。しかしながら、3つのCDRを含む他の軽鎖可変領域を本発明の重鎖可変領域の共に使用することもまた考えられる。本発明の重鎖可変領域と共に使用することができ、かつ、CCR4に結合する抗体を生じる適切な軽鎖可変領域を、当業者は容易に同定することができる。

30

【0191】

例えば、本発明の重鎖可変領域を単一の軽鎖可変領域または軽鎖可変領域のレポーターと組み合わせ、得られた抗体をCCR4への結合について試験することができる。そのような、本発明の重鎖可変領域と様々な軽鎖可変領域の組み合わせのうちの妥当な数が、CCR4に結合する能力を維持することが期待される。

【0192】

同様の方法を用いて、本発明の好ましい軽鎖可変領域と共に使用するための別の重鎖可変領域を同定することもできる。

【0193】

特定の実施形態において抗体または抗体断片は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgE、IgMまたはIgD定常領域などの重鎖定常領域の全体または一部を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域またはその一部である。さらに、抗体または抗体断片は、カップ軽鎖定常領域の全体もしくは一部分、またはラムダ軽鎖定常領域もしくはその一部を含んでもよい。そのような定常領域の全体または一部は、天然に産生しても、または完全にもしくは部分的に合成してもよい。そのような定常領域に適切な配列は当技術分野で周知であり、かつ、十分に裏付けられている。本発明の抗体に重鎖および軽鎖に由来する定常領域全体が含まれている場合、そのような抗体は本明細書では基本的に、「完全長」抗体または「完全」抗体と呼ばれる。

40

【0194】

特定の用途、特にADCCなどの、Fc領域がエフェクター機能を仲介しているインビ

50

ボでの治療用途には、Fc領域を含む抗体が好ましい。

【0195】

さらに、実質的に相同な核酸配列には、開示した核酸配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列（またはその相補的な配列）、例えば、本発明の軽鎖または重鎖CDR、本発明の軽鎖または重鎖可変領域、または本発明の抗体のうちの1つ以上をコードしているヌクレオチド配列に（またはそれらの相補的な配列に）、少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、好ましくはストリンジェンシーが高い条件でハイブリダイズする配列も含まれる。

【0196】

本発明のタンパク質に実質的に相同な配列にはさらに、これらに限定されるものではないが、抗体のV_H、V_LまたはCDRドメインに影響を及ぼさない変化（例えば、異なるリンカー配列が使用されているscFv抗体、または抗原への結合に寄与しないタグ配列もしくは他の要素が付加されている抗体）、または1つの型もしくは形態の抗体分子または断片を別の型もしくは形態の抗体分子または断片に（例えば、FabからscFvへまたはその逆に）変換する変化、または抗体分子を特定のクラスもしくはサブクラスの抗体分子に（例えば、抗体分子をIgGもしくはそのサブクラス、例えばIgG1もしくはIgG3に）変換する変化も含まれる。

【0197】

他の好ましい実施形態では、元の抗CCR4抗体よりも高いまたは優れた特性をもつ第二世代抗体（例えば208、306、308、406、501、503、601、603および803）が提供される。例えば第二世代抗体は、CCR4に対するより高い結合親和性、優れた交差反応性プロファイル、CCR4⁺細胞（特に腫瘍細胞）を標的とする高い能力、改善されたADCC誘導能、改善されたCDC誘導能、本明細書の他の部分で論じた障害のより良い治療を有し得る。

【0198】

有効な第二世代抗体を同定するための比較は、例えば、本明細書でまたは当技術分野において詳しく記述されている様々なアッセイのうちの1つ以上を使用することで、容易に実施され、かつ、定量される。208、306、308、406、501、503、601、603および803抗体として例示される、本発明の抗CCR4抗体よりも少なくとも約2倍、5倍、10倍、20倍、および好ましくは、少なくとも約50倍高い生物学的な特性または活性を有する第二世代抗体も、本発明に包含される。

【0199】

本発明の抗体、結合タンパク質および核酸分子は通常、それらがヒトもしくは動物の体内で、またはヒトもしくは動物の体由来する組織試料の中でその場で存在するそのような要素のいずれからも区別される限りにおいて、「単離された」または「精製された」分子である。しかしながら、配列は、ヒトまたは動物の体内で見られる配列に相当するまたは実質的に相同な配列であり得る。したがって本明細書で使用する場合、核酸分子または配列およびタンパク質またはポリペプチド、例えば、抗体に関する、「単離された」または「精製された」という用語は、天然の環境から単離された、精製された、または天然の環境を実質的に含まないそのような分子、例えば、ヒトまたは動物の体から単離したまたは精製した分子（もしそれが天然に生じたものであれば）を指すか、または技術的な方法によって、すなわち組換えを含む技術によって生産された分子や合成された分子を指す。

【0200】

したがって、核酸分子に関して使用する場合、そのような用語は、他の核酸/遺伝子またはポリペプチドなどの、それらの核酸分子に天然に付随する物質を実質的に含まない核酸を指し得る。これらの用語はまた、組換えDNA技術によって生産された場合には、細胞性物質もしくは培地を実質的に含まない核酸、または化学的に合成した場合には、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸を指し得る。単離されたまたは精製された核酸はまた、その核酸の元になった核酸と天然では隣接している配列（すなわち、その核酸の5'および3'末端に位置している配列）を、または、例えば遺伝子工学に

10

20

30

40

50

よってその核酸に隣接して作られた配列（例えば、タグ配列または治療効果をもたない他の配列）を実質的に含まない場合もある。

【0201】

したがって、タンパク質またはポリペプチド分子、例えば軽鎖CDR1、2および3、重鎖CDR1、2および3、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、ならびに完全長抗体を含む本発明の結合タンパク質または抗体に関連して使用する場合、「単離された」または「精製された」という用語は通常、そのタンパク質の提供源由来の細胞性材料または他のタンパク質を実質的に含まないタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、特にタンパク質をヒトまたは動物に投与する実施形態では、そのような単離されたまたは精製されたタンパク質は、組み換え技術で生産した場合には培地を、または化学的に合成した場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を、実質的に含まない。そのような単離されたまたは精製されたタンパク質はまた、単離された核酸分子について上述のような、隣接配列を含まない場合もある。

10

【0202】

本明細書で使用する場合、「核酸配列」または「核酸分子」という用語は、天然に存在する塩基、糖および糖間（骨格）結合で構成されている、ヌクレオシド配列またはヌクレオチド配列の単量体を指す。この用語はまた、天然に存在しない単量体もしくはその一部を含む、修飾されたまたは置換された配列も含む。本発明の核酸配列は、デオキシリボ核酸の配列（DNA）であつてもリボ核酸の配列（RNA）であつてもよく、天然に存在する塩基（アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシル）を含んでいてもよい。また、配列は修飾された塩基を含んでいてもよい。そのような修飾された塩基の例としては、アザおよびデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシル；およびキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。核酸分子は二本鎖であつても一本鎖であつてもよい。核酸分子は完全にまたは部分的に合成されたものであつてもまたは組み換えられたものであつてもよい。

20

【0203】

好ましい実施形態では、本発明の抗体はヒト抗体であり、より好ましくは完全なヒト抗体である。ヒト抗体は一般的に、ヒトの治療においては少なくとも3つの利点をもつ可能性がある。第一に、ヒトの免疫系はその抗体を異物として認識しないはずである。第二に、ヒトの血中での半減期が天然に存在するヒト抗体と同程度であるため、より少量、かつ低頻度の投与が可能になる。第三に、エフェクタータンパク質がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分よりも強く相互作用し、例えば、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）によって、標的細胞がより効率的に破壊される。

30

【0204】

しかしながら、一般的に、ヒト抗体はこれらの利点を示すと認識されているが、ヒトの治療を成功させるための、十分に高い親和性と適切な機能的特徴を有するヒト抗体の開発が決して容易ではないことが分かっている。したがってこの技術分野では、ヒトの治療に使用するための安全かつ有効な抗CCR4が未だに存在せず、そのような薬剤を開発するための取り組みがなされている。

【0205】

本明細書で使用する場合、抗体分子および結合タンパク質に関連する「ヒト」という用語は第一に、可変領域（例えば、V_H、V_L、CDRまたはFR領域）と、任意で抗体の定常領域を有し、ヒトレパートリーから単離されたもしくはヒトレパートリーに由来する、またはヒトで、例えば、ヒト生殖細胞系または体細胞で見られる配列に由来するもしくはそれらの配列に相当する抗体および結合タンパク質を指す。

40

【0206】

208、306、308、406、501、503、601、603および803抗体は、可変領域がヒトレパートリーから単離された、そのようなヒト抗体分子の例である。

【0207】

本発明の「ヒト」抗体および結合タンパク質はさらに、ヒト配列がコードしていないア

50

ミノ酸残基、例えば、ランダムにもしくは部位特異的にインビトロで導入された突然変異、例えばインビトロクローニングもしくはPCRで導入された突然変異を含む。そのような突然変異の具体例としては、抗体または結合タンパク質のCDRの1つ以上を形成している抗体または結合タンパク質の少数の残基、例えば、抗体または結合タンパク質の5個、4個、3個、2個または1個までの残基に、好ましくは例えば、5個、4個、3個、2個または1個までの残基に入っている保存的置換を含む突然変異、または他の突然変異がある。そのような「ヒト」抗体の具体例としては、免疫原性をもつ可能性のある部位の量を減らすための標準的な修飾法にかけられた抗体および可変領域が挙げられる。

【0208】

したがって、本発明の「ヒト」抗体は、ヒトで見られる配列に由来する配列やヒトで見られる配列に係る配列を含むが、それらの配列はインビボでのヒト抗体の生殖細胞系レパートリーに天然に存在するものでなくてもよい。加えて、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、ヒト配列から同定されたヒトで保存されている配列、またはヒトの配列に実質的に相同な配列を含むタンパク質を含む。

10

【0209】

さらに、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、ヒト抗体分子の組み合わせに見られる、 V_H 、 V_L 、CDRまたはFR領域の組み合わせには限定されない。したがって、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、それらの領域の組み合わせを含むかまたはそのような組み合わせに対応することができるが、それらの領域はヒトに天然に存在するものである必要はない。

20

【0210】

好ましい実施形態では、ヒト抗体は完全なヒト抗体である。本明細書で使用する場合「完全なヒト」抗体とは、上で定義したような、実質的に非ヒト抗体配列を含まないまたはいかなる非ヒト抗体配列をも含まない「ヒト」可変領域ドメインおよび/またはCDRを含む抗体である。例えば、「実質的に非ヒト抗体配列を含まない」ヒト可変領域ドメインおよび/またはCDRを含む抗体とは、ドメインおよび/またはCDR中のわずか5個、4個、3個、2個または1個までのアミノ酸のみが、ヒト抗体配列によってコードされていないアミノ酸である抗体である。したがって、「完全なヒト」抗体は、実質的にヒトのものではない可変領域ドメインを使用した、例えば、ヒト抗体に通常存在するアミノ酸とよりよく対応するように特定のアミノ酸が変更されたマウス可変領域ドメインを使用した「ヒト化」抗体とは区別されるものである。

30

【0211】

本発明の「完全なヒト」抗体は、一本鎖抗体になっている、他の実質的な抗体配列を含まないヒト可変領域ドメインおよび/またはCDRであってもよい。あるいは、本発明の「完全なヒト」抗体は、ヒト抗体の1つ以上の定常領域に統合されたまたは操作可能に連結されたヒト可変領域ドメインおよび/またはCDRであってもよい。特に好ましい完全なヒト抗体は、完全なIgGの定常領域を含むIgG抗体である。

【0212】

他の実施形態では、本発明の「ヒト」抗体は、部分的なヒトキメラ抗体である。本明細書で使用する場合「部分的なヒトキメラ」抗体とは、非ヒト種、例えばラットまたはマウスの定常領域に操作可能に連結されたまたは接合された「ヒト」可変領域ドメインおよび/またはCDRを含む抗体である。そのような、部分的なヒトキメラ抗体を例えば前臨床試験で、好ましくは、定常領域が前臨床試験で使用される動物種のものと同じ前臨床試験で使用することができる。これらの部分的なヒトキメラ抗体はまた、例えば、非ヒト種の定常領域が抗体検出に関してさらなる選択肢を提供し得るエクスピボでの診断に使用することもできる。

40

【0213】

本明細書で使用する場合、用語「断片」は、生物学的に適切な断片、例えば、抗原との結合に寄与する、例えば抗原結合部位の一部を形成する断片、および/またはCCR4抗原の機能の阻害または低下に寄与する断片を指す。特定の好ましい断片は、本発明の抗

50

体の重鎖可変領域（ V_H ドメイン）および/または軽鎖可変領域（ V_L ドメイン）を含む。他の好ましい断片は、本発明の抗体の1つ以上重鎖CDR（または本発明の V_H ドメイン）、または本発明の抗体の1つ以上の軽鎖CDR（または本発明の V_L ドメイン）を含む。ある好ましい断片は、少なくとも5アミノ酸の長さを有し、かつ、少なくとも1つのCDR領域、好ましくはCDR3領域、より好ましくは重鎖CDR3領域を含む。

【0214】

本発明の抗体が本明細書に開示した配列で規定したいずれかの断片を含む実施形態では、例えば、抗体が本発明の V_H および/または V_L ドメインを含んでいる実施形態、または抗体もしくは結合タンパク質が1つ以上の本発明のCDRを含んでいる実施形態では、これらの領域/ドメインは通常、抗体または結合タンパク質の中で離れた位置にあるために、それぞれの領域/ドメインがそれらの生物学的な機能を発揮することができ、そして抗原結合への寄与が保持されている。したがって、 V_H および V_L ドメインは、好ましくは、適切な足場配列/リンカー配列で分離されており、CDRは、好ましくは、天然に存在する抗体および/または有効な改変抗体で見られるような適切なフレームワーク領域によって分離されている。したがって、本発明の V_H 、 V_L および個々のCDR配列は、好ましくは、抗原との結合を可能にする適切なフレームワークまたは足場の中に入った状態またはそれらに組み込まれた状態で提供される。そのようなフレームワーク配列または領域は、適切な足場を形成するのに適している天然に存在するフレームワーク領域である、FR1、FR2、FR3および/またはFR4に対応するものであってよく、または保存されているフレームワーク領域、例えば天然に存在する様々なフレームワーク領域の比較によって同定された、保存されているフレームワーク領域に対応するものであってもよい。あるいは、非抗体性足場またはフレームワーク、例えば、T細胞受容体のフレームワークを使用することもできる。

【0215】

フレームワーク領域として使用することが可能な適切な配列は当技術分野において周知であり、かつ、十分に裏付けられている。また、これらのいずれをも使用することができる。フレームワーク領域に好ましい配列は、本発明の V_H および/または V_L ドメインを構成している1つ以上（すなわち1つ、2つ、3つまたは4つ）のフレームワーク領域、すなわち、表1、2、3または4で開示する1つ以上のフレームワーク領域、またはそれらに実質的に相同なフレームワーク領域であり、具体的には、抗原特異性を維持することが可能なフレームワーク領域、例えば抗体と実質的に同じまたは抗体と同じ三次元構造を生じるフレームワーク領域である。

【0216】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4つ全ての軽鎖可変（配列番号12、13、14および15）および/または重鎖可変（配列番号7、8、9、10）、必要に応じて、配列番号47のFR領域（表1にも示す）もしくはそれらに実質的に相同なFR領域が見られる。

【0217】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4つ全ての軽鎖可変（配列番号12、13、14および15）および/または重鎖可変（配列番号7、8、16および10）、必要に応じて、配列番号48のFR領域（表2にも示す）、またはそれらに実質的に相同なFR領域が見られる。

【0218】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4つ全ての軽鎖可変（配列番号12、13、14、15）および/または重鎖可変（配列番号7、8、18および10）、必要に応じて、配列番号49のFR領域（表3にも示す）、またはそれらに実質的に相同なFR領域が見られる。

【0219】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4つ全ての軽鎖可変（配列番号12、13、14および15）および/または重鎖可変（配列番号19、8、9および10）

10

20

30

40

50

、必要に応じて、配列番号 50 の F R 領域 (表 4 に示す)、またはそれに実質的に同様な F R 領域が見られる。

【0220】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4 つ全ての軽鎖可変 (配列番号 21、13、23 および 15) および / または重鎖可変 (配列番号 19、8、9 および 10)、必要に応じて、配列番号 51 の F R 領域 (表 5 に示す)、またはそれに実質的に同様な F R 領域が見られる。

【0221】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4 つ全ての軽鎖可変 (配列番号 12、13、23 および 15) および / または重鎖可変 (配列番号 19、8、9 および 10)、必要に応じて、配列番号 52 の F R 領域 (表 6 に示す)、またはそれに実質的に同様な F R 領域が見られる。

10

【0222】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4 つ全ての軽鎖可変 (配列番号 21、13、23 および 15) および / または重鎖可変 (配列番号 7、8、9 および 10)、必要に応じて、配列番号 53 の F R 領域 (表 7 に示す)、またはそれに実質的に同様な F R 領域が見られる。

【0223】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4 つ全ての軽鎖可変 (配列番号 25、13、23 および 15) および / または重鎖可変 (配列番号 7、8、9 および 10)、必要に応じて、配列番号 54 の F R 領域 (表 8 に示す)、またはそれに実質的に同様な F R 領域が見られる。

20

【0224】

特定の好ましい実施形態では、本発明の抗体には、4 つ全ての軽鎖可変 (配列番号 12、13、23 および 15) および / または重鎖可変 (配列番号 7、8、28 および 10)、必要に応じて、配列番号 55 の F R 領域 (表 9 に示す)、またはそれに実質的に同様な F R 領域が見られる。

【0225】

したがって、いくつかの実施形態では重鎖 F R 1 の 26 番目は好ましくは E であるが、他の実施形態では G である。いくつかの実施形態では重鎖 F R 3 の 22 番目は好ましくは P であるが、他の実施形態では S であり、かつ、いくつかの実施形態では 23 番目は好ましくは E であるが、他の実施形態では D である。いくつかの実施形態では軽鎖 F R 1 の 7 番目は好ましくは P であるが、他の実施形態では Q である。いくつかの実施形態では軽鎖 F R 3 の 20 番目は好ましくは S であるが、他の実施形態では G である。

30

【0226】

前述の通り、配列番号 12 の好ましいホモログは、配列番号 129 または 130 であり、配列番号 21 の好ましいホモログは、配列番号 131 または 132 である。したがって、以上の内容は全て、配列番号 129 ~ 132 の参照も含むと見なされる。

【0227】

加えて、本発明の好ましい抗体は本発明の V_H、V_L または CDR から構成されるが、本発明の抗体は、本明細書で概略を示した本発明の抗体の CCR4 結合特性または抗 CCR4 特性が維持される場合、本発明のものではない他の V_H、V_L または CDR と組み合わせた 1 つ以上の本発明の V_H、V_L または CDR をも包含することに注意する。

40

【0228】

本明細書で使用する場合、「重鎖相補性決定領域」(「重鎖 CDR」) という用語は、抗体分子の重鎖可変領域 (V_H ドメイン) に含まれている超可変領域を指す。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、重鎖 CDR 1、重鎖 CDR 2 および重鎖 CDR 3 と命名されている 3 つの CDR を有する。重鎖可変領域はさらに、4 つのフレームワーク領域 (アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、FR 1、FR 2、FR 3 および FR 4) を有する。これらのフレームワーク領域によって CDR 同士は隔てられてい

50

る。

【0229】

本明細書で使用する場合、「重鎖可変領域」(V_Hドメイン)という用語は、抗体分子の重鎖の可変領域を指す。

【0230】

本明細書で使用する場合、「軽鎖相補性決定領域」(「軽鎖CDR」)という用語は、抗体分子の軽鎖可変領域(V_Lドメイン)に含まれる超可変領域を指す。軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3と命名されている3つのCDRを有する。軽鎖可変領域はさらに、4つのフレームワーク領域(アミノ末端からカルボキシ末端に向かってFR1、FR2、FR3およびFR4)を有する。これらのフレームワーク領域は、CDR同士を隔てている。

10

【0231】

本明細書で使用する場合、「軽鎖可変領域」(V_Lドメイン)という用語は、抗体分子の軽鎖の可変領域を指す。

【0232】

CDRの位置を定義する必要がある場合には、本明細書がカバット命名法(Kabat et al., 1991。参照することにより具体的に本明細書に組み入れられる)にしたがっていることに注意されたい。

【0233】

本発明のタンパク質およびポリペプチド、例えば軽鎖および重鎖CDR、軽鎖および重鎖可変領域、抗体、抗体断片、および免疫複合体を、当技術分野で周知の、かつ、十分に裏付けられている任意の方法のいくつかを使用して調製してもよいことを当業者は理解するだろうが、最も好ましくは、それらは組換え法によって調製される。

20

【0234】

本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードしている核酸断片を、任意の適切な方法によって、例えばクローニングまたは合成によって得ることもまたは生産することもできる。例えばそのような配列は、例えばヒト生殖細胞系遺伝子由来の適切な配列をクローニングし、その後この生殖細胞系の配列に、本発明の配列を得るために必要な任意の修飾を、当技術分野で周知の、かつ、十分に裏付けられている方法によって施すことで調製される。より効率的な別の方法としては、適切な軽鎖または重鎖可変領域の配列を重複のあるプライマーとして合成し、プライマーエクステンションで完全な配列を得る方法がある。次いで、その後のクローニングおよび操作、例えば適切な発現ベクターへのクローニングのために、適切な制限酵素部位を含むプライマーを用いたPCRによってこの完全な配列を増幅してもよい。一般的に、1つの可変領域につき5つ~7つの重複のあるプライマーで十分であり、それによって、この技術が非常に効果的かつ正確なものになっている。

30

【0235】

一旦、本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードしている核酸断片が得られれば、標準的な組換えDNA技術によってこれらの断片をさらに操作することができる。例えば可変領域断片を、適切な定常領域ドメインをもつ完全長抗体分子または本明細書の他の部分で論じる特定の形態の抗体断片、例えば、Fab断片、scFv断片などに変換することができる。典型的には、またはこの後の操作の一部としては、本発明の抗体分子をコードしている核酸断片を通常、適切な発現ベクターに組み込み、本発明の抗体の産生を容易にする。

40

【0236】

使用可能な発現ベクターとしては、これらには限定されないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルス(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)が、これらのベクターが使用される宿主細胞と適合可能な限りにおいて、含まれる。発現ベクターは、「宿主細胞の形質転換に適したもの」である。すなわち発現ベクターは、本発明の核酸分子と、発現させるために宿主細胞に応じて選択され、核酸分子に操作可能に連結された制御配列とを含む。操作可能に連結されるとは、核酸が制御配

50

列に、その核酸を発現させることができる方法で連結されていることを意味する。

【0237】

本発明は、したがって本発明の核酸分子またはその断片、および本発明の核酸分子によってコードされているタンパク質配列の転写および翻訳に必要な制御配列を含む組換え発現ベクターを考えている。

【0238】

適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳類、または昆虫の遺伝子などの様々な提供源から得ることができる（例えば、Goeddel、1990に記載されている制御配列を参照のこと）。適切な制御配列の選択は、以下に記載するように選択した宿主細胞に依存し、また、当業者により容易に行うことができ得る。そのような制御配列の例としては、転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、リボソーム結合配列（翻訳開始シグナルなど）が挙げられる。加えて、選択した宿主細胞や使用したベクターに応じて、複製開始点、さらなるDNA制限酵素部位、エンハンサー、および転写の誘導に寄与する配列などの他の配列を、発現ベクターに組み込んでよい。

【0239】

本発明の組換え発現ベクターはまた、本発明の組換え分子を形質転換したすなわち導入した宿主細胞の選抜を容易にする選択マーカー遺伝子を含んでいてもよい。選択マーカー遺伝子の例には、ネオマイシンおよびハイグロマイシン（特定の薬剤に対する耐性を付与する）、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、または免疫グロブリンもしくはその一部分（例えば免疫グロブリン、好ましくはIgGのFc部分）などのタンパク質をコードしている遺伝子がある。選択マーカー遺伝子の転写は、選択マーカータンパク質（例えば β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、またはホタルルシフェラーゼ）の濃度の変化によって監視される。選択マーカー遺伝子が、抗生物質耐性（例えばネオマイシン耐性）を付与するタンパク質コードしている場合には、G418を使用して形質転換体を選抜することができる。組み込まれた選択マーカー遺伝子を有する細胞は生き残るが、その他の細胞は殺滅する。これにより、本発明の組換え発現ベクターの発現を可視化および試験することができる。具体的には、変異が発現および表現型に及ぼす影響を決定することができる。選択マーカーを目的の核酸とは別のベクターに導入することもできることが理解される。

【0240】

組換え発現ベクターはさらに、組換えタンパク質の発現の亢進や組換えタンパク質の溶解度の向上をもたらし、また、アフィニティー精製においてリガンドとして機能することによって標的組換えタンパク質の精製を補助する融合部分をコードしている遺伝子を含んでいてもよい。例えば、精製および/または同定を可能にする適切な「タグ」、例えば、Hisタグまたはmycタグ、が含まれていてもよい。例えば、融合タンパク質を精製した後に、融合部分から組換えタンパク質を切断できるように、タンパク質分解によって切断される部位を標的組換えタンパク質に付加してもよい。一般的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを組換えタンパク質にそれぞれ融合する、pGEX（Amrad Corp.、メルボルン、オーストラリア）、pMal（New England Biolabs、ベヴァリー、マサチューセッツ）およびpRIT5（Pharmacia、ピスカタウェイ、ニュージャージー）が挙げられる。

【0241】

組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、形質転換宿主細胞を作成することができる。「形質転換した」、「導入した」、「形質転換」および「導入」という用語は、当技術分野で知られている多くの使用可能な技術のうちの1つによって核酸（例えば、ベクター）を細胞に導入することを包含することを意図している。本明細書で使用する場合、「形質転換宿主細胞」という用語はまた、本発明の組換え発現ベクターで形質転換した、グリコシル化可能な細胞を含むことを意図している。例えば、エレクトロポレーションまたは塩

10

20

30

40

50

化カルシウム介在性形質転換によって原核細胞を核酸で形質転換することができる。例えば、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムとの共沈、D E A E - デキストラン介在性形質転換、リポフェクション、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションなどの標準的な方法を介して、核酸を哺乳類の細胞に導入することができる。宿主細胞の形質転換および導入に適切な方法は、Sambrook et al., 1989、および他の研究用の教科書に見出すことができる。

【0242】

好適な宿主細胞には、広範囲に及ぶ原核宿主細胞や真核細胞が含まれる。例えば、本発明のタンパク質を酵母細胞または哺乳類細胞で発現させてもよい。他の適切な宿主細胞は、Goeddel, 1990に見出すことができる。さらに、本発明のタンパク質を大腸菌などの原核細胞で発現させることもできる(Zhang et al., 2004)。

10

【0243】

本発明の実施に適切な酵母および真菌宿主細胞には、これらには限定されないが、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア属またはクルイベロミセス(*Kluyveromyces*)属およびアスペルギルス属の様々な種が含まれる。酵母(*S. cerevisiae*)で発現させるためのベクターの例としては、pYepSec1(Baldari et al., 1987)、pMFa(Kurjan and Herskowitz, 1982)、pJRY88(Schultz et al., 1987)、およびpYES2(Invitrogen Corporation、サンディエゴ、カリフォルニア)が挙げられる。当業者は、酵母や真菌を形質転換するための手順をよく分かっている(Hinnen et al., 1978; Ito et al., 1983、およびCullen et al. 1987を参照のこと)。

20

【0244】

本発明の実施に好適な哺乳類細胞としては特に、COS(例えば、ATCC寄託番号CRL1650または1651)、BHK(例えば、ATCC寄託番号CRL6281)、CHO(ATCC寄託番号CCL61)、HeLa(例えば、ATCC寄託番号CCL2)、293(ATCC寄託番号1573)、NS-1細胞、NS0(ATCC CRL-11177)、およびPer.C6(登録商標)(Cruce11、ライデン、オランダ)が挙げられる。哺乳類の細胞中での発現を誘導するのに適切な発現ベクターは一般的に、プロモーター(例えば、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などのウイルス性材料由来)、ならびに他の転写および翻訳制御配列を含んでいる。哺乳類の発現ベクターには、pCDM8(Seed, B., 1987)およびpMT2PC(Kaufman et al., 1987)が含まれる。

30

【0245】

本明細書で提示した教示を考慮すると、適切な型の発現ベクターを植物、鳥類、および昆虫細胞に導入するためのプロモーター、ターミネーター、および方法を容易に達成することができる。例えば一実施形態では、本発明のタンパク質を植物細胞から発現させることができる(アグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)ベクターの使用についての総説であるSinkar et al., 1987を参照のこと; また、植物細胞用の発現ベクター、特にPAPS2022、PAPS2023、およびPAPS2034の使用について記載しているZambryski et al., 1984も参照のこと)。

40

【0246】

本発明の実施に好適な昆虫細胞としては、カイコガ属、イラクサギンウワバ属またはスポドプテラ属由来の細胞や細胞株が挙げられる。培養昆虫細胞(SF9細胞)中でタンパク質を発現させることができるバキュロウイルスベクターには、一連のpAc(Smith et al., 1983)および一連のpVL(Luckow and Summers, 1989)がある。本発明の組換えタンパク質を発現させるのに適切なくつこのバキュロウイルス-昆虫細胞発現系が、国際出願PCT/US/02442号に記載されている。

50

【0247】

あるいは、本発明のタンパク質を、ラット、ウサギ、ヒツジおよびブタなどの非ヒトランジェニック動物で発現させてもよい (Hammer et al., 1985; Palmiter et al., 1983; Brinster et al., 1985; Palmiter and Brinster, 1985、および米国特許第4,736,866号)。

【0248】

また、固相合成 (Merrifield, 1964; Frische et al., 1996) または均一な溶液中での合成などの、タンパク質の化学で良く知られている方法で化学的に合成することによって、本発明のタンパク質を調製することもできる。

10

【0249】

他の分子 (例えばタンパク質) に複合体化された本発明の抗体およびタンパク質を含むN末端またはC末端融合タンパク質を、組換え技術を介した融合によって調製してもよい。得られた融合タンパク質は、選択したタンパク質もしくはマーカータンパク質、または本明細書に記載のタグタンパク質に融合した本発明の抗体またはタンパク質を含む。既知の方法によって、本発明の抗体およびタンパク質を他のタンパク質に複合体化することができる。例えば、国際公開第WO90/10457号に記載されているヘテロ二官能性チオール含有リンカー、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロプリオネートまたはN-サクシニミジル-5-チオ酢酸で、タンパク質を結合させてもよい。融合タンパク質または複合体の調製に使用することができるタンパク質の例としては、免疫グロ

20

【0250】

最初の抗CCR4抗体核酸セグメントの調製方法にかかわらず、さらに、好適な抗体核酸セグメントを標準的な分子生物学的な方法によって調製することができる。どの変異体、突然変異体または第二世代の抗CCR4抗体核酸セグメントが本発明の使用に適しているかを確認するために、本発明にしたがって核酸セグメントを試験し、抗CCR4抗体の発現を確認する。好ましくは、変異体、突然変異体または第二世代の核酸セグメントをさら

30

【0251】

様々な抗体を容易に調製することができるため、本発明の治療法は、生物学的に有効な量の少なくとも本発明の第一の抗CCR4抗体を患者で発現する少なくとも第一の核酸セグメントもしくは分子を、動物もしくは患者に提供することによって実施することができる。「抗CCR4抗体を発現する核酸セグメントまたは分子」は通常、少なくとも発現コ

40

【0252】

さらなる態様は本発明の核酸セグメントまたは分子を1つ以上含む発現コンストラクトまたは発現ベクターを提供する。発現コンストラクトまたはベクターは、好ましくは組換え体である。好ましくは、前記コンストラクトまたはベクターはさらに、本発明の核酸分子によってコードされているタンパク質配列の転写および翻訳に必要な制御配列を含む。

50

【0253】

さらに別の態様は本発明の発現コンストラクトまたは発現ベクターを1つ以上含む宿主細胞またはウイルスを提供する。本発明の核酸分子を1つ以上含む宿主細胞またはウイルスもまた提供する。本発明の抗体を発現している宿主細胞またはウイルスは、一層さらに別の態様を形成する。

【0254】

本発明のさらに別の態様は本発明の宿主細胞を培養する工程を含む、本発明の抗体の産生方法を提供する。好ましい方法は、(i) 1つ以上の組換え発現ベクターまたは1つ以上の本発明の核酸配列を含む宿主細胞を、コードされている抗体またはタンパク質の発現に適切な条件で培養する工程、および、必要に応じて(ii) 宿主細胞または培地/上清から、抗体またはタンパク質を単離するまたは得る工程を含む。そのような産生方法はさらに、抗体もしくはタンパク質産物を精製する工程、および/または抗体もしくは産物を少なくとも1つの別の成分、例えば薬学上許容可能な担体または賦形剤を含む組成物として処方する工程を含み得る。

10

【0255】

本発明の抗体またはタンパク質が1つ以上のポリペプチド鎖(例えば、Fab断片などの特定の断片)で構成されている実施形態では、完全なタンパク質(例えば、本発明の結合タンパク質)が宿主細胞中で組み立てられ、これを宿主細胞から単離または精製できるように、全てのポリペプチドは、好ましくは宿主細胞中で、同じまたは別の発現ベクターのいずれかから発現される。

20

【0256】

本発明の抗体を使用して、CCR4に結合するさらなる抗体を産生してもよい。そのような使用には例えば、新しい抗体を作成するために、本明細書の他の場所で定義した本発明の抗体のうちの1つである親抗体のアミノ酸配列中に含まれる1つ以上のアミノ酸を付加、欠損、置換または挿入すること、およびCCR4に結合する抗体を同定するために、得られた新しい抗体を試験することが含まれる。そのような方法では複数の新しい抗体を作成することができ、新しい抗体は全て、CCR4への結合能に関して試験することができる。好ましくは前記1つ以上のアミノ酸の付加、欠損、置換または挿入は、1つ以上のCDRドメイン内で行う。

【0257】

そのような親抗体への修飾または変異の導入は、当技術分野で周知であり、かつ、十分に裏付けられている技術を使用した、いかなる適切な方法でも行うことができる。例えば、無作為または部位特異的な突然変異を生成する方法で行うことができる。部位特異的な突然変異生成が行われる場合には、突然変異生成に適切な残基を確認するための一方法では、結合タンパク質-抗原複合体、例えば、Ab-Ag複合体の結晶構造の解析が、抗原結合に関与する重要な残基の同定に活用される(Davies and Cohen, 1996)。その後、それらの残基を変化させて相互作用を高めることができる。あるいは、単純に1つ以上のアミノ酸残基を標的とした部位特異的な突然変異生成を行い、CCR4への結合に及ぼす影響を評価してもよい。

30

【0258】

任意の適切な方法によって、例えば、エラープロン(error-prone)PCR、鎖シャフリング(chain shuffling)またはミューテーター大腸菌株を使った無作為突然変異生成を行うことができる。

40

【0259】

したがって、1つ以上の本発明のV_Hドメインを、単一のV_Lドメインまたは任意の適切な提供源由来のV_Lドメインのレパートリーと組み合わせ、得られた新しい抗体を試験して、CCR4に特異的な抗体を同定することができる。逆に、1つ以上の本発明のV_Lドメインを単一のV_Hドメインまたは任意の適切な提供源由来のV_Hドメインのレパートリーと組み合わせ、得られた新しい抗体を試験して、CCR4に結合する抗体を同定することができる。

50

【0260】

同様に、必要に応じて、1つ以上、または好ましくは3つ全ての本発明のV_Hおよび/またはV_LドメインのCDRを接合して、単一のV_Hおよび/またはV_Lドメイン、またはV_Hおよび/またはV_Lドメインのレパートリーとし、得られた新しい抗体を試験してCCR4に結合する抗体を同定してもよい。

【0261】

突然変異の標的となるCDR、特に軽鎖および/または重鎖のCDR3は、抗体の親和性を高める効果的な技術であることが示されており、かつ、好ましい。好ましくは、CDR3のうちの3~4個のアミノ酸のまとめり、または「ホットスポット」と呼ばれている特定の領域を突然変異生成の標的とする。

10

【0262】

「ホットスポット」とは、インビボで体細胞超変異が生じる配列である(以下のNeuberger and Milstein, 1995も参照のこと)。ホットスポット配列は、特定のコドンによる保存されているヌクレオチド配列として定義することができる。保存されている配列はRGYWからなる4つのヌクレオチドで、ここで、RはAまたはGのいずれであってもよく、YはCまたはTであってもよく、WはAまたはTのいずれであってもよい(Neuberger and Milstein, 1995)。さらに、可変ドメインのCDR領域では、ヌクレオチドAGYによってコードされているセリン残基がTCNによってコードされているセリンよりも多く含まれており、TCNがホットスポット配列に対応する可能性がある(Wagner et al., 1995)。

20

【0263】

したがって、本発明のそれぞれの抗体の重鎖および軽鎖CDRのヌクレオチド配列を走査して、ホットスポット配列やAGYコドンの有無を確認することができる。その後任意で、International Immunogenetics database (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>)を使い、軽鎖および重鎖のCDR領域中で確認されたホットスポットを、生殖細胞の重鎖および軽鎖の配列と比較することができる(Davies et al., 1990)。生殖細胞系の配列と同一の配列には体細胞変異が起こっていないと示唆されるため、インビボで生じる体細胞の現象を模倣したランダムな突然変異を導入することが、または、部位特異的な突然変異生成、例えばホットスポットおよび/またはAGYコドンへの突然変異生成を行うことができる。それとは対照的に、生殖細胞系の配列とは異なる配列は既に体細胞変異が起こったことを示しているが、インビボでの体細胞変異が最適であったか否かを決定する必要がある。

30

【0264】

突然変異生成に好ましいホットスポットは、分子表面に露出しているアミノ酸をコードしているホットスポットであり、好ましくは、抗原結合部位を形成しているアミノ酸をコードしているホットスポットである。突然変異生成に好ましい他のホットスポットは、非保存アミノ酸をコードしているホットスポットである。分子内部に埋もれているアミノ酸またはCDRに保存されているアミノ酸をコードしているホットスポットには、好ましくは、突然変異を生成しない。これらの残基は通常、構造全体にとって重要であり、かつ、内部に埋もれているため、抗原とは相互作用しない傾向にある。

40

【0265】

アミノ酸およびタンパク質ドメインを操作するための上述した方法は、当業者に周知である。例えば前記操作は、核酸レベルでの遺伝子操作によって都合よく行うことができる。この場合、適切な結合タンパク質およびそのドメインをコードしている核酸分子が修飾され、その結果、得られた発現タンパク質のアミノ酸配列が適切な方法で修飾される。

【0266】

1つ以上の抗体が特異的にCCR4に結合するかの能力を試験する方法は、当技術分野で周知の、かつ、十分に裏付けられている任意の適切な方法によって実施することができる。CCR4⁺細胞株は培養株保存機関から入手しても、あるいは組換えCCR4を発現

50

させることが可能なコンストラクトでCCR4陰性株を形質転換することによって調製してもよい。そのような細胞、または固定化したCCR4を直ちに結合アッセイに、例えばELISA、BiaCronなどの標準的な方法によるアッセイに使用することができる。

【0267】

好ましくは、これらの方法によって産生した新しい抗体の機能特性は向上しており、例えば、CCR4に対する親和性が親抗体よりも高くまたは強くなっている（または少なくとも同等の親和性をもっている）。また新しい抗体は、本明細書の他の部分で説明したように、本発明の抗体と同じように処理・使用することができる（例えば、治療、診断、組成物に加えるなどのために）。あるいは、またはこれに加えて、新しい抗体は本明細書の他の部分で説明したように、向上した、1つ以上の他の機能特性を有している。

10

【0268】

これらの方法で産生され、入手され、または入手可能な新しい抗体は、本発明のさらに別の態様を形成する。

【0269】

本発明はさらに、少なくとも1つの本発明のヒト抗体または抗体断片を含み、必要に応じて希釈剤を含む組成物を提供する。そのような組成物は薬学上許容可能な組成物であっても、または基礎研究で使用するための組成物であってもよい。医薬組成物は、好ましくは、非経口投与用、静脈内投与用、さらには皮下投与用に処方され得る。

【0270】

本発明は、本発明のヒト抗体および抗体断片の数多くの方法および使用を提供する。全ての方法に関し、「1つ」（「a」および「an」）という用語は特段の記載のない限り、記載した方法における「少なくとも1つの」、「少なくとも第一の」、「1つ以上の」または「複数の」工程を意味することを目的として使用される。これは特に、治療法における投与工程に適切である。したがって、本発明では様々な用量を用いることができるばかりではなく、様々な投与回数、例えば、複数回の注射までを含む、様々な注射回数を用いることもできる。抗CCR4治療用抗体の投与前、投与後、または投与中に併用治療を行ってもよい。

20

【0271】

生物学的に重要な意味をもつ、本発明の抗体または免疫複合体の様々な利用価値のあるインビトロ法および使用を提供する。最初に、CCR4を結合させる方法、およびCCR4の結合の使用を提供する。CCR4の結合は通常、CCR4を含む組成物と少なくとも第一の本発明の抗CCR4抗体、またはその抗原結合断片を効果的に接触させることを含む。したがって、本発明の抗体またはその免疫複合体を結合アッセイに使用することができる。適切な有用な結合アッセイには、免疫ブロット、ウェスタンブロット、ドットブロット、RIA、ELISA、免疫組織化学、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、免疫沈降、アフィニティクロマトグラフィーなどの、当技術分野で一般的に用いられている方法が含まれる。

30

【0272】

CCR4の検出方法およびCCR4の検出の使用を提供する。CCR4の検出には通常、CCR4を含んでいると考えられるもしくはCCR4を含んでいることが分かっている組成物を、本発明の第一の抗体もしくは免疫複合体またはその抗原結合断片と、CCR4/抗体複合体の形成を可能にするのに有効な条件で接触させること、および形成された複合体を検出することを含む。検出の方法と使用は、生体試料に行っても、例えば腫瘍の診断について行ってもよく、また、それらに基づく診断キットも提供する。

40

【0273】

本発明の抗体を使用して、抗CCR4治療が対象に有効かどうかを決定することもできる。したがって、CCR4関連障害を患っている対象の細胞、標的部位、組織または器官で発現しているCCR4の有無またはCCR4の量を測定するための本発明の抗体の使用を提供し、ここで検出されたまたは測定されたCCR4の有無または量が健常対照群よりも高いことが、抗CCR4治療が前記対象にとって有効であることの指標となる。別の見

50

方では、抗CCR4治療が対象に有効かどうかを決定するための方法が提供され、この方法は、有効量の本発明の抗体を対象に投与すること、および前記対象の細胞、標的部位、組織、または器官で発現しているCCR4の有無を検出または量を測定することを含み、ここで検出されたまたは測定されたCCR4の有無または量が健常対照群よりも高いことが、抗CCR4治療が前記対象にとって有効であることの指標となる。

【0274】

前記細胞または標的部位は、好ましくは、固形腫瘍または血液腫瘍であってよい。好ましくは、検出されたまたは測定されたCCR4の有無または量を使用して、そのCCR4関連障害が抗CCR4剤、好ましくは本発明の抗CCR4抗体に感受性であるかどうかを予測する。好ましくは、検出されたまたは測定されたCCR4の有無または量を使用して、抗CCR4剤、好ましくは本発明の抗CCR4抗体を投与するかどうかを決定する。

10

【0275】

本発明の方法および使用は特に、CCR4の発現もしくは活性が関連している、またはCCR4が生物学的な役割を担っている任意の疾患もしくは状態を患っている、またはそのような疾患もしくは状態を発症するリスクがある動物および患者に対して使用することを目的としている。そのような疾患および障害には、CCR4陽性細胞、典型的にはCCR4⁺のTh2またはTh17細胞が介在する疾患が含まれる。それらの細胞は、リガンドがCCR4に結合すると、シグナル伝達経路に加わり、障害もしくは疾患を引き起こすまたは障害もしくは疾患に寄与する可能性がある。CCR4を発現している細胞が異常に増殖することによって引き起こされる疾患も含まれる。そのような異常増殖細胞は天然でCCR4⁺である場合があり、または、それらの細胞は、突然変異が生成され/形質転換され、CCR4を発現している場合がある。上述のように、CCR4の発現は、この抗原を発現している癌細胞が免疫系から逃れるのを補助する可能性がある。したがって、CCR4が介在する疾患もしくは障害、および/またはCCR4陽性細胞の異常な増殖によって特徴付けられる疾患もしくは障害の治療法を提供する。

20

【0276】

別の見方では、以下の、

(i) CCR4⁺細胞の選択的な除去

(ii) CCR4とその1つ以上のリガンドとの結合の障害

(iii) CCR4リガンドに対するCCR4介在性細胞応答の障害、特に走化性またはカルシウムイオン濃度の上昇の障害(細胞の活性化)

30

のうちの1つ以上から利益を得ることができる状態の治療を提供する。

【0277】

好ましくは、CCR4リガンドは、MDCおよび/またはTARCである。

【0278】

CCR4は多くの疾患や障害に関与しているため、一旦、所定の抗CCR4治療が任意の許容可能なモデル系で有効であることが示されれば、CCR4の発現に関連した全ての疾患および障害の治療に使用できることを、当業者は理解する。

【0279】

一実施形態では、CCR4が介在する条件は、ヘルパーT細胞2型が介在する免疫疾患である。「ヘルパーT細胞2型が介在する免疫疾患」は、アレルゲンに特異的なTh2細胞の発現および活性化に由来する、免疫グロブリンE(IgE)および肥満細胞が関与している疾患を意味する。

40

【0280】

CCR4が介在する疾患または障害は、炎症、感染および/または癌(血液癌および非血液癌を含む)に関連する疾患または状態であり得る。そのような疾患または障害を、本発明の抗体および組成物で治療または予防することができる。好ましい疾患または状態としては、(1)アレルギー性疾患(例えば全身性アナフィラキシーまたは過敏性反応、薬物アレルギー、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)、昆虫刺傷アレルギーおよび食物アレルギー)、(2)炎症性腸疾患(例えばクローン病、潰瘍性大腸炎、回

50

腸炎および腸炎)、(3) 膣炎、(4) 乾癬および炎症性皮膚疾患(例えば皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹および掻痒)、(5) 脈管炎、(6) 脊椎関節症、(7) 強皮症、(8) 喘息および呼吸アレルギー疾患(例えばアレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、慢性閉塞性肺疾患、過敏性肺疾患など)、(9) 自己免疫疾患(例えば関節炎(リウマチおよび乾癬を含む)、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、I型糖尿病、糸球体腎炎など)、(10) 移植片拒絶反応(同種移植の拒絶反応や移植片対宿主拒絶反応を含む)、ならびに(11) 望ましくない炎症性応用が阻害されるべき他の疾患(例えばアテローム性動脈硬化症、筋炎、T細胞介在性神経変性疾患、多発性硬化症、脳炎、髄膜炎、肝炎、腎炎、敗血症、サルコイドーシス、アレルギー性結膜炎、耳炎、キャスルマン病、副鼻腔炎、LPS誘導性内毒素性ショック、ベーチェット症候群および痛風)、(12) 癌(血液癌と非血液癌の両方)、好ましくは乳癌、直腸結腸癌、食道癌、胃癌、肝細胞癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌、膵癌、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)、末梢T細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、B細胞慢性リンパ球性白血病、CTCL、特に菌状息肉腫、セザリー症候群、子宮頸癌、腎臓癌、脳腫瘍、前立腺癌、胃癌)(13) 感染(例えばエプスタイン・バーウイルス(EBV)感染、HIV感染および他のウイルス感染)が挙げられる。

10

【0281】

本発明の抗体がCCR4に結合すると、癌細胞などのCCR4陽性細胞の宿主免疫系を回避する能力が損なわれる可能性がある。本発明の抗体を使用して T_{reg} 細胞によるDCの抑制を阻害し得る。したがって、ワクチンのアジュバントとしての本発明の抗CCR4抗体の使用を提供する。ワクチンは、好ましくは癌または感染症のためのワクチンである。ワクチンは予防用のワクチンであっても治療用のワクチンであってもよい。「アジュバント」とは、抗原に対する宿主の免疫応答を高める薬剤を意味する。ワクチンのアジュバントとして使用する場合には、通常、免疫応答を誘導することが望まれる抗原との関連で、またはそのような抗原と併用して、本発明の抗体を投与する。

20

【0282】

本明細書で使用する場合、「異常な増殖」という用語は、正常な、適切な、または予期される経過から逸脱した細胞の増殖を意味する。例えば、異常な細胞増殖には、DNAまたは他の細胞の構成要素が損傷を受けたまたは欠損している細胞の不適当な増殖が含まれる場合がある。

30

【0283】

異常な細胞増殖には、不適当に高いレベルの細胞分裂、不適当に低いレベルのアポトーシス、またはそれらの両方によって引き起こされる、それらが介在している、またはそれらの結果である徴候と関連する特徴をもつ、細胞増殖が含まれる場合もある。それらの徴候は例えば、細胞の、細胞群の、または組織の単発性または多発性の局所的な異常増殖、癌性または非癌性、良性または悪性によって特徴付けられ得る。

【0284】

本明細書では、「腫瘍」という用語はいずれも、「癌」または「癌腫」も指す。原発性腫瘍からの転移を抑制することで、転移性癌も治療することができる。手術後にも患者に残っている、いわゆる「微小残存病変(MRD)」が、抗CCR4抗体を用いた免疫療法に感受性である場合もある。

40

【0285】

したがって、本発明はさらに、上で定義した疾患を患っている動物または患者に、治療上有効量の本発明の抗CCR4抗体、または抗原結合断片またはそのような抗CCR4抗体の免疫複合体を投与することを含む、そのような疾患の治療方法および治療の使用を提供する。

【0286】

本発明のさらに別の態様は治療、画像化、または診断に使用する組成物または薬物の製造における、本発明の抗体または抗原結合断片またはそのような抗体の免疫複合体の使用を提供する。

50

【 0 2 8 7 】

一層さらに別の態様は治療、診断、または画像化で使用するための、本発明の抗体または抗原結合断片またはそのような抗体の免疫複合体を提供する。

【 0 2 8 8 】

さらに本発明は、本発明の抗体または抗原結合断片またはそのような抗体の免疫複合体と、1つ以上の薬学上許容可能な賦形剤、担体、希釈剤、緩衝液または安定化剤を含む組成物を提供する。

【 0 2 8 9 】

本明細書に記載したインビボでの方法は通常、哺乳類中で実施される。いかなる哺乳類をも、例えばヒトおよび任意の家畜、飼育動物、または実験動物を治療することができる。具体例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシおよびサルが挙げられる。しかしながら、哺乳類は好ましくはヒトである。

10

【 0 2 9 0 】

したがって、本明細書で使用する場合、「動物」または「患者」という用語には、いかなる哺乳類も、例えばヒトおよび任意の家畜、飼育動物、または実験動物も含まれる。具体例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシおよびサルが挙げられる。しかしながら、動物または患者は、好ましくはヒト対象である。

【 0 2 9 1 】

本発明は、非複合体化または裸の抗体およびその断片を使用した上で定義した障害の治療法と、免疫複合体を使用したCCR4⁺細胞、好ましくはCCR4⁺腫瘍細胞を標的化する方法の双方を関連づけるものであり、この免疫複合体中では、本発明の抗体またはその抗原結合断片が治療薬に操作可能に連結されている。したがって、特段の記載のない限りまたは科学的な用語から明かでない限り、「抗体およびその断片」という用語は本明細書で使用する場合、別の薬剤（特に治療薬または診断薬）に結合していない、「非複合体化または裸の」抗体または断片を意味する。これらの定義は抗体の修飾、例として示すだけであるが、例えば、抗体の生物学的な半減期、親和性、結合能もしくは他の特性を向上させるための修飾、または抗体と他のエフェクターとの組み合わせを排除するものではない。

20

【 0 2 9 2 】

本発明の治療法および使用はまた、非複合体化または裸の抗体と免疫複合体の双方の使用を包含する。免疫複合体を使用した治療法では、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、好ましくは、第二の治療薬に操作可能に連結されている（抗CCR4抗体それ自体が第一の治療薬である）。治療薬は例えば、コルチコステロイドおよび非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）などの抗癌剤または抗炎症剤であってもよい。

30

【 0 2 9 3 】

前述の治療法および使用は通常、経皮注入、筋内注入、静脈内注入などによる、動物または患者への薬学的に有効な組成物の全身的な投与を伴う。しかしながら、治療薬を腫瘍部位または部位に局在させることが可能ないかなる投与経路も許容可能である。そのため、他の適切な送達経路には、経口経路、経鼻経路または呼吸器経路および局所経路が含まれる。

40

【 0 2 9 4 】

本明細書で使用する場合、「投与」とは、治療効果、例えば抗腫瘍効果を発揮するのに有効な量および期間、抗CCR4抗体治療薬を供給または送達することを意味する。一般的には、タンパク質製剤の受動投与が、一つには、単純で再現性があることから好ましい。

【 0 2 9 5 】

しかしながら、本明細書で使用される「投与」という用語は、本発明の抗CCR4抗体を標的部位に送達するか、さもなければ標的部位に供給するいずれのおよび全ての手段を指す。したがって、「投与」には、本発明の抗CCR4抗体を産生する細胞を、標的部位に送達するのに有効な方法で供給することを含む。そのような実施形態では、選択的な透

50

過性を示す膜、構造または移植可能な装置に細胞を処方するまたは梱包することが望ましい場合がある。通常、これらの膜、構造または装置を除去することで、治療を止めることができる。さらに、一般的には、本発明の外生抗CCR4抗体が好ましい。なぜならば、本発明の外生抗CCR4抗体は、嚴重に監視・制御可能な非侵襲的な方法であるためである。

【0296】

本発明の治療法および使用はまた、本発明の抗CCR4抗体をコードしている核酸を、それらを腫瘍の近傍で発現させるまたはそれらを標的部位に局在させるのに有効な方法で供給することも包含する。いかなる遺伝子治療技術も、例えば裸のDNAの送達、組換え遺伝子およびベクター、患者の細胞をエクスピボで操作することを含む細胞を用いた送達なども、使用することができる。

10

【0297】

本発明の抗CCR4抗体を使用して、他の治療薬または診断薬を標的部位に送達することもできる。そのような実施形態では、その他の治療薬または診断薬は一般的に、本発明の抗CCR4抗体に操作可能に連結されている。

【0298】

本発明で使用される「治療上有効量」とは、少なくとも一部の標的CCR4⁺細胞を特異的に殺滅させる；標的CCR4⁺細胞の少なくとも一部でアポトーシスを特異的に誘導する；標的CCR4⁺細胞の少なくとも一部で壊死を特異的に誘導する；CCR4リガンドのCCR4への結合を阻害する；CCR4リガンドに対するCCR4介在性細胞応答を阻害する、好ましくはCCR4リガンドに応答した細胞内でのカルシウムイオン濃度の上昇を阻害する；炎症を抑制する；および/またはCCR4⁺腫瘍を呈している動物または患者に投与した場合に腫瘍の退縮または寛解を誘導するのに有効な、本発明の抗CCR4抗体またはその免疫複合体の量である。好ましくは、そのような効果が達成されるが、動物または患者の、正常な健康組織に含まれる細胞への結合または正常な健康組織に含まれる細胞の殺滅をほとんど、または、全く示さず、そして、無視できる、または管理可能な有害副作用を正常な健康組織に及ぼす。

20

【0299】

「標的部位」は、障害に介在している、または障害を引き起こすもしくは増悪させる異常な形で増幅しているCCR4⁺細胞の位置を意味する。したがって、標的部位は例えば、腫瘍またはCCR4介在性炎症が起こっている場所であり得る。「標的細胞」は、障害に介在している、または障害を引き起こすもしくは増悪させる異常な形で増幅しているCCR4⁺細胞である。したがって、標的細胞は例えば、CCR4⁺腫瘍細胞、CCR4⁺T_H1細胞および/またはCCR4⁺T_H2細胞を含み得る。

30

【0300】

したがって、CCR4⁺細胞（例えばCCR4⁺腫瘍細胞）を殺滅させることもしくはアポトーシスの誘導もしくは壊死の誘導または炎症の抑制または腫瘍の退縮もしくは寛解の誘導に関して本明細書で使用する場合、「優先的に」および「特異的に」という用語は、本発明の抗CCR4抗体またはその免疫複合体が機能して、CCR4⁺標的細胞の破壊、例えば腫瘍細胞の破壊および/または腫瘍壊死が起こることを意味している。これは実質的に動物または対象の標的部位に限定されるものであり、実質的に、正常な健康組織の破壊および/または組織壊死の誘導までに及ぶものではない。

40

【0301】

本発明の抗CCR4抗体または治療用複合体は好ましくは、1つ以上の放射線治療薬、化学療法薬、血管新生阻害剤、アポトーシス誘導剤、抗チューブリン薬、抗細胞剤または細胞毒物、サイトカインまたはケモカインアンタゴニスト、サイトカインまたはケモカインの発現阻害剤、ATPアーゼ阻害剤、抗炎症薬、他の抗体（例えば二重特異的抗体として）または凝固剤（凝固因子）または抗炎症薬（例えばコルチコステロイド、好ましくはグルココルチコイド、または非ステロイド系抗炎症薬、すなわちNSAID）に結合される。

50

【0302】

したがって本発明は、抗CCR4抗体と少なくとも1つの他の治療薬または診断薬が操作可能に連結している、様々な複合体化抗体とその断片を提供する。「免疫複合体」という用語は広い意味で使われ、抗体と別の有効な薬剤との操作可能な連結を定義しているが、単に任意の型の操作可能な連結のみを指すことを意図しているわけではなく、特に化学的な「共役」に限定されるものでもない。特に、組換え融合タンパクが考えられる。送達剤または標的化剤が標的に結合可能であり、かつ、治療薬または診断薬が送達に際して十分にその機能を発揮するがぎり、その結合様式は好適である。

【0303】

抗体の炭水化物部分を介した薬剤の結合も考えられている。抗体では、O-結合型およびN-結合型両方のグリコシル化が自然に生じる。組換え抗体を修飾して、さらなるグリコシル化部位を再形成または形成することができる。必要に応じて、抗体の一次配列に適切なアミノ酸配列 (Asn-X-Ser、Asn-X-Thr、Ser、またはThrなど。Xはプロリン以外のいかなるアミノ酸であってもよい) を単に加えることによって達成される。

【0304】

本発明の抗CCR4抗体または治療用複合体ならびに関連した方法および使用で使用するのに好ましい現行の薬剤としては、抗体の効果を補完するまたは向上させる薬剤および/または特定の型の障害 (例えば腫瘍型) または患者のために選択された薬剤がある。

【0305】

「抗体の効果を補完するまたは向上させる治療薬」としては、放射線治療薬、化学療法薬、血管新生阻害剤、アポトーシス誘導剤、抗チューブリン薬、抗細胞剤または細胞毒物、凝固剤、サイトカインまたはケモカインアンタゴニスト、サイトカインまたはケモカインの発現阻害剤、ATPアーゼ阻害剤、抗炎症薬 (例えばコルチコステロイド、好ましくはグルココルチコイド、または非ステロイド系抗炎症薬、すなわちNSAID)、他の抗体 (例えば二重特異的抗体として) が挙げられ、これらのうちの1つ以上はいずれも、本発明の使用に好ましい。

【0306】

現行の好ましい抗癌剤、特に抗白血病薬には、ダウノルビシン、ドキソルビシン、シタラビン、6-チオグアニン、ミトキサントロン、プスルファン (Myleran (登録商標))、ダサチニブ (Sprycel (商標))、プレドニゾン、ピンクリスチン硫酸塩 (Oncovin (登録商標))、クロラムブシル、フルダラビン、ペントスタチンおよびクラドリピンなどのアントラサイクリン系薬剤が含まれる。

【0307】

ATLの治療に好ましい現行の薬剤には、ジドブジン (アジドチミジン) およびCHOP療法がある。CHOPは、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン (アドリアマイシン)、オンコピン (ピンクリスチン)、プレドニゾン/プレドニゾロンの略である。

【0308】

現行の好ましい血管新生阻害剤としては、アンギオスタチン、エンドスタチン、アンギオポエチン類のうちのいずれかが1種、バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマスピンがある。

【0309】

本明細書で使用する場合「抗チューブリン薬」とは好ましくは、細胞の有糸分裂に必須のチューブリン活性、好ましくはチューブリンの重合または脱重合を、直接または間接的に阻害することによって、細胞の有糸分裂を阻害する、いかなる薬剤、薬物、プロドラッグまたはその組み合わせを意味する。現行の好ましい抗チューブリン薬としては、コルヒチン、タキソール、ピンラスチン、ピンクリスチン、ビンデスチン (vindesine) および1種以上のコンプレスタチン類が挙げられる。

【0310】

10

20

30

40

50

現行の好ましいNSAIDとしては、COX-2阻害剤、スルホンアニリド、リコフェロン (licofelone) およびオメガ-3脂肪酸が挙げられる。

【0311】

好ましい薬剤と本発明の抗CCR4抗体の結合または会合により、「免疫複合体」が生じる。そのような免疫複合体は、増強された、さらには相乗的な治療特性、例えば抗腫瘍特性または抗炎症性特性を有することが多い。

【0312】

抗細胞剤および細胞毒物を使用することで本発明のCCR4抗体「免疫毒素」が得られ、凝固剤を使用することで本発明の抗CCR4抗体「コアグリガンド (coagulgands)」が得られる。

10

【0313】

少なくとも2種類の治療薬を使用することもまた考えられる。例えば、放射線治療薬、化学療法薬、血管新生阻害剤、アポトーシス誘導剤、抗チューブリン薬、抗細胞剤または細胞毒物、サイトカインまたはケモカインアンタゴニスト、サイトカインまたはケモカインの発現阻害剤、ATPアーゼ阻害剤、抗炎症薬 (例えばコルチコステロイド、好ましくはグルココルチコイド、または非ステロイド系抗炎症薬、すなわちNSAID)、他の抗体 (例えば二重特異的抗体として) および凝固因子の1つ以上の組み合わせが考えられる。

【0314】

特定の用途では、本発明の抗CCR4抗体治療薬を、細胞成長または細胞分裂を停止させるまたは抑制する能力を有する細胞毒物、細胞分裂抑制剤あるいは抗細胞剤に操作可能に連結させる。好適な抗細胞剤には、化学療法薬や細胞毒物および細胞分裂抑制剤が含まれる。細胞分裂抑制剤は通常、標的細胞の自然な細胞周期をかく乱する薬剤、好ましくは、標的細胞を細胞周期から逸脱させる薬剤である。

20

【0315】

化学療法薬の例としては、ホルモン (例えばステロイド) ; 代謝拮抗剤 (例えばシトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートまたはアミノプテリン) ; アンストラサイクリン ; マイトマイシンC ; ピアンカアルカロイド ; 抗生物質 ; デメコルチン ; エトポシド ; ミトラマイシン ; および抗腫瘍アルキル化剤 (例えばクロランブシルまたはメルファラン) が挙げられる。特定の好ましい抗細胞剤には、DNA合成阻害剤 (例えばダウノルビシン、ドキシソルビシン / アドリアマイシンなど) がある。総合すると、タキソール / パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタピン、コンプレスタチンおよびドキシソルビシン / アドリアマイシンが現行の好ましい抗癌剤である。

30

【0316】

サリチルイハラミド、コンカナマイシンまたはバフィロマイシンなどのV型ATPアーゼもまた現在好ましいものであり、プリムベリン (psymberin)、ペデリン、イルシニアスタチンAなどのタンパク質合成阻害剤も同様である。

【0317】

毒素の多くがもたらす細胞殺滅効果が、他の使用可能な薬剤よりもかなり大きいため、特定の治療用途には毒素部分が好ましい。そのため、本発明の抗CCR4抗体コンストラクトに好ましい特定の抗癌剤は、植物、真菌、または細菌に由来する毒素である。毒素の例としては、エピポドフィロトキシン ; 細菌性内毒素または細菌性内毒素の脂質部分 ; リボソーム不活性化タンパク質 (例えばサポリンまたはゲロニン) ; a-サルシン ; アスペルギリン ; レストリクトシン ; リボヌクレアーゼ (例えば胎盤のリボヌクレアーゼ) ; ジフテリア毒素および緑膿菌外毒素が挙げられる。現行の好ましい例には、リシン、ゲロニン、アプリン、ジフテリア、緑膿菌および百日咳毒素がある。

40

【0318】

特定の好ましい毒素は、リシンA鎖などの毒素A鎖である。最も好ましい毒素部分は、炭水化物残基を修飾または除去するように処理されているリシンA鎖、いわゆる「脱グリコシル化A鎖」 (dgA) であることが多い。脱グリコシル化リシンA鎖の効果が高いこ

50

と、半減期が長いこと、また、臨床に適したグレードおよび規模での製造が経済的に実現可能なことから、脱グリコシル化リシンA鎖が好ましい。組換えおよび/または切断型リシンA鎖を用いることもできる。

【0319】

本発明の抗CCR4抗体治療薬は、凝固を促進することができる成分、すなわち凝固剤を含んでいてもよい。この場合、目的の抗体を直接または間接的に、例えば別の抗体を介して、直接または間接的に凝固を刺激する因子に結合させることができる。

【0320】

そのような使用に好ましい凝固剤には、組織因子(TF)およびTF誘導体(例えば切断型TF(tTF)、二量体、三量体、重合した/多重結合したTF)、ならびにVII因子を活性化する能力を欠損したTF変異体がある。他の適切な凝固因子としては、ビタミンK依存性凝固剤(例えばII/IIa因子、VII/VIIa因子、IX/IXa因子およびX/Xa因子);GIa修飾を欠損しているビタミンK依存性凝固因子;ラッセルクサリヘビ毒X因子活性化剤;血小板活性化化合物(例えばトロンボキサンA₂およびトロンボキサンA₂合成酵素);および繊維素溶解阻害剤(例えば2-抗プラスミン)が挙げられる。総合すると、切断型組織因子(tTF)が現在好まれている。

【0321】

一般的に、免疫複合体および免疫毒素の調製は当技術分野において周知である(例えば、米国特許第4,340,535号を参照のこと)。さらに、下記の特許はそれぞれ、免疫毒素の生成、精製および使用に関する本発明の教示をさらに補う目的で、参照することにより本明細書に組み入れられる。米国特許第6,004,554号;同第5,855,866号;同第5,965,132号;同第5,776,427号;同第5,863,538号;同第5,660,827号および同第6,051,230号。

【0322】

様々な化学療法および他の薬剤を本発明の抗CCR4抗体治療薬に複合体化することができる。抗体に複合体化されている抗腫瘍薬の例としては、ドキソルピシン、ダウノマイシン、メトトレキサートおよびビンブラスチンが挙げられる。さらに他の薬剤、例えばネオカルチノスタチン、マクロマイシン(macromycin)、トレニモン(trenimon)および-アマニチンの結合については記載がある(それぞれ本明細書に組み入れられる、米国特許第5,660,827号;同第5,855,866号;および同第5,965,132号を参照のこと)。

【0323】

コアグリガンドの調製も容易に実施することができる。免疫毒素について上で記載したように、本発明の抗CCR4抗体と1つ以上の凝固因子を操作可能に連結させることは直接的な結合となり得る。あるいは、操作可能な連結は間接的な結合であってもよく、この場合、例えば、抗体を第二の結合領域、好ましくは凝固因子に結合する抗体または抗体の抗原結合領域に操作可能に連結させる。本発明の抗CCR4抗体を、凝固因子の凝固機能をもつ部位とは離れた場所に結合させなければならず、分子の結合には特に共有結合が用いられる。

【0324】

本発明の方法では、二重特異性または三重特性抗体を使用してもよい。そのような抗体も本発明の抗体であり、そのような抗体では一本のアームがCCR4に結合する。二重特異性抗体の調製方法は当技術分野で周知であり、かつ、詳しく記述されている。

【0325】

免疫複合体、免疫毒素およびコアグリガンドの調製には、組換え発現を用いてもよい。選択した本発明の抗CCR4抗体をコードしている核酸配列と、治療薬、毒素または凝固剤をコードしている核酸配列を発現ベクター中で、インプレームで結合させる。組換え発現によって核酸配列が翻訳され、所望の免疫複合体が得られる。化学架橋剤およびアビジンとビオチンの架橋も、治療薬を本発明の抗CCR4抗体に連結させることができる。

【0326】

本発明の組成物および方法を他の治療薬および診断薬と組み合わせても良い。本発明にしたがって、抗CCR4抗体と「組み合わせる」使用される生物製剤、好ましくは診断薬または治療薬に関し、「組み合わせる」という用語は簡潔に使用され、多岐にわたる実施形態を包含する。したがって「組み合わせる」の用法は、別段の記載のない限りまたは科学的な用語から明かでない限り、組成物、医薬品、混合物、キット、方法、ならびに第一のおよび第二の医学用途の様々な形態の組み合わせに適用される。

【0327】

したがって本発明の「組み合わせる」実施形態には、例えば、本発明の抗CCR4が裸の抗体であり、本発明の抗CCR4が、この抗体に操作可能に連結されていない薬剤または治療薬と組み合わせる使用される実施形態がある。そのような例では、薬剤または治療薬は、標的としていないまたは標的としている形態で使用することができる。「標的としていない形態」では、薬剤特に治療薬は通常、当技術分野におけるそれらの標準的な方法にしたがって使用される。「標的としている形態」では、薬剤は通常、標的疾患部位に薬剤または治療薬を送達する別の抗体または標的化領域に操作可能に連結されている。そのような標的としている形態の生物製剤、診断薬と治療薬の両方、の使用もまた、当技術分野では非常に標準的である。

10

【0328】

本発明の他の「組み合わせる」実施形態では、本発明の抗CCR4抗体は免疫複合体であり、この場合、抗体自体が薬剤または治療薬に操作可能に連結されているかまたは組み合わせられている。操作可能な連結は、本明細書に記載のおよび当技術分野で知られている、全ての型の直接的および間接的な結合を含む。

20

【0329】

特に治療薬と併用される本発明の抗CCR4抗体に関しては、「組み合わせる」使用はさらに、組み合わせる組成物、医薬品、混合物、キット、方法、ならびに第一のおよび第二の医学的用途を含み、この場合、治療薬はプロドラッグの形態である。そのような実施形態では、プロドラッグを、機能型の薬剤に変換することができる活性化成分もまた、ここでも、本発明の抗CCR4抗体に操作可能に連結される。

【0330】

特定の好ましい実施形態では、治療用組成物、組み合わせ、医薬品、混合物、キット、方法、ならびに第一のおよび第二の医学的用途は、「プロドラッグの組み合わせ」である。当業者に理解されるように、「プロドラッグの組み合わせ」という用語は、特にことわりがない限り、本発明の抗体が、プロドラッグを活性薬剤へと変換することが可能な成分に操作可能に連結されていることを意味しており、抗体がプロドラッグ自体に結合しているのではないことを意味している。しかしながら、本発明のプロドラッグの実施形態を、プロドラッグの組み合わせとして使用する必要はない。したがってプロドラッグは、ADEPTおよび他の形態を含む当技術分野で使用されているいかなる方法においても、使用することができる。

30

【0331】

したがって、好ましくは診断薬に、より好ましくは治療薬に関し、組み合わせる組成物、医薬品、混合物、キット、方法、ならびに第一のおよび第二の医学的用途についての記述がある場合、組み合わせるには裸の抗体である抗CCR4抗体と免疫複合体が含まれ、本発明の実施形態のインピボにおける実施には、裸の抗体または免疫複合体および生物学的な診断薬または治療薬を、先に、同時に、または後で投与することが含まれる。ただし、いくつかの複合体化型または非複合体化型では、いくつかの形態の抗体およびいくつかの形態の生物学的な診断薬または治療薬の全体的な供給が達成される場合に限られる。

40

【0332】

腫瘍に及ぼす本発明の効果に関する上述のおよび他の説明は、作業の組み合わせ方、結合剤の型などを簡単に説明するためのものである。この記述方法を、本発明の抗CCR4抗体の有益な特性の過小評価または過度の単純化のいずれとしても見なすべきではない。したがって、そのような抗体はそれら自体が抗CCR4特性を有し、そのような抗体の免

50

疫複合体はこれらの特性を維持し、免疫複合体はその特性を連結した薬剤の特性と組み合わせ、さらに、抗体と任意の連結した薬剤の組み合わせた効果は、通常、抗体自体がもつ効果よりも向上しているおよび/または拡大していることが理解される。

【0333】

したがって本発明は、任意で、少なくとも第一の組成物または容器中に入った、生物学的に有効な量の少なくとも第一の本発明の抗CCR4抗体、またはそのような抗CCR4抗体の抗原結合断片もしくは免疫複合体；および、生物学的に有効な量の少なくとも第二の生物製剤、成分または系を含む、組成物、医薬組成物、治療用キットおよび医療用混合物を提供する。

【0334】

「少なくとも第二の生物製剤、成分またはシステム」は、治療用または診断用の製剤、成分または系であることが多いが、それらである必要はない。例えば、少なくとも第二の生物製剤、成分またはシステムは、抗体を修飾するための成分および/または他の薬剤を抗体に結合させるための成分を含んでいてもよい。特定の好ましい第二の生物製剤、成分またはシステムは、プロドラッグか、またはプロドラッグを生成するためのおよび使用するための成分である。このような成分には、プロドラッグそのものを生成するための成分や、本発明の抗体を適応させて、そのようなプロドラッグまたはADEPT実施形態中で機能させるための成分が含まれる。

【0335】

治療薬または診断薬が少なくとも第二の生物製剤、成分またはシステムとして含まれる場合には、そのような治療薬および/または診断薬は通常、上で定義した1つ以上の障害の治療または診断に関連して使用するための薬剤である。

【0336】

したがって特定の実施形態では、「少なくとも第二の治療薬」は、治療用キットまたは治療用混合物に含まれる。「少なくとも第二の治療薬」という用語は、第一の治療薬である本発明の抗CCR4抗体を参考にして選択される。したがって本発明の抗体は、化学療法薬、放射線治療薬、サイトカインもしくはケモカインアンタゴニスト、サイトカインもしくはケモカインの発現阻害剤、血管新生阻害剤、アポトーシス誘導剤または抗癌性免疫毒素またはコアグリガンド、または抗炎症剤（コルチコステロイドやNSAIDなど）と組み合わせてもよく、それらのうちのいくつかの例については本明細書の他の部分で論じる。

【0337】

他の抗癌剤の例としては、例えば、ネオマイシン、ポドフィロトキシン、TNF- α 、 α アンタゴニスト、カルシウムイオノフォア、カルシウム流動誘導剤、およびそれらの誘導體またはプロドラッグのいずれもが含まれる。現行の好ましい抗チューブリン薬としては、コルヒチン、タキソール、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデスチン(vindesine)、コンプレスタチンまたはそれらの誘導體もしくはプロドラッグが挙げられる。

【0338】

本発明の組成物、キットおよび/または薬剤については、組み合わせた有効量の治療薬を、単一の容器もしくは入れ物に入れてもよいし、または別個の容器もしくは入れ物に入れることもできる。混合物を組み合わせる場合には、通常、混合物を混ぜ合わせる。静脈内投与用に処方された薬剤が好ましいことが多い。画像化剤を加えてもよい。キットには、キットに入っている少なくとも第一の抗体と1つ以上の他の生物製剤を使用するための説明を加えてもよい。

【0339】

一般的に、少なくとも第二の治療薬は、単一の医薬組成物もしくはほぼ同時に投与される2つの医薬組成物として、動物または患者に、本発明の抗CCR4抗体と実質的に同時に投与され得る。

【0340】

10

20

30

40

50

あるいは、本発明の抗CCR4抗体と少なくとも第二の治療薬を順次、動物または患者に投与することもできる。本明細書で使用する場合、「順次」は「ずらす」こと、すなわち、少なくとも第二の抗癌剤を動物または患者に、本発明の抗CCR4抗体の投与とは別の時点で投与することを意味する。一般に、十分に時間をあけて2つの薬剤を投与し、2つの薬剤がそれぞれの治療効果を発揮することができるようにする。すなわち、2つの薬剤を「生物学的に有効な時間間隔」で投与する。少なくとも第二の治療薬を、生物学的に有効な時間間隔をあけて、本発明の抗CCR4抗体の前に動物または患者に投与することも、または生物学的に有効な時間間隔をあけて、本発明の抗CCR4抗体の後に投与することもできる。

【0341】

10

したがって本発明は、腫瘍を患っている動物または患者の治療方法を提供し、この方法は、

(a) 動物または患者に、腫瘍量をかなり減少させる第一の治療を施すこと；および
(b) 続いて、少なくとも第一の本発明の抗CCR4抗体またはその抗原結合断片を投与することを含み、抗体または断片は必要に応じて、第二の治療薬と操作可能に連結されている。

【0342】

好ましい第一の治療としては、外科的切除および化学療法による介入が挙げられる。

【0343】

他の実施形態において本発明は、CCR4介在性疾患を患っている動物または患者の治療法を提供し、この治療法は、

20

(a) 動物または患者に、CCR4が介在している負荷、例えば炎症を十分に軽減させる第一の治療を施すこと；および
(b) 続いて、少なくとも第一の本発明の抗CCR4抗体またはその抗原結合断片を投与することを含み、抗体または断片は必要に応じて、第二の治療薬と操作可能に連結されている。

【0344】

特定の他の実施形態では、本発明の抗体および免疫複合体と1つ以上の診断薬、一般的には、上で定義した障害の診断に関して使用される診断薬と組み合わせてもよい。したがって、本発明には多様な診断用組成物、キットおよび方法が含まれる。

30

【0345】

さらに別の態様は対象を診断する方法または画像化する法を提供する。これらの方法は、本明細書で定義した、適切な量の本発明の抗体または他のタンパク質を対象に投与すること、および対象における本発明の抗体または他のタンパク質の有無および/または量および/または位置を検出することを含む。

【0346】

一実施形態において本発明は、CCR4の発現と関連している、動物での免疫抑制を軽減する方法を提供し、この方法は、前記動物中のCCR4と複合体を形成するのに有効な量の本発明の抗体またはその免疫複合体を投与することを含み、その結果、CCR4の発現と関連している動物での免疫抑制が軽減する。

40

【0347】

上述の使用および方法にしたがって画像化するまたは診断するのに適した疾患には、本明細書の他の部分で説明したような、任意の疾患、そして好ましくは任意の癌が含まれる。

【0348】

一実施形態において本発明は、動物の疾患を診断する方法または疾患の進行を監視する方法を提供し、これらの方法は、

(a) 前記動物から得た試験試料と本発明の抗体またはその免疫複合体を接触させる工程、を含む。

【0349】

50

さらなる実施形態において本発明は、動物の疾患を診断する方法または疾患の進行を監視する方法を提供し、これらの方法は、

- (a) 前記動物から得た試験試料と本発明の抗体またはその免疫複合体を接触させる工程；
- (b) 試験試料中における、抗体 - 抗原複合体の有無および / または量および / または位置を測定するまたは検出する工程；および、任意で、
- (c) 試験試料中の抗体 - 抗原複合体の有無および / または量を対照と比較する工程、を含む。

【0350】

上述の方法では、抗体 - 抗原複合体の形成を可能にする条件で、前記接触させる工程を実施する。当業者は適切な条件を容易に決定することができる。

【0351】

上述の方法では、いかなる適切な試験試料も、例えば疾患に罹患している疑いのある細胞生検、組織もしくは器官、または組織切片も使用することができる。

【0352】

上述の方法のうちのあるものでは、試験試料中に多少なりとも抗体 - 抗原複合体が存在することが、疾患が存在していることの指標となる。確実に診断するためには、好ましくは、試験試料中の抗体 - 抗原複合体量は適切な対照試料で見られる量よりも高く、好ましくは有意に高い。より好ましくは、有意に高いレベルは、統計的に有意なレベルであり、好ましくは確率値が < 0.05 の場合のレベルである。統計的な有意差を決定するのに適した方法は当技術分野で周知であり、かつ、詳しく記述されており、また、これらのいずれを使用してもよい。

【0353】

疾患の進行を監視することは、試験試料中の抗体 - 抗原複合体の有無および / または量を時間経過に沿って監視することを含み得る。したがって監視することは、(d) 第一の試験試料中の抗体 - 抗原複合体の有無および / または量と、前記動物から得た第二の試料中の抗体 - 抗原複合体の有無および / または量を比較することを含み得る。「第一の試験試料」とは、「第二の試験試料」を採取するよりも前に、例えば第二の試験試料を採取するよりも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 もしくは 12 日前に、何週間か前に、何ヶ月か前にまたは何年か前に得た試料を意味する。第二の試験試料中の抗体 - 抗原複合体の量が、第一の試験試料と比較して減少している場合、これは疾患が退行していることの指標となり、量の増加は疾患が進行していることの指標となる。

【0354】

当業者は、適切な対照試料を容易に選択することができる。例えば、特定の疾患を診断する場合には、その疾患を患っていない対象由来の試料が適切な対照となる。また、全ての試験で対照「試料」についての試験を行わなくても、例えば当技術分野において既知の正常対象の範囲を参照することで、適切な対照「値」を容易に決定することができる。

【0355】

診断用途または画像化用途で使用する場合、本発明の抗体を検出可能なマーカー、例えば、放射線不透過性または放射性同位元素 (^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I など)；放射線放出体 (例えば、 α 、 β 、 γ 、または X 線放出体)；蛍光 (蛍光色素分子) または化学発光化合物 (発色団) (フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリンなど)；酵素 (アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなど)；画像化剤；または金属イオン；または化学部分 (特定の同族の検出可能部分、例えば標識されたアビジン / ストレプトアビジンへの結合によって検出することができるビオチンなど) で標識してもよい。結合タンパク質、例えば抗体または抗体断片に標識を結合させる方法は当技術分野で知られている。そのような検出可能なマーカーによって、試験試料中の結合タンパク質 - 抗原複合体の有無、量または位置の解析が可能になる。

【0356】

インビボで使用するための好ましい検出可能なマーカーには、X線により検出することができる化合物（例えば、ビスマス（III）、金（III）、ランタン（III）もしくは鉛（II））；放射性イオン（例えば銅⁶⁷、ガリウム⁶⁷、ガリウム⁶⁸、インジウム¹¹¹、インジウム¹¹³、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、水銀¹⁹⁷、水銀²⁰³、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、ルビジウム⁹⁷、ルビジウム¹⁰³、テクネチウム^{99m}もしくはイットリウム⁹⁰）；核磁気スピン共鳴同位体（例えば、コバルト（II）、銅（II）、クロム（III）、ジスプロシウム（III）、エルビウム（III）、ガドリニウム（III）、ホルミウム（III）、鉄（II）、鉄（III）、マンガン（II）、ネオジム（III）、ニッケル（II）、サマリウム（III）、テルビウム（III）、バナジウム（II）もしくはイッテルビウム（III）など）；またはローダミンもしくはフルオレセインがある。

10

【0357】

本発明はまた、検出可能なシグナルを生成する標識に、直接または間接的に結合した、本発明の抗体を含む診断薬または画像化剤を含む。適切な標識については、本明細書の別の部分で記述する。

【0358】

本発明はさらに、1つ以上の本発明の抗体、免疫複合体もしくは組成物、または本発明の抗体をコードしている1つ以上の核酸分子、または本発明の核酸配列を含んでいる1つ以上の組換え発現ベクター、または本発明の組換え発現ベクターまたは核酸配列を含んでいる1つ以上の宿主細胞もしくはウイルスを含むキットを包含する。前記キットは、好ましくは本発明に記載の方法および使用で、例えば、本明細書に記載の治療、診断または画像化法で用いるためのものであるかまたは、本明細書に記載のインビトロでのアッセイまたは方法で使用するためのものである。そのようなキットに含まれる抗体は、好ましくは、本明細書の他の部分で説明するような、抗体複合体、例えば、検出可能な部分との複合体であってもまたは免疫複合体であってもよい。前記キットは好ましくは、キットの構成要素の、例えば診断で使用する場合の使用説明書を含む。前記キットは好ましくは、本明細書の他の部分で説明したような、疾患の診断または治療のためのものであり、任意で、そのような疾患の診断または治療で使用する場合の、キットの構成要素に関する使用説明書を含む。

20

【0359】

本明細書で定義したように、本発明の抗体を、インビトロでのまたはインビボでの用途およびアッセイ用の分子ツールとして使用してもよい。抗体には抗原結合部位があるため、抗体は特定の結合対のメンバーとして機能することができ、特定の結合対のメンバーが必要とされる任意のアッセイで、これらの分子を使用することができる。

30

【0360】

したがって本発明の一層さらなる態様は、本明細書で定義した本発明の抗体を含む試薬と、そのような抗体の分子ツールとしての使用、例えばインビトロまたはインビボアッセイでの使用を提供する。

【0361】

癌治療はまた、
(a) 腫瘍を患っている動物または患者に、診断量の少なくとも第一の検出可能に標識した本発明の抗CCR4抗体（本発明の抗CCR4抗体に操作可能に連結した診断薬を含む）を投与し、その結果検出可能な腫瘍の画像を生成することで、腫瘍の画像を生成すること；および
(b) 同じ動物または患者に、治療上最適化量の少なくとも第一の本発明の裸の抗CCR4抗体または、そのような抗体を用いた治療薬-抗体コンストラクトを続いて投与し、その結果抗腫瘍効果を誘導すること、によって行うことができる。

40

【0362】

配列番号16と18は同一であり、そのため、本明細書に開示したいずれの実施形態においても、配列番号16の参照は配列番号18の参照も含むと見なされ、そしてその逆も

50

また同じである。

【 0 3 6 3 】

次に、表および図を参照して、以下の非限定的な例において本発明がより詳細に説明される。

表 1 は抗体 2 0 8 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 2 は抗体 3 0 6 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 3 は抗体 3 0 8 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 4 は抗体 4 0 6 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 5 は抗体 5 0 1 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 6 は抗体 5 0 3 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

10

表 7 は抗体 6 0 1 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 8 は抗体 6 0 3 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 9 は抗体 8 0 3 に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。

表 1 0 は抗体 2 0 8 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 1 は抗体 3 0 6 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 2 は抗体 3 0 8 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 3 は抗体 4 0 6 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

20

表 1 4 は抗体 5 0 1 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 5 は抗体 5 0 3 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 6 は抗体 6 0 1 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 7 は抗体 6 0 3 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

表 1 8 は抗体 8 0 3 の I g G 型に関連して本明細書に開示される配列のいくつかを記載する。可変領域には下線が引かれている。

30

表 1 9 は、T A R C 介在性カルシウム流動阻害から得られる、 $I C_{50}$ の計算値を示す。

表 2 0 は、標識化リガンドを使用する、抗 C C R 4 I g G のリガンド干渉性結合実験からの $I C_{50}$ の実測値を示す（実施例 3）。K W 0 7 6 1 について数値は決定されなかった。適合度は最小自乗 (R^2) 値により判定される。

表 2 1 はリガンド介在性カルシウム流動実験での抗 C C R 4 抗体の拮抗性特性の概要である（実施例 5）。T A R C 誘導性カルシウム流動の場合、 $I C_{50}$ 値が測定され、適合度が最小自乗 (R^2) により判定される。M D C 誘発性シグナル伝達への阻害効果は $10 \mu g / m l$ の濃度で抗 C C R 4 抗体の最大阻害として提示され、% 単位で表される。K W 0 7 6 1 について数値は決定されなかった。

40

表 2 2 は、抗 C C R 4 抗体によるリガンド誘導性遊走 (T A R C および M D C) の抑制からの $I C_{50}$ 実測値および残存遊走の割合 (%) の概要である。 $I C_{50}$ 値は、実施例 6 に記載されるように、リガンドの存在下でのタイトレーション曲線から得られた。適合度は最小自乗 (R^2) 値により判定される。M D C の阻害の場合、 $10 \mu g / m l$ の I g G 濃度での最大阻害が提示される。

表 2 3 は、7 8 6 O 細胞への抗 C C R 4 抗体 5 0 3 による T A R C 誘導性侵入の抑制からの $I C_{50}$ 実測値の概要である。 $I C_{50}$ 値は、実施例 6 に記載されるように、T A R C (25 および $125 n M$) の存在下でのタイトレーション曲線から得られた。適合度は最小自乗 (R^2) 値により判定される。

表 2 4 は、血液腫瘍細胞株 C C R F C E M および L 4 2 8 に対する、実施例 9 に記載

50

されるADCC実験からのEC₅₀実測値の概要である。EC₅₀実測値は、GraphPad (Prism)を使用して、データを「log(アゴニスト) vs. 反応モデル」に当てはめることにより得られた。細胞傷害性の最大値が所与の濃度で提示される。

表25：腎臓細胞腫瘍マイクロアレイ(TMA)とその妥当な対照組織(胎盤および正常な腎臓)についての免疫組織化学(IHC)実験からのスコア表。1つのTMAについて染色されたコアの総数から陽性染色のコアの数が与えられる。損傷を受けたコアはスコアされなかったため、染色されたコアの数は各染色で異なる。ゼロは染色されたものがなかったことを意味し、1は中間の染色を意味し、2は強い染色を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0364】

【図1a)】実施例2の結果：CCR4を発現する標的細胞への抗CCR4 s c F vの結合。二量体の状況をシミュレートするために抗My c - 抗体(マウス)を使用してs c F vが架橋され、10 μ g / m lから始めて、3倍に希釈された。R P E複合体化抗マウスI g Gを使用して、結合したs c F vを検出した。a) C C R 4陽性D T 4 0細胞への結合。b) C C R 4陰性D T 4 0細胞への結合。

【図1b)】同上

【図2】実施例2の結果：CCR4陰性He k 2 9 3 T細胞と比較した、CCR4発現He k 2 9 3 T細胞への抗CCR4 s c F v 2 0 8の結合。二量体の状況をシミュレートするために抗My c - 抗体(マウス)を使用してs c F vが架橋され、10 μ g / m lから始めて、3倍に希釈された。R P E複合体化抗マウスI g Gを使用して、結合したs c F vを検出した。

【図3】実施例2の結果：CCR4を発現する天然の標的細胞(C C R F - C E M)への抗CCR4 s c F vの結合。二量体の状況をシミュレートするために抗My c - 抗体(マウス)を使用してs c F vが架橋され、20 μ g / m lから始めて、3倍に希釈された。R P E複合体化抗マウスI g Gを使用して、結合したs c F vを検出した。

【図4】実施例3の結果：A l e x a 6 4 7標識化M D C - S N A Pを用いる抗CCR4 s c F vのリガンド干渉性結合実験。一定濃度のM D C - S N A P (5 0 n M)の存在下、5 μ g / m l (1 5 0 n M)の濃度で、そして、12希釈点にわたって3倍ずつs c F vを希釈して、s c F vをインキュベートした。

【図5】実施例3の結果：T A R CおよびM D Cの存在下での抗CCR4 s c F vのリガンド干渉性結合実験。一定濃度のリガンド(1 μ g / m l)と2.5 μ g / m lのマウス抗My c - 抗体(マウス)の存在下、0.5 μ g / m lの濃度でs c F vをインキュベートし、抗マウス - R P E複合体化抗体を用いて染色した。s c F vは実施例1に記載される通り(候補601は提示されず)。シグナルが、抗体対照のみで染色された細胞(バックグランド)ならびに未染色細胞(未染色)と比較された。

【図6】実施例4の結果：ビオチン化K W 0 7 6 1 - I g Gの存在下での抗CCR4抗体208、306、308、406、501、503、601、60、803およびK M 3 0 6 0 v a rとの間の競合実験。P E複合体化ストレプトアビジンを使用してビオチン化K W 0 7 6 1 - I g Gを検出した。

【図7】実施例5の結果：K M 3 0 6 0 v a rと比較した、抗CCR4 s c F v抗体によるT A R C介在性カルシウム流動の阻害。s c F vの濃度を上昇させつつ、28.6 n g / μ l (3 . 6 n M)の終濃度のT A R Cをインキュベートし、0.5 μ g / m lの濃度で始まる6点のs c F vの希釈点にわたってT A R Cの力価測定を行った。T A R Cリガンドはあるが、s c F v抗体が無いなかで記録されたシグナルを100%シグナル伝達として、シグナルが%単位で表された。

【図8】実施例5の結果：抗CCR4 s c F v抗体によるM D C介在性カルシウム流動の阻害。10 μ g / m lという一定の濃度のs c F vの存在下で、5 n g / μ l (6 . 2 5 n M)の終濃度のM D Cをインキュベートした。M D Cリガンドはあるが、s c F v抗体が無いなかで記録されたシグナルを100%シグナル伝達として、シグナルが%単位で表された。

10

20

30

40

50

【図9】実施例6の結果：抗CCR4 s c F v抗体の濃度が上昇するなかでの(0.36 ~ 333 nM)、CCR4⁺CCR4⁻CEM細胞のTARC介在性走化性の抑制。TARCの濃度は3.5 nMという一定の濃度であった。TARCリガンドはあるが、s c F v抗体が無いなかでの細胞の遊走を100%として、シグナルが%単位で表された。グラフはフィットさせられた。

【図10】実施例2の結果：CCR4を発現する標的細胞への抗CCR4 IgGの結合。規定濃度のIgGをインキュベートし、RPE複合体化抗ヒトIgGを使用して、結合したIgGを検出した。a) CCR4陽性CCR4⁻CEM細胞への結合。IgGを1 μg/mlで始まる8点にわたって4倍ずつ希釈した。b) CCR4陽性Hut78細胞への結合。IgGを1 μg/mlで始まる8点にわたって4倍ずつ希釈した。c) CCR4陽性L-428細胞への結合。IgGを10 μg/mlで始まる8点にわたって3倍ずつ希釈した。

10

【図11】実施例2の結果：ヒト血清の存在下でのCCR4発現標的細胞(CCR4⁻CEM)への結合。0%のヒト血清(FACS緩衝液)か10%および50%のヒト血清の存在下で10 μg/mlの濃度のビオチン化試料をインキュベートした。PE複合体化ストレプトアビジンにより試料を検出した。a) 記録された結合シグナルの比較。b) %単位に換算された残存結合シグナル。

【図12】実施例3の結果：標識化リガンドを使用する抗CCR4 IgGのリガンド干渉性結合実験。a) 一定の濃度のAlexa647標識化MDC-SNAP(50 nM)の存在下で5 μg/ml(35 nM)の濃度のIgGと8希釈点にわたって4倍ずつ希釈したIgGをインキュベートした。b) 一定の濃度のビオチン化TARC(3.12 μM)の存在下で2.5 μg/ml(17.5 nM)の濃度のIgGと8希釈点にわたって4倍ずつ希釈したIgGをインキュベートした。PE複合体化ストレプトアビジンを使用して、残っている結合したビオチン化TARCを検出した。

20

【図13】実施例6の結果：786-O細胞のCCL17/TARC介在性侵入の抑制。抗CCR4抗体503の濃度(μg/ml)を上昇させつつ、2つの異なる濃度のCCL17/TARC(25 nMおよび125 nM)と細胞がインキュベートされた。実施例6に概説されるように、遊走した細胞を染色し、解析し、%単位に換算した。破線(y = 25%)はアッセイ中の786-O細胞の基底侵入能力を示す。

【図14】実施例9の結果：CCR4発現細胞株CCR4⁻CEM(a)およびL-428(b)に対するADCCの誘導。ヒトPBMCの存在下で、実施例1に記載されるように、様々な濃度の抗CCR4抗体とカルセイン標識化標的細胞をインキュベートした。KW0761が対照としてインキュベートされた。トライトンX 100で処理した後の100%溶解した細胞での試料の蛍光強度に基づき、ADCCの誘導を%単位に換算した。非線形回帰分析により用量反応曲線を算出した。

30

【図15】実施例9の結果：CCR4を発現する単離されたT_{reg}細胞に対するADCCの誘導。実施例9に記載されるようにT_{reg}細胞が単離され、カルセインで標識化され、そして、自己PBMCの存在下で4.5 μg/mlという単一濃度の抗CCR4抗体と共にインキュベートされた。トライトンの存在下での細胞からのカルセインの放出最大値に対して正規化することにより、細胞傷害性を%単位に換算した。殺滅のパーセンテージが示される。

40

【図16】実施例10の結果：成人性T細胞白血病リンパ腫(ATLL)のヒト異種移植片モデルにおける抗CCR4抗体のインビボ効力。腫瘍移植(TI)後の試験の間に様々な群で測定された体重が示される。A群(対照群)は大きい腫瘍体積のため23日後に殺処理を受けた。a) 処理時間に対する平均体重(g単位)。b) 処理時間に対する相対的体重(%単位)。

【図17】実施例10の結果：成人性T細胞白血病リンパ腫(ATLL)のヒト異種移植片モデルにおける抗CCR4抗体のインビボ効力。腫瘍移植(TI)後の試験の間に様々な群(a ~ e)で測定された腫瘍体積の比較。腫瘍移植(TI)後の時間に対して個々の(mm³単位で測定された)腫瘍体積がプロットされている。対照群(A群)は腫瘍体積

50

が大きいため第23日に殺処理を受けなければならなかった。

【図18】実施例10の結果：成人性T細胞白血病リンパ腫（ATLL）のヒト異種移植片モデルにおける抗CCR4抗体のインビボ効力。a）様々な実験群の間での腫瘍の平均値。各群内で生存している動物の数が示される。b）個々の処理群（抗体）と未処理（対照）群の比較により計算された生存率。抗CCR4抗体306および503について統計的有意値が特定された。c）第23日での腫瘍倍化時間の計算値。抗CCR4抗体503についての統計的有意差が特定された（*で印される）。

【図19】実施例12の結果：腎臓細胞癌（RCC）患者由来の腫瘍マイクロアレイに対する抗CCR4抗体503の結合。パラフィン包埋組織切片についてIgG503の結合を評価した。3 μ g/mlの濃度で抗体をインキュベートし、ビオチン複合体化ヤギ抗ヒト抗体（1：500）とインキュベートし、そして、基質としての3,3ジアミノベンジジンとペクタステイン・エリートABCキットを使用して抗体を可視化した。顕微鏡の倍率はx倍で示されている。脾臓由来の陽性対照組織で染色を最適化し（a）、そして、正常なヒト胎盤組織で特異性について確認した（b）。RCCの患者由来の組織への結合はc）およびd）に示される。

【実施例】

【0365】

比較情報

先に考察したように、公知の抗CCR4抗体ファミリーはKM2160、KM3060、KM2760およびKW-0761を含み、それらは、ヒトCCR4のN末端アミノ酸の位置2～29の領域にあるエピトープを認識する（欧州特許第1270595号）。

【0366】

本明細書において報告される実験のいくつかでは、本発明者らはKM3060 var（「KM3060 v」とも称される）を使用しており、それはKM3060に対応するが、異なる宿主で発現されたので、異なる糖プロファイルを有する可能性がある。scFv型でこの抗体を使用した。

【0367】

本明細書において報告される実験のいくつかでは、本発明者らはIgG型のKW0761を使用した。

【0368】

KM2760はCCR4とTARCまたはMDCの間の相互作用を妨げないことが報告されている（Ishida et al., 2006, Cancer Research 66 (11), pp 5716-5722）。出願者のKM3060 varを使用した発見はこの報告と一致する。

【0369】

KM2760がCCR4のシグナル伝達を阻害しないことも報告されている。出願者は、KM3060 varがMDCまたはTARC誘導性カルシウム流動を阻害しないことを発見している。出願者はまた、KM3060 varがMDCまたはTARC介在性走化性をあまり抑制しないことを発見した。

【0370】

実施例1：新規抗体

CCR4に特異的に結合する9つのヒト抗体を同定した。c-mycタグエピトープおよび6xヒスチンタグエピトープを含むpHOG21プラスミドに単鎖形態の抗体をクローン化した。TG1バクテリアを形質転換し、IPTG誘導でscFvを発現させた。精製したscFvの結合をEasyCytelにより確認した（実施例2を参照のこと）。

【0371】

抗体の重鎖および軽鎖を産生するクローンのヌクレオチド配列が解析された。抗体は208、306、308、406、501、503、601、603および803と名付けられた。208、306、308、406、501、503、601、603および803の軽鎖および重鎖の、特に、CDR領域の配列が表1～9に、それぞれ、示される。

10

20

30

40

50

【0372】

IgG形態の抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803もまた作製された。標準的な方法を用いてIgGを調製した。簡単に述べると、対応する可変ドメインをコードする遺伝子が、ヒト定常ドメインを含む哺乳類発現ベクターpLNO (Norderhaug et al, 1997)にクローン化された。細胞工場で抗体が発現され、そして、プロテインAカラムで最初の採取物が精製され、そして、サイズ排除クロマトグラフィーによって単量体に分画された。IgGはそれらのCCR4に特異的に結合する能力を保持していた。

【0373】

IgG形態のこれらの抗体はIgG1アイソタイプの抗体であり、2本の重鎖と2本の軽鎖を含む。各重鎖はV_Hドメイン(配列は適切な表に示される)とヒトIgG1定常領域を含む。各軽鎖はV_Lドメイン(配列は適切な表に示される)とヒト軽鎖定常領域を含む。実施例7において説明されるように、脱フコシル化形態のIgG抗体が作製された。IgG形態の本発明の抗体を用いる、本明細書において記載されるいずれのアッセイも脱フコシル化形態の抗体を使用する。

【0374】

実施例2: 抗CCR4抗体の標的発現細胞への結合

実施例1において開示された抗体のCCR4特異性を示すために、scFv208、306、308、406、501、503、601、603および803を用いる染色についてのフローサイトメトリーにおいて、自分でCCR4を形質移入したHEK293T細胞、DT40細胞、および非形質移入型のそれらの細胞、および天然のCCR4⁺CCR4-CEM細胞株を使用した。陽性対照として、自分でクローン化し、発現したKM3060var scFvを使用した。(緑色蛍光タンパク質に対して生じた)抗GFP scFv抗体を陰性対照として使用した。

【0375】

CCR4-CEM(急性リンパ芽球性白血病、ATCC寄託番号CCL-119)、HEK293T/17(ヒト腎臓、ATCC寄託番号CRL-11268)およびDT40(ニワトリリンパ腫、ATCC寄託番号CRL-2111)細胞株を米国培養細胞系統保存機関(ATCC、ロックビル、メリーランド州)から入手した。

【0376】

ヒトCCR4での一過性形質移入のため、T75(NUNC)フラスコに 2×10^6 細胞のHEK293T/17細胞を蒔いた。播種48時間後に、形質移入剤としてFugene(ROCHE)を使用して、ヒトCCR4をコードするpcDNA3.1プラスミドで前記細胞を形質移入した。T75あたり40 μ lのFugeneと16 μ gのDNAを使用する。形質移入の48時間後にその細胞をアッセイに使用した。

【0377】

CCR4-CEM細胞とDT40細胞はRPMI 1640培地で維持し、HEK293T細胞はダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)培地に維持した。ウシ胎児血清を用いて全ての細胞を維持したが、濃度はDT40細胞とHEK293T細胞には10%で、CCR4-CEM細胞には20%であった。全ての培地にはペニシリンとストレプトマイシンが添加された。

【0378】

フローサイトメトリー実験のため、培養フラスコから細胞を回収し、PBSで2回細胞を洗浄し、0.2%BSAと0.09%NaN₃を含むPBSに細胞を再懸濁し、最後に、V型96ウェルプレート(Greiner Bio-One、フリッケンハウゼン、ドイツ)にウェルあたり 1×10^5 細胞の割合で分注した。400 \times gで5分間、細胞を遠心分離し、そして、様々に希釈したscFvと4で60分間インキュベートした。

【0379】

細胞に添加する前にscFvを架橋するために、全てのscFv調製物をマウス抗myc-抗体(9E10.2、Diatec、オスロ、ノルウェイ)とブレインキュベートし

10

20

30

40

50

、そして、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度から始めて、3倍ずつ希釈した。

【0380】

0.2% BSAと0.09% NaN_3 を含むPBSで洗浄した後、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のRPE複合体化ヤギ抗マウスIgG (AbD Serotec、デュッセルドルフ、ドイツ)を用いて細胞を4で30分間染色した。染色した細胞を洗浄し、0.2% BSAと0.09% NaN_3 を含む $200 \mu\text{l}$ のPBSに再懸濁し、そして、Easy Cyteフローサイトメーター (Guava Technologies、ハイワード、カリフォルニア州、米国)でのデータ獲得のため、U型96ウェルプレート (Corning、スキポールライク、オランダ)に移した。

【0381】

scFv 208、306、308、406、501、503、601、603および803はCCR4に特異的であることが得られた結果より明らかに示されている。図1に、CCR4陰性DT40細胞と比較した、scFv 208、306、308、406、501、503、601、603および803のCCR4陽性DT40細胞への結合が示される。CCR4⁺HEK293T細胞と比較した、scFv 208、306、308、406、501、503、601、603および803のCCR4⁺HEK293T細胞への選択的結合もまた示される (図2；抗体208についてのデータのみが示される)。図3にscFv 208、306、308、406、501、503、601、603および803のCCR4発現CCR4⁺CEM細胞への結合が示される。

【0382】

HEK293T/17細胞とヒトCCR4を発現するように形質転換されたHEK293T/17細胞への結合を比較することにより、脱フコシル化IgG₁型 (実施例7を参照のこと)の抗体306、406および503のCCR4特異性も確認された。これらの抗体はまた、CCR4陽性細胞株CCR4⁺CEM、L-428、Hut78、786-O、A498、KatoIIIおよびMCF-7への結合について、フローサイトメトリーを用いて試験された。

【0383】

抗CCR4抗体1G1 (BD Pharmingen、フランクリンレイクス、ニュージャージー州、米国)、抗CCR4抗体Ab1669 (Abcam、ケンブリッジ、英国)ならびに自家製のKW0761 IgG (上記を参照)のいずれかを陽性対照として使用した。オピオイド系薬物であるヘロインと結合するアイソタイプ対照抗体6-MAMと (緑色蛍光タンパク質に対して生じた)抗GFP抗体を陰性対照として使用した。両方の抗体をIgG₁分子として自作した。

【0384】

ヒト血清の存在下での標的発現細胞への結合を示すために、EZ-リンク・マレイミド-PEG固相ビオチン化キット (Thermo Fisher、ロックフォード、イリノイ州、米国)のマニュアルに従って、システインを介して抗CCR4抗体306、406、503およびKW0761をビオチン化した。

【0385】

CCR4陽性細胞株CCR4⁺CEM、Hut78 (皮膚T細胞リンパ腫、ATCC寄託番号TIB-161)、786-O (ヒト腎臓細胞腫、ATCC寄託番号CRL-1932)、MCF-7 (ヒト乳腺腺癌、ATCC寄託番号HTB-22)、KatoIII (ヒト胃癌、ATCC寄託番号HTB-103)およびHEK293T/17細胞株を米国培養細胞系統保存機関 (ATCC、ロックビル、メリーランド州)から入手した。L-428細胞 (非ホジキンリンパ腫、DSMZ番号ACC197)およびA-498 (ヒト腎臓細胞腫、DSMZ番号ACC55)を「ドイツ微生物培養細胞系統保存機関」 (DSMZ、ブラウンシュバイク、ドイツ)から入手した。CCR4⁺CEM、L-428、Hut78、786-OおよびKatoIII細胞はRPMI 1640培地で維持した。HEK293T/17細胞およびMCF-7細胞はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM；PAA由来、カタログ番号E15-810)培地で維持した。A-498細胞はE

10

20

30

40

50

MEM培地で培養した。CCRF-CEM、L-428、Hut78およびKatoIIIは20%のウシ胎児血清の存在下で維持されたことを例外として、全ての細胞が10%のウシ胎児血清(PAA由来、カタログ番号A15-252)で維持された。全ての培地にペニシリンとストレプトマイシン(PAA由来、カタログ番号P11-010)が添加された。

【0386】

フローサイトメトリー実験のため、懸濁細胞株CCRF-CEM、Hut78およびL-428を培養フラスコから直接回収した。接着性細胞株Hek293T/17、786-O、A-498、KatoIIIおよびMCF-7はPBSで2回洗浄し、そして、製造業者の方法に従って室温で3分間アクターゼ(Accutase)(PAA Laboratories、リンツ、オーストリア)とインキュベートすることにより培養フラスコから剥離させた。0.2%BSAと0.09%NaN₃を含むPBSに全ての細胞を再懸濁し、最後に、V型96ウェルプレート(Greiner Bio-One、フリッケンハウゼン、ドイツ)にウェルあたり1×10⁵細胞の割合で分注した。400×gで5分間、細胞を遠心分離し、そして、様々に希釈したIgGと4で60分間インキュベートした。ヒト血清の存在下での結合については、10%か50%のヒト血清(Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)と様々なIgG溶液を37で60分間CCRF-CEM細胞とインキュベートした。

10

【0387】

0.2%BSAと0.09%NaN₃を含むPBSで洗浄した後、1μg/mlのRPE複合体化ヤギ抗マウスIgG(AbD Serotec、デュッセルドルフ、ドイツ)を用いて細胞を4で30分間染色した。染色した細胞を洗浄し、0.2%BSAと0.09%NaN₃を含む200μlのPBSに再懸濁し、そして、EasyCyte(Guava Technologies、ハイワード、カリフォルニア州、米国)でのデータ獲得のため、U型96ウェルプレート(Corning、スキポールライク、オランダ)に移した。

20

【0388】

IgG抗体306、406および503はCCR4に特異的であることが得られた結果より明らかに確認されている。IgG306、406および503のCCR4陽性Hek293T/17細胞に対する結合はCCR4陰性Hek293T/17細胞に対する結合よりも著しく高かった。対照抗体1G1もまたCCR4陽性Hek293T/17細胞に結合したが、生じたシグナルは弱かった。

30

【0389】

図10にIgG抗体306、406および503の血液系CCR4発現L428細胞およびHut78細胞、ならびにCCRF-CEM細胞への結合が示される。306、406および503の786-O、A498、KatoIIIおよびMCF-7への結合もまた確認されたが、陰性対照抗体はこれらの細胞株に結合しなかった(データは示さない)。

【0390】

安心させるために言うと、抗CCR4抗体のCCR4陽性細胞への結合は、図11に細胞株CCRF-CEMとの関連で示されるように、ヒト血清の濃度が上昇しても阻害されない。

40

【0391】

図11はまた、抗体306、406および503の結合は抗体KW0761の結合よりもまざっていることを示している。細胞株KatoIII、MCF-7およびA498への結合がアッセイされたとき、同様の観察がなされた(データは示さない)。

【0392】

抗CCR4抗体306、406および503の様々なCCR4⁺細胞株への結合プロファイルは、他のCCR4⁺細胞株と比較して増加した、いくつかのCCR4⁺細胞株への結合を示す。例えば、L-428への結合はCCRF-CEMと比較して減少する。L-4

50

28はCCR4のリガンドであるTARC(Ishida T et al, Leukemia Vol 20, 2006を参照のこと)を分泌することが知られており、抗CCR4抗体306、406および503はTARCとCCR4の結合部位について競合する(実施例3を参照のこと)。

【0393】

抗CCR4抗体306、406および503の結合プロファイルはKW0761の結合プロファイルと異なる。例えば、KW0761はL-428への結合の増加を示す。論理にとらわれるつもりではないが、これは(実施例4に概説されるように)これらの抗体の異なるエピトープ結合部位によるものであると考えられている。KW0761はCCR4およびTARCの結合を妨げず、L-428により分泌されるTARCと競合しない。

10

【0394】

さらに、細胞株毎に異なる値を有するEC₅₀値を決定したが(データは示さない)、それは、様々な細胞種の表面でのCCR4発現の差によるものと考えられている。

【0395】

実施例3: リガンド結合への抗CCR4抗体の干渉

実施例1由来の抗CCR4抗体がCCR4リガンドの受容体への結合を干渉するか判定するために、競合実験を行った。この目的のために、scFvの濃度を上昇させつつ、一定の濃度のMDC-SNAPとCCR4陽性CCRF-CEM標的細胞をインキュベートした。SNAPタグがMDCのC末端に融合するように、SNAPタグのN末端にMDCを遺伝学的に融合した。SNAPタグは20kDaのDNA修復タンパク質であるO6-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼに由来する。その遺伝子をGeneart社(レーゲンスブルク、ドイツ)に注文し、MDC-SNAP融合タンパク質をコードするその遺伝子でHEK293/T細胞を一過的に形質移入した。5~6日後に、Ni-NTA親和性カラムに続いてサイズ排除により融合タンパク質を精製してMDC-SNAP単量体画分を単離した。Alexa Fluor 647 Molecular Probe 標識化キット(Invitrogen Corporation、サンディエゴ、カリフォルニア州)のマニュアルの手順に従って、Alexa 647でMDC-SNAPを標識化した。CCRF-CEM細胞に対する走化性アッセイでCCR4に結合するMDC-SNAPの機能性を確認した(データは示さない)。

20

【0396】

培養フラスコからCCR4⁺CCRF-CEM細胞を回収し、RPMI 1640培地で2回細胞を洗浄し、V型96ウェルプレート(Greiner Bio-One、フリッケンハウゼン、ドイツ)にウェルあたり1×10⁵細胞の割合で分注した。500×gで5分間、細胞を遠心分離し、そして、上清を吸引した。scFv208、306、406、501、503、601、603および803(試料308は含まれなかった)を5μg/ml(150nM)から初めて、8希釈点にわたって3倍ずつ希釈し、0.2%BSAと0.09%NaN₃を含むPBS中の140ng/mlという一定の濃度のMDC-SNAP(50nM)の存在下で、細胞と460分間インキュベートした。0.2%BSAと0.09%NaN₃を含むPBSで3回洗浄した後に、0.2%BSAと0.09%NaN₃を含む200μlのPBSに細胞を再懸濁し、そして、FACS Cant

30

40

【0397】

実施例1に記載されるscFvがCCR4へのTARCリガンド結合およびMDCリガンド結合に干渉するか試験するために同様の実験を行った。それ故、CCR4⁺DT40細胞を培養フラスコから回収し、RPMI 1640培地で2回細胞を洗浄し、V型96

50

ウェルプレート (Greiner Bio-One、フリッケンハウゼン、ドイツ) にウェルあたり 1×10^5 細胞の割合で分注した。500 × g で5分間、細胞を遠心分離し、そして、上清を吸引し、その後、RPMI 1640培地中の0または $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のTARCまたはMDC (Peprotech EC、ロンドン、英国) と37 で30分間インキュベートした。500 × g で5分間の遠心分離工程の後に上清を吸引し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のscFv 208、306、308、406、501、503、601、603および803ならびに $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス抗c-Myc (9E10.2; DIAT EC Monoclonals、オスロ、ノルウェイ) と4 で1時間細胞をインキュベートした。500 × g で5分間、細胞を遠心分離し、その後、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のRPE複合体化ヤギ抗マウスIgG (BD Pharmingen、サンディエゴ、米国、カリフォルニア州) と細胞を4 で45分間インキュベートした。細胞を洗浄し、0.2% BSAと0.09% NaN_3 を含む200 μl のPBSに再懸濁し、そして、EasyCyte装置 (Guava Technologies、ハイワード、カリフォルニア州、米国) を使用するフローサイトメリーのためにU型96ウェルプレート (Corning、スキポールライク、オランダ) に移した。TARCおよびMDCの存在下でscFvをインキュベートしたとき、染色シグナルが減少することが結果により示された (図5)。このことは、実施例1に記載されるscFvがリガンド結合に干渉し、したがって、CCR4ブロッキング活性を有することを示している。

10

【0398】

IgG₁形態の306、406および503のリガンド結合への影響を試験するために実質的に同じ方法を用いた。比較のためにKW0761を使用した。ソフトウェアPrism (GraphPad) の「log (阻害剤) vs. 反応」モデルを使用して非線形回帰カーブフィットにより実験データをフィットさせたが、表20に実験データが要約される。

20

【0399】

KW0761を例外として、IgGの濃度の増加と共に、標識化リガンドのMDCとTARCの両方の染色シグナルの明らかな減少が結果により示された (図12)。このことは、このIgG₁形態の306、406および503がリガンド結合に干渉し、したがって、CCR4ブロッキング活性を有することを示している。

30

【0400】

実施例4：抗CCR4抗体間の競合

抗CCR4抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803によって認識されるエピトープをKM3060varと比較して解析するために、フローサイトメリーを用いて競合実験を行った。ビオチン化KW0761IgG抗体のCCR4⁺CCR4⁻CEM細胞への結合が様々な濃度の単鎖型の非ビオチン化抗CCR4抗体 (208、306、308、406、501、503、601、603、803およびKM3060var) の存在下で検証された。CCR4⁺CCR4⁻CEM細胞を培養フラスコから回収し、RPMI 1640培地で2回細胞を洗浄し、V型96ウェルプレート (Greiner Bio-One、フリッケンハウゼン、ドイツ) にウェルあたり 1×10^5 細胞の割合で分注した。500 × g で5分間、細胞を遠心分離し、そして、上清を吸引した。標準的な方法を用いて抗体KW0761-IgGをビオチン化した。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から始まり、8抗体価測定点にわたって3倍ずつ希釈された抗CCR4scFv 208、306、308、406、501、503、601、603、803およびKM3060varの存在下で、ビオチン化KW0761-IgGを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ という一定の濃度でCCR4⁺CEM細胞と4 で1時間インキュベートした。0.2% BSAと0.09% NaN_3 を含むPBSで洗浄した後、ビオチン化KW0761-IgGの検出のために、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトアビジン-RPE (BD Pharmingen、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国) で細胞を4 で30分間染色した。染色した細胞を洗浄し、0.2% BSAと0.09% NaN_3 を含む250 μl のPBSに再懸濁し、そして、FACS Canto IIフローサイトメーター (BD Bio

40

50

sciences、ハイデルベルク、ドイツ)を使用するデータ獲得のため、U型96ウェルプレート(Corning、スキポールライク、オランダ)に移した。

【0401】

図6に示される結果は、実施例1に記載される抗CCR4抗体のいずれも細胞への結合についてKW0761と競合せず、抗体KW0761-IgGとKM3060var scFvの間での競合だけが観察されることを示している。このことは、抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803はKM3060varまたはKW0761と同じエピトープに結合しないことを示している。

【0402】

IgG₁形態の306、406および503のKW0761との、および、互いの競合をアッセイするために、実質的に同じ方法を用いた。抗体306、406および503は互いに競合するが、KW0761とは競合しないことがこの実験により確認された(データは示さない)。

【0403】

実施例5：拮抗性活性

天然のCCR4⁺CCR4-CEM細胞株で抗体208、306、308、406、501、503、601、603および803がリガンド誘導性カルシウム流動を低減させる能力を評価した。通常の条件下で培養したCCR4-CEM標的細胞を遠心分離により沈降させ、RPMI 1640培地に2回再懸濁した。Fluo-4-AM(Invitrogen、カールスバード、カリフォルニア州)、プルロニックF-127(Invitrogen、カールスバード、カリフォルニア州)およびプロベネシドを、それぞれ、1μM、0.02%および1mMの終濃度まで1ml中の 2.5×10^6 細胞と混合した。細胞を回転培養器(7rpm)で37、30分間培養した。1mMプロベネシドの存在下でその後の全ての工程を行った。10%FCSを含むRPMI 1640で2回、測定緩衝液(145mM NaCl、4mM KCl、1mM NaH₂PO₄、0.8mM MgCl₂、25mM HEPES、22mMグルコース)で細胞を1回洗浄した。TARCおよびMDC介在性カルシウム流動の阻害を2つの測定に分けた。

【0404】

PheraStarFSハイスループット・リーダー(BMG Labtech、オッフエンブルク、ドイツ)を使用して、scFv208、306、308、406、501、503、601、603および803の存在下でのTARC介在性カルシウム流動の阻害を評価した。抗体KM3060varを陰性対照として使用した。細胞を 1.6×10^6 細胞/mlの終濃度までに希釈した。25μlの体積の細胞を黒色96ウェルプレート(Nunc、Thermo Fisher Scientific、ロチェスター、ニューヨーク州、米国)に移し、25μlのscFv抗体の存在下、暗条件、室温で15分間インキュベートした。scFvを、0.5μg/mlから始まり、6抗体価測定点にわたって10倍ずつ用量設定した。全てのscFvを3反復試験に適用し、試料KM3060varを比較のためインキュベートした。PheraStarFSリーダーにプレートを移し、自動的に、28.6ng/μl(3.6nM)の終濃度のリガンドを各ウェルに別々に注入した。485~520nmのバンドパスフィルターを使用して、総計で16点(リガンドの注入前の5点(範囲1);リガンドの注入中の1点(範囲2の開始点);リガンドの注入後の10点(範囲2))にわたって蛍光の変化を測定した。次に数式を用いて活性化のパーセンテージを計算した:

{IgGでの(範囲2の生データの合計 - (11×範囲2の開始点)) - 緩衝液での(範囲2の生データの合計 - (11×範囲2の開始点))} / リガンドでの(範囲2の生データの合計 - (11×範囲2の開始点))。

【0405】

FACSCanto IIフローサイトメーター(BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)を使用して、scFv208、306、308、406、501、503、601、603および803の存在下でのMDC介在性カルシウム流動の阻害

10

20

30

40

50

を評価した。上に記載したように細胞を染色し、そして、 1.2×10^6 細胞/mlの終濃度に希釈した。等量の細胞、s c F v抗体を含む測定緩衝液またはs c F v抗体を含まない測定緩衝液、およびリガンド(M D C)を混合した。最初の2つの成分(細胞および抗体)をリガンドの添加前に15分間、前もってインキュベーションした。s c F vの終濃度は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、M D Cは $5 \text{ng}/\text{ml}$ であった。F A C S C a n t o I I フローサイトメーター(B D B i o s c i e n c e s、ハイデルベルク、ドイツ)上の515 ~ 545 nmのバンドパスフィルターを使用して試料を直ぐに解析した。評価のために、それ以外は未処理の染色した細胞の平均シグナルを全ての試料から減算した。染色した細胞からs c F v抗体は無いがM D Cの存在下で記録されたシグナルが100%のシグナル伝達として設定され、M D Cおよびs c F v抗体の存在下の細胞のシグナルが%単位に換算された。

10

【0406】

図7および8で示される結果は、実施例1に記載される全てのs c F vがT A R CおよびM D Cの阻害剤として作用することを明確に示した。T A R C阻害から得られた $I C_{50}$ 値が表19に示される。

【0407】

K W 0 7 6 1と比較した、I g G₁形態の306、406および503によるリガンド誘導性カルシウム流動への影響を測定するために、実質的に同じ方法を用いた。抗体306、406および503がリガンド誘導性カルシウム流動を低下させるが、K W 0 7 6 1は低下させないことがこの実験により確認された。ソフトウェアP r i s m (G r a p h P a d)の「log(阻害剤) vs . 反応」モデルを使用して、非線形回帰カーブフィットにより実験データを当てはめた。

20

【0408】

本発明の抗体がT A R CおよびM D C誘導性カルシウム流動の阻害剤として作用することが結果により明示された。T A R C阻害から得られた $I C_{50}$ 値が表21に提示される。様々な実験条件下で推測された値を有するこれらの推定値は必ずしも適正ではないということが理解されるものとする。

【0409】

実施例6：走化性の抑制

1つの容器内で化学遊走が可能であるC C R 4⁺細胞をs c F v抗体と接触させ、一方、適切な孔径を有する膜またはフィルターで最初の容器と分けた別の容器にC C R 4のリガンド(M D CまたはT A R C)を設置することにより、実施例1のs c F v抗体による走化性の抑制をアッセイした。リガンドに向かう細胞の遊走(走化性)に対する抗体の効果を、抗体が無いときの走化性と抗体が有るときの走化性を比較することにより決定した。実施例1に記載される全てのs c F v抗体がM D CおよびT A R Cに向かうC C R 4陽性細胞の走化性を抑制することがわかった。

30

【0410】

実施例2に記載されるように培養されたC C R 4⁺C C R F - C E M標的細胞を遠心分離により沈降させ、F C Sを含まないR P M I 1640培地に2回再懸濁した。3回目の遠心分離工程で、1%のF C Sを添加したR P M I 1640培地に細胞を再懸濁し、 1.6×10^7 細胞/mlの終密度に調整した。並行して、マルチスクリーン - M I C プレート96ウェル(孔径8 μm 、M i l l i p o r e、ピレリカ、マサチューセッツ州、米国、M A M I C 5 S 1 0)の下部容器のそれぞれに3.5 nMの濃度でT A R CまたはM D Cを含む1% F C Sが添加された150 μl のR P M Iを加えた。s c F vを架橋し、二量体性I g G型をシミュレートするためにマウス抗m y c - 抗体(9 E 1 0 . 2、D i a t e c、オスロ、ノルウェイ)の存在下でs c F v抗体を333 nMから0.36 nMまで段階希釈した。50 μl のs c F v抗体を50 μl の細胞(3.9×10^5 細胞/mlの終濃度)と混合し、マルチスクリーン - M I C 96チャンパープレートの上部区画に添加し、そして、37 °Cで3時間インキュベートした。フィルターを取り除き、そして、再懸濁の後に(下部の容器から)100 μl の細胞を96ウェルC O A S T A R プレー

40

50

ト (Greiner Bio-One、フリケンハウゼン、ドイツ) に移した。さらに $100\ \mu\text{l}$ の体積の (0.2% BSA と 0.09% NaN_3 を添加した) PBS を試料に添加した。FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ) を使用して、ゲートで囲まれた細胞の数を数えることにより遊走を評価した。

【0411】

s c F v 抗体は無いが、TARC または MDC の存在下で遊走した細胞の数を 100% 遊走として設定し、リガンドと s c F v 抗体の存在下で遊走した細胞の数を % 単位に換算した。

【0412】

実施例 1 に記載される全ての s c F v 抗体が CCRF - CEM 細胞の TARC 誘導走化性を抑制したことが図 9 に提示されるデータにより示されている。さらに、同じ s c F v 抗体が MDC 介在性走化性を抑制した (データは示さない)。

【0413】

IgG₁ 形態の 306、406 および 503 を用いて実質的に同じ実験を行い、IgG₁ 形態も CCRF - CEM 細胞の TARC 誘導走化性ならびに CCRF - CEM 細胞の MDC 誘導走化性を抑制することが確認された。Graph Pad Prism を用いる log (阻害剤) vs . 反応機能を使用してデータを当てはめることにより結果を解析し、IC₅₀ 値を抽出した。表 22 に IC₅₀ 測定値が要約される。

【0414】

さらなる実験で、TARC の存在下での固形腫瘍細胞株 786 - O の遊走への抗 CCR4 抗体 503 (IgG₁ 形態) の効果を、トランスウェルプレートアッセイを用いて測定した。

【0415】

被覆のために $50\ \mu\text{l}$ の $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のマトリゲル溶液 (BD Matrigel、カタログ番号 356230、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ) を孔の上部に分注してマルチスクリーン - MIC96 ウェルプレート (孔径 $8\ \mu\text{m}$ 、Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国、MAMIC8S10) の準備をした。マトリゲルを 37 で 1 時間重合させた。PBS で孔を洗浄して、反応しなかったマトリゲルを除去した。上に概説したように、786 - O 細胞を培養した。PBS で 2 回洗浄し、アキュターゼ (PAA Laboratories、リンツ、オーストリア) と室温で 3 分間インキュベートすることにより培養フラスコから剥離させた後にフラスコから細胞を回収した。 0.1% ウシ胎児血清を添加した RPMI 1640 に細胞を 8.0×10^5 細胞 / ml の終細胞密度になるように分注した。並行して、 0.1% FCS を添加した RPMI 1640 に $60\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように IgG 抗体 503 を希釈し、そして、5 点にわたって 5 倍ずつ段階希釈した。抗体の調剤緩衝液中に存在する塩の量は一定に保たれた。 0.1% FCS を添加した RPMI 1640 にリガンド TARC を $1000\ \text{ng}/\text{ml}$ および $200\ \text{ng}/\text{ml}$ という 2 つの終濃度にまで希釈した。抗体の調剤緩衝液中に存在する塩の量は一定に保たれた。 $150\ \mu\text{l}$ の体積のリガンドをトランスウェル・マルチスクリーン - MIC プレート 96 ウェルプレート (孔径 $8\ \mu\text{m}$ 、Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国、MAMIC8S10) の底部容器に分注した。 $50\ \mu\text{l}$ の抗体希釈液と等体積の $50\ \mu\text{l}$ の細胞を混合した。マトリゲル被覆膜上に混合物を設置し、37 で 3 時間インキュベートした。マトリゲル被覆膜に上にある遊走しなかった細胞をこすり落とすことにより機械的に除去し、セルタイター-glo 生物発光細胞生存性アッセイキット (Promega、マディソン、ウィスコンシン州、米国) の手順書に従ってマトリゲル被覆膜を通して遊走した細胞を染色した。染色された試料を 96 ウェルプレート (NUNC、平底、黒色) に移し、Tecan Infinite M200 リーダー (Tecan、メナードルフ、スイス) で生物発光を解析した。抗体は無いが、TARC の存在下で遊走した細胞の数を 100% 遊走と設定し、リガンドと抗体の存在下で遊走した細胞の数を % 単位に換算した。Graph Pad Prism

10

20

30

40

50

を用いるlog(阻害剤)vs.反応機能を使用してデータを当てはめることにより結果を解析し、IC₅₀値を抽出した。抗体503が固形腫瘍細胞株786-OのTARC誘導性遊走を抑制することが結果により示される(図13)。表23にIC₅₀測定値が要約される。

【0416】

マウス腎臓細胞癌細胞株RENC Aで同様の発見がなされたが、その発見では、抗CCR4抗体503は標的細胞のマウスTARC誘導性遊走を妨げることができた(データは示さない)。

【0417】

実施例7：脱フコシル化抗CCR4IgG₁分子の作製

ヒトIgG₁サブクラス上のオリゴ糖の状態を操作することによりADCCの増強を達成することができることが報告されている(Niwa *et al*, *Can Res*, Vol. 64, 2004)。フコースの量の改変がADCCに有益な効果を持つことが示された。それ故、クラスIマンノシダーゼの選択的阻害剤であるキフネンシンの存在下で抗体306、406および503を作製し、培養細胞での産生中にIgGのフコシル化の停止を誘導した。同じ条件下で抗体KW0761を作製した。

【0418】

キフネンシン(100ng/ml; Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)の存在下でIgGを作製した。細胞培養液を回収した後に、まず、プロテインAカラム(HiTrap、5ml、プロテインA; GE)を使用する親和性精製でIgGを単離した。クエン酸緩衝液(pH3)を使用してIgGを溶出し、1Mトリス緩衝液(pH9)中に移した。2番目の精製の前にIgG試料を濃縮し、そして、サイズ排除クロマトグラフィー(HiLoad Sephadex 200, GE; 移動緩衝液20mMリン酸ナトリウム/145mM NaCl, pH7.2)に負荷した。単量体画分を収集し、再度IgGを濃縮した。

【0419】

実施例8：種間交差反応性

抗体306、406および503のヒト以外の種に由来するCCR4と交差反応する能力についてそれらを試験した。

【0420】

一過性形質移入のために、T75(NUNC)フラスコに 2×10^6 細胞のHeK293T/17細胞を蒔いた。播種から48時間後に、Fugene(ROCHE)を用いて細胞を形質移入した。T75あたり40μlのFugeneと16μgのDNAを使用する。形質移入から48時間後にアッセイのために細胞を使用した。

【0421】

形質移入試薬としてFugene(Roche)を使用して、ヒトCCR4をコードするpcDNA3.1プラスミドまたはマウスCCR4(GeneBank CAA62372)かサル(アカゲザル(Macaca mulatta))CCR4(PubMedアクセス番号XP_001098807)のどちらかをコードするpLNOプラスミド(Norderhaug *et al*, 1997)でHEK-293T/17細胞への一過性形質移入を行った。非形質移入(CCR4陰性)細胞を陰性対照とした。通常の条件下でさらに48時間細胞を培養し、先に記載したようにフラスコから細胞を回収した。V型96ウェルプレート(Greiner Bio-One、フリケンハウゼン、ドイツ)にウェルあたり 1×10^5 細胞の割合で細胞を分注した。細胞を遠心分離し(400xg、5分、4(C)、0.2%BSAと0.09%NaN₃を含むPBS中の1μg/mlの濃度の抗体(306、406、503およびアイソタイプ対照6-MAM)50μlに再懸濁し、そして、4で60分間インキュベートした。PE複合体化マウス抗ヒトCCR4抗体1G1の存在下で、またはPE複合体化ハムスター抗マウスCCR4抗体2G12(Biolgend; サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)を用いてそれらの細胞をインキュベートすることにより、ヒトCCR4とマウスCCR4の発現を確認した。その

10

20

30

40

50

後、試料を遠心分離し、 $150\mu\text{l}$ のFACS緩衝液に再懸濁することで2回洗浄した。最後に、抗体306、406、503とアイソタイプ対照IgG6-MAMの検出のために $3\mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗ヒトIgG-PE (AbD Serotec、デュッセルドルフ、ドイツ) $50\mu\text{l}$ に細胞ペレットを再懸濁し、4で45分間インキュベートした。上に記載したように試料を2回洗浄し、そして、 $250\mu\text{l}$ のFACS緩衝液に再懸濁し、そして、FACS Canto II (BD Biosciences、サンホセ、カリフォルニア州)でのフローサイトメトリーのためにU型96ウェルプレート (Corning、スキポールライク、オランダ)に移した。

【0422】

ヒトCCR4とサルCCR4の両方に抗体306、406および503が結合することがわかり、そして、マウスCCR4に対する低下した親和性が検出された(データは示さない)。

【0423】

実施例9：抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)

天然のCCR4⁺細胞株CCRF-CEM、L-428およびHut78に対してADCCを誘導する抗CCR4抗体306、406および503の能力を評価し、KW0761と比較した。さらに、KW0761との比較で抗CCR4抗体306、406および503を使用して、単離した制御性T細胞(T_{reg} 細胞)に対するADCCの誘導を試験した。癌疾患の進行中の固形腫瘍の免疫逃避に T_{reg} 細胞が重要な役割を果たすことがよく証明されている(Wolf AM et al, Clin Cancer Res Vol 9, 2003を参照のこと)。重要なことに、腫瘍の支質領域に向かい、そこで腫瘍に対する免疫反応を抑制するCD4⁺CD25⁺T細胞でCCR4が発現することが記載されている。CCR4を介したこれらの T_{reg} 細胞の(MDCにより誘導される)遊走の抑制も(ADCCによる)直接的な殺滅も、転移を妨害する、または、固形腫瘍の増殖を低下させる将来性のある方法であり得る。

【0424】

懸濁細胞CCRF-CEM、L-428およびHut78へのADCCのために、実施例2に記載したような通常の条件下で細胞を培養した。遠心分離により細胞を沈降させ、RPMI 1640培地に細胞を再懸濁した。この工程を1回繰り返した。 2.5×10^6 細胞を含む 1ml と混合してカルセイン-AM (Invitrogen、カールスバード、カリフォルニア州)の終濃度を $10\mu\text{M}$ とし、その後、回転培養器上で(7rpm)3730分間インキュベートした。 10% FCSを含むRPMI 1640中で細胞を3回洗浄し、細胞密度を $3 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した。これとは別に、従来の手順に従って(Ficoll-Hypaque濃度勾配遠心分離で濃縮して)末梢血単核細胞(PBMC)を調製し、 10% FCSを含むRPMI 1640中で洗浄し、そして、 6×10^6 細胞/ ml に再懸濁した。各標的細胞およびエフェクター細胞 $50\mu\text{l}$ を96ウェルマイクロタイタープレートの同じウェルに加え、20:1というエフェクター細胞と標的細胞の比(E:T)が生じた。4反復試料について $100\mu\text{l}$ の体積の各ウェルに抗体を添加し、次のような濃度範囲になった:CCRF-CEMの場合 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ から $0.002\text{ng}/\text{ml}$ まで;L-428の場合 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ から $0.32\text{ng}/\text{ml}$ まで;Hut78の場合 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ から $0.1\text{ng}/\text{ml}$ まで。その後、37で4時間マイクロタイタープレートをインキュベートし、そして、ウェルのいくつかについては3時間45分後に $20\mu\text{l}$ の 0.9% トライトンX100を添加して標的細胞の完全な溶解を達成した。その後、各試料の $100\mu\text{l}$ の上清を黒色のマイクロタイタープレートに移し、Tecan Infinite M200リーダー(Tecan、メナードルフ、スイス)で蛍光(励起光: 488nm 、蛍光: 518nm)を解析した。抗体が無い試料での蛍光強度を他の試料の強度から減算した。トライトンX-100での処理後に 100% 細胞溶解が起きた試料の蛍光強度に基づき、抗体を用いた試料での溶解のパーセンテージを推定した。ソフトウェアPrism(GraphPad、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)を用いる非線形回帰解析と3パラメーター当てはめモデルにより用量反応曲線を

10

20

30

40

50

算出した。

【0425】

T_{reg} 細胞へのADCCの誘導を試験するために、次のプロトコルを確立し、そして、抗CCR4抗体(1G1、カタログ番号551266、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)を用いて設定を確立した。

【0426】

健康なドナーの血液中の T_{reg} 細胞のパーセンテージは5%と10%の間であると報告されている(Wolf AM et al, Clin Cancer Res Vol 9, 2003を参照のこと)。このことが、かなりの量の単離された T_{reg} 細胞を得るために健康なドナーのPBMCから T_{reg} 細胞を濃縮しなくてはならなかったことの原因である。Dynabeads CD4+CD25+制御性T細胞キット(カタログ番号113-63D、Invitrogen Corporation、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)のプロトコルに従って単離を行い、3つの異なる集団を得た(PBMC、CD4⁺およびTreg)。精製の特定の段階で、品質管理としていくらかの細胞を保存し、そして、適切に染色した。遠心分離によりPBMC、CD4⁺細胞および T_{reg} 細胞を沈降させ、0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加したPBS中に 1×10^6 細胞/mlになるように再懸濁した。各実験のため、96ウェルV型プレートに200 μ lの分けられていない 2×10^5 個のPBMCと単離されたCD4⁺細胞および100 μ lの 1×10^5 個の単離された T_{reg} 細胞を移し、400 \times g、4で5分間遠心分離した。ピペットを用いて上清を除去し、0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加した50 μ lのPBSに、または T_{reg} 細胞の特定に役立つ(Simonetta F et al, Eur J Immunol Vol 9, 2010を参照のこと)50 μ lのビオチン化抗CD127(カタログ番号558633、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)か50 μ lのビオチン化抗CCR4抗体(1G1、カタログ番号551266、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)に細胞ペレットを再懸濁し、4で1時間インキュベートした。(0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加した)PBSで試料を3回洗浄し、400 \times g、4で5分間遠心分離した。ピペットを用いて上清を除去し、(0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加した)50 μ lのPBSかビオチン化抗CCR4(1G1、カタログ番号551266、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)を含む、または含まない50 μ lの抗CD4-FITCと抗CD25-APC(カタログ番号11-0049-42およびカタログ番号17-0259-42、eBiosciences、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)とストレプトアビジン-PerCP(カタログ番号554064、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)の混合液に細胞ペレットを再懸濁し、そして、4で1時間インキュベートした。(0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加した)PBSで試料を3回洗浄し、400 \times g、4で5分間遠心分離した。ピペットを用いて上清を除去し、抗CCR4-PEを含む細胞ペレットと未染色の細胞ペレットを200 μ lの(0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加した)PBSに再懸濁し、96ウェルU型プレートに移した。様々なフルオロクロームを用いる補正がFACSCanto II(BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)で実行され、そして、試料を解析した。抗FoxP3抗体(カタログ番号560046、BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)を用い、FoxP3染色緩衝液キット(カタログ番号00-5523-00、eBiosciencesサンディエゴ、カリフォルニア州、米国)に記載されるプロトコルに従って残りの試料を染色した。細胞を200 μ lの(0.2%BSAと0.09%NaN₃を添加した)PBSに再懸濁し、そして、FACSCanto II(BD Biosciences、ハイデルベルク、ドイツ)を使用するフローサイトメトリーでの解析のため、96ウェルU型プレートに移した。抗CD4-FITC/抗CD25-APCでの二重陽性シグナルならびに抗FoxP3-PE/抗CCR4(ストレプトアビジン-PerCPを使用するビオチン化1G1の検出)での二重陽性シグナルにより、単離された T_{reg} 細胞は純粋な T_{reg} 細胞であると判断された。単離され

10

20

30

40

50

た細胞のおよそ95%がCD4⁺CD25⁺細胞であり、これらの66%がFoxP3-CCR4陽性であることが分かった。

【0427】

実施例1に記載される抗CCR4抗体の単離されたT_{reg}細胞に対する効果を評価するために、自家性PBMCからの単核細胞の単離収率が低いことからE:T(この場合、自家性PBMCから単離されたエフェクター細胞；標的細胞はT_{reg}細胞)比を15に下げたことを例外として、記載したようにADCC実験を行った。3反復試験において、3.3nMという単一濃度で抗体306、406、503およびKW0761をインキュベートした。単離された自家性PBMCは機能的であるということを確認するために、CCR4⁺CCR4-CEM標的細胞に対するADCCを並行して行った(データは示さない)

10

【0428】

図14に示される結果と要約されたEC₅₀計算値(表24を参照のこと)は、本発明の抗CCR4抗体が3つの標的細胞株全てに対してヒトPBMCの存在下でADCCを誘導することができたことを明らかに示す(Hut78は示されない)。最も効果的な抗CCR4抗体503は、KW0761の315pMと比較して、CCR4-CEM細胞に対して試験すると、5.3pMのEC₅₀を有すると判断された。L-428細胞に対して試験すると、KW0761と比較して、実施例1に記載される全ての抗CCR4抗体について殺滅活性の低下が観察された。このことは、この細胞株はCCR4-リガンドCCL17/TARCを分泌することが示されており、それによって抗体のCCR4への結合と競合

20

【0429】

さらに、抗CCR4抗体はまた、単離されたT_{reg}細胞に対するADCCについて検証されると、かなりの最大殺滅活性を示した(図15を参照のこと)。

【0430】

実施例10：成人性T細胞白血病リンパ腫(ATLL)のインビボモデル

脱フコシル化IgG₁分子を使用して、ヒトT細胞リンパ腫異種移植片モデルでの腫瘍成長を低下させる能力について、実施例1に記載される抗CCR4抗体306、406および503を試験した。ATLLについてインビボ有効性を有することが以前に示されている抗体(Niwa *et al*, *CanRes*, Vol 65, 2004)

30

【0431】

CCR4⁺血液系成人性T細胞リンパ腫細胞株CCR4-CEMの腫瘍小片(3×3×3mmのサイズ)をNMRInu/nuマウス(Taconic, Hudson, ニューヨーク州、米国)に皮下移植した。次のように、様々な試料で、全体で5群を並行して処理した：A群=5匹の動物からなる対照群(実施例2に記載されるようなベヒクル調剤緩衝液)；B群=5匹の動物からなるKW0761-IgG；C群=10匹の動物からなる306-IgG；D群=10匹の動物からなる406-IgG；E群=10匹の動物からなる503-IgG。腫瘍がおよそ100mm³の触知できるサイズに達したときに抗体試料を静脈内(i.v.)投与した。次の等式を用いて腫瘍体積を計算した。

40

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 0.5 \times (\text{一番長い直径}) \times (\text{一番短い直径})^2$$

マウスを4週間にわたって週に2回(全体で8回の処理)、20mg/kg(1匹あたり25gの平均体重を仮定して、マウスあたり500μgのIgG)の用量で処理した。処理開始後、全体で6週間にわたって動物をモニターし、週に2回腫瘍体積と体重を測定した。腫瘍サイズが1.5cm³超のサイズを超えたとき、動物を殺処理した。腫瘍体積が大きいため、23日後に対照群を殺処理しなくてはならなかった。ソフトウェアPrism(GraphPad, サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)を使用して、得られたデータの実験群間での統計学的有意性を解析した。処理(抗体)群と未処理(対照)群を比較することによりMantel-Cox検定を用いて生存率を分析した。分散分析(A

50

NOVA)と独立t検定分析により腫瘍倍化時間を分析した。

【0432】

図16、17および18に試験の結果が提示および要約されている。体重の喪失が無いことから評価可能であるように、前記抗体でのマウスの処理がよく忍容された(図16)。図17に、異なる群に由来する個々の腫瘍体積の比較が示される。おそらくは、誘導期後に速い腫瘍成長を引き起こすことができる腫瘍小片を接種された腫瘍モデルであったという事実のため、1つの群の中でも腫瘍体積の変動が高いことを見て取ることができる。腫瘍移植から23日後に、大きい腫瘍サイズのため、A対照群を殺処理しなくてはならなかった。試験した抗CCR4抗体全てについて腫瘍体積の明らかな減少を見て取ることができた。第23日で測定された、対照群と比較した最小平均腫瘍体積の値が(処理群対対照群、%単位; T/C)が、それぞれ、抗CCR4抗体503について35%、KW0761の場合は67%、306では50%、そして、406の場合は62%と決定された。対照群と比較して、抗CCR4抗体503については腫瘍倍化時間の統計学的有意差も判定された(6.28 ± 1.03日対2.58 ± 0.25日; P = 0.0273、独立t検定)。腫瘍体積と腫瘍倍化時間のこの差異は、A対照群の22日と対照的に、生存期間中央値が26日と判定された当該E群(抗CCR4抗体503)の動物の生存曲線に反映されている。

10

【0433】

こうして、実施例1に記載される3つの抗CCR4抗体全てがインビボで腫瘍撲滅効力を有することが示された。抗体503については統計学的に有意なデータが得られた。

20

【0434】

実施例11: 血小板凝集能測定

CCR4は血小板で発現することが知られており、そのリガンドであるMDCとTARCは血小板の凝集を誘導することが知られている。IgG分子は2つのリガンド結合部位を持ち、それ故、両方のアームが異なる血小板上のCCR4に結合することができる場合、CCR4を認識可能であるIgGが血小板を架橋することが可能である場合もあるという可能性があるため、このことは潜在的に問題を含み得る。このことがインビボで血液凝固を引き起こし得る。それ故、実施例1に記載されるような抗CCR4抗体の血小板凝集への効果を検討した。単離した血小板のみと、または、よく記述されている凝集の誘導因子であるADPと併せて抗体をインキュベートした(Varon and Spectre "Antiplatelet agents" Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 267-72, 2009)。

30

【0435】

クエン酸ナトリウムを含むチューブに総計で50mlの新鮮なドナーからの血液を採取した。185g、室温(RT)で15分間遠心分離することにより血小板に富む血漿を得た。血小板含有血漿を新しいチューブに移した。ベースラインを規定するため、1mlの血小板に富む血漿を1200g、室温で5分間遠心分離することによって、血小板を除いた血漿を調製した。新しいチューブに上清を移し、そして、次の、血小板に富む試料と同じ方法で処理した。AggRam血小板凝集計(Helena Laboratories、ポーモント、テキサス州、米国)を使用して、攪拌しながら37で凝集測定を行った。FACS緩衝液(PBS、pH7.4、0.2%BSA、0.09%NaN₃)中の10μg/mlの濃度でIgG(503、406、306および陰性対照として抗GFP)を血小板とインキュベートした。ADPが凝集の陽性対照となり、5μMの終濃度でADPを使用した。ADPを用いて得られたシグナルを100%と設定し、設定された実験全てで並行して測定されたベースライン0は血小板除去血清により規定された。

40

【0436】

実施例1に記載される抗CCR4抗体の血小板への結合が観察された(データは示さない)。凝集の誘導は観察されず、また、ADPの存在下での凝集の抑制も観察されなかった(データは示さない)。これらの結果から、実施例1に記載される抗CCR4抗体は血小板に結合するが、血小板の凝集には何の効果も無いことが結論され得る。それらは凝集

50

を誘導することも、例えば、ADP誘導性血小板凝集を抑制することもない。

【0437】

実施例12：ヒト腎臓細胞腫への結合

CCR4は淡明細胞型腎臓癌細胞(CCRC;特許出願国際公開第WO2009/037454号を参照のこと)の固形腫瘍細胞株に含まれ、それらによって発現されていることが知られている。腎臓細胞癌(RCC)の患者から調製した組織に存在するCCR4への特異的な結合を示すことを目的として、免疫組織化学実験を行った。癌研究所応用分子腫瘍学センター(バート・ロンドン医科歯科学校、ロンドン大学クイーン・メアリー、チャーターハウス・スクエア)にて記載される全ての実験を行った。抗CCR4抗体503を使用して染色を行い、陽性抗CCR4抗体と染色を比較した。

10

【0438】

ステージIVと診断された患者に由来するRCC腫瘍マイクロアレイ(TMA)は、バート・ロンドン医科歯科学校(ロンドン大学クイーン・メアリー、チャーターハウス・スクエア、ロンドン、英国)により提供されたが、それは3つの異なる群(TMA1、2および3)のセットを含むものであった。パラフィン包埋切片を4 μ mの厚さで切り出し、そして、アルコール濃度勾配により脱ワックスと水和を行った。抗原アンマスキング溶液(Vector Laboratories、バーリングゲーム、カリフォルニア州、米国)中で沸点まで9分間電子レンジにかけて抗原賦活化を行った。次に、PBSに希釈した5%ヤギ血清か20%ウサギ血清(Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)の中で、室温で1時間切片をブロックした。CCR4の検出のため、次の抗体を用いてTMAを染色した：3 μ g/mlの濃度の抗CCR4抗体503を用いてCCR4を検出し、ヤギ抗CCR4抗体Ab1669(3 μ g/ml;Abcam、ケンブリッジ、英国)と比較した。抗CCR4抗体503の結合特異性を示すためにヒトアイソタイプ対照抗体(カタログ番号1-001-A、3 μ g/mlで使用;RnD systems、ミネアポリス、ミネソタ州、米国)を含めた。対応するブロッキング剤中で抗体(PBSで希釈した5%ヤギ血清中のヒト抗体;PBSで希釈した20%ウサギ血清中のAb1669)を4で一晚インキュベートした。翌日、1回あたり30から50mlの量のPBSでスライドを3回洗浄した。1:500に希釈したビオチン複合体化ヤギ抗ヒト二次抗体(カタログ番号AP112B、Chemicon International、Milliporeの一部門、ピレリカ、マサチューセッツ州、米国)を用いてヒト抗体503とRnDのアイソタイプ対照抗体を検出した。1:200に希釈したビオチン複合体化ウサギ抗ヤギ抗体(BA-1000;Vector Laboratories、バーリングゲーム、カリフォルニア州、米国)と室温で45分間インキュベーションして抗CCR4抗体Ab1669を検出した。1回あたり30から50mlの量のPBSでスライドを2回洗浄した。30% H_2O_2 との混合液中にメタノール(Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)を室温で20分間混合することにより内在性ペルオキシダーゼをブロックした。1回あたり30から50mlのPBSでスライドを3回洗浄した。ベクタステイン・エリートABCキット(Vector Laboratories、バーリングゲーム、カリフォルニア州、米国)を用い、そして、3、3'-ジアミノベンジジン(DAB;Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)を用いて現像して抗原を可視化した。高発現のCCR4を有すると報告されており、したがって、抗CCR4抗体の陽性対照として働く脾臓組織上の抗CCR4抗体306、406および503に対して同様の染色法を行った(データは示さない)。CCR4のリガンドであるTARCとMDCの検出を並行して行った。染色法は上に概説した通りであるが、次の抗体を用いた。ウサギ抗ヒトTARC抗体(ab9816、Abcam、ケンブリッジ、英国)を用いてTARCを検出した。1:50に希釈してその抗体を使用し、そして、1:200に希釈したビオチン複合体化ヤギ抗ウサギ抗体(Vector Laboratories、バーリングゲーム、カリフォルニア州、米国)を使用してその抗体を検出した。1:20に希釈したウサギ抗ヒトMDC抗体(500-P107、Peprotech、プリンストン、ニュージャージー州、米国)を用い、ビオチン複合体化抗ウサギ抗体を

20

30

40

50

用いてMDCを検出した。Nikon Eclipse 80i顕微鏡(Nikon、東京、日本)を用いて全ての結合パターンを解析した。

【0439】

さらに、上記の試験された抗体全てについて、陰性対照組織への結合を正常ヒト胎盤組織および腎臓組織で評価した。

【0440】

RCCの患者に由来する腫瘍マイクロアレイの染色の結果は、抗CCR4抗体503がRCC患者の組織で発現するCCR4に結合することをIHCで示した(図19)。さらに、抗CCR4抗体503は淡明細胞型腎臓細胞腫の領域に結合するが、乳頭状腎臓細胞腫には結合しない(データは示さない)ことが示された。納得のいくことに、その結合パターンは抗CCR4陽性対照抗体Ab1669と一致する。胎盤由来の正常なヒト組織へのわずかな結合が観察された。しかしながら、胎盤は血管が非常に発達した器官なので、これらの結合パターンは、CCR4が発現することが知られている血管に関連している可能性がある。CCR4の発現はCCR4のリガンドであるTARCとMDCの発現パターンと一致した。表25にIHC実験の結合結果の要約が提示されている。抗CCR4抗体503はRCCで治療薬または診断薬として働き得ることをこれらのデータは示唆している。

【表 1】

表 1

配列 番号	scFv 208	
7	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
9	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSDDTAVYYCAR
3	CDR3:	RGGSYFDY
10	FR4:	WGQGTLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
12	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
4	CDR1:	SGSTSNIGSHYVF
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
14	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC
6	CDR3:	AVWDAKYRGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
56	scFv 208	<p>CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGTTCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAA ATACAGGGGTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC</p>

10

20

30

40

		GTCCTA	
47	scFv 208 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSDDTAVYYCARR GGSYFDYWGQGLTVTVSS KLSGSASAPKLEEGEFSEAR VSYVLTQPPSASGTPGQSV TISCSGSTSNIGSHYVFWY QQLPGTAPRLLIYRNHQRP SGVPDRLSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAVWD AKYRGWVFGGGTKLTVL	
29	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSDDTAVYYCARR GGSYFDYWGQGLTVTVSS	10
30	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSV TISCSGSTSNIGSHYVFWY QQLPGTAPRLLIYRNHQRP SGVPDRLSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAVWD AKYRGWVFGGGTKLTVL	
101	V _H ドメイン (ヌクレオチド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGT CTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCC TGGGTCCTCGGTGA AGGTCTCCTGCAAGGCTT CTGGAGGCCCTTCAGCAG CTATGCTATGAGCTGGGT GCGACAGGCCCTGGGCA AGGGCTTGAGTGGATGGG GAGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGC ACAGAAAGTTCCAGGGC AGAGTCA CCATGACCAGG GACACGTCCACGAGCAC AGTCTACATGGAGCTG AGCAGCCTGAGATCTGAT GACACGGCCGTGTACTG TGCGAGACGCGGTGGG AGCTACTTTGACTACTG GGGGCCAAGGGACCCTG GGTCACCGTCTCCTCA	20
102	V _L ドメイン (ヌクレオチド)	TCCTATGTGCTGACTCAG CCACCCTCAGCGTCTGGG ACCCCCGGGCAGAGCGT CACCATCTCTTGTCTGGA AGCACCTCCAA CATCGG AAGTCATTATGTGTTCT GGTACCAGCAGCTCCC AGGAACGGCCCCAGACT CCTCATCTATAGGAAT CATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGACT CTCTGGCTCCAAGTCT GGCACCTCAGCCTCCCT GGCCATCAGTGGGCTC CGGTCCGAGGATGAGG CTGATTACTGTGCAGT GTGGGATGCGAAATAC AGGGGTTGGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCTCA A	30

【表 2】
表 2

配列 番号	scFv 306	
7	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
16	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRPDDTAVYYCAR
3	CDR3:	RGGSYFDY
10	FR4:	WGQGTLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
12	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
17	CDR1:	SGSTSNIGSHYVS
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
14	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC
6	CDR3:	AVWDAKYRGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
57	scFv 306	<p>CAGGTCCAGCTTGACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGACCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAAACCTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGTCCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAA</p>

10

20

30

40

		ATACAGGGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC GTCCTA	
48	scFv 306 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRPDDTAVYYCARRGGSYFDYWGGQTLVTVSSKLSGSASA PKLEEGEFSEARVSYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSH YVSWYQQLPGTAPRLLIYRNHQPSGVPDRLSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAVWDAKYRGWVFGGGTKLTVL	10
31	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRPDDTAVYYCARRGGSYFDYWGGQTLVTVSS	
32	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVSWYQQLPGTA PRLLIYRNHQPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAVWDAKYRGWVFGGGTKLTVL	
103	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGACCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	20
104	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAA CATCGGAAGTCATTATGTGTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGG ATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAAATAC AGGGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTC A	30

【表 3】

表 3

配列 番号	scFv 308	
7	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
18	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRPDDTAVYYCAR
3	CDR3:	RGGSYFDY
10	FR4:	WGQGLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
12	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
4	CDR1:	SGSTSNIGSHYVF
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
14	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC
6	CDR3:	AVWDAKYRGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
58	scFv 308	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGACCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGTTCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAA ATACAGGGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC

10

20

30

40

		GTCCTA	
49	scFv 308 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRPDDTAVYYCARRGGSY FDYWGQGLTVTVSSKLSGSASA PKLEEGEFSEARVSYVLTQ PPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSH YVFWYQQLPGTAPRLLIYR NHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAVWD AKYRGWVFGGGTKLTVL	
33	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRPDDTAVYYCARRGGSY FDYWGQGLTVTVSS	10
34	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSVT ISCSGSTSNIGSHYVFWYQQLPGTA PRLLIYRNHQRPSGVPDR LSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAVWD AKYRGWVFGGGTKLTVL	
105	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGT CTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGT CTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTAT GAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGG ATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGC ACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGT CCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGACCT GATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCAGACCGGTGGGAGCT ACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	20
106	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGC CACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGCGTCACCATCT CTGTTCTGGAAGCACCTCCAA CATCGGAAGTCATTATGT GTTCTGGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCCAGACTCCT CATCTATAGGAATCATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACC GACTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGG ATGAGGCTGATTACTGTG CAGTGTGGGATGCGAAATAC AGGGGTGGGTGTTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCT A	30

【表 4】

表 4

配列 番号	scFv 406	
19	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASEGTF
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
9	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSDDTAVYYCAR
3	CDR3:	RGGSYFDY
10	FR4:	WGQGLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
12	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
17	CDR1:	SGSTSNIGSHYVS
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
14	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC
6	CDR3:	AVWDAKYRGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
59	scFv 406	<p>CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGATTACTG TGCGAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCAAACCTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGTCCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAA ATACAGGGGTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC</p>

10

20

30

40

		GTCCTA	
50	scFv 406 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASEGTFSSYAMSWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSS LRSDDTAVYYCARRGGSYFDYWGQGTLVTVSSKLSGSASAPK LEEGEFSEARVSYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNI GSHYV SWYQQLPGTAPRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLA ISG LRSEDEADYYCAVWDAKYRGWVFGGGTKLTVL	
35	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASEGTFSSYAMSWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSS LRSDDTAVYYCARRGGSYFDYWGQGTLVTVSS	10
36	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNI GSHYVSWYQQLPGTA PRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAVWDAKYRGWVFGGGTKLTVL	
107	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTACTACTG TGCGAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	20
108	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAA CATCGGAAGTCATTATGTGTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGG ATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAAATAC AGGGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCT A	30

【表 5】

表 5

配列 番号	scFv 501	
19	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTF
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
9	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSDDTAVYYCAR
20	CDR3:	RRGAKFDY
10	FR4:	WGQGLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
21	軽鎖 FR1:	SYVLTQQPSASGTPGQSVTISC
22	CDR1:	SGSTSNIGSHYVV
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
23	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYYC
24	CDR3:	AVWDDTLSGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
60	scFv 501	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTACTACTG TCGGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAAACCTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCAACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACAC CCTGAGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG

10

20

30

40

		TCCTA	
51	scFv 501 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTFSSYAMSWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSKLSGSASAPK LEEGEFSEARVSYVLTQQPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYV VWYQQLPGTAPRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIG GLRSEDEADYYCAVWDDTLSGWVFGGGTKLTVL	
37	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTFSSYAMSWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSS	10
38	V _L (アミノ酸)	SYVLTQQPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVWVWYQQLPGT APRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADY YCAVWDDTLSGWVFGGGTKLTVL	
109	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	20
110	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCAACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCA ACATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCA GGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCG GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTG GCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAG GATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCT GAGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC TA	30

【表 6】

表 6

配列 番号	scFv 503	
19	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTF
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
9	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSDDTAVYYCAR
20	CDR3:	RRGAKFDY
10	FR4:	WGQGLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
12	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
22	CDR1:	SGSTSNIGSHYVV
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
23	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYYC
24	CDR3:	AVWDDTLGWW
15	FR4:	FGGGTKLTVL
61	scFv 503	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTACTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAAAGTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACAC CCTGAGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG

10

20

30

40

		TCCTA	
52	scFv 503 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTFSSYAMSWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSKLSGSASAPK LEEGEFSEARVSYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNI ¹⁰ SHYV VWYQQLPGTAPRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIG GLRSEDEADYYCAVWDDT ¹⁰ LSGWVFGGGTKLTVL	
39	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTFSSYAMSWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSS	
40	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNI ²⁰ SHYV VWYQQLPGTAPRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIG GLRSEDEADYYCAVWDDT ²⁰ LSGWVFGGGTKLTVL	
111	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
112	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAA CATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGG ATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTG AGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTC A	

10

20

30

【表 7】

表 7

配列 番号	scFv 601	
7	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
9	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSDDTAVYYCAR
20	CDR3:	RRGAKFDY
10	FR4:	WGQGLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
21	軽鎖 FR1:	SYVLTQQPSASGTPGQSVTISC
22	CDR1:	SGSTSNIGSHYVV
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
23	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYYC
24	CDR3:	AVWDDTLSGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
62	scFv 601	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAAAGTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCAACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACAC CCTGAGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG

10

20

30

40

		TCCTA	
53	scFv 601 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSDDTAVYYCARRRGAK FDYWGQGLTVTVSSKLSGSASA PKLEEGEFSEARVSYVLTQ QPSASGTPGQSVTISCSGSTSNI GSH YVVWYQQLPGTAPRLLIYR NHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLA IGGLRSEDEADYYCAVWDD TLSGWVFGGGTKLTV	
41	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSDDTAVYYCARRRGAK FDYWGQGLTVTVSS	10
42	V _L (アミノ酸)	SYVLTQQPSASGTPGQSVT ISCSGSTSNI GSHYVVWYQQLPGT APRLLIYRNHQRPSGVPDR LSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEAD Y YCAVWDDTLSGWVFGGGTK LTV	
113	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGT CTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCT CCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATG AGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGAT GGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCC ACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAT GACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTA AATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCT CA	20
114	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCA ACCCTCAGCGTCTGGGACCCC CGGGCAGAGCGTCACCATCT CTGTTCTGGAAGCACCTCCA ACATCGGAAGTCATTATGTG GTTCTGGTACCAGCAGCTCCCA GGAACGGCCCCCAGACTCCTC ATCTATAGGAATCATCAGCG GCCCTCAGGGGTCCCTGACC GACTCTCTGGCTCCAAGTCTG GCACCTCAGCCTCCCTGGCC ATCGGTGGGCTCCGGTCCGAG GATGAGGCTGATTACTGTGC AGTGTGGGATGACACCCT GAGTGGCTGGGTGTTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCC TA	30

【表 8】

表 8

配列 番号	scFv 603	
7	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS
1	CDR1:	SYAMS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
2	CDR2:	GIPIFGTVNYAQKFQG
9	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSDDTAVYYCAR
20	CDR3:	RRGAKFDY
10	FR4:	WGQGTLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
25	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
22	CDR1:	SGSTSNIGSHYVV
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
23	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYYC
24	CDR3:	AVWDDTLGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
63	scFv 603	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCA TCCGCCCCAAAAGTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACG CGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGA CCCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACC TCCAACATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCT CCCAGGAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTGTGGGATGACAC CCTGAGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG

10

20

30

40

		TCCTA	
54	scFv 603 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMS WVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVY MEL SSLRSDDTAVYYCARRRGAK FDYWGQGLVTVSSKLSGSASA PKLEEGEFSEARVSYVLTQP PSASGTPGQSVTISCSGSTS NIGSH YVVWYQQLPGTAPRLLIYRN HQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLA IGGLRSEDEADYYCAVWDDT LSGWVFGGGTKLTVL	
43	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMS WVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTVNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVY MEL SSLRSDDTAVYYCARRRGAK FDYWGQGLVTVSS	10
44	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSVTIS CSNSTNIGSHYVVWYQQLPGTA PRLLIYRNHQ RPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY CAVWDDT LSGWVFGGGTKLTVL	
115	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCT GGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTC CTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATGAG CTGGGTGCGACAGGCCCT GGGCAAGGGCTTGAGTGGATGG GAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGTAAACTACGCACAGA AGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATGACCAGGGACACGTCCACG AGCACAGTCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGATGAC ACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGACGGCGCGGCGCTAAAT TTGACTACTGGGGCCAAG GGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	20
116	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC CTAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGCGTCACCATCTCTT GTTCTGGAAGCACCTCCAA CATCGGAAGTCATTATGTGGTCT GGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCCAGACTCCTCATCT ATAGGAATCATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCT CTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGT GGGCTCCGGTCCGAGG ATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGT GGGATGACACCCTG AGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCT A	30

【表 9】
表 9

配列 番号	scFv 803	
7	重鎖 FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
26	CDR1:	SYAIS
8	FR2	WVRQAPGQGLEWMG
27	CDR2:	GIPIFGTANYAQKFQG
28	FR3:	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
20	CDR3:	RRGAKFDY
10	FR4:	WGQGTLVTVSS
11	リンカー:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
12	軽鎖 FR1:	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISC
22	CDR1:	SGSTSNIGSHYVV
13	FR2	WYQQLPGTAPRLLIY
5	CDR2:	RNHQRPS
23	FR3:	GVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYYC
24	CDR3:	AVWDDTLSGWV
15	FR4:	FGGGTKLTVL
64	scFv 803	<p>CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTC ACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAA GGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGC ATCCGCCCAAACCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCAC GCGTATCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGG ACCCCGGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAC CTCCAACATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGC TCCCAGGAACGGCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCAT CAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAA GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGT CCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTGTGGGATGAC ACCCTGAGTGGCTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC</p>

10

20

30

40

		CGTCCTA	
55	scFv 803 アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSKLSGSASAPK LEEGEFSEARVSYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTS NIGSHYV VWYQQLPGTAPRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIG GLRSEDEADYYCAVWDDT LSGWVFGGGTKLTVL	
45	V _H (アミノ酸)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSS	10
46	V _L (アミノ酸)	SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTS NIGSHYVWVWYQQLPGTA PRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY CAVWDDT LSGWVFGGGTKLTVL	
117	V _H ドメイン (ヌクレオチ ド)	CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAA ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC ACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTACT GTGCGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAA GGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	20
118	V _L ドメイン (ヌクレオチ ド)	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAA CATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAG GAACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGG CCCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGG ATGAGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTG AGTGGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCT A	30

66	(ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGTTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA</u> <u>ACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGCC</u> <u>TCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC</u> <u>TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGA</u> <u>GGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAAATACAGGG</u> <u>GTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCCTCTGTTCCCGCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</u>	10
配列 番号 67	208 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRSDDTAVYYCARRGGSYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列 番号 68	208 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVFWYQQLPGTAP</u> <u>RLLIYRNHORPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC</u> <u>AVWDAKYRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	30

70	λ 軽鎖 (ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA</u> <u>ACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGCC</u> <u>TCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC</u> <u>TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGA</u> <u>GGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAAATACAGGG</u> <u>GTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCCTCTGTTCCCGCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</u>	10
配列 番号 71	306 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEISS</u> <u>LRPDDTAVYYCARRGGSYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列 番号 72	306 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVSWYQQLPGTAP</u> <u>RLLIYRNHQPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC</u> <u>AVWDAKYRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	30

74	λ 軽鎖 (ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGTTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA</u> <u>ACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGCC</u> <u>TCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC</u> <u>TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGA</u> <u>GGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAAATACAGGG</u> <u>GTTGGGTGTTCTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTC A</u>	10
配列 番号 75	308 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRPDDTAVYYCARRGGSYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列 番号 76	308 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGTSNIGSHYVFWYQQLPGTAP</u> <u>RLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC</u> <u>AVWDAKYRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	30

【表 1 3】

表 1 3

配列 番号 77	406 IgG1 重鎖 (ヌクレオ チド)	<u>CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC</u> <u>TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCAC</u> <u>CTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTG</u> <u>GGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTT</u> <u>GGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC</u> <u>CATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGC</u> <u>TGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTGTG</u> <u>CGAGACGCGGTGGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGG</u> <u>ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG</u> <u>GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC</u> <u>ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA</u> <u>ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCTGACCAGCG</u> <u>GCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCT</u> <u>ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG</u> <u>GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC</u> <u>AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA</u> <u>CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT</u> <u>GGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGG</u> <u>ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG</u> <u>TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC</u> <u>TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA</u> <u>GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA</u> <u>GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG</u> <u>GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC</u> <u>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG</u> <u>AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG</u> <u>ACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT</u> <u>CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC</u> <u>AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC</u> <u>TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC</u> <u>AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT</u> <u>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC</u> <u>TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</u>
配列 番号	406	<u>TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC</u> <u>GGGCAGAGCGTCACCATCTTGTCTGGAAGCACCTCCAAC</u>

10

20

30

40

78	λ 軽鎖 (ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA</u> <u>ACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGCC</u> <u>TCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC</u> <u>TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGA</u> <u>GGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGCGAAATACAGGG</u> <u>GTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</u>	10
配列 番号 79	406 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASEGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRSDDTAVYYCARRGGSYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列 番号 80	406 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNI GSHYVSWYQQLPGTAP</u> <u>RLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC</u> <u>AVWDAKYRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	30

【表 1 4】

表 1 4

配列 番号 81	501 IgG1 重鎖 (ヌクレオ チド)	<u>CAGGTCCAGCTTGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC</u> <u>TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAGGCAC</u> <u>CTTCAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTG</u> <u>GGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTT</u> <u>GGTACAGTAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCAC</u> <u>CATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGC</u> <u>TGAGCAGCCTGAGATCTGATGACACGGCCGTGTATTACTGTG</u> <u>CGAGACGGCGCGGCGCTAAATTTGACTACTGGGGCCAAGGG</u> <u>ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG</u> <u>GTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC</u> <u>ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA</u> <u>ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCG</u> <u>GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCT</u> <u>ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG</u> <u>GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC</u> <u>AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA</u> <u>CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATCCT</u> <u>GGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGG</u> <u>ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG</u> <u>TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC</u> <u>TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA</u> <u>GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA</u> <u>GCGTCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG</u> <u>GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC</u> <u>CATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG</u> <u>AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG</u> <u>ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT</u> <u>CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC</u> <u>AGCCGGAGAACAATAAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC</u> <u>TCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC</u> <u>AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT</u> <u>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC</u> <u>TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</u>	10 20 30 40
配列 番号	501	<u>TCCTATGTGCTGACTCAGCAACCCTCAGCGTCTGGGACCCCC</u> <u>GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAAC</u>	

82	λ 軽鎖 (ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGG</u> <u>AACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGC</u> <u>CCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA</u> <u>CCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG</u> <u>AGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTGAGTG</u> <u>GCTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCCAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</u>	10
配列 番号 83	501 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWQGLVTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF</u> <u>PAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列 番号 84	501 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQQPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVVWYQQLPGTA</u> <u>PRLLIYRNHQPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY</u> <u>CAVWDDTLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	30

86	λ 軽鎖 (ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGG</u> <u>AACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGC</u> <u>CCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA</u> <u>CCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG</u> <u>AGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTGAGTG</u> <u>GCTGGGTGTTCTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTCA</u>	10
配列 番号 87	503 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASEGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF</u> <u>PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列 番号 88	503 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGTSNIGSHYVVWYQQLPGTA</u> <u>PRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY</u> <u>CAVWDDTLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	30

<p>番号 90</p>	<p>λ 軽鎖 (ヌクレオチド)</p>	<p><u>GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAAC</u> <u>ATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGG</u> <u>AACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGC</u> <u>CCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA</u> <u>CCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG</u> <u>AGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTGAGTG</u> <u>GCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGT</u> CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCC TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCCACTGGTGTGTCT CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC ACACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA GCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</p>	10
<p>配列 番号 91</p>	<p>601 IgG 重鎖 (アミノ酸)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP</u> LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	20
<p>配列 番号 92</p>	<p>601 λ 軽鎖 (アミノ酸)</p>	<p><u>SYVLTOQPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVWVYQQLPGTA</u> <u>PRLIYRNHQRPSPGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY</u> <u>CAVWDDTLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>	30

<p>番号 94</p>	<p>λ 軽鎖 (ヌクレオチド)</p>	<p><u>GGGCAGAGCGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAAC</u> <u>ATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGG</u> <u>AACGGCCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGC</u> <u>CCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA</u> <u>CCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG</u> <u>AGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTGAGTG</u> <u>GCTGGGTGTTCTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCCAACAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA</u></p>	10
<p>配列 番号 95</p>	<p>603 IgG 重鎖 (アミノ酸)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAMSWVRQAPG</u> <u>QGLEWMGGIPIFGTVNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS</u> <u>LRSDDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF</u> <u>PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	20
<p>配列 番号 96</p>	<p>603 λ 軽鎖 (アミノ酸)</p>	<p><u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVWYQQLPGTA</u> <u>PRLLIYRNHORPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY</u> <u>CAVWDDTLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u></p>	30

98	λ 軽鎖 (ヌクレオチド)	<u>ATCGGAAGTCATTATGTGGTCTGGTACCAGCAGCTCCCAGG</u> <u>AACGGCCCCAGACTCCTCATCTATAGGAATCATCAGCGGC</u> <u>CCTCAGGGGTCCCTGACCGACTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA</u> <u>CCTCAGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG</u> <u>AGGCTGATTACTGTGCAGTGTGGGATGACACCCTGAGTG</u> <u>GCTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT</u> <u>CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTCCC GCCCTCC</u> <u>TCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT</u> <u>CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA</u> <u>AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC</u> <u>ACACCCTCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG</u> <u>CTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA</u> <u>GCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG</u> <u>AAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA</u>	10
配列 番号 99	803 IgG 重鎖 (アミノ酸)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ</u> <u>GLEWMGGIPIFGTANYAQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL</u> <u>RSEDTAVYYCARRRGAKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	20 30
配列 番号 100	803 λ 軽鎖 (アミノ酸)	<u>SYVLTQPPSASGTPGQSVTISCSGSTSNIGSHYVVWYQQLPGTA</u> <u>PRLLIYRNHQRPSGVPDRLSGSKSGTSASLAIGGLRSEDEADYY</u> <u>CAVWDDTL SGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA</u> <u>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN</u> <u>KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>	

【表 19】

表 19 : TARC 介在性カルシウム流動阻害から得られた計算上の IC_{50} 値

	208	306	308	406	501	503	601	603	803	KM3060var
IC_{50} (nM)	0.0019	0.0012	0.003	0.001	0.001	0.0012	0.003	0.002	0.01	約 172.5
R^2	0.98	0.98	0.99	0.96	0.94	0.93	0.97	0.99	0.99	0.43

10

20

30

40

【表 2 0】

表 2 0 : 標識化リガンドを使用する抗 C C R 4 I g G のリガンド干渉性結合
実験からの I C ₅₀ 実測値

IC ₅₀ (nM)	306	406	503
MDC	0.28	0.27	0.11
R ²	0.98	0.99	0.97
TARC	0.51	0.94	0.87
R ²	0.96	0.97	0.95

【表 2 1】

10

表 2 1 : リガンド介在性カルシウム流動実験における抗 C C R 4 抗体の拮抗
性特性の概要

	T A R C の阻害		M D C の阻害
	IC ₅₀ (pM)	R ²	シグナル伝達阻害の割合 (%)
306	39 ± 0.4	0.95	74 %
406	28 ± 6	0.97	74 %
503	13 ± 3.5	0.96	64 %
KW0761	n.d.	n.d.	n.d.

20

*n.d. = 未検

【表 2 2】

表 2 2 : 抗 C C R 4 抗体によるリガンド誘導性遊走 (C C L 1 7 / T A R C お
よび C C L 2 2 / M D C) の抑制実験での I C ₅₀ 実測値および残存遊走の割合
(%) の概要

試料	C C L 1 7 / T A R C の阻害		C C L 2 2 / M D C の阻害
	IC ₅₀ (pM)	R ²	遊走の阻止 (%)
306	158	0.97	50 %
406	178	0.98	49 %
503	39	0.99	39 %
KW0761	n.d.	n.d.	n.d.

30

*n.d. = 未検

【表 2 3】

表 2 3 : 7 8 6 - O 細胞への抗 C C R 4 抗体 5 0 3 による C C L 1 7 / T A R C
C 誘導性侵入の抑制実験からの I C ₅₀ 実測値の概要

	C C L 1 7 / T A R C (1 2 5 n M)	C C L 1 7 / T A R C (2 5 n M)
IC ₅₀ (μ g / m l)	1.33	0.12
R ²	0.97	0.77

40

【表 2 4】

表 2 4 : 血液腫瘍細胞株 CCRF - CEM および L - 4 2 8 に対する ADCC 実験からの EC₅₀ 測定値の概要

IgG	CCRF-CEM		L-428	
	EC ₅₀ (pM)	最大殺滅頻度 (%; nM I g G)	EC ₅₀ (pM)	最大殺滅頻度 (%; nM I g G)
306	114	118 (1.4)	708	88 (7)
406	99.9	121 (1.4)	704	78 (7)
503	5.3	108 (1.4)	233	93 (7)
KW0761	315	69.8 (1.4)	57	84 (7)

10

【表 2 5】

表 2 5 : 腎臓細胞腫瘍マイクロアレイ (TMA) とその妥当な対照組織 (胎盤 および正常な腎臓) についての IHC 実験からのスコア表

胎盤対照組織				
スコア	CCR4 - 503-IgG	CCR4 - Ab1669-IgG	CCL17	CCL22
0	32/39	33/40	38/38	36/37
1	7/39	7/40	0/38	1/37
2	0/39	0/40	0/38	0/37
腎臓対照組織				
スコア	CCR4 - 503-IgG	CCR4 - Ab1669-IgG	CCL17	CCL22
0	0/2	1/3	2/3	0/2
1	2/2	2/3	1/3	0/2
2	0/2	0/3	0/3	2/2
腎臓細胞癌組織				
スコア	CCR4 - 503-IgG	CCR4 - Ab1669-IgG	CCL17	CCL22
0	21/174	19/175	128/169	37/171
1	83/174	92/175	39/169	99/171
2	70/174	64/175	2/169	35/171

20

30

40

【 0 4 4 1】

引用文献

次の引用文献は、本明細書に示された事項に対して補足となる、例示的な方法または他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に特異的に組み込まれる。

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997.

Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", *F*

50

EBS Lett., 414:521-526, 1997.

Baatar, Olkhanud, Newton, Sumitomo, Biragyn. CCR4 expressing T cell tumors can be specifically controlled via delivery of toxins to chemokine receptors. *J Immunol* 179: 1996-2004 (2007a)

Baatar, Olkhanud, Sumitomo, Taub, Gress, Biragyn. Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4⁺ Tregs and unprimed CCR4⁻ Tregs, regulate effector T cells using FasL. *J Immunol* 178: 4891-900 (2007b)

Baeuerle and Gires, *BJC*, 96: 417-423, 2007.

Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in *Saccharomyces Cerevisiae*", *EMBO J.*, 6:229-234, 1987

Bayry, Tchilian, Davies, Forbes, Draper, Kaveri, Hill, Kazatchkine, Beverley, Flower, Tough. In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10221-6 (2008)

Beckman, Weiner and Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", *Cancer*, 109(2):170-179, 2006.

Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985.

Burdi, Chi, Mattia, Harrington, Shi, Chen, Jacutin-Porte, Bennett, Carson, Yin, Kansra, Gonzalo, Coyle, Jaffee, Ocain, Hodge, LaRosa, Harriman. Small molecule antagonists of the CC chemokine receptor 4 (CCR4). *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3141-5 (2007)

Carillo and Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073, 1988.

Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*", *BioTechnology*, 5:369, 1987.

Church: Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor. *QJM* 96: 91-102 (2003)

Chvatchko, Hoogewerf, Meyer, Alouani, Juillard, Buser, Conquet, Proudfoot, Wells, Power A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* 191: 1755-64 (2000)

Curiel: (2008) Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 20: 241-6

Dannull, Su, Rizzieri, Yang, Coleman, Yancey, Zhang, Dahm, Chao, Gilboa, Vieweg Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115: 3623-33 (2005)

Davies, Bayry, Tchilian, Vani, Shaila, Forbes, Draper, Beverley, Tough, Flower. Toward the discovery of vaccine adjuvants: coupling in silico screening and in vitro analysis of antagonist binding to human and mouse CCR4 receptors. *PLoS One* 4: e8084 (2009)

Davies and Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7-12, 1996.

Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," *Annu. Rev. Biochem.* 59: 439-473, 1990.

Davies and Riechmann, "Antibody VH domains as small recognition units", *Biotec hnology (NY)*, 13:475-479, 1995.

Devereux, Haeblerli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Progra

10

20

30

40

50

ms for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984.

Di Paolo et al., "A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity", *Clin Cancer Res* 9: 2837-48, 2003.

Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", *J. Pept. Sci.*, 2(4): 212-22, 1996.

Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990.

10

Graham: D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur J Immunol* 39: 342-51 (2009)

Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature*, 363(6428):446-448, 1993.

Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature*, 315:680-683, 1985.

Henikoff and Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915 - 10919, 1992.

Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929, 1978.

20

Holliger and Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136, 2005.

Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995.

Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993

Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998.

Hoogenboom, Lutgerink, Pelsers, Rousch, Coote, Van Neer, De Bruine, Van Nieuwenhoven, Glatz, Arends. Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library. *Eur. J. Biochem* 260, 774-784 (1999)

30

Ishida, Ishii, Inagaki, Yano, Komatsu, Iida, Inagaki, Ueda. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Research*, 66:11, pages 5716-5722, 2006

Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983.

Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991.

40

Kawasaki, Takizawa, Yoneyama, Nakayama, Fujisawa, Izumizaki, Imai, Yoshie, Homma, Yamamoto, Matsushima. Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 166: 2055-62 (2001)

Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", *EMBO J.*, 6: 187-195, 1987.

Kipriyanov, Moldenhauer, Martin, Kupriyanova, Little. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield of

50

n bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng* 10: 445-53 (1997)

Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.

Kurjan and Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF₁): a Putative -Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature -Factor", *Cell*, 30: 933-943, 1982.

Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4): 357-366, 2004. 10

Levings, Sangregorio, Sartirana, Moschin, Battaglia, Orban, Roncarolo. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 196: 1335-46 (2002)

Locati, Torre, Galliera, Bonecchi, Bodduluri, Vago, Vecchi, Mantovani. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 679-86 (2005)

Luckow and Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Auto grapha Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170 :31-39, 1989. 20

Mahnke, Schonfeld, Fondel, Ring, Karakhanova, Wiedemeyer, Bedke, Johnson, Storn, Schallenberg, Enk. Depletion of CD4⁺CD25⁺ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 120: 2723-33 (2007)

Marhaba et al., "CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers", *Curr Mol Med* 8: 784-804, 2008.

Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154, 1964.

Munz et al., "The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation", *Oncogene* 23: 5748-58, 2004. 30

Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS*, 4:11-17, 1988.

Naundorf, Preithner, Mayer, Lippold, Wolf, Hanakam, Fichtner, Kufer, Raum, Rie thmuller, Baeuerle, Dreier. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment. *Int J Cancer* 100: 101-10 (2002)

Needleman and Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.

Neuberger and Milstein, "Somatic hypermutation," *Curr. Opin. Immunol.*, 7:248-254, 1995. 40

Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", *Protein Sci.*, 13: 1882-1891, 2004.

Niwa, Shoji-Hosaka, Sakurada, Shinkawa, Uchida, Nakamura, Matsushima, Ueda, Hanai, Shitara. Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 64: 2127-33 (2004)

Norderhaug, Olafsen, Michaelsen, Sandlie. Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J Immunol Methods* 204: 77-87 (1997)

O'Brien et al., "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth 50

- in immunodeficient mice", *Nature* 445: 106-10, 2007.
- Olsen, Duvic, Frankel, Kim, Martin, Vonderheid, Jegasothy, Wood, Gordon, Heald, Oseroff, Pinter-Brown, Bowen, Kuzel, Fivenson, Foss, Glode, Molina, Knobler, Stewart, Cooper, Stevens, Craig, Reuben, Bacha, Nichols. Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 19: 376-88 (2001)
- Palmiter and Brinster, "Transgenic Mice", *Cell*, 41:343-345, 1985.
- Palmiter, Norstedt, Gelinias, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science*, 222:809-814, 1983.
- Panina-Bordignon, Papi, Mariani, Di Lucia, Casoni, Bellettato, Buonsanti, Miotto, Mapp, Villa, Arrigoni, Fabbri, Sinigaglia. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 107: 1357-64 (2001) 10
- Pearson and Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988.
- Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990.
- Perros, Hoogsteden, Coyle, Lambrecht, Hammad. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy* 64: 995-1002 (2009) 20
- Prang, Preithner, Brischwein, Goster, Woppel, Muller, Steiger, Peters, Baeuerle, da Silva, "Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines", *Br J Cancer*, 92(2):342-349, 2005.
- Purandare, Wan, Somerville, Burke, Vaccaro, Yang, McIntyre, Poss. Core exploration in optimization of chemokine receptor CCR4 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 679-82 (2007)
- Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929, 2007. 30
- Reff and Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 40:25-35, 2001.
- Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee and Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnology*, 14:1239-1245, 1996.
- Ruter, Barnett, Kryczek, Brumlik, Daniel, Coukos, Zou, Curiel. Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines. *Front Biosci* 14: 1761-70 (2009)
- Schodin, Kranz. Binding affinity and inhibitory properties of a single-chain anti-T cell receptor antibody. *J Biol Chem* 268: 25722-7 (1993) 40
- Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", *Gene*, 54:113-123, 1987.
- Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", *Nature*, 329:840, 1987.
- Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Biosci (Bangalore)*, 11:47-58, 1987.
- Smith and Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981. 50

Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With Baculovirus Expression Vector", *Mol. Cell Biol.*, 3:2156-2165, 1983.

Spizzo et al., "High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer", *Breast Cancer Res Treat* 86: 207-13, 2004.

Spizzo et al., "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer", *Gynecol Oncol* 103: 483-8, 2006.

Sui, Bai, St Clair Tallarico, Xu, Marasco. Identification of CD4 and transferrin receptor antibodies by CXCR4 antibody-guided Pathfinder selection. *Eur. J. Biochem* 270, 4497-4506 (2003)

10

Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.

van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.*, 310:591-601, 2001.

Varga et al., "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival", *Clin Cancer Res* 10: 3131-6, 2004.

Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature*, 376:732, 1995.

20

Ward, Gussow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia Coli*", *Nature*, 341(6242):544-546, 1989.

Went et al., "Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers", *Br J Cancer* 94: 128-35, 2006.

Yang, Huang, Huang, Pardoll. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol* 5: 508-15 (2004)

30

Yokoyama, Ishikawa, Igarashi, Kawano, Masuda, Hamaguchi, Yamasaki, Koganemaru, Hattori, Miyazaki, Ogino, Matsumoto, Takeuchi, Ohta. (2009) Potent and orally bioavailable CCR4 antagonists: Synthesis and structure-activity relationship study of 2-aminoquinazolines. *Bioorg Med Chem* 17: 64-73 (2009)

Yokoyama, Ishikawa, Igarashi, Kawano, Masuda, Hattori, Miyazaki, Ogino, Orita, Matsumoto, Takeuchi, Ohta M. Potent CCR4 antagonists: synthesis, evaluation, and docking study of 2,4-diaminoquinazolines. *Bioorg Med Chem* 16: 7968-74 (2008)

Young, MacKenzie, Narang, Oomen and Baenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995.

40

Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.

Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')₂ Fragments For Efficient Production in *Escherichia Coli* and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.

Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", *Science*, 303(5656): 371-373, 2004.

【 図 1 a) 】

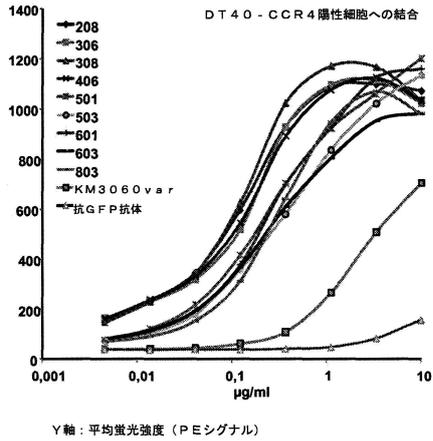
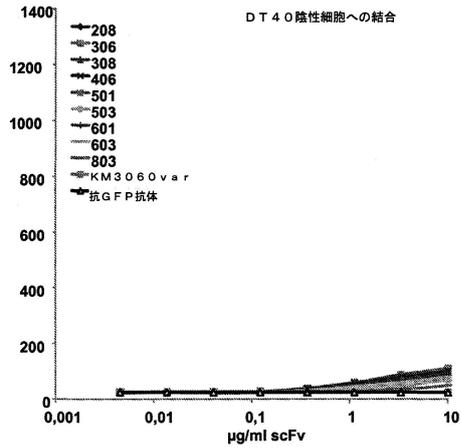


図 1 a)

【 図 1 b) 】



Y軸：平均蛍光強度 (PEシグナル)

図 1 b)

【 図 2 】

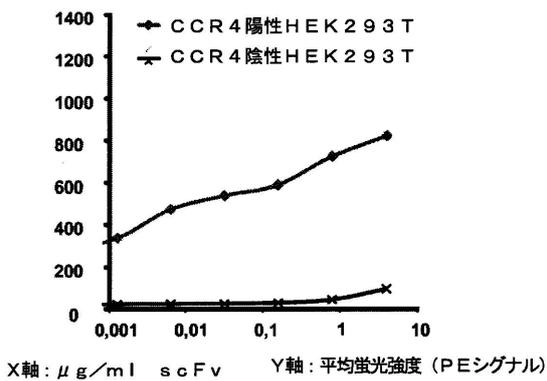


図 2

【 図 4 】

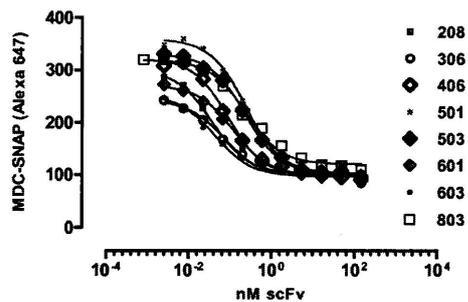


図 4

【 図 3 】

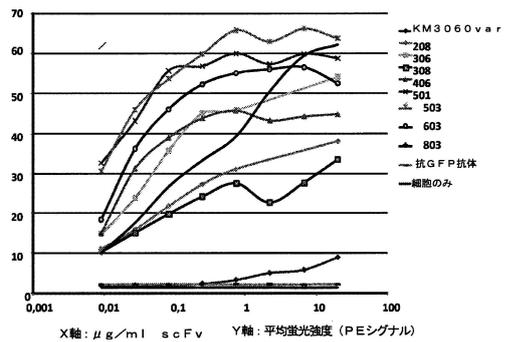


図 3

【 図 5 】

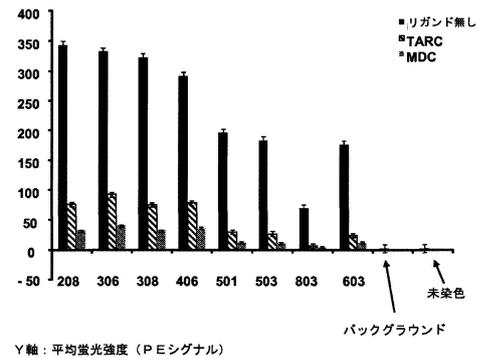


図 5

【 図 6 】

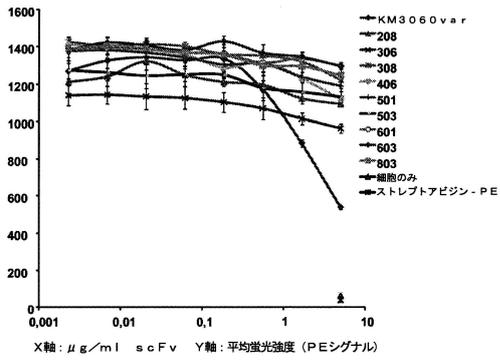


図 6

【 図 7 】

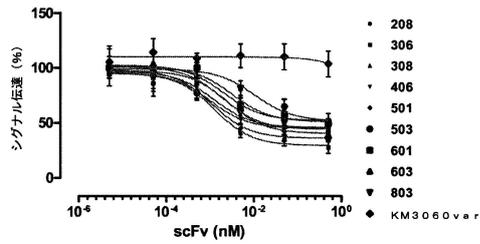


図 7

【 図 8 】

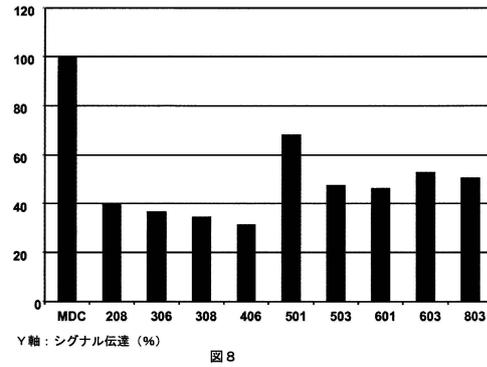


図 8

【 図 9 】

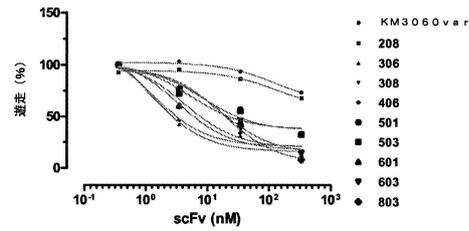


図 9

【 図 10 】

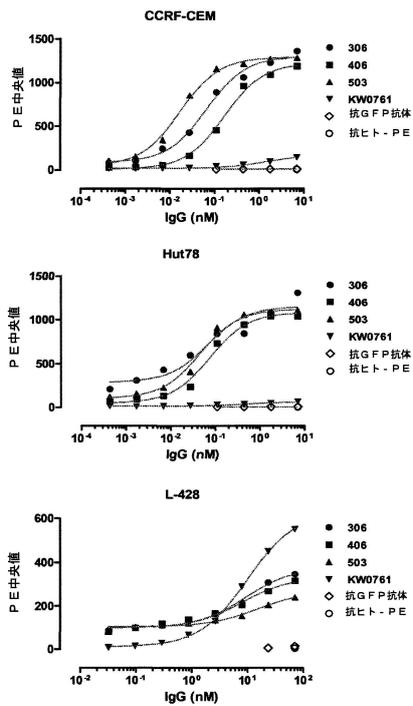


図 10

【 図 11 】

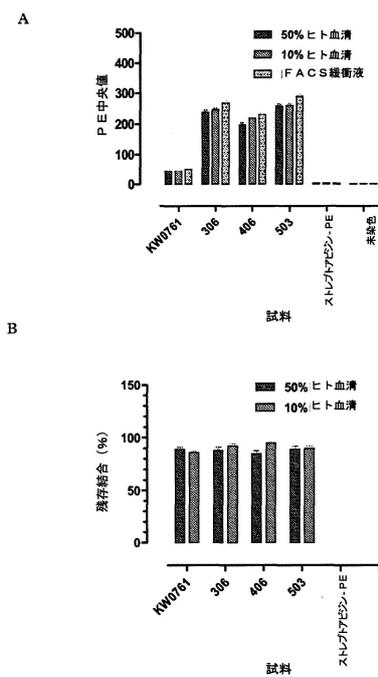


図 11

【 図 1 2 】

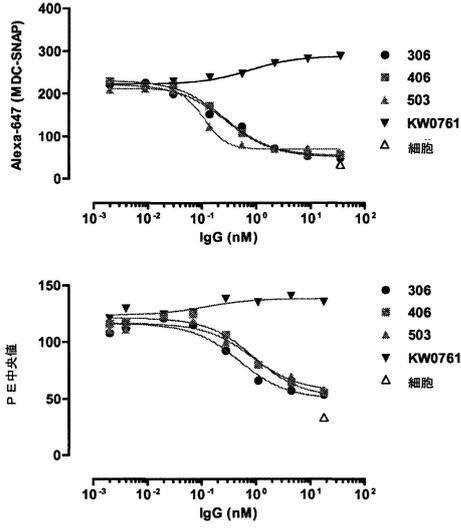


図 1 2

【 図 1 3 】

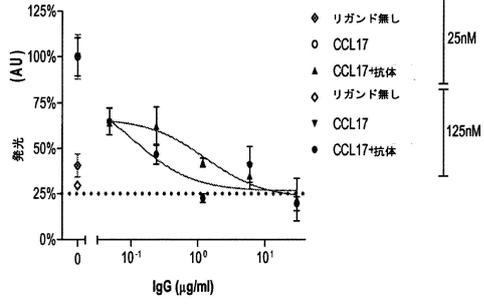


図 1 3

【 図 1 4 】

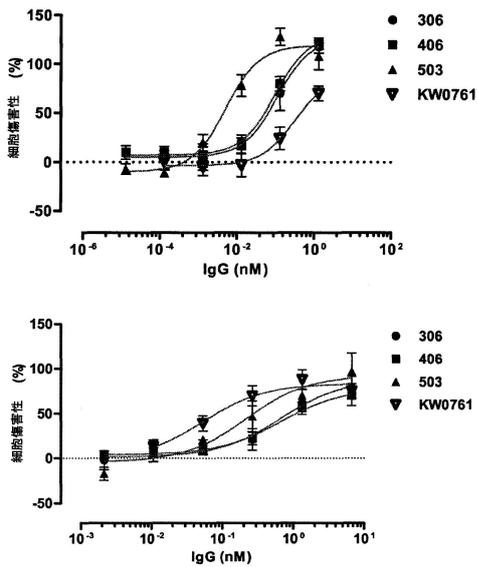


図 1 4

【 図 1 5 】

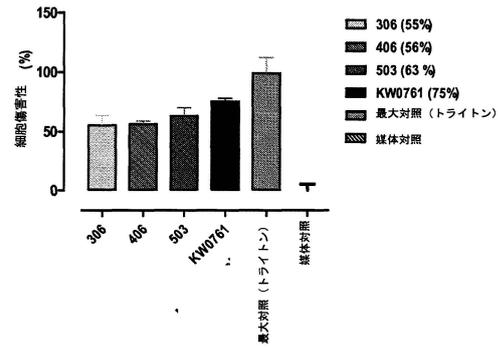


図 1 5

【 図 16 】

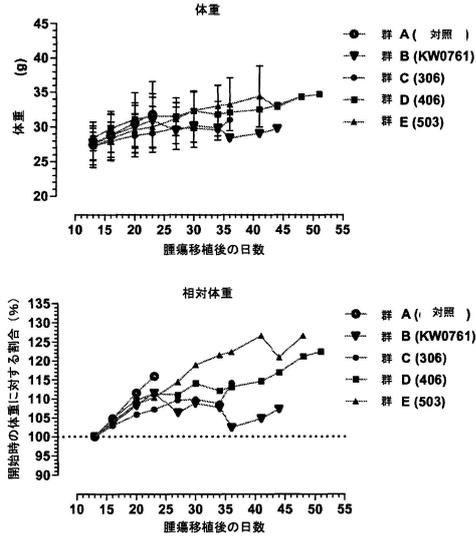


図 16

【 図 17 】

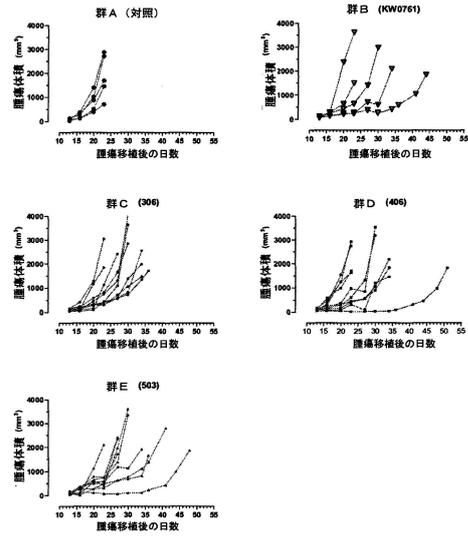


図 17

【 図 18 】

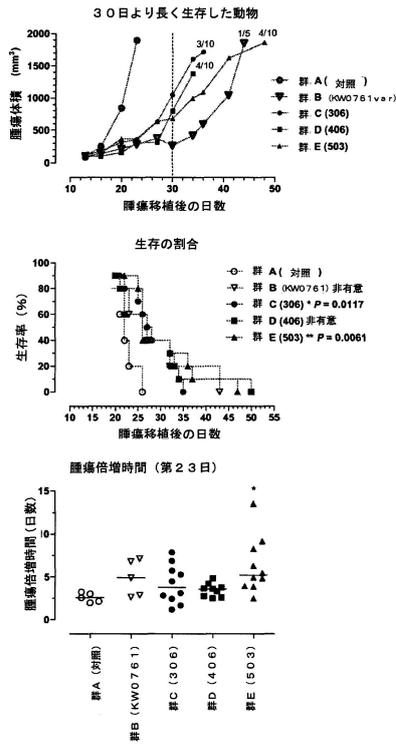


図 18

【 図 19 】

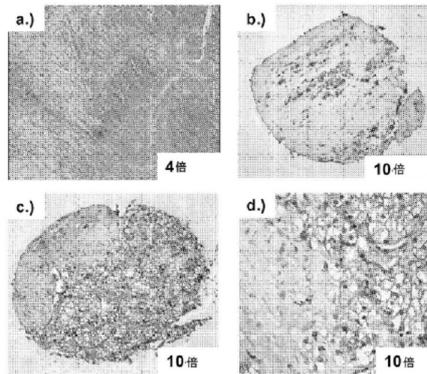


図 19

【配列表】

0006215707000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 S
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00

- (72)発明者 グリエブ, レメコ アルバート
 ノルウェー エヌ - 3 4 7 0 スレムスタッド, オダルスヴェイエン 3 1 ビー
- (72)発明者 レイエセン, ヘラルド
 ノルウェー エヌ - 1 4 1 2 ソフィエミル, ジャーズ ヴェイ 5 シー
- (72)発明者 キブリジャノヴ, セルゲイ ミハイロヴィク
 ノルウェー エヌ - 0 7 6 8 オスロ, ホヴセターヴェイエン 9 8

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 6 5 1 4 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 2 - 5 3 9 0 7 9 (J P , A)
 特表 2 0 0 2 - 5 3 4 4 8 2 (J P , A)
 特表 2 0 0 2 - 5 4 4 1 7 1 (J P , A)
 国際公開第 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 2 (W O , A 1)
 国際公開第 0 1 / 0 6 4 7 5 4 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 0 / 1 4 2 9 5 2 (W O , A 2)
 治療学, 2 0 1 0 年 1 2 月 1 0 日, Vol.44, No.12, pp.87-92
 The Journal of Biological Chemistry, 2 0 0 2 年, Vol.277, No.9, pp.6864-6873

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q
 D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)