

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4963701号
(P4963701)

(45) 発行日 平成24年6月27日 (2012. 6. 27)

(24) 登録日 平成24年4月6日 (2012. 4. 6)

(51) Int. Cl.

F I

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

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28

C O 7 K 16/46 (2006. 01)

C O 7 K 16/46

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

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 31 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-507984 (P2008-507984)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月19日 (2006. 4. 19)
 (65) 公表番号 特表2008-538508 (P2008-538508A)
 (43) 公表日 平成20年10月30日 (2008. 10. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/015492
 (87) 国際公開番号 W02006/116319
 (87) 国際公開日 平成18年11月2日 (2006. 11. 2)
 審査請求日 平成21年3月24日 (2009. 3. 24)
 (31) 優先権主張番号 60/674, 140
 (32) 優先日 平成17年4月21日 (2005. 4. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504208887
 ケモセントリックス インコーポレーティ
 ッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウ
 ンテン ビュー モード アベニュー 8
 5 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74) 代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CCX-CKR2 を結合する試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CCX-CKR2に結合する抗体であって、
 SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または
 SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の、Kabatの相補性決定領域(CDR)を含む、抗体。

【請求項 2】

検出可能な標識に連結されている、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項 4】

ヒト化抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項 5】

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14のKabatの相補性決定領域(CDR)を含む、請求項1記載の抗体。

【請求項 6】

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14を含む、請求項1記載の抗体。

【請求項 7】

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18のKabatの相補性決定領域(CDR)を含む、請求項1記載の抗体。

【請求項 8】

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む、請求項1記載の抗体。

【請求項 9】

薬学的に許容される賦形剤と、請求項1記載の抗体とを含む薬学的組成物。

【請求項 10】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

抗体がヒト化抗体である、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

抗体が、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14のKabatの相補性決定領域(CDR)を含む、請求項9記載の薬学的組成物。 10

【請求項 13】

抗体が、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14を含む、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

抗体が、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18のKabatの相補性決定領域(CDR)を含む、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

抗体が、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

生物学的試料を請求項1記載の抗体と接触させる工程、および該抗体の存在を検出する工程を含む、生物学的試料におけるCCX-CKR2を発現する細胞を検出する方法。 20

【請求項 17】

個体における癌細胞の血管新生または増殖を阻害するための医用薬剤の製造のための請求項1記載の抗体の使用。

【請求項 18】

個体が関節炎を有するかまたは関節炎を有する傾向がある、請求項17記載の使用。

【請求項 19】

個体がヒトではない、請求項17記載の使用。

【請求項 20】

生物学的試料においてCCX-CKR2のモジュレーターを同定する方法であって、生物学的試料を請求項1記載の抗体と接触させる工程、および該抗体の存在を検出する工程を含む、方法。 30

【請求項 21】

(a) 第1の非ヒト動物に試験薬剤を投与する工程、
(b) 請求項1記載の抗体を、第2の非ヒト動物に投与する工程、および
(c) 第1の動物に対する試験薬剤の効果を、第2の動物に対する抗体の効果と比較し、それにより試験薬剤の効力を決定する工程
を含む、CCX-CKR2活性を調節する試験薬剤の効力を試験するための方法。

【請求項 22】

CCX-CKR2に結合するキメラ抗体を含むポリペプチドであって、該キメラ抗体が、 40
(i) SEQ ID NO : 12、およびSEQ ID NO : 14のKabatの相補性決定領域(CDR) ; または
(ii) SEQ ID NO : 16、およびSEQ ID NO : 18のKabatの相補性決定領域(CDR)
を含む、ポリペプチド。

【請求項 23】

CCX-CKR2に結合するキメラ抗体をコードするポリヌクレオチドであって、該キメラ抗体が、
(i) SEQ ID NO : 12、およびSEQ ID NO : 14のKabatの相補性決定領域(CDR) ; または
(ii) SEQ ID NO : 16、およびSEQ ID NO : 18のKabatの相補性決定領域(CDR)
を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 24】

キメラ抗体がSEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、またはSEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む、請求項23記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 5】

抗体が、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14のKabatの相補性決定領域(CDR)を含む、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 6】

抗体が、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14を含む、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 7】

抗体が、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18のKabatの相補性決定領域(CDR)を含む、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 8】

抗体が、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 9】

生物学的試料においてCCX-CKR2を発現する細胞を検出する方法であって、生物学的試料を請求項 1 記載の抗体と接触させる工程、および該抗体の存在を検出する工程を含む、方法。

【請求項 3 0】

抗体が、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14を含む、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

抗体が、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む、請求項 2 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本特許出願は、全ての目的において参照により本明細書に組み入れられる、2005年4月21日に出願された米国特許仮出願第60/674,140号の優先権の恩典を主張する。

【0 0 0 2】

発明の背景

ケモカインは、とりわけ炎症の際に産生されて白血球の動員、活性化および増殖を調節する小さなサイトカインのファミリーを構成する(Baggiolini, M. et al., Adv. Immunol. 55 : 97-179 (1994)(非特許文献1) ; Springer, T.A., Annu. Rev. Physiol. 57 : 827-872 (1995)(非特許文献2) ; およびSchall, T.J. and K.B. Bacon, Curr. Opin. Immunol. 6 : 865-873 (1994)(非特許文献3))。好中球、単球、マクロファージ、好酸、好塩基球、マスト細胞、ならびに、T細胞およびB細胞を含むリンパ球等の白血球を含む、形成された血液因子(赤血球以外)の化学走性を、ケモカインは選択的に誘導することができる。ケモカインは、化学走性を刺激することに加え、細胞形態の変化、細胞内遊離カルシウムイオン(Ca^{2+})濃度の一過的な上昇、顆粒エキソサイトーシス、インテグリンアップレギュレーション、生物活性脂質(例えば、ロイコトリエン)の形成、サイトカインの発現、ならびに、リンパ球の活性化、成長および増殖を伴う呼吸バーストを含め、反応性細胞において選択的にその他の変化を誘導することができる。従って、ケモカインは、炎症性メディエーターの放出、化学走性、および感染または炎症部位への管外遊出を引き起こす炎症性反応の初期の誘発刺激である。

【0 0 0 3】

CXCおよびCCケモカインと称されるケモカインの2つのサブファミリーは、4つの保存されたシステイン残基の内の最初の2つの配置により、1アミノ酸により隔てられているか(CXCケモカインSDF-1、IL-8、IP-10、MIG、PF4、ENA-78、GCP-2、GRO、GRO、GRO、NAP-2、NAP-4、I-TACの場合のように)、または隣り合う残基であるか(CCケモカインMIP-1、MIP-1、RANTES、MCP-1、MCP-2、MCP-3、I-309の場合のように)により区別される。殆どのCXCケモカインは、好中球白血球を引き寄せる。例えば、CXCケモカインのインターロイキン8(IL-8)、血小板第4因子(PF4)、および好中球活性化ペプチド2(NAP-2)は好中球

10

20

30

40

50

の強力な化学誘引物質および活性化物質である。MIG(インターフェロンにより誘導されるモノカイン)およびIP-10(インターフェロン により誘導性10kDaタンパク質)と称されるCXCケモカインは、特に、活性化された末梢血リンパ球の化学走性誘導に活躍する。CCケモカインは、一般に、より選択性が低く、そして、単球、好酸球、好塩基球、Tリンパ球、顆粒球およびナチュラルキラー細胞を含む多様な白血球を誘引することができる。ヒト単球化学走性タンパク質1~3(MCP-1、MCP-2およびMCP-3)、RANTES(Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)、ならびにマクロファージ炎症性タンパク質1および1 (MIP-1 およびMIP-1)等のCCケモカインは、化学誘引物質、および単球またはリンパ球の活性化物質とみなされているが、好中球の化学誘引物質ではないようである。

10

【 0 0 0 4 】

CCおよびCXCケモカインは、7回膜貫通型Gタンパク質共役受容体スーパーファミリーに属する(Murphy, P.M., Pharmacol Rev. 52 : 145-176 (2000)(非特許文献4))。このGタンパク質共役受容体ファミリーは、7つの膜貫通領域を含む不可欠な膜タンパク質の大きなグループを含んでいる。GTPに結合して共役する受容体からのシグナル伝達に介在するヘテロ三量体調節タンパク質であるGタンパク質と、これらの受容体は、例えば細胞内伝達物質を産生することにより、共役していることがある。さらに、ケモカイン受容体は、Gタンパク質の結合とは独立して作用し得る。例えば、赤血球上に主として発現されるダッフィ受容体は、循環系からケモカインを除去するケモカインとして作用すると考えられている無差別ケモカイン結合受容体である。

20

【 0 0 0 5 】

一般的に言って、ケモカインとケモカイン受容体との相互作用は、1つのケモカインが多くのケモカイン受容体に結合でき、また逆に、単一のケモカイン受容体がいくつかのケモカインと相互作用できるという点で無差別な傾向がある。この規則についてはいくつかの例外がある：このような例外の一つはSDF-1およびCXCR4との間の相互作用である(Bleul et al., J Exp Med, 184(3) : 1101-9 (1996)(非特許文献5) ; Oberlin et al., Nature, 382(6594) : 833-5 (1996)(非特許文献6))。元々は前B細胞成長刺激因子として同定された(Nagasawa et al., Proc Natl Acad Scie USA, 91(6) : 2305-9 (1994)(非特許文献7))SDF-1は、CXCR4の唯一報告されているヒトリガンドである。SDF-1遺伝子は、SDF-1 およびSDF-1 と称される2つのタンパク質を、選択的スプライシングによりコードしている。SDF-1 のN末端においては存在するが、SDF-1 では欠けている4つのアミノ酸残基を除いて、これらの2つのタンパク質は同一である。

30

【 0 0 0 6 】

ケモカイン受容体シグナル伝達およびリガンド選択には、従来理解されていなかった多くの局面がある。例えば、以前に機能の決定されていない多数のオーファン受容体が存在する。RDC1は、例えば、血管作動性腸管ペプチド(VIP)の受容体であると以前には思われていたが、つい最近まで、その内因性リガンドが同定されていなかった為、オーファン受容体であると考えられていた。例えば、Cook et al., FEBS Letts. 300(2) : 149-152 (1992)(非特許文献8)を参照のこと。

【 0 0 0 7 】

最近、CCX-CKR2と改名されたRDC1は、SDF-1およびI-TACの両ケモカインと結合することが突き止められた。例えば、全てにおいて参照により本明細書に組み入れられる、PCT/US 04/34807(特許文献1)、ならびに米国特許出願第10/698,541号(特許文献2)、同第10/912,638号(特許文献3)、および同第11/050,345号(特許文献4)を参照のこと。

40

【 0 0 0 8 】

【特許文献 1】 国際出願番号PCT/US04/34807

【特許文献 2】 米国特許出願第10/698,541号

【特許文献 3】 米国特許出願第10/912,638号

【特許文献 4】 米国特許出願第11/050,345号

【非特許文献 1】 Baggiolini, M. et al., Adv. Immunol. 55 : 97-179 (1994)

50

【非特許文献2】Springer, T.A., Annu. Rev. Physiol. 57 : 827-872 (1995)

【非特許文献3】Schall, T.J. and K.B. Bacon, Curr. Opin. Immunol. 6 : 865-873 (1994)

【非特許文献4】Murphy, P.M., Pharmacol Rev. 52 : 145-176 (2000)

【非特許文献5】Bleul et al., J Exp Med, 184(3) : 1101-9 (1996)

【非特許文献6】Oberlin et al., Nature, 382(6594) : 833-5 (1996)

【非特許文献7】Nagasawa et al., Proc Natl Acad Scie USA, 91(6) : 2305-9 (1994)

【非特許文献8】Cook et al., FEBS Letts. 300(2) : 149-152 (1992)

【発明の開示】

【0009】

10

発明の概要

本発明は、CCX-CKR2への競合抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供し、該競合抗体は、

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0010】

いくつかの態様において、抗体は検出可能な標識に結合されている。いくつかの態様では、抗体は、放射性同位元素または細胞毒性化学物質に結合されている。

【0011】

20

いくつかの態様では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様では、抗体は抗体断片である。いくつかの態様では、抗体はヒト化抗体である。

【0012】

いくつかの態様では、抗体はSEQ ID NO : 12および/もしくはSEQ ID NO : 14の相補性決定領域(CDR)を含むか、またはSEQ ID NO : 12および/もしくはSEQ ID NO : 14のCDRと実質的に同一のCDRを含む。いくつかの態様では、抗体は、SEQ ID NO : 12および/またはSEQ ID NO : 14を含む。

【0013】

いくつかの態様では、抗体はSEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18の相補性決定領域(CDR)を含むか、またはSEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18のCDRと実質的に同一のCDRを含む。いくつかの態様では、抗体は、SEQ ID NO : 16および/またはSEQ ID NO : 18を含む。

30

【0014】

本発明はまた、薬学的に許容される賦形剤と、CCX-CKR2への競合抗体の結合を競合的に阻害する抗体とを含む、薬学的組成物を提供し、該競合抗体は、

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の相補性決定領域(CDR)を含む。

【0015】

いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様では、抗体は抗体断片である。いくつかの態様では、抗体はヒト化抗体である。

40

【0016】

いくつかの態様では、抗体はSEQ ID NO : 12および/もしくはSEQ ID NO : 14の相補性決定領域(CDR)を含むか、またはSEQ ID NO : 12および/もしくはSEQ ID NO : 14のCDRと実質的に同一のCDRを含む。いくつかの態様では、抗体は、SEQ ID NO : 12および/またはSEQ ID NO : 14を含む。

【0017】

いくつかの態様では、抗体はSEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18の相補性決定領域(CDR)を含むか、またはSEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18のCDRと実質的に同一のCDRを含む。いくつかの態様では、抗体は、SEQ ID NO : 16および/またはSEQ ID NO : 18を含む。

50

D NO : 18を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、生物学的試料において、CCX-CKR2を発現する細胞を検出する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、生物学的試料を抗体と接触させる工程、および該抗体の存在を検出する工程を含み、該抗体はCCX-CKR2への競合抗体の結合を競合的に阻害し、該競合抗体は、

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の相補性決定領域(CDR)を含む。

【 0 0 1 9 】

いくつかの態様では、抗体は検出可能な標識に結合されている。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、癌細胞の血管新生または増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、競合抗体が、

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の相補性決定領域(CDR)を含み、

当該細胞を、CCX-CKR2への該競合抗体の結合を競合的に阻害する抗体と接触させ、それにより癌細胞の血管新生または増殖を阻害する工程を含む。

【 0 0 2 1 】

いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様では、抗体は抗体断片である。いくつかの態様では、抗体はヒト化抗体である。

【 0 0 2 2 】

いくつかの態様では、抗体はSEQ ID NO : 12および/もしくはSEQ ID NO : 14の相補性決定領域(CDR)を含むか、またはSEQ ID NO : 12および/もしくはSEQ ID NO : 14のCDRと実質的に同一のCDRを含む。いくつかの態様では、抗体は、SEQ ID NO : 12および/またはSEQ ID NO : 14を含む。

【 0 0 2 3 】

いくつかの態様では、抗体はSEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18の相補性決定領域(CDR)を含むか、またはSEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18のCDRと実質的に同一のCDRを含む。いくつかの態様では、抗体は、SEQ ID NO : 16および/またはSEQ ID NO : 18を含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの態様では、細胞は個体中に存在する。いくつかの態様では、個体は、関節炎を有するか、または関節炎を有する傾向がある。いくつかの態様では、個体はヒトではない。

【 0 0 2 5 】

本発明は、CCX-CKR2のモジュレーターを同定する方法を提供する。いくつかの態様では、方法は、

(a) CCX-CKR2ポリペプチドを発現する細胞または該細胞の抽出物を、試験薬剤と合わせる工程、および

(b) 競合抗体が、

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の相補性決定領域(CDR)を含み、

CCX-CKR2ポリペプチドへの結合について、試験薬剤が該競合抗体と競合するかどうかを検出するアッセイを行う工程

を含み、ここで、CCX-CKR2ポリペプチドへの結合における競合抗体と試験薬剤との間の競合は、試験薬剤がCCX-CKR2活性のモジュレーターであることの指標である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

いくつかの態様では、競合抗体はSEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの態様では、競合抗体は、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14を含む。

【 0 0 2 7 】

いくつかの態様では、競合抗体はSEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの態様では、競合抗体は、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、CCX-CKR2活性を調節する試験薬剤の効力を試験する方法を提供する。この方法は、例えば、CCX-CKR2の小分子アゴニストまたはアンタゴニストの分析に、本発明の抗体を対照薬剤として使用する場合に有用である。いくつかの態様において、方法は以下の工程を含む：

(a) 第1の動物に試験薬剤を投与する工程、

(b) 競合抗体が

SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、または

SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18

の相補性決定領域(CDR)を含み、

CCX-CKR2ポリペプチドへの結合について、競合抗体と競合する抗体を、第2の動物に投与する工程、ならびに

(c) 第1の動物に対する試験薬剤の効果を、第2の抗体に対する抗体の効果と比較し、それにより試験薬剤の効力を決定する工程。

【 0 0 2 9 】

いくつかの態様では、競合抗体はSEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの態様では、競合抗体は、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14を含む。

【 0 0 3 0 】

いくつかの態様では、競合抗体はSEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの態様では、競合抗体は、SEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む。

【 0 0 3 1 】

本発明はさらに、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16、もしくはSEQ ID NO : 18を含むポリペプチド、またはSEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16、もしくはSEQ ID NO : 18からの少なくとも1つのCDRを含むポリペプチドを提供する。いくつかの態様では、ポリペプチドは抗体である。

【 0 0 3 2 】

本発明はさらに、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16、もしくはSEQ ID NO : 18をコードするポリヌクレオチド、またはSEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16、もしくはSEQ ID NO : 18からの少なくとも1つのCDRをコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 13、SEQ ID NO : 15、またはSEQ ID NO : 17を含む。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、キメラ抗体を作製する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は以下の工程を含む：

SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16、またはSEQ ID NO : 18からの少なくとも一つの相補性決定領域(CDR)をコードするポリヌクレオチドを、抗体の重鎖または軽鎖の少なくともフレームワーク領域をコードする異種ポリヌクレオチドに操作可能に(operably)連結して、抗体のキメラ重鎖または軽鎖をコードする融合ポリヌクレオチドを形成する工程、および

融合ポリヌクレオチドよりキメラ重鎖または軽鎖を発現させる工程。

10

20

30

40

50

【0034】

定義

本明瞭書中「CCX-CKR2」と呼ばれる「RDC1」は、Gタンパク質結合受容体(GPCR)と推定される7回膜貫通ドメインを意味する。CCX-CKR2のイヌオーソログは、1991年に最初に同定された。Libert et al., Science 244:569-572 (1989)参照。イヌ配列は、Libert et al., Nuc. Acids Res. 18(7):1917 (1990)中に記載されている。マウス配列は、例えば、Heesen et al., Immunogenetics 47:364-370 (1998)中に記載されている。ヒト配列は、例えば、Sreedharan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4986-4990 (1991)中に記載され、該文献では、このタンパク質は、血管作動性腸管ペプチドの受容体として誤って記載されていた。「CCX-CKR2」は、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:10の保存的に改変されたバリエーションである配列を含む。CCX-CKR2の断片は、上に列記される配列の一つ、またはその保存的に改変されたバリエーションのうちの少なくとも5、場合により少なくとも10、20、50、100、200、300または最大300までの連続するアミノ酸の断片である。

10

【0035】

「被験者」または「個体」とは、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌまたは他の哺乳類を含む動物を指す。

【0036】

「化学治療剤」とは、個体に投与された場合に、癌性細胞の成長を阻害、遅延もしくは抑止するのに十分、または癌性細胞において細胞毒性効果を生ずるのに十分な薬剤を指す。従って、「化学治療的に有効な量」とは、癌性細胞の成長を阻害、遅延もしくは抑制するのに十分、または癌性細胞において細胞特性効果を(直接的もしくは間接的に)生じるのに十分な、個体に対して投与される化学治療剤の量をいう。「低治療的(sub-therapeutic)量」とは、癌性細胞の成長を阻害、遅延もしくは抑制するのに十分、または癌性細胞において細胞特性効果を(直接的もしくは間接的に)生じるのに十分な量より少ない量をいう。

20

【0037】

「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子のフレームワーク領域またはその断片を含み、抗原に特異的結合、且つ認識するポリペプチドを指す。知られた免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、および α 定常領域遺伝子、ならびに、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、 κ または λ の一方に分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、または α に分類され、各々、順にIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEの免疫グロブリンクラスとして定義される。

30

【0038】

天然に生じる免疫グロブリンは、2つの同一の軽鎖(約24kD)および2つの同一の重鎖(約55または70kD)が四量体を形成する、共通のコア構造を有する。各鎖のアミノ末端部分は、可変(V)領域として知られ、各鎖の残りのより保存された定常(C)領域から区別することができる。軽鎖の可変領域中には、J領域として知られるC末端部分がある。重鎖の可変領域内には、J領域に加えてD領域が存在する。免疫グロブリン中のアミノ酸配列変化は、V領域中の超可変領域、または相補性決定領域(CDR)と知られる、抗原結合に直接関与する三つの隔てられた位置に制限されている。アミノ末端より順に、3つの領域は各々CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれている。これらのCDRは、より保存されたフレームワーク領域(FR)により位置が保たれている。アミノ末端より順に、これらの領域は各々FR1、FR2、FR3、およびFR4と呼ばれる。CDRおよびFR領域の位置、ならびに番号付けの体系は、例えば、Kabatらにより定義されている(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991))。

40

【0039】

例示的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は四量体を含む。各四量体は、各対が一つの「軽」(約25kDa)および一つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する、二つの同一のポリペプチ

50

ド鎖対から構成される。各鎖のN末端は、抗原認識に最も重要な、約100から110またはより多くのアミノ酸の可変領域を特徴とする。可変軽鎖(V_L)および可変重鎖(V_H)の用語は、各々、これらの軽および重鎖を指す。

【0040】

抗体は、例えば、無傷の免疫グロブリンとして、または、多様なペプチダーゼによる消化により産生される多数の良く特徴付けられた断片として存在する。従って、例えば、ペプシンはヒンジ領域中のジスルフィド結合の下で抗体を消化し、 $F(ab)'_2(V_H-C_{H1})$ にジスルフィド結合に連結された軽鎖であるFabの二量体を産生する。 $F(ab)'_2$ を穏やかな条件下で還元してヒンジ領域中のジスルフィド結合を壊すことにより、 $F(ab)'_2$ 二量体をFab'単量体に変換することができる。Fab'単量体は、ヒンジ領域の一部が付加された、本質的にFabである(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3d ed. 1993)参照)。無傷の抗体の消化に関しては、種々の抗体断片が定義されているが、このような断片が、化学的に、または組換えDNA手法を用いて、新しく合成され得ることが当業者には理解される。従って、抗体という用語は、本明細書において、全抗体の改変により産生される抗体断片、または組換えDNA手法を用いて新たに合成されるもの(例えば、一本鎖Fv)、またはファージディスプレイライブラリーを用いて同定されるもの(例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990)参照)をも含む。

10

【0041】

モノクローナルまたはポリクローナル抗体の調製には、当分野において公知の如何なる技術を用いてもよい(例えば、Kohler & Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp.77-96 (1985)参照)。「モノクローナル」抗体は、一つのクローンに由来する抗体を指す。一本鎖抗体の産生のための技術(米国特許第4,946,778号)を、本発明のポリペプチドに対する抗体を産生するために適用することができる。さらに、トランスジェニックマウス、または他の哺乳動物等の他の生物を、ヒト化抗体を発現させる為に用いてもよい。または、選択された抗原と特異的に結合する抗体、およびヘテロマーFab断片を同定する為に、ファージディスプレイ技術を用いることができる(例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10: 779-783 (1992)参照)。

20

【0042】

「キメラ抗体」とは、(a)異なるもしくは変えられたクラス、エフェクター機能および/または種の定常領域、または、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物等の、キメラ抗体に新しい特徴を与える全く異なる分子と抗原結合部位(可変領域)が結合されるよう、定常領域またはその一部が改変、置換または交換された抗体分子、または(b)異なるもしくは改変された抗原特異性を有する可変領域と、可変領域またはその一部が、改変、置換または交換された抗体分子である。

30

【0043】

「ヒト化」抗体は、非ヒト抗体の反応性を維持しながら、ヒトにおいてより免疫原性が少ない抗体である。これは、例えば、非ヒトCDR領域を保ちつつ、抗体の残りの部分をヒトの対応物で置換することにより得ることができる。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)、Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92 (1988)、Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)、Padlan, Molec. Immun., 28: 489-498 (1991)、Padlan, Molec. Immun., 31(3): 169-217 (1994)を参照のこと。

40

【0044】

「単離された」という用語は、タンパク質について使用される場合、天然状態において伴われている他の細胞性成分が、本質的にないことを意味する。乾燥または水性溶液のどちらかであっても良いが、好ましくは均質な状態である。純度および均一性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または高性能液体クロマトグラフィー等の分析化学技術を用いて決定することができる。調製物中において存在する主な種類であるタンバ

50

ク質は、実質的に精製されている。「精製された」という用語は、電気泳動ゲルにおいて、本質的に一本のバンドとなるタンパク質を意味する。より詳細には、タンパク質が少なくとも85%純粋、より好ましくは、少なくとも95%純粋、そして最も好ましくは、少なくとも99%純粋であることを意味する。

【0045】

タンパク質またはペプチドについて言及する場合、抗体に「特異的(もしくは、選択的)に結合」、または、「特異的(もしくは、選択的)に～と免疫反応性」とは、タンパク質および他の生物学的成分の異種性集団におけるタンパク質の存在を決定付ける結合反応を指す。従って、指定の免疫分析条件下では、本明細書の抗体は、特定のタンパク質にバックグラウンドの少なくとも2倍結合し、試料中に存在する他のタンパク質に対しては有意な量では実質的に結合しない。典型的には、特異的または選択的反応は、バックグラウンドのシグナルまたはノイズの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10から100倍より多い。

【0046】

「ペプチド模倣物(peptidomimetic)」および「模倣(mimetic)」という用語は、天然または非天然に生じるポリペプチド(例えば、CCX-CKR2に結合する試薬)と実質的に同じ構造的および機能的特徴を有する合成化学化合物を指す。製薬業界では、ペプチドアナログが、鑄型ペプチドの特性に類似した特性の非ペプチド薬物として、一般に使用されている。これらの型の非ペプチド化合物は、「ペプチドの模倣物(peptide mimetic)」または「ペプチド模倣物」と呼ばれる(参照により本明細書に組み入れられる、Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986)、Veber and Freidinger TINS p.392 (1985)、およびEvans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987))。治療上有用なペプチドと構造的に似たペプチドの模倣物は、均等な、もしくは増大された治療的または予防的効果を起こすために使用される。一般に、ペプチド模倣物は、所望のポリペプチド中に見出される等、典型ポリペプチド(即ち、生物学的または薬理学的活性を有するポリペプチド)と構造的に類似しているが、1つまたは複数のペプチド結合が、例えば、 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (シスおよびトランス)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、ならびに $-\text{CH}_2\text{SO}-$ からなる群より選択される結合により任意に置換されている。模倣物は、アミノ酸の合成の非天然アナログによって完全に構成されていてもよく、または、部分的に天然ペプチドアミノ酸および部分的にアミノ酸の非天然アナログのキメラ分子であってもよい。模倣物は、模倣物の構造および/活性が実質的に変えられない限り、いくつかの天然アミノ酸の保存的置換が組み込まれていてもよい。例えば、所望のポリペプチドの結合または酵素活性のうちの少なくとも1つを行うことができれば、模倣物組成物は本発明の範囲に含まれる。

【0047】

「リガンド」とは、例えば、受容体に結合することができるポリペプチドまたは他の分子である、薬剤を指す。

【0048】

「保存的に改変されたバリエーション」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関しては、「保存的に改変されたバリエーション」とは、同一または実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指し、核酸がアミノ酸配列をコードしていない場合には、実質的に同一の配列を指す。遺伝子コードの縮重のため、いずれかの所定のタンパク質は多数の核酸配列によりコードされる。例えば、GCA、GCC、GCGおよびGCUの全てがアミノ酸アラニンをコードしている。従って、コドンによりアラニンが特定されているあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを変更することなく、記載の対応コドンのいずれかへとコドンを変更することができる。このような核酸バリエーションは、保存的に改変されたバリエーションの一種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする本明細書中の各核酸配列はまた、当該核酸の全ての可能なサイレント変異を表現している。当業者であれば、核酸中の各コドン(通常、メチオニンの唯一のコドンであるAUG、および、通常トリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く)を、機能的に同一の分子を与えるよう改変することができる。よって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレン

ト変異は、記載される各配列に事実上包含される。

【0049】

アミノ酸配列に関しては、単一のアミノ酸またはコードされる配列中のアミノ酸の小さな割合を改変、付加もしくは欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列への個々の置換、欠失または付加は、アミノ酸の化学的に類似したアミノ酸への置換を起こす変化であれば、「保存的に改変されたバリエーション」であることを当業者であれば理解するであろう。機能的に類似のアミノ酸を示す保存的置換表は当分野において周知である。このような保存的に改変されたバリエーションは、本発明の多型バリエーション、種間ホモログ、および対立遺伝子と共に包含され、そして、またこれらを排除するものでもない。

【0050】

以下の8群は、各々、互いに保存的置換となるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン(A)、グリシン(G)；
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；
- 4) アルギニン(R)、リジン(K)；
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；
- 7) セリン(S)、スレオニン(T)；および
- 8) システイン(C)、メチオニン(M)

(例えば、Creighton, Proteins (1984)参照)。

【0051】

「配列同一性の割合(percentage)」は、2つの最適に整列された配列を、比較ウィンドウ上で比較することによって決定され、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列の一部は、参照配列(付加または欠失を含まない)と比べて付加または欠失(即ち、ギャップ)を含んでいてもよい。この割合は、両配列において同一の核酸塩基またはアミノ酸残基のある位置の数を決定し、一致した位置の数を求め、一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の割合を求めることにより決定される。

【0052】

2つもしくはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列についての「同一」またはパーセント「同一性」との用語は、比較ウィンドウ上または指定された領域について、最大の一一致となるよう比較および整列された場合、同一であるか、または、以下の配列比較アルゴリズムの一つを用いてもしくはマニュアルアライメント(整列)および視察により計算されるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドが特定の割合(即ち、特定の領域(例えば、本発明の全ポリペプチド配列または本発明のポリペプチドの細胞外ドメイン)について、60%同一性、場合により65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%の同一性)を有する2つもしくはそれ以上の配列またはサブ配列を指す。このような配列はそのような場合、「実質的に同一」とであると言われる。この定義はまた、試験配列の片割れを指す。場合により、少なくとも約50ヌクレオチドの長さに亘る領域、またはより好ましくは100から500もしくは1000もしくはそれ以上のヌクレオチドの長さに亘る領域について存在する。本発明は、図1に示されるように、SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18に対して、ならびに/またはSEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 16および/もしくはSEQ ID NO : 18のCDR1もしくはCDR2に対して実質的に同一なポリペプチドを含む。

【0053】

配列比較のため、典型的には、一つの配列が、試験配列が比較される参照配列となる。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列をコンピューターに入力し、必要によりサブ配列配位(subsequence coordinate)を指定し、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。デフォルトプログラムパラメーターを使用するか、または代替パラメーターを指定することができる。次に、プログラムパラメーターに基づき

10

20

30

40

50

、配列比較アルゴリズムにより、参照配列に対する試験配列についての配列同一性割合が計算される。

【 0 0 5 4 】

本明細書中において「比較ウインドウ」は、例えば、全長、または20から600、約50から約200、もしくは約100から約150アミノ酸、またはヌクレオチドからなる群より選択される連続する位置の数のいずれかのセグメントであって、2つの配列が最適に整列された後に、同数の連続する位置について、参照配列に対して配列が比較されるセグメントについての指示内容を含む。比較の為に配列を整列する方法は当分野において周知である。比較のための配列の最適な整列は、例えば、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math.

2 : 482cのホモロジーアルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443のホモロジー整列アルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444の同一性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピューター化された手段 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または手動アライメントおよび視察(例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995補追)参照)により行うことができる。

【 0 0 5 5 】

配列同一性割合および配列類似性を決定するのに好適なアルゴリズムの例としては、各々、Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25 : 3389-3402およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403-410に記載されるBLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムが挙げられる。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を介して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、照会配列中の長さWの短いワードであって、データベース配列中の同じ長さのワードと整列された場合、あるポジティブバリュー閾値スコア(positive-valued threshold score)Tと一致するか、またはそれを満たす短いワードを同定することにより最初に高得点配列対(high scoring sequence pair (HSP))を同定することを含む。Tは近隣ワードスコア閾値(neighborhood word score threshold)と呼ばれる(前述のAltschul et al.)。これらの初期近隣ワードのヒットは、これらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するためのシードとして働く。ワードヒットは、各配列の両方向に向かって、累積アライメントスコアが増加できる限り拡張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメーターM(マッチする残基の対についてのリワード(reward)スコア ; 常に>0)、およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア ; 常に<0)を用いて計算される。アミノ酸に関しては、スコアリングマトリクスを用いて累積スコアが計算される。各方向へのワードヒットの拡張は次の場合停止される : 最大達成値から定量X、累積アライメントスコアが減少した場合 ; 1つもしくは複数のネガティブスコア残基アライメントの集積により、累積スコアが零もしくはそれ以下になった場合 ; またはどちらかの配列の終わりに達した場合。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、およびXにより、アライメントの感度および速度が決定される。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列について)は、ワード長さ(wordlength ; W)11、期待値(expectation ; E)10、M=5、N=-4および両鎖の比較のデフォルトを用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、ワード長さ3、および期待値(E)10のデフォルトを用い、BLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915参照)は、アライメント(B)50、期待値(E)10、M=5、N=-4、および両鎖の比較のデフォルトを用いる。

【 0 0 5 6 】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列についての類似性についての統計分析を行う(例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性単位の一つは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間的一致が偶然により起こる蓋然性の目安となる最小蓋然性値(smallest sum probability ; P(N))である。例えば、試験核酸の参照核酸に対する比較における最小蓋然性値が約0.2より小さい、より好ましくは約0.01より小さい、および最も好ましくは約0.0

01より小さい場合に、核酸は参照配列に対して類似していると判断される。

【0057】

以下に記載されるように、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドに対して惹起された抗体と免疫学的に交差反応性であることは、2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一である指標となる。よって、例えば、2つのペプチドが単に保存的置換により異なっている場合、典型的には、ポリペプチドは第2のポリペプチドに対して実質的に同一である。2つのヌクレオチド配列が実質的に同一であるとの別の指標としては、以下に記載されるように、2つの分子またはその相補物が、ストリンジェントな条件下において互いにハイブリダイズする場合が挙げられる。2つの核酸配列が実質的に同一であるとのさらに別の指標としては、配列を増幅するために同じプライマーが使用できる場合が挙げられる。

10

【0058】

発明の詳細な説明

1. 本発明の抗体

本発明は、CCX-CKR2に対する抗体を用いたCCX-CKR2に関連する疾患および障害に対する処置、診断、および予後のための試薬および方法を提供する。CCX-CKR2に関連する疾患および障害は、以下にさらに例示され、ならびに癌、過度のまたは異常な血管形成および関節炎を伴う疾患を含むが、これらに限定されない。

【0059】

いくつかの態様では、抗体は単離されている。本発明のいくつかの態様において、抗体はSEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 14中のCDRによって結合されるエピトープと同じエピトープを認識する。本発明のいくつかの態様において、抗体はSEQ ID NO: 16およびSEQ ID NO: 18中のCDRによって結合されるエピトープと同じエピトープを認識する。SEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 14、またはSEQ ID NO: 16およびSEQ ID NO: 18を含む抗体は、CCX-CKR2に結合し、かつCCX-CKR2への結合について、ケモカインSDF-1およびI-TACと競合する。CCX-CKR2結合についての競合アッセイが記載されており、例えば、PCT/US04/34807ならびに米国特許出願公開第2004/0170634号および同第2005/0074826号を参照されたい。

20

【0060】

本発明のいくつかの態様において、抗体はCCX-CKR2に結合するが、ヒト末梢血には結合しない。例えば、いくつかの態様において、本発明の抗体は以下のうちの少なくとも1つに結合しない：好塩基球、単球、形質細胞様樹状細胞；B細胞、またはCD4⁺ T細胞。

30

【0061】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 12またはSEQ ID NO: 14またはSEQ ID NO: 16またはSEQ ID NO: 18を含む。いくつかの態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 14、またはSEQ ID NO: 16およびSEQ ID NO: 18を含む。いくつかの態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 12またはSEQ ID NO: 14またはSEQ ID NO: 16またはSEQ ID NO: 18のCDRを含む。いくつかの態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 14、またはSEQ ID NO: 16およびSEQ ID NO: 18のCDRを含む。

【0062】

40

CDRおよびFR領域の場所ならびに付番体系は、例えば、Kabatら(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991))により、以前に記載されている。CDRは通常、NCBI IgBLASTアルゴリズムを用いて同定することができる。当業者は、異なる配列アルゴリズムによって、特定の抗体アミノ酸配列中のCDRの場所のわずかに異なる説明が提供されることがあり得るということを認識すると考えられる。場合によっては、重鎖CDRは、アミノ酸位置31~35(CDR1)、50~65(CDR2)、および96~102(CDR3)に生じる。場合によっては、軽鎖CDRは、アミノ酸位置24~34(CDR1)、50~56(CDR2)、および89~97(CDR3)に生じる。いくつかの態様において、CDRは図1で描写されたように表示される。

50

【0063】

特定の抗体が別の抗体と同じエピトープを認識する能力は、典型的には、ある抗体が抗原への、例えば、CCX-CKR2またはその断片もしくは融合体への、第2の抗体の結合を競合的に阻害する能力によって決定される。多数の競合結合アッセイのいずれかを用いて、同じ抗原に対する2つの抗体間の競合を測定することができる。例示的なアッセイはBiacoreアッセイである。簡潔に述べると、これらのアッセイでは、例えば異なる抗体などの、相互に作用し合うものが、もう一方の結合を阻害する能力を試験することにより、構造の点から見て結合部位をマッピングすることができる。2つの連続した抗体試料を十分な濃度で注射することにより、同じ結合エピトープについて競合する抗体の対を同定することができる。抗体試料は、各々の注射によって顕著な飽和に達する潜在的な可能性を有するべきである。第2の抗体注射の正味の結合が、結合エピトープ解析についての指標になる。2つの応答レベルを用いて、完全競合対別個のエピトープに起因する非競合的結合の境界を記載することができる。同一のおよび別個の結合エピトープの結合と比較した第2の抗体注射の結合応答の相対量によって、エピトープ重複の程度が決定される。抗体は、線状または立体構造エピトープを認識する可能性があり、したがって抗体は、異なるおよび末端のエピトープを認識するものの、競合的である可能性がある。

10

【0064】

当技術分野において公知のその他の従来の免疫アッセイを本発明において用いることができる。例えば、サンドイッチELISAアッセイを用いて、抗体をそれらが結合するエピトープによって識別することができる。ウェルの表面をコーティングするための捕捉抗体を用いることによって、これを実行する。その後、飽和濃度未満のタグ付き抗原を捕捉表面に添加する。このタンパク質は、特異的な抗体：エピトープ相互作用を通じて抗体に結合すると考えられる。洗浄後、検出可能部分(例えば、検出抗体と定義されている標識抗体付きのHRP)に共有結合的に連結された、第2の抗体をELISAに添加する。この抗体が捕捉抗体と同じエピトープを認識する場合、その特定のエピトープはもはや結合にとって利用可能ではないので、標的タンパク質に結合することができないと考えられる。しかしながら、この第2の抗体が標的タンパク質上の異なるエピトープを認識する場合、結合することができると考えられ、ならびに関連基質を用いて活性(およびしたがって結合した抗体)のレベルを定量することによって、この結合を検出することができる。バックグラウンドは、1つの抗体を捕捉抗体および検出抗体の両方として用いることによって定義するが、最大シグナルは、抗原特異的な抗体で捕捉し、かつ抗原上のタグに対する抗体で検出することによって確定することができる。バックグラウンドおよび最大シグナルを参照として用いることによって、抗体をペア-ワイズ式で評価し、エピトープ特異性を決定することができる。

20

30

【0065】

上記のアッセイのいずれかを用いて、第1の抗体の存在下で、第2の抗体の抗原への結合が少なくとも30%、通例少なくとも約40%、50%、60%、または75%、および多くの場合少なくとも約90%低下する場合、第1の抗体は第2の抗体の結合を競合的に阻害すると考えられる。

【0066】

40

ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に公知である。例えば、免疫付与物質(immunizing agent)、および望ましい場合、アジュバントの1回または複数回の注射によって、ポリクローナル抗体を哺乳動物で作製することができる。典型的には、免疫付与物質および/またはアジュバントは、複数の皮下注射または腹腔内注射によって哺乳動物に注射されると考えられる。免疫付与物質は、核酸もしくはその断片によってコードされるタンパク質またはその融合タンパク質を含んでもよい。免疫付与される哺乳動物で免疫原性があることが公知のタンパク質に免疫付与物質をコンジュゲートすることが有用である可能性がある。そのような免疫原性タンパク質の例として、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、および大豆トリプシン阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。利用し得るアジュバントの例として、フロイントの完全アジュバ

50

ントおよびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート)が含まれる。免疫付与プロトコルは、必要以上の実験を伴わずに当業者によって選択されてもよい。

【0067】

あるいは、抗体はモノクローナル抗体であってもよい。Kohler & Milstein, Nature 256 : 495 (1975)によって記載された方法のような、ハイブリドーマ法を用いて、モノクローナル抗体を調製してもよい。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、またはその他の適切な宿主動物は典型的には、免疫付与物質に特異的に結合すると考えられる抗体を産生するまたは産生することができるリンパ球を引き出すための免疫付与物質によって免疫付与される。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫付与されてもよい。免疫付与物質は典型的には、CCX-CKR2ポリペプチド、またはその断片もしくは融合体を含むと考えられる。通常、ヒト起源の細胞が望ましい場合に末梢血リンパ球(「PBL」)が用いられるか、または非ヒト哺乳動物源が望ましい場合に脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が用いられるかのいずれかである。その後、ポリエチレングリコールなどの、好適な融合薬剤を用いて、リンパ球を不死化細胞株と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, pp.59-103 (1986))。不死化細胞株は通例、形質転換された哺乳動物細胞、特に齧歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髓腫細胞である。通例、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株が利用される。ハイブリドーマ細胞は、未融合の、不死化細胞の成長または生存を阻害する1つまたは複数の物質を含む好適な培養培地中で培養することができる。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチンデアミンホスホシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含むと考えられ(「HAT培地」)、その物質がHGPRT欠損細胞の成長を妨げる。

【0068】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、CCX-CKR2への結合について、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、またはSEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18を含む抗体と競合するキメラまたはヒト化抗体である。上述のように、ヒト化型の抗体は、ヒト抗体の相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種のCDR由来の残基と取り替えられているキメラ免疫グロブリンである。例えば、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、またはSEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18のCDRをヒト抗体のフレームワークに挿入することができる。

【0069】

ファージディスプレイライブラリー(Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227 : 381 (1991) ; Marks et al., J. Mol. Biol. 222 : 581 (1991))を含む、当技術分野において公知の様々な技術を用いて、ヒト抗体を産生することができる。ColeらおよびBoernerらの技術もまたヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p.77 (1985)およびBoerner et al., J. Immunol. 147(1) : 86-95 (1991))。同様に、例えば内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されているマウスなどの、トランスジェニック動物へのヒト免疫グロブリン座の導入によって、ヒト抗体を作成することができる。チャレンジによって、ヒト抗体産生が観察され、それは、遺伝子再配列、遺伝子アセンブリー、および抗体レパートリーを含む、全ての点においてヒトで見られる抗体産生に酷似している。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号 ; 第5,545,806号 ; 第5,569,825号 ; 第5,625,126号 ; 第5,633,425号 ; 第5,661,016号に、および以下の科学的刊行物に記載されている : Marks et al., Bio/Technology 10 : 779-783 (1992) ; Lonberg et al., Nature 368 : 856-859 (1994) ; Morrison, Nature 368 : 812-13 (1994) ; Fishwild et al., Nature Biotechnology 14 : 845-51 (1996) ; Neuberger, Nature Biotechnology 14 : 826 (1996) ; Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 : 65-93 (1995)。

【0070】

いくつかの態様では、本発明の抗体は、単鎖Fv(scFv)である。scFv抗体のV_HおよびV_L領

10

20

30

40

50

域(例えば、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 14、またはSEQ ID NO : 16およびSEQ ID NO : 18)は、2本鎖抗体に見出されるものと同様の抗原結合部位を生み出すように折り畳まれる単鎖を含む。ひとたび折り畳まれると、非共有結合的な相互作用によって、単鎖抗体は安定化する。いくつかの抗体態様の V_H および V_L 領域を直接一緒にするように繋ぎ合わせることができるが、1つまたは複数のアミノ酸からなるペプチドリンカーによって該領域を分離し得るということを当業者は正しく理解すると考えられる。ペプチドリンカーおよびそれらの使用は当技術分野において周知である。例えば、Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 8 : 5879 (1988) ; Bird et al., Science 242 : 4236 (1988) ; Glockshuber et al., Biochemistry 29 : 1362 (1990) ; 米国特許第4,946,778号、米国特許第5,132,405号およびStemmer et al., Biotechniques 14 : 256-265 (1993)を参照されたい。通常ペプチドリンカーは、前記領域を繋ぎ合わせ、または V_H と V_L の間のある最小限の距離もしくはその他の空間的関係性を保持すること以外の特定の生物学的活性を有さないと考えられる。しかしながら、折り畳み、正味の電荷、または疎水性などの分子のある特性に影響を与えるように、ペプチドリンカーの構成要素のアミノ酸を選択してもよい。単鎖Fv(scFv)抗体は、長さが50アミノ酸を超えない、通常40アミノ酸を超えない、好ましくは30アミノ酸を超えない、およびより好ましくは20アミノ酸を超えないペプチドリンカーを含んでもよい。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(SEQ ID NO : 23)、好ましくは2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのそのような配列のコンカテマーである。しかしながら、リンカー内でのいくつかのアミノ酸置換がなされ得るということが正しく理解されるべきである。例えば、バリンがグリシンと置換されうる。

【0071】

scFv抗体を作製する方法が記載されている。例えば、Huse et al., Science 246 : 1275-1281 (1989) ; Ward et al., Nature 341 : 544-546 (1986) ; およびVaughan et al., Nature Biotech. 14 : 309-314 (1996)を参照されたい。簡潔に述べると、免疫付与した動物由来のB細胞からのmRNAを単離し、およびcDNAを調製する。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域に特異的なプライマーを用いて、cDNAを増幅する。PCR産物を精製し、および核酸配列を繋ぎ合わせる。リンカーペプチドが望ましい場合、該ペプチドをコードする核酸配列を重鎖核酸配列と軽鎖核酸配列の間に挿入する。scFvをコードする核酸をベクターに挿入し、および適切な宿主細胞で発現させる。所望の抗原に特異的に結合するscFvは典型的には、ファージディスプレイライブラリーのパニングによって見出される。いくつかの方法のいずれかによって、パニングを実施することができる。それらの表面上に所望の抗原を発現する細胞を用いてまたは所望の抗原でコーティングされた固体表面を用いて、パニングを好都合に実施することができる。好都合には、表面は磁気ビーズであり得る。結合していないファージを固体表面から洗い流し、および結合したファージを溶出する。

【0072】

最も高い親和性を有する抗体の発見は、選択過程の効率によって決定付けられ、かつスクリーニングし得るクローンの数およびそれがなされるストリンジェンシーに依存する。典型的には、より高いストリンジェンシーがより選択的なパニングに対応する。しかしながら、条件があまりにストリンジェントである場合、ファージは結合しないと考えられる。1ラウンドのパニングの後、CCX-CKR2コーティングしたプレートにまたは表面上にCCX-CKR2を発現する細胞に結合するファージを大腸菌(E. coli)で拡大し、別のラウンドのパニングに供する。このように、多数倍の濃縮が3ラウンドのパニングで生じる。したがって、各ラウンドの濃縮が低い場合でさえも、複数ラウンドのパニングによって、稀なファージおよびその内部に含まれる最も高い親和性を有するscFvをコードする遺伝子材料またはファージ上でより良く発現する遺伝子材料の単離がもたらされると考えられる。

【0073】

選ばれるパニングの方法にかかわらず、ファージディスプレイによって提供される遺伝子型と表現型の間の物理的関連性によって、クローンの大規模なライブラリーでさえも、抗原への結合についてcDNAライブラリーの全てのメンバーを試験することが可能になる。

【0074】

ある態様において、抗体は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有し、または同じ抗原上の2つのエピトープに対する結合特異性を有する、ヒト抗体またはヒト化抗体を含むが、これらに限定されない、モノクローナル抗体である。ある態様において、結合特異性の一方は、CCK-CKR2タンパク質に対するものであり、もう一方は別の異なる癌抗原に対するものである。あるいは、テトラマー型の技術によって、多価の試薬が生み出されてもよい。

【0075】

いくつかの態様では、抗体はエフェクター部分にコンジュゲートされる。エフェクター部分は、放射能標識もしくは蛍光標識などの検出可能な標識部分を含む、任意の数の分子であってもよく、または治療的部分であってもよい。

10

【0076】

他の態様において、治療的部分は細胞毒性物質である。この方法では、細胞毒性物質を癌組織または細胞に標的することによって、罹患細胞の数の低下を結果的にもたらし、それによって癌と関連する症状を低下させる。細胞毒性物質は多数かつ多様で、および細胞毒性薬物または毒素もしくはそのような毒素の活性断片を含むが、これらに限定されない。好適な毒素およびそれらの対応する断片には、ジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシン、オーリスタチン(auristatin)等が含まれる。細胞毒性物質には、放射性同位元素を本発明の抗体にコンジュゲートすることによって作られる放射性化学物質も含まれる。

20

【0077】

II. 免疫アッセイ

数多くのよく認知された免疫学的結合アッセイのいずれかを用いて、CCX-CKR2またはCCX-CKR2発現細胞を検出するために、本発明の抗体を使用することができる(例えば、米国特許第4,366,241号;第4,376,110号;第4,517,288号;および第4,837,168号参照)。通常の免疫アッセイの概説については、Methods in Cell Biology, Vol.37, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993); Basic and Clinical Immunology 7th Edition, Stites & Terr, eds. (1991)も参照されたい。

【0078】

したがって、本発明は、CCX-CKR2を発現する細胞を検出する方法を提供する。ある方法において、対象に対して生検を実施し、および収集した組織をインビトロで試験する。その後、組織または組織由来の細胞を、本発明の抗CCX-CKR2抗体と接触させる。結果的に生じる任意の免疫複合体によって、生検した試料におけるCCX-CKR2タンパク質の存在が示される。そのような検出を容易にするために、抗体を放射性標識または蛍光標識などの、検出可能な標識であるエフェクター分子と結び付けることができる。別の方法において、画像システムを用いて、細胞をインビボで検出することができる。その後、標識の局在を決定する。診断画像を可視化するための従来の方法を用いることができる。例えば、常磁性放射性同位元素をMRI用に用いることができる。抗体の内在化は、循環クリアランスと対になって細胞外の酵素環境によるクリアランスに影響を受け易いと考えられる細胞外結合によって提供される寿命を超えて、生物内での寿命を延ばすために重要である可能性がある。

30

40

【0079】

標準的な免疫アッセイ法および本発明の抗体を用いて、CCX-CKR2タンパク質を検出することもできる。標準的な方法には、例えば、放射免疫アッセイ、(ELISAを含む)サンドイッチ免疫アッセイ、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロット、親和性クロマトグラフィー(固体相に結合した親和性リガンド)、および標識抗体によるインサイチュー検出が含まれる。また、例えば、ヒツジ抗マウスFITCなどの、2次検出薬剤を利用してもよい。適用可能な技術の全体的概観を、Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988)に見出すことができる。

【0080】

50

本発明は、癌の予後または診断を提供する方法含む、癌細胞を検出する方法を提供する。CCX-CKR2は、今まで試験されたほとんどあらゆる癌細胞で発現し、一方CCX-CKR2の正常(非癌)発現は、胎児肝臓のある発生段階と同様に腎臓およびいくつかの脳細胞に限定されているように見える。例えば、PCT/US04/34807ならびに米国特許出願第10/698,541号および同第10/912,638号を参照されたい。それゆえ、細胞における、ならびに特に、非胎児細胞および/または腎臓もしくは脳細胞以外の細胞における、CCX-CKR2の発現は、癌細胞の可能性のある存在を示す。組織の血管内皮におけるCCX-CKR2の存在もまた癌の存在を示し得る。場合によっては、CCX-CKR2発現細胞を含む試料は、当技術分野において公知のその他の方法を用いて癌細胞の存在について確認される。

【0081】

本発明のまた別の局面によって、癌を有するまたは癌を有することが疑われる対象の処置の方針を選択するための方法が提供される。本方法には、対象から生体試料を得る工程、試料をCCX-CKR2に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程、抗体結合の有無を検出する工程、および対象の癌に適切な処置の方針を選択する工程が含まれる。いくつかの態様において、処置とは、本発明のCCX-CKR2抗体を対象に投与することである。

【0082】

本発明は、癌腫、神経膠腫、中皮腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、膠芽腫、白血病、リンパ腫、前立腺癌、およびパーキンソンリンパ腫、頭部および頸部癌、結腸癌、直腸結腸癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、食道の癌、胃癌、膵臓癌、肝胆道癌、胆嚢の癌、小腸の癌、直腸癌、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、陰茎癌、尿道癌、精巣癌、子宮頸癌、膣癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、膵内分泌癌、カルチノイド癌、骨癌、皮膚癌、網膜芽腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(さらなる癌については、CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE(DeVita, V.T. et al. eds 1997)参照)などの癌;ならびに例えば、アルツハイマー病および多発性硬化症などの脳および神経機能不全;腎臓機能不全;関節リウマチ;心臓同種移植拒絶;動脈硬化症;喘息;糸球体腎炎;接触性皮膚炎;炎症性腸疾患;大腸炎;乾癬;再灌流傷害;ならびに本明細書において記載されたその他の障害および疾患を含むが、これらに限定されない、ヒト疾患を診断する方法を提供する。いくつかの態様において、対象はカボジ肉腫、多中心性キャッスルマン病、またはAIDS関連原発性滲出液リンパ腫を有さない。

【0083】

III. CCX-CKR2のモジュレーター

A. ケモカイン受容体のモジュレーターを同定する方法

多数の異なるスクリーニングプロトコルを利用して、細胞における、特に哺乳動物細胞における、とりわけヒト細胞における、CCX-CKR2の活性または機能のレベルを調節する薬剤を同定することができる。一般論として、例えば、CCX-CKR2に結合しおよび本発明の抗体がCCX-CKR2に結合しもしくはCCX-CKR2を活性化するのを妨げることによって、CCX-CKR2(またはその細胞外ドメイン)と相互作用する薬剤を同定するために、スクリーニング方法は複数の薬剤をスクリーニングする工程を伴う。いくつかの態様において、薬剤は、別のタンパク質に対する薬剤の親和性の少なくとも約1.5、2、3、4、5、10、20、50、100、300、500、または1000倍でCCX-CKR2に結合する。

【0084】

1. ケモカイン受容体結合アッセイ

いくつかの態様において、CCX-CKR2ポリペプチドへの結合により本発明の抗体と競合する分子をスクリーニングすることによって、CCX-CKR2モジュレーターを同定する。当業者は、競合解析を実施するための多数の方法があるということを認識していると考えられる。いくつかの態様において、CCX-CKR2を含む試料を本発明の標識抗体(例えば、少なくともSEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、および/またはSEQ ID NO: 18のCDRを含む抗体)とプレインキュベートし、その後、潜在的な競合因子分子と接触させる。試験化合物の存在下でCCX-CKR2に結合した抗体の量の変化(例えば、減少)によって、試験化

10

20

30

40

50

合物が潜在的なCCX-CKR2モジュレーターであるということが示されえる。

【0085】

そのように同定された少なくともいくつかの薬剤はケモカイン受容体モジュレーターである可能性が高いので、CCX-CKR2に結合することができる薬剤についてスクリーニングすることによって、予備的なスクリーニングを行なうことができる。結合アッセイは通例、CCX-CKR2を1つまたは複数の試験薬剤と接触させる工程、ならびにタンパク質および試験薬剤が結合複合体を形成するのに十分な時間を与える工程を伴う。多数の確立された分析技術のいずれかを用いて、形成された任意の結合複合体を検出することができる。タンパク質結合アッセイには、免疫組織化学的結合アッセイ、フローサイトメトリー、放射性リガンド結合、ユーロピウム標識リガンド結合、ビオチン標識リガンド結合、またはCCX-CKR2の立体構造を維持するその他のアッセイが含まれるが、これらに限定されない。そのようなアッセイにおいて利用されるケモカイン受容体は、天然に発現させても、クローン化しても、または合成してもよい。結合アッセイを用いて、アゴニストまたはアンタゴニストを同定してもよい。例えば、CCX-CKR2を潜在のアゴニストと接触させ、かつCCX-CKR2活性について測定することによって、CCX-CKR2活性を刺激する分子を同定することが可能である。

【0086】

2. 細胞および試薬

本発明のスクリーニング方法は、インビトロアッセイまたは細胞を基にしたアッセイとして実施することができる。インビトロアッセイは、例えば、CCX-CKR2を含む膜分画または細胞全体を用いて実施する。細胞に基づくアッセイは、CCX-CKR2が発現する任意の細胞で実施することができる。

【0087】

薬剤結合についてまたは薬剤によるCCX-CKR2の活性の調節についてスクリーニングするために、細胞に基づくアッセイはCCX-CKR2を含む細胞全体または細胞分画を伴う。本発明の方法によって使用することができる例示的な細胞型には、好中球、単球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、肥満細胞などの白血球、ならびにT細胞およびB細胞などのリンパ球、白血病、パーキットリンパ腫、腫瘍細胞、内皮細胞、周皮細胞、線維芽細胞、心臓細胞、筋肉細胞、胸部腫瘍細胞、卵巣癌腫、子宮頸癌、膠芽腫、肝臓細胞、腎臓細胞、ならびに神経細胞、ならびに酵母を含む真菌細胞が含まれる。細胞は、初代細胞もしくは腫瘍細胞、またはその他の種類の不死化細胞株であり得る。もちろん、内因性型のCCX-CKR2を発現していない細胞に、CCX-CKR2を発現させることができる。

【0088】

場合によっては、タンパク質融合体だけでなく、CCX-CKR2の断片もスクリーニング用に用いることができる。CCX-CKR2リガンドとの結合について競合する分子が望ましい場合、用いられるCCX-CKR2断片は、本発明の抗体に結合することができる断片である。あるいは、CCX-CKR2に結合する分子を同定するための標的として、CCX-CKR2の任意の断片を用いることができる。CCX-CKR2断片は、例えば、CCX-CKR2の1アミノ酸だけ除いて全部を含むタンパク質までの、少なくとも20、30、40、50アミノ酸の任意の断片を含むことができる。典型的には、リガンド結合断片は、CCX-CKR2の膜貫通領域および/またはCCX-CKR2の細胞外ドメインの大部分もしくは全部を含むと考えられる。

【0089】

3. シグナル伝達または接着アッセイ

いくつかの態様において、CCX-CKR2活性化によって誘発されるシグナル伝達を用いて、CCX-CKR2モジュレーターを同定する。ケモカイン受容体のシグナル伝達活性は、多くの方法で決定することができる。例えば、ケモカイン受容体を介する細胞接着を検出することによって、シグナル伝達を決定することができる。ケモカインとケモカイン受容体の間の相互作用は、インテグリン親和性および結合活性の改変による速やかな接着をもたらすことができる。例えば、Laudanna, Immunological Reviews 186: 37-46 (2002)を参照されたい。

【 0 0 9 0 】

また、定性的かつ定量的に、サイクリックAMPまたはイノシトールリン酸などの、2次メッセンジャーを決定することによって、シグナル伝達を測定することができ、同様にリン酸化または脱リン酸化事象をモニターすることもできる。例えば、Premack, et al. *Nature Medicine* 2 : 1174-1178 (1996)およびBokoch, *Blood* 86 : 1649-1660 (1995)を参照されたい。

【 0 0 9 1 】

さらに、CCX-CKR2活性化の下流のその他の事象をモニターして、シグナル伝達活性を決定することもできる。下流の事象には、ケモカイン受容体の刺激の結果として生じる活性または徴候が含まれる。例示的な下流の事象には、例として、(例えば、正常から癌細胞へまたは癌細胞から非癌細胞への)細胞の変化した状態が含まれる。細胞応答には、(例えば内皮細胞への)細胞の接着が含まれる。CCX-CKR2モジュレーターによってもたらされる効果について、血管形成に關与する確立されたシグナル伝達カスケード(例えば、VEGF介在性シグナル伝達)をモニターすることもできる。Leung et al. (1989) *Science* 246 : 1306-1309によって議論されたような、例えば、ニワトリ絨毛尿膜で、薬剤が血管形成を促進する能力を評価することができる。別の選択肢は、Rastinejad et al. (1989) *Cell* 56 : 345-355によって議論されたような、ラット角膜を用いたアッセイを行なうことである。その他のアッセイは、米国特許第5,840,693号に開示されている。卵巣血管形成モデルを用いることもできる(例えば、Zimmerman, R.C., et al. (2003) *J. Clin. Invest.* 112 : 659-669; Zimmerman, R.C., et al. (2001) *Microvasc. Res.* 62 : 15-25; およびHixenbaugh, E.A., et al. (1993) *Anat. Rec.* 235 : 487-500参照)。

【 0 0 9 2 】

その他のスクリーニング方法は、ある種の調節タンパク質の発現がCCX-CKR2の存在または活性化によって誘導されるという観察に基づいている。したがって、そのようなタンパク質の検出を用いて、CCX-CKR2の活性を間接的に決定することができる。一連のELISA検査を行なって、CCX-CKR2をトランスフェクトした細胞およびトランスフェクトしていない細胞について、細胞培養培地中の様々な分泌タンパク質の相対濃度を比較した。これらの検討を通じて、CCX-CKR2が、成長因子、ケモカイン、メタロプロテアーゼ、およびメタロプロテアーゼ阻害剤を含む、数多くの多様な調節タンパク質の産生を誘導するということが明らかにされた。したがって、提供されているスクリーニング方法の中には、試験薬剤が、CCX-CKR2によって、ある種の成長因子、ケモカイン、メタロプロテアーゼ、およびメタロプロテアーゼ阻害剤の産生を調節するかどうかを決定する工程を伴うものもある。ある例においては、アッセイは、CCX-CKR2誘導タンパク質の産生が増大することが見出されているので、限定的な血清条件下で成長した細胞(またはその抽出物)を用いて行なう。

【 0 0 9 3 】

以下のタンパク質は、検出された様々なクラスのタンパク質、ならびに各々のクラスの中の特定のタンパク質の例である：(1)成長因子(例えば、GM-CSF)；(2)ケモカイン(例えば、RANTES、MCP-1)；(3)サイトカイン(例えばIL-6)(4)メタロプロテアーゼ(例えば、MMP3)；および(5)メタロプロテアーゼ阻害剤(TIMP-1)。これらの様々なクラスの中のその他のタンパク質を検出することもできるということが期待される。

【 0 0 9 4 】

当技術分野において公知である標準的な免疫学的検出方法を用いて、これらの特定のタンパク質を検出することができる。ハイスループット形式での使用に好適である1つのアプローチは、例えば、マルチウェルプレートで行なうELISAである。TIMP-1を検出するためのELISAキットは、DakoCytomation(製品コード番号EL513)から入手可能である。IL-6およびMMP3用のELISAキットは、R and D Systemsから得ることができる。上で挙げたタンパク質に特異的に結合する抗体の供給元のさらなる例は、下の実施例で提供されている。酵素であるメタロプロテアーゼなどのタンパク質を公知の酵素的アッセイによって検出することもできる。

【 0 0 9 5 】

その他の態様において、細胞接着を調節するそれらの能力について、CCX-CKR2の潜在的モジュレーターを試験する。内皮細胞単層に対する腫瘍細胞接着は、転移性侵襲のモデルとして検討されている(例えば、Blood and Zetter, Biochem. Biophys. Acta, 1032, 89-119 (1990)参照)。これらの内皮細胞の単層は、リンパ管の脈管系によく似ており、かつ様々なサイトカインおよび成長因子(例えば、TNF およびIL-1)によって刺激することができる。静的な接着アッセイとインビボの脈管系の力を模倣するために細胞がフロー条件下にあるアッセイとの両方において、この単層に接着する能力について、CCX-CKR2を発現する細胞を評価することができる。さらに、接着を評価するためのアッセイをインビボで実施することもできる(例えば、von Andrian, U.H. Microcirculation. 3(3): 287-300 (1996))。

10

【0096】

4. バリデーション

前記のスクリーニング方法のいずれかによって最初に同定された薬剤をさらに試験して、明らかな活性をバリデートすることができる。好ましくは、そのような検討を好適な動物モデルを用いて行なう。そのような方法の基本的形式は、最初のスクリーニング時に同定されたリード化合物をヒトの代わりに疾患モデルになる動物に投与し、その後疾患(例えば、癌、心筋梗塞、創傷治癒、もしくはその他の血管形成に関連する疾患)が実際に調節され、および/または疾患もしくは病気が改善されるかどうかを決定する工程を伴う。バリデーション検討で利用される動物モデルは通常、任意の種類の哺乳動物である。好適な動物の具体的な例として、霊長類、マウス、ラット、およびゼブラフィッシュが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0097】

いくつかの態様では、関節炎動物モデルを用いて、CCX-CKR2を調節する薬剤についての治療的使用をスクリーニングおよび/またはバリデートする。例示的な関節炎動物モデルには、例えば、コラーゲン誘導性関節炎(CIA)動物モデルが含まれる。

【0098】

B. CCX-CKR2と相互作用する薬剤

CCX-CKR2のモジュレーター(例えば、アンタゴニストまたはアゴニスト)は、例えば、(モノクローナル、ヒト化、またはその他の種類の当技術分野において公知である結合タンパク質を含む)抗体、小有機分子、siRNA、CCX-CKR2ポリペプチドまたはその変異体、(SDF-1および/またはI-TACを含むが、これらに限定されない)ケモカイン、ケモカイン模倣物、ケモカインポリペプチドなどを含むことができる。

30

【0099】

CCX-CKR2のモジュレーターとして試験された薬剤は、任意の小さい化学的化合物(chemical compound)、またはポリペプチド、糖、核酸、もしくは脂質などの、生物学的実体であってもよい。あるいは、モジュレーターは、ケモカインまたはその他のリガンドの、遺伝子改変型、またはペプチド模倣物型であってもよい。典型的には、試験化合物は、小さい化学的分子およびペプチドである。ほとんどの場合、水性または有機(とりわけDMSOベースの)溶液に溶解することができる化合物を用いるが、本発明のアッセイにおける潜在的モジュレーターまたはリガンドとして、本質的に任意の化学的化合物を用いることができる。アッセイ工程を自動化し、かつ典型的には(例えば、ロボットによるアッセイにおいてマイクロタイタープレート上のマイクロタイター形式で)並行して実行されるアッセイに、任意の好都合な供給源由来の化合物を提供することによって、大規模な化学ライブラリーをスクリーニングするようにアッセイを設計する。Sigma(St. Louis, MO)、Aldrich(St. Louis, MO)、Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)、Fluka Chemika-Biochemica Analytika(Buchs, Switzerland)等を含む、化学的化合物の多くの供給元があるということが正しく理解され则认为られる。

40

【0100】

いくつかの態様において、薬剤は1,500ダルトン未満、および場合によっては1,000、800、600、500、または400ダルトン未満の分子量を有する。より小さい分子は、より高分子

50

量の薬剤よりも、経口吸収を含む、良い薬物動態特徴に適合する物理化学的特性を有する可能性が高いので、比較的小さいサイズの薬剤が望ましい可能性がある。例えば、透過性および溶解性に基づいて薬物として好結果である可能性がより低い薬剤が、Lipinskiらによって以下のように記載された：5つを上回る(OHおよびNHの合計として表される)H結合供与体を有する；500を超える分子量を有する；5を超えるLogP(もしくは4.15を超えるMLogP)を有する；ならびに/または10を上回る(NおよびOの合計として表される)H結合受容体を有する。例えば、Lipinski et al. *Adv Drug Delivery Res* 23 : 3-25 (1997)を参照されたい。生物学的輸送体の基質である化合物クラスは、典型的には規則の例外である。

【0101】

ある態様において、ハイスループットなスクリーニング方法は、多数の潜在的治療化合物(潜在的モジュレーターまたはリガンド化合物)を含むコンビナトリアル化学ライブラリーまたはペプチドライブラリーを提供する工程を伴う。その後、所望の特徴的活性を示すライブラリーメンバー(特に化学種またはサブクラス)を同定するために、本明細書において記載されたような、1つまたは複数のアッセイで、そのような「コンビナトリアル化学ライブラリー」または「リガンドライブラリー」をスクリーニングする。このように同定された化合物は、従来の「リード化合物」として役立つことができ、またはそれら自体、潜在もしくは実際の治療薬として用いられ得る。

【0102】

コンビナトリアル化学ライブラリーは、多数の化学「構成成分」を組み合わせることによって、化学合成または生合成のいずれかにより作製される多様性のある化学的化合物の収集物である。例えば、ポリペプチドライブラリーなどの線状のコンビナトリアル化学ライブラリーは、所与の化合物の長さ(すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数)について、一連の化学構成成分(アミノ酸)をあらゆる可能な方法で組み合わせることによって形成される。そのような化学構成成分のコンビナトリアル混合を通じて、何百万という化学的化合物を合成することができる。

【0103】

コンビナトリアル化学ライブラリーの調製およびスクリーニングは当業者に周知である。そのようなコンビナトリアル化学ライブラリーはペプチドライブラリーを含むが、これに限定されない(例えば、米国特許第5,010,175号、Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37 : 487-493 (1991)、およびHoughton et al., *Nature* 354 : 84-88 (1991)参照)。化学的多様性ライブラリーを作製するためのその他の化学的性質(chemistry)を用いることもできる。そのような化学的性質には：ペプトイド(例えば、PCT公報国際公開公報第91/19735号)、コードされたペプチド(例えば、PCT公報国際公開公報第93/20242号)、ランダムパイオオリゴマー(例えば、PCT公報国際公開公報第92/00091号)、ベンゾジアゼピン(例えば、米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびジペプチドなどのダイバーソマー(diversomer)(Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90 : 6909-6913 (1993))、ビニル様ポリペプチド(Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 : 6568 (1992))、グルコース足場材料を有する非ペプチド性ペプチド模倣物(Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 : 9217-9218 (1992))、小化合物ライブラリーの類似有機合成物(Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116 : 2661 (1994))、オリゴカルバメート(Cho et al., *Science* 261 : 1303 (1993))、ならびに/またはペプチジルホスホネート(Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59 : 658 (1994))、核酸ライブラリー(全て前記のAusubel, BergerおよびSambrook参照)、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5,539,083号参照)、抗体ライブラリー(例えば、Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14(3) : 309-314 (1996)およびPCT/US96/10287参照)、炭水化物ライブラリー(例えば、Liang et al., *Science*, 274 : 1520-1522 (1996)および米国特許第5,593,853号参照)、小有機分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum *C&EN*, 1月18日、33頁 (1993)；イソプレノイド、米国特許第5,569,588号；チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号；ピロリジン、米国特許第5,525,735号および第5,519,134号；モルフォリノ化合物、米国特許第5,506,337号；ベンゾジアゼピン、第5,288,514号等)が含まれるが、これらに限定されな

10

20

30

40

50

い。

【0104】

コンビナトリアルライブラリーの調製用の機器は市販されている(例えば、357 MPS、390 MPS、Advanced Chem Tech, Louisville KY、Symphony、Rainin、Woburn, MA、433A Applied Biosystems、Foster City, CA、9050 Plus、Millipore、Bedford, MA参照)。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリーがそれ自体市販されている(例えば、ComGenex、Princeton, N.J.、Tripos, Inc.、St. Louis, MO、3D Pharmaceuticals、Exton, PA、Martek Biosciences、Columbia, MDなどを参照)。

【0105】

IV. CCX-CKR2の癌、血管形成、およびその他の生物学的局面

10

本発明の抗体をCCX-CKR2を発現する細胞とインビトロ、インビボ、またはエクスビボ(すなわち、身体から除去し、処置し、および身体に戻す)で接触させることができる。インビボでのケモカイン受容体活性の調節のために、本発明の抗体を直接的に哺乳動物対象に投与することができる。いくつかの態様において、抗体は、CCX-CKR2への結合について、SDF-1および/またはI-TACと競合する。本発明のいくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 14、またはSEQ ID NO: 16およびSEQ ID NO: 18中のCDRによって結合されるエピトープと同じエピトープを認識する。いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO: 12および/もしくはSEQ ID NO: 14、またはSEQ ID NO: 16および/もしくはSEQ ID NO: 18を含む。

【0106】

20

いくつかの態様では、癌を有する対象にCCX-CKR2抗体を投与する。場合によっては、例えば、癌腫、神経膠腫、中皮腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、膠芽腫、白血病、リンパ腫、前立腺癌、およびパーキットリンパ腫、頭部および頸部癌、結腸癌、直腸結腸癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、食道の癌、胃癌、膵臓癌、肝胆道癌、胆嚢の癌、小腸の癌、直腸癌、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、陰茎癌、尿道癌、精巣癌、子宮頸癌、膣癌、子宮癌、卵巣癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、膵内分泌癌、カルチノイド癌、骨癌、皮膚癌、網膜芽腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(さらなる癌については、CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE(DeVita, V.T. et al. eds 1997)参照)などの癌; ならびに例えば、アルツハイマー病および多発性硬化症などの、脳および神経機能不全; 腎臓機能不全; 関節リウマチ; 心臓同種移植拒絶; アテローム性動脈硬化症; 喘息; 糸球体腎炎; 接触性皮膚炎; 炎症性腸疾患; 大腸炎; 乾癬; 再灌流傷害; ならびに本明細書において記載されたその他の障害および疾患を処置するために、CCX-CKR2モジュレーターを投与する。いくつかの態様において、対象はカボジ肉腫、多中心性キャッスルマン病、またはAIDS関連原発性滲出液リンパ腫を有さない。

30

【0107】

本発明はまた、本発明の抗体を投与することによって、それを必要とする任意の対象において血管形成を減少させることも包含する。例えば、CCX-CKR2を本発明の抗体と接触させることによってCCX-CKR2活性を減少させ、その結果血管形成を減少させることは、腫瘍、とりわけ固形腫瘍の形成、成長、および/または転移を阻害するために有用である。調節されたCCX-CKR2および血管形成に関する態様の説明は、例えば、米国特許出願第11/050,345号に記載されている。

40

【0108】

望まないまたは問題となる血管形成を伴うその他の疾患には、関節リウマチ; 乾癬; 眼球血管形成疾患、例えば、糖尿病性網膜症、未熟児の網膜症、黄斑変性症、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス; オスラー-ウェーバー症候群; 心筋血管形成; プラーク血管新生; 毛細血管拡張症; 血友病関節症; 血管線維腫が含まれ、腸管癒着症を含む、内皮細胞の過度のまたは異常な刺激の疾患、クローン病、乾癬、エクセマ(excema)、および強皮症などの皮膚疾患、糖尿病、糖尿病性網膜症、未熟児の網膜症、加齢に関連する黄斑変性症、動脈硬化症、強皮症、創傷肉芽形成および肥厚性瘢痕、すなわちケロイド、ならびに猫引っかき病および潰瘍(ヘリコバクターピロリ(Helicobact

50

er pylori))などの病理学的結果として血管形成を有する疾患もまた、本発明の抗体によって処置することができる。血管形成阻害剤を用いて、癒着、とりわけ開腹または腹腔鏡手術後に結果的に生じる癒着などの腹腔内または骨盤内癒着、および熱傷性収縮を防止または阻害することができる。血管形成阻害剤を用いて有利に処置されるべきその他の状態には、移植後の癒着の防止、肝臓の肝硬変、急性呼吸促進症候群後の肺線維症またはその他の新生児の肺線維症、仮の人工装具の埋め込み、および手術後の脳と硬膜の間の癒着が含まれる。子宮内膜症、ポリープ症、心臓肥大症、ならびに肥満も、血管形成の阻害によって処置される可能性がある。これらの障害は、子宮筋腫、前立腺肥大症、およびアミロイドーシスなどの、その他の種類の正常組織のサイズの増大または成長を伴う可能性がある。本明細書において記載された障害または疾患のいずれかに対して、本発明の抗体を予防的または治療的に用いてもよい。

10

【0109】

本発明の抗体によるCCX-CKR2活性の減少を血管新生の防止に用いて、障害のある宿主を効果的に処置することもできる。したがって、例えば、血管形成の減少を血管の障害(例えば、血管腫および動脈硬化性プラーク内の毛細血管増殖)、筋疾患(例えば、心筋血管形成、心筋梗塞、または平滑筋内の血管形成)、関節(例えば、関節炎、血友病関節症など)、ならびに血管形成と関連するその他の障害に対する処置の一部として用いることができる。血管形成の促進はまた、様々な生理的過程ならびに創傷治癒、骨折、および火傷などの血管新生の増大を必要とする疾患、炎症性疾患、虚血心、ならびに末梢血管疾患の処置を加速する手助けとなることができる。

20

【0110】

また、本発明の抗体を用いて創傷治癒を増強してもよい。本発明を特定の作用の機構に限定するつもりはないが、CCX-CKR2の拮抗作用により、内因性リガンドが低親和性の受容体に代わりに結合し、それによって創傷治癒を増強を誘発することが可能になることがあってもよい。例えば、SDF-1はCCX-CKR2およびCXCR4の両方に結合するが、より低い親和性でCXCR4に結合する。同様に、I-TACは、I-TACがCCX-CKR2に結合するよりも低い親和性でCXCR3に結合する。これらのリガンドがCCX-CKR2に結合するのを防ぐことによって、CCX-CKR2アンタゴニストは、リガンドがその他の受容体に結合し、それによって創傷治癒を増強することを可能にし得る。このように、創傷治癒を増強するためのCCX-CKR2の拮抗作用は、アゴニストでCCX-CKR2活性を刺激することにより創傷治癒を増強する以外の異なる機構によって仲介されてもよい。

30

【0111】

血管新生と関連する障害および症状を処置することの他に、血管形成の阻害を用いて血管新生と関連する正常な生理的状态の発生を調節または防止することができる。したがって、例えば本発明の方法を産児制限として用いることができる。本発明に従って、卵巣または子宮内膜内でのCCX-CKR2活性を減少させることによって、排卵、胚の着床、胎盤形成などと関連する血管新生を弱めることができる。

【0112】

血管形成の阻害剤はさらにその他の治療的用途を有する。例えば、本発明の抗体を以下のために用いてもよい；

40

(a) 脂肪組織切除および肥満の処置。例えば、Kolonin et al., Nature Medicine 10(6) : 625-632 (2004)を参照されたい；

(b) 子癇前症の処置。例えば、Levine et al., N. Engl. J. Med. 350(7) : 672-683 (2004) ; Maynard, et al., J. Clin. Invest. 111(5) : 649-658 (2003)を参照されたい；ならびに

(c) 心臓血管疾患の処置。例えば、March, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 287 : H458-H463 (2004) ; Rehman et al., Circulation 109 : 1292-1298 (2004)を参照されたい。

【0113】

V. 投与および薬学的組成物

50

本発明の薬学的組成物は、例えば、本発明の抗体および薬学的に許容される担体を含んでもよい。薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために用いられる特定の方法によって、一部決定される。したがって、本発明の薬学的組成物の多種多様の好適な製剤がある(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985参照)。

【0114】

投与に好適な製剤には、水性および非水性溶液；抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を等張にする溶質を含むことができる等張滅菌溶液；ならびに懸濁化剤、可溶化剤、濃化剤、安定剤、および保存剤を含むことができる水性および非水性の滅菌懸濁剤が含まれる。本発明の実施において、例えば、経口的に、経鼻的に、局所的に、静脈内に、腹腔内に、皮下に、または髄腔内に、組成物を投与することができる。アンプルまたはバイアルなどの、単位用量または複数用量の密封容器中に化合物の製剤を提示することができる。以前に記載された種類の滅菌した粉末、顆粒、および錠剤から、溶液および懸濁剤を調製することができる。

10

【0115】

例えば、インスリンまたは化学療法を特定の臓器または腫瘍に送達するために使用される型の、注入ポンプによって、組成物を投与することができる。切除の前もしくは後に直接的に腫瘍の中もしくは原発腫瘍の部位に；または原発腫瘍の切除後に全身に、注射器またはカテーテルを用いて本発明の組成物を注射することができる。必要な場合、本発明の組成物を局所または局部に投与することができる。長期間にわたる局部投与のために、腫瘍の部位に注射された制御放出インプラントの中に抗体を投与してもよい。あるいは、個々の細胞を、本発明の抗体を発現するようにプラスミドによってエクスピボでトランスフェクトし、その後腫瘍の部位に注射することができる。皮膚状態の局所処置のために、軟膏またはゲルで酵素抗体を投与してもよい。

20

【0116】

いくつかの態様では、例えば、化学療法剤を含む、その他の適切な治療剤、放射線照射などと組み合わせ、本発明のCCX-CKR2抗体を投与することができる。組み合わせ療法での使用に好適な薬剤の選択は、従来の薬学原理に従って、当業者によってなされてもよい。治療剤の組み合わせは、例えば、癌、創傷、腎臓機能不全、脳機能不全、または神経機能不全などのような様々な障害の処置または防止をもたらすように相乗的に作用する可能性がある。このアプローチを用いて、より低い投薬量の各薬剤で治療的有効性を達成し、それによって意に沿わない副作用の潜在的な可能性を低下させることができてもよい。

30

【0117】

本発明の文脈における、患者に投与される用量は、長期にわたって対象における有利な応答をもたらす(例えば、腫瘍サイズまたは腫瘍負荷を低下させる)のに十分であるべきである。任意の患者に対する最適用量レベルは、利用される特定のモジュレーターの有効性、患者の年齢、体重、身体的活動、および食事を含む様々な因子、その他の薬物のあり得る組み合わせ、ならびに特定の疾患の重症度に左右されると考えられる。用量サイズはまた、特定の対象における特定の化合物またはベクターの投与に付随する任意の意に沿わない副作用の存在、性質、および程度によって決定されることが考えられる。

40

【0118】

投与されるべき抗体の有効量を決定する際、医師は、抗体の循環血漿レベル、抗体毒性、および抗-抗体 抗体の産生を評価してもよい。一般に、抗体の用量当量は、典型的な対象について、約1ng/kg ~ 10mg/kgである。

【0119】

投与のために、対象の大部分および全般的な健康に適用された場合の、抗体のLD-50、および様々な濃度での抗体の副作用によって決定された割合で、本発明の抗体を投与することができる。レシピエントの免疫系による抗体のクリアランスもまた、投与されるべき好適な投薬量に影響を及ぼす可能性がある。単一投薬または分割投薬で投与を遂行することができる。

50

【0120】

本発明の抗体を含む組成物を治療的または予防的処置のために投与することができる。治療的適用において、疾患およびその合併症を治療するのに十分な量または例えば腫瘍サイズの減少など、少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で、疾患(例えば、癌、関節炎、またはその他のCCX-CKR2関連疾患もしくは障害)に苦しむ患者に、組成物を投与する。これを遂行するのに十分な量は、「治療的有效用量」として定義される。この使用に有効な量は、疾患の重症度および患者の健康の全身状態に左右されと考えられる。患者によって必要とされかつ耐えられるような投薬量および頻度に応じて、単一または複数投与の組成物を投与してもよい。任意の事象において、組成物は、効果的に患者を処置するために十分な品質の本発明の薬剤を提供するべきである。哺乳動物における癌の進行を防止しまたは遅延させることができるモジュレーターの量は、「予防的効果用量」と称される。予防的処置に必要とされる特定の用量は、哺乳動物の医学的状态および病歴、防止される特定の癌、ならびに年齢、体重、性別、投与経路、効率性などのようなその他の因子に左右されと考えられる。癌の再発を防止するために以前に癌を有していた哺乳動物において、または進行癌の著しい可能性を有することが疑われる哺乳動物において、そのような予防的処置を用いてもよい。

10

【0121】

VI. 組み合わせ療法

本発明の抗体を単独でまたは1つもしくは複数のその他の薬物と共に供給することができる。可能な組み合わせ相手は、例えば、さらなる抗血管形成因子および/または化学療法剤(例えば、細胞毒性物質)もしくは放射線照射、癌ワクチン、免疫調節薬剤、抗血管薬剤、シグナル伝達阻害剤、抗増殖薬剤、もしくはアポトーシス誘導因子を含むことができる。

20

【0122】

インテグリン関与を遮断する抗体およびペプチド、メタロプロテアーゼを阻害するタンパク質および小分子(例えば、マルミスタット(marmistat))、内皮細胞内のリン酸化カスケードを阻害する薬剤(例えば、ヘルバマイシン(herbamycin))、血管形成の公知の誘導因子に対するドミナントネガティブ受容体、血管形成の誘導因子に対する抗体もしくはそれらの活性を遮断するその他の化合物(例えば、スラミン)、またはその他の手段によって作用するその他の化合物(例えば、レチノイド、IL-4、インターフェロンなど)と共に、本発明の抗体を用いることができる。実際、そのような因子は異なる機構によって血管形成を調節し得るので、本発明の抗体をその他の抗血管形成薬剤と組み合わせて利用することは、所望の組織内の血管形成のより強力な(かつ潜在的に相乗的な)阻害を助長することができる。

30

【0123】

MMP-2(マトリックスメタロプロテアーゼ2)阻害剤、MMP-9(マトリックスメタロプロテアーゼ9)阻害剤、およびCOX-II(シクロオキシゲナーゼII)阻害剤などの、抗血管形成薬剤を、本発明の抗体および本明細書において記載された薬学的組成物と共に用いることができる。本発明の抗CCX-CKR2抗体を、EGFR抗体、EGF抗体、およびEGFR阻害剤である分子などの、EGFR(上皮成長因子受容体)応答を阻害することができる薬剤；VEGF受容体およびVEGFを阻害することができる分子などの、VEGF(血管内皮成長因子)阻害剤；ならびに、例えば、HERCEPTIN(商標)(Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., USA)などの、erbB2受容体に結合する有機分子または抗体などの、erbB2受容体阻害剤のようなシグナル伝達阻害剤と共に用いることもできる。

40

【0124】

本発明の抗CCX-CKR2抗体を、血管形成および/または創傷治癒を促進する薬物を含むその他の薬物と組み合わせることもできる。1つまたは複数の医学的外科的に有用な物質または治療剤、例えば、組成物が血管形成を必要とする所望の部位に適用された場合、血管形成応答をさらに強化し、ならびに/または治癒過程を加速および/もしくは有利に修正することができる物質または治療剤を組み入れることができるということを当業者は正し

50

く理解すると考えられる。例えば、血管形成、修復および/または組織成長をさらに促進するために、例えば、線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、マクロファージ由来成長因子などの、いくつかのホルモン、成長因子、または分裂促進タンパク質の少なくとも1つを組成物に含めることができる。さらに、例えば、硫酸ゲンタマイシンなどの抗生物質、またはエリスロマイシンなどの、抗菌薬剤を組成物に含めることができる。その他の医学的外科的に有用な薬剤は、抗炎症剤、鎮痛剤、麻酔薬、引赤薬、酵素、抗ヒスタミン剤、および色素を含むことができる。

【0125】

本発明の抗CCX-CKR2抗体を、関節炎を処置するための薬物を含むその他の薬物と組み合わせることもできる。そのような薬剤の例として、抗炎症治療剤が含まれる。例えば、プレドニソロンおよびメチルプレドニソロンなどの、グルココルチコステロイドは、頻繁に用いられる抗炎症薬物である。非ステロイド抗炎症薬物(NSAID)もまた炎症を抑制するために用いられる。NSAIDは、炎症の部位で過剰に産生されるプロスタグランジンの産生にとって重要である、シクロオキシゲナーゼ(COX)酵素、COX-1およびCOX-2を阻害する。さらに、炎症促進サイトカインである、腫瘍壊死因子 (TNF) は、関節炎を含む、多発的な炎症事象と関連し、および抗TNF 療法は臨床的に用いられているところである。

【0126】

VII. 診断的および/または予後的適用における使用のためのキット

上で示唆された診断的、研究的、および治療的適用における使用のために、キットもまた本発明によって提供される。診断的および研究的適用において、そのようなキットは以下のいずれかまたは全てを含んでもよい：アッセイ試薬、緩衝剤、および本発明の抗CCX-CKR2抗体。治療的製品には、滅菌生理食塩水または別の薬学的に許容されるエマルジョンおよび懸濁基剤が含まれてもよい。

【0127】

さらに、キットには、本発明の方法の実施のための手引き(すなわち、プロトコル)を含む取扱説明資料が含まれてもよい。取扱説明資料は典型的には、書かれたまたは印刷された資料であるが、それらはそのようなものに限定されない。そのような取扱説明書を保管し、かつそれらを最終使用者に伝えることができる任意の媒体が本発明によって企図されている。そのような媒体には、電子保管媒体(例えば、磁気ディスク、磁気テープ、磁気カートリッジ、磁気チップ)、光学媒体(例えば、CD ROM)等が含まれるが、これらに限定されない。そのような媒体には、そのような取扱説明資料を提供するインターネットサイトのアドレスが含まれてもよい。

【0128】

実施例

Gタンパク質共役受容体(GPCR)に対する抗体の産生は難しいことが一般に知られている。本発明者らは、カナダ特許出願のCA2 350 078に略述されているGenovac AG、DEの方法を用いた。CCX-CKR2(SEQ ID NO: 1)を発現するcDNAをマウスに接種することによって、CCX-CKR2に結合する抗体を作成した。簡潔に述べると、CCX-CKR2を発現ベクターにクローニングし、および遺伝子銃法によってマウスにベクターを接種した。適当な時点で、B細胞を単離し、標準的な技術によって骨髓腫細胞と融合し、および融合ハイブリドーマ細胞をインビトロ培養で選択した。CCX-CKR2を安定にトランスフェクトした細胞への結合について、クローン培養由来の上清を、フローサイトメトリーによって解析した。陽性クローンを増幅し、およびさらなるラウンドのフローサイトメトリースクリーニングに供した。

【0129】

モノクローナル抗体6E10および11G8がCCX-CKR2に結合することが明らかにされた。抗体6E10および11G8は、CCX-CKR2を内因性に産生しないトランスフェクタント細胞株上のCCX-CKR2、ならびにHeLaおよびMCF-7(ATCC, VA)などの、CCX-CKR2を内因性に発現する細胞上のCCX-CKR2を検出した。さらに、本抗体は、CCX-CKR2のマウスホモログを認識することができた。例えば、抗体6E10および11G8は、マウス乳腺腫瘍細胞株4T1およびルイス肺癌細胞(ATCC, Va)上のCCX-CKR2を検出した。抗体6E10および11G8は、CCX-CKR2をトランスフェ

クトしたHEK293細胞株上で検出されたが、アイソタイプ対照は検出されず、空ベクターをトランスフェクトしたHEK293細胞またはその他のケモカイン受容体(CXCR2)を発現するHEK293細胞には結合しなかった。

【0130】

放射性リガンド競合結合アッセイによって実証されたように、本抗体は中和抗体でもあった。抗体6E10および11G8の両方とも、マウスおよびヒトCCX-CKR2両方への結合について、SDF-1およびI-TACの両方と競合する。抗体11G8は典型的には、抗体6E10が示すよりも大きい割合のケモカイン結合の阻害を示した。

【0131】

抗体6E10および11G8は、免疫組織化学(IHC)アッセイにおいて固定したパラフィン包埋組織切片上のCCX-CKR2も認識する。様々な組織型での実験において、抗体6E10および11G8によるIHC染色は、それぞれの組織上に放射性標識SDF-1またはI-TACを取り込ませる結合アッセイによって決定された発現パターンと一致した。例えば、CCX-CKR2染色は、E13胎仔マウスの切片で見出されたが、E17胎仔または成獣マウスの切片では見出されなかった。CCX-CKR2染色は、ヒトCCX-CKR2を安定に発現する細胞のサイトスピンでも見られた。

【0132】

重鎖および軽鎖可変領域コード配列、および推定アミノ酸配列が決定された。6E10の重鎖可変領域は、(SEQ ID NO: 11によってコードされる)SEQ ID NO: 12に含まれている。6E10の軽鎖可変領域は、(SEQ ID NO: 13によってコードされる)SEQ ID NO: 14に含まれている。11G8の重鎖可変領域は、(SEQ ID NO: 15によってコードされる)SEQ ID NO: 16に含まれている。11G8の軽鎖可変領域は、(SEQ ID NO: 17によってコードされる)SEQ ID NO: 18に含まれている。

【0133】

本発明は、理解の明確性のために実例および実施例という方法によって幾分詳しく記載されているが、付随する特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなくある種の変更および修正がそれに対してなされ得るということが、本発明の教示に照らして、当業者に容易に明らかになると考えられる。

【0134】

本明細書において引用された刊行物、データベース、Genbank配列、特許、および特許出願は全て、各々が参照により組み入れられるよう具体的かつ個別的に示されるように、参照により本明細書に組み入れられる。

【0135】

配列表

SEQ ID NO: 1 CCX-CKR2コード配列

10

20

30

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACCTTCTCGGACATCAGCT
GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
GGTTGTCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAAACAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCGGCAGCATTTTCTTCTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCTGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCTTCTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCTTGTCTGCTGGCTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACA
TCTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTC
ACGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCAGTGTGCGTCAACCCTG
TCCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCAT
CTTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTC
TCAGAGACGGAGTACTCTGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

10

SEQ ID NO : 2 CCX-CKR2アミノ酸配列

20

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSULLYTLFSFIYIFVIGM
IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTPVWVSVLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFGSIFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKTVTSASNNEYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
LLARASASSDQEKHSSRKIIFSYYVVFVLCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHAL
FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAGTGLTKLIDASRVSE
TEYSALEQSTK

SEQ ID NO : 3 CCX-CKR2.2コード配列

ATGGATCTGCACCTCTTCGACTACGCCGAGCCAGGCAACTTCTCGGACATCAGCT
GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
GGTTGTCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAAACAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCAGCGGCATTTTCTTCTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCTGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCTTCTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCTTGTCTGCTGGCTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACA
TCTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTC
ACGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCAGTGTGCGTCAACCCTG
TCCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCAT
CTTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTG
TCGGAGACGGAGTACTCCGCCTTGGAGCAAAAACGCCAAGTGA

30

40

SEQ ID NO : 4 CCX-CKR2.2アミノ酸配列

MDLHLFDYAEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSULLYTLSTFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVWNIQAKTTGYDTHCYILNLAIDLWVLTIPVWVSLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFGSIFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKT VTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
LLARAISSSDQEKHSSRKIIFS YVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHAL
FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYS AKTGLTKLIDASRVSE
TEYSALEQNAK

SEQ ID NO : 5 CCX-CKR2.3コード配列

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACCTTCTCGGACATCAGCT
GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
TGCCCAACAAAAGCGTCTCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTTCATCTTC
GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
GGTTGTCCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
TCGGCAGCATTTTCTTCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCTGTCTGC
ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCTCTTACCCCGAG
CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
TTGCCGTTCCCTTCTCCATTGTCGCTGTCTTCTACTTCTGCTGGCCAGAGCCATC
TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
GTGGTGGTCTTCTTGTCTGCTGGTTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACAT
CTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTCA
CGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTCGCTGGTGCCTGCTGCGTCAACCCTGT
CCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCATC
TTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTCT
CAGAGACGGAGTACTCTGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

10

20

SEQ ID NO : 6 CCX-CKR2.3アミノ酸配列

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSULLYTLSTFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVWNIQAKTTGYDTHCYILNLAIDLWVLTIPVWVSLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFGSIFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKT VTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIVAVFY
FLLARAISSSDQEKHSSRKIIFS YVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHA
LFTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYS AKTGLTKLIDASRVSE
ETEYSALEQSTK

30

SEQ ID NO : 7 CCX-CKR2.4コード配列

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACCTTCTCGGACATCAGCT
 GGCCATGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
 TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
 GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
 CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
 GGTTGTCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
 CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
 TCGGCAGCATTTTCTTCTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
 TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGC
 ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
 GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTACCCCGAG
 CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
 TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATC
 TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
 GTGGTGGTCTTCTTGTCTGCTGGCTGCCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACA
 TCTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTC
 ACGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTGCTGGTGCCTGCTGCGTCAACCCTG
 TCCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCAT
 CTTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTC
 TCAGAGACGGAGTACTCTGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

10

SEQ ID NO : 8 CCX-CKR2.4アミノ酸配列

20

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSULLYTLFSFIYIFIVIGM
 IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTPVWVSVLVQHNQWPMGEL
 TCKVTHLIFSINLFGSIFLTCMSVDRLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
 VSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
 LLARASASSDQEKHSSRKIIFSYYVVFVLCWLPYHVAVLDDIFSILHYIPFTCRLEHAL
 FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAGTGLTKLIDASRVSE
 TEYSALEQSTK

SEQ ID NO : 9 CCX-CKR2.5コード配列

ATGGATCTGCATCTCTTCGACTACTCAGAGCCAGGGAACCTTCTCGGACATCAGCT
 GGCCGTGCAACAGCAGCGACTGCATCGTGGTGGACACGGTGATGTGTCCCAACA
 TGCCCAACAAAAGCGTCCTGCTCTACACGCTCTCCTTCATTTACATTTTCATCTTC
 GTCATCGGCATGATTGCCAACTCCGTGGTGGTCTGGGTGAATATCCAGGCCAAGA
 CCACAGGCTATGACACGCACTGCTACATCTTGAACCTGGCCATTGCCGACCTGTG
 GGTTGTCTCACCATCCCAGTCTGGGTGGTCAGTCTCGTGCAGCACAACCAGTGG
 CCCATGGGCGAGCTCACGTGCAAAGTCACACACCTCATCTTCTCCATCAACCTCT
 TCAGCAGCATTTTCTTCTCCTCACGTGCATGAGCGTGGACCGCTACCTCTCCATCACC
 TACTTCACCAACACCCCCAGCAGCAGGAAGAAGATGGTACGCCGTGTCGTCTGC
 ATCCTGGTGTGGCTGCTGGCCTTCTGCGTGTCTCTGCCTGACACCTACTACCTGAA
 GACCGTCACGTCTGCGTCCAACAATGAGACCTACTGCCGGTCCTTCTACCCCGAG
 CACAGCATCAAGGAGTGGCTGATCGGCATGGAGCTGGTCTCCGTTGTCTTGGGCT
 TTGCCGTTCCCTTCTCCATTATCGCTGTCTTCTACTTCCTGCTGGCCAGAGCCATC
 TCGGCGTCCAGTGACCAGGAGAAGCACAGCAGCCGGAAGATCATCTTCTCCTAC
 GTGGTGGTCTTCTTGTCTGCTGGTGGCCTACCACGTGGCGGTGCTGCTGGACAT
 CTTCTCCATCCTGCACTACATCCCTTTCACCTGCCGGCTGGAGCACGCCCTCTTCA
 CGGCCCTGCATGTCACACAGTGCCTGTGCTGGTGCCTGCTGCGTCAACCCTGT
 CCTCTACAGCTTCATCAATCGCAACTACAGGTACGAGCTGATGAAGGCCTTCATC
 TTCAAGTACTCGGCCAAAACAGGGCTCACCAAGCTCATCGATGCCTCCAGAGTCT
 CAGAGACGGAGTACTCCGCCTTGGAGCAGAGCACCAAATGA

30

40

SEQ ID NO : 10 CCX-CKR2.5アミノ酸配列

MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVELLYTLSFIYIFIFVIGM
IANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTPVWVVSLLVQHNQWPMGEL
TCKVTHLIFSINLFSSIFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWLLAFC
VSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAVFYF
LLARASASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEHAL
FTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYS AKTGLTKLIDASRVSE
TEYSALEQSTK

SEQ ID NO : 11 抗体6E10の重鎖可変領域のDNA配列

ATGTA CTTGGGACTGAGCTGTGTATT CATTGTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGTG
TGAGGTGAAGCTGGATGAGACTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGAGGCCCAT
GAAACTCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACTACTGGATGAACTGG
GTCCGCCAGTCTCCAGAAAAAGGACTGGAGTGGGTAGGACAAATTAGAAACAAA
CCTTATAATTATGAAACATATTATTCAGATTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCT
CAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAACTG
AAGACACGGGTATCTACTACTGTACATCCTTACGTTACTGGGGCCAAGGAACTCT
GGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCCGTGTATCCTGTGGCCCCCT
GGAAGCTTGGG

10

SEQ ID NO : 12 抗体6E10の重鎖可変領域のアミノ酸配列

MYLGLSCVFIVFLKGVQCEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNW
VRQSPEKGLEWVGQIRNKPYN YETYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN NLRTEDT
GIYYCTSLRYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVYPVAPGSL

20

SEQ ID NO : 13 抗体6E10の軽鎖可変領域のDNA配列

ATGGTCCTCATGTCCTTGCTGTTCTGGGTATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGAT
GACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTC ACTATGAG
CTGCAAGTCCAGTCACAGTCTGTAAACAGTGAATTCAAAGA ACTTCTTGACC
TGGTATCAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAAGTATTGATCTACTGGGCATTCA
CTAGGGAATCTGGGGTCCCTGAACGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTT
CACTCTCACCATCAGTAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAG
AGTGATTATACTTATCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAAC
GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTAAGCTTGGGG

30

SEQ ID NO : 14 抗体6E10の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

MVLMSLLFWVSGTCGDIVMTQSPSLTVTAGEKVTMSCKSSHLLNSGIQKNFLTW
YQQKPGQPPKVLIIYWAFTRESGVPERFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQSDY
TYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSKLG

SEQ ID NO : 15 抗体11G8の重鎖可変領域のDNA配列

ATGGAGTTGGGGTTAAACTGGGTTTTCTTGTCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTG
TGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCT
GAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTTTTGGG
TTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTACTAATGGGG
GTGATAGAAGTTATTATTCAGACACTGTAACGGGCCGATTATCATCTCCAGAGA
CAATGCCAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAGCCGTCTGAAGTCTGAGGACAC
AGCCATGTATTACTGTGCAAGACAAGGGAAGTGGGCCGCTGGTTTGTATTATTGG
GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTTTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCCGTTT
ATCCCTTGGCCCCCTGGAAGCTTGG

40

SEQ ID NO : 16 抗体11G8の重鎖可変領域のアミノ酸配列

MELGLNWVFLVLVLKGVQCEVKLVESGGDLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMFW
VRQTPEKRLEWVAYITNGGDRSYSDTVTGRFIISRDN AKNTLYLQMSRLKSED TAM
YYCARQGNWAAWFVYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSL

SEQ ID NO : 17 抗体11G8の軽鎖可変領域のDNA配列

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCACCAG
 TGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
 GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCACTATATTGTACATAGTGACGGAAACACCT
 ATTTAGAGTGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAA
 AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGG
 ACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTAT
 TACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
 AGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTAA
 GCTTGGG

SEQ ID NO : 18 抗体11G8の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

10

MKLPVRLLVLMFWIPASTSDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSHYIVHSDGNTYLE
 WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGS
 HVPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSKLG

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】本発明の抗体(SEQ ID NO : 19 ~ 22)のいくつかの相補性決定領域(CDR)のいくつかの態様を示す。

【図1】

SEQ ID NO : 12について
 <---FR1---> <---CDR1---> <---FR2---> <---CDR2---> <---FR3--->
 1 EVKLDGTGGIVQGRIMKLSVAGSTFS DYANN WYQSPKGLIEWG QIENKFNZYISDSVKG RFTISRDSKNS VILQWNLRTDITGIYCT- 99

SEQ ID NO : 14について
 <---FR1---> <---CDR1---> <---FR2---> <---CDR2---> <---FR3--->
 1 DIWVQSPGSLTTPAGEKVTWBC KSSHSLASSGIQKMFIT WYQKFGQPKVILY WATFES GVPRTFGSGGCTFTLTSSVQNELLAYVC QSDYTP 101

SEQ ID NO : 16について
 <---FR1---> <---CDR1---> <---FR2---> <---CDR2---> <---FR3--->
 1 EVKLVSGLVQSGSLKLSGNSQTFES DYWF WYQTPKRLIENVA IYTWGDSRSTYSSTVIG RFTISRDMKNTLYLQNSRLKSDIDMTYICAR 96

SEQ ID NO : 18について
 <---FR1---> <---CDR1---> <---FR2---> <---CDR2---> <---FR3--->
 1 DWIMTQPLSLPVSLGDQASISCRSSHYIVHSDGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYC FQGHVP 100

【配列表】

0004963701000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/53 (2006.01)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 D
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 33/50 Z
 C 0 7 K 19/00

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ハワード モーリーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アルトス ビスカイノ ロード 1 2 7 0 0

(72)発明者 シャラ トーマス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト ホーマー アヴェニュー 5 6 3

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第 0 4 / 0 9 9 7 8 1 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

PubMed