

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-526076

(P2010-526076A)

(43) 公表日 平成22年7月29日(2010.7.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-506507 (P2010-506507)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成20年4月25日 (2008.4.25)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月26日 (2009.11.26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/061513		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87) 国際公開番号	W02008/137338		ウェイ 1
(87) 国際公開日	平成20年11月13日 (2008.11.13)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/915,340		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成19年5月1日 (2007.5.1)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C R I g アンタゴニスト

(57) 【要約】

本発明は、最近発見されたマクロファージ特異的受容体 C R I g に特異的に結合する遮断抗体、並びにウイルス、細菌、寄生生物などの細胞内病原体の細胞侵入の阻止及び赤血球及び血小板の望ましくないクリアランスの防止のためのその使用に関する。一態様において、本発明は、天然配列 C R I g ポリペプチドの C 3 b 及び / 又は i C 3 b との結合を遮断し、並びに細胞内病原体の C R I g 媒介補体依存性細胞侵入を阻害し、又は血液循環から細胞内病原体を除去する C R I g アンタゴニストに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

天然配列 C R I g ポリペプチドの C 3 b 及び / 又は i C 3 b との結合を遮断し、並びに細胞内病原体の C R I g 媒介補体依存性細胞侵入を阻害し、又は血液循環から細胞内病原体を除去する C R I g アンタゴニスト。

【請求項 2】

抗 C R I g 抗体又はその断片である請求項 1 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 3】

モノクローナル抗体又はその断片である請求項 2 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 4】

該抗体断片が F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、(S c F v)₂、d A b、相補性決定領域 (C D R) 断片、直鎖状抗体、単鎖抗体分子、ミニボディ、ダイアボディ、および抗体断片から形成した多特異性抗体からなる群から選ばれる請求項 3 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 5】

1 4 G 8 (A T C C 寄託番号 P T A - 8 2 9 8)、3 D 1 0 (A T C C 寄託番号 P T A - 8 2 9 9) 及び 2 H 1 (A T C C 寄託番号 P T A - 8 3 0 0) 又はこれらの断片からなる群から選ばれる抗 C R I g 抗体と同じエピトープに基本的に結合するモノクローナル抗体である請求項 3 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 6】

1 4 G 8 (A T C C 寄託番号 P T A - 8 2 9 8)、3 D 1 0 (A T C C 寄託番号 P T A - 8 2 9 9) 及び 2 H 1 (A T C C 寄託番号 P T A - 8 3 0 0) 又はこれらの断片からなる群から選ばれるモノクローナル抗 C R I g 抗体である請求項 3 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 7】

前記抗体がキメラ型、ヒト化型もしくはヒト型又はこれらの断片である請求項 3 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 8】

前記抗体がヒト化型抗体又はその断片である請求項 7 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 9】

前記細胞内病原体がウイルス、寄生生物、細菌、真菌及びプリオンからなる群から選ばれる請求項 1 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 10】

前記病原体が R N A 又は D N A ウイルスである請求項 9 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 11】

前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルス (H I V)、A、B 及び C 型肝炎ウイルス、単純疱疹ウイルス (H S V)、サイトメガロウイルス (C M V)、エプスタイン バーウイルス (E B V) ならびにヒト乳頭腫ウイルス (H P V) からなる群から選ばれる請求項 10 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 12】

前記病原体が寄生生物である請求項 9 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 13】

前記病原体が細菌である請求項 9 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 14】

前記病原体が真菌である請求項 9 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 15】

前記病原体がプリオンである請求項 9 に記載の C R I g アンタゴニスト。

【請求項 16】

請求項 3 に記載の抗体をコードする核酸又はその断片。

【請求項 17】

担体と混合された請求項 1 又は請求項 3 に記載の C R I g アンタゴニストを含む組成物。

【請求項 18】

医薬組成物である請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

細胞内病原体の C R I g 媒介補体依存性細胞侵入を阻害する方法であって、有効量の C R I g アンタゴニストを必要とする哺乳動物の対象に投与することを含む方法。

【請求項 20】

前記哺乳動物の対象がヒトである請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 C R I g アンタゴニストが抗 C R I g 抗体又はその断片である請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

哺乳動物の対象の血液循環から細胞内病原体を除去する方法であって、有効量の C R I g アンタゴニストを前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 23】

前記哺乳動物の対象がヒトである請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 C R I g アンタゴニストが抗 C R I g 抗体又はその断片である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

感染症の予防又は治療のための方法であって、有効量の C R I g アンタゴニストを必要とする哺乳動物の対象に投与することを含む方法。

【請求項 26】

前記 C R I g アンタゴニストが抗 C R I g 抗体又はその断片である請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

C R I g アンタゴニストと前記 C R I g アンタゴニストを投与して感染症を治療するための使用説明書とを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、最近発見されたマクロファージ特異的受容体 C R I g に特異的に結合する遮断抗体、並びにウイルス、細菌、寄生生物などの細胞内病原体の細胞侵入の阻止及び赤血球及び血小板の望ましくないクリアランスの防止のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

補体系

補体系は、通常は不活性な酵素前駆体として存在する一連の血清糖蛋白質から構成される複雑な酵素カスケードである。2つの主要経路、古典的経路と代替経路が C 3 のレベルで融合している補体を活性化することができ、そこでは2種の類似の C 3 コンバーターが C 3 を C 3 a と C 3 b とに開裂させる。

【0003】

マクロファージは、細胞表面に発現された識別タグ、いわゆる分子パターンの構造の微妙な相違を認識する生得の能力を発達させた専門細胞である (Taylor ほか、Eur . J . Immunol . 33 : p . 2090 - 2097 (2003年) ; Taylor ほか、Annu . Rev . Immunol . 23 : p . 901 - 944 (2005年))

10

20

30

40

50

)。こうした表面構造の直接的な認識は先天性免疫の基本的な側面であるが、オプソニン作用によって一般的なマクロファージ受容体が貪食を媒介することが可能となり、その結果その効率が増し、この食細胞の認識レパートリーが多様化する (Stuart 及び Ezekowitz、Immunity 22 : p . 539 - 550 (2005年))。貪食の過程は複数のリガンド - 受容体相互作用を必要とし、現在、種々のオプソニン (免疫グロブリン、コレクチン及び補体成分を含む) がマクロファージ細胞表面の受容体との相互作用を介した病原体のインターナリゼーションに必要な細胞活性を誘導することが明らかになっている (Aderem 及び Underhill、Annu . Rev . Immunol . 17 : p . 593 - 623 (1999年) ; Underhill 及び Ozinsky、Annu . Rev . Immunol . 20 : 825 - 852 (2002年) に概説されている)。生殖細胞遺伝子によってコードされている天然の免疫グロブリンは多種多様な病原体を認識することができるが、オプソニン化 IgG の大部分は適応免疫によって生じ、従って、Fc 受容体を介した効率的なクリアランスは迅速ではない (Carroll、Nat . Immunol . 5 : p . 981 - 986 (2004年))。一方、補体は病原体表面の分子を迅速に認識して補体受容体による取り込みのための粒子を用意する (Brown、Infect . Agents Dis . 1 : p . 63 - 70 (1991年))。

【0004】

補体は、多種多様な病原体を補体受容体による認識のためにオプソニン化する30種を超える血清蛋白質からなる。上記カスケードの最初の引き金によって、3つの経路を区別することができる (Walport、N . Engl . J . Med . 344 : p . 1058 - 1066 (2001年) に概説されている)。これらの3経路は全て中心性成分C3を活性化する共通の段階を備えているが、認識の内容及びC3活性化をもたらす最初の生化学的段階によってこれらは異なる。古典的経路は病原体表面に結合した抗体によって活性化され、こうした抗体はC1q補体成分と結合し、その結果、最終的にC3をその活性型C3bに開裂するセリンプロテアーゼカスケードが作動する。レクチン経路は、レクチン蛋白質により炭水化物モチーフが認識された後に活性化される。現在に至るまで、この経路の3構成物質、即ち、マンノース結合レクチン (MBL : mannose - binding lectins)、SIGN - R1ファミリーのレクチン及びフィコリンが同定されている (Pyzほか、Ann . Med . 38 : p . 242 - 251 (2006年))。MBL及びフィコリンはセリンプロテアーゼと関係があり、このプロテアーゼが古典的経路でC1のように働き、中心的C3段階に導くC2成分及びC4成分が活性化される。代替経路は、内部C3エステルと病原体表面の認識モチーフとの直接反応によって活性化される点で、古典的経路及びレクチン経路と異なる。活性化表面への最初のC3結合によって、代替経路プロテアーゼB因子及びD因子の作用によるC3b沈着の速やかな拡大がもたらされる。重要なことは、古典的経路又はレクチン経路により沈着したC3bがB因子及びD因子の作用によるC3b沈着の拡大をもたらすこともできることである。補体活性化の3経路全てにおいて、オプソニン化の極めて重要な段階はC3成分のC3b成分への変換である。これらの補体カスケードの酵素によってC3が開裂されると、そのチオエステルが求核攻撃に曝され、その結果、C3bがそのチオエステルドメインを介して抗原表面に共有結合することが可能となる。これは補体オプソニン化の最初の段階である。その後、この結合C3bが蛋白分解されて、異なる受容体によって認識されるiC3b、C3c及びC3dg断片が生じる (Ross 及び Medof、Adv . Immunol . 37 : p . 217 - 267 (1985年))。この開裂によって、C3b沈着をさらに拡大し、膜に直接損傷を与えることができる細胞膜傷害複合体を初めとする補体カスケードの後期成分 (late components) を活性化するC3bの能力が消失する。しかしながら、マクロファージ貪食受容体はC3b及びその断片を選択的に認識し、従って、エステル結合の多用性のためもあり、C3媒介オプソニン化は病原体認識の要となり (Holler ほか、Immunol Today 13 : p . 231 - 236 (1992年))、このため、各種C3分解産物の受容体は宿主免疫反応において重要な役割を

10

20

30

40

50

果たす。

【0005】

C3自体は、13個の異なるドメインからなる複雑で柔軟な蛋白質である。この分子のコアは8個のいわゆるマクログロブリン(MG: *macroglobulin*)ドメインから構成され、これらのドメインはC3の密に詰め込まれた 及び 鎖を構成している。この構造に挿入されているのはCUB(C1r/C1s、Uegf及び骨形成蛋白質-1)及びTEDドメインであり、後者は病原体表面とC3bとを共有結合させるチオエーテル結合を含んでいる。残余のドメインはC3aを含有し、又はコアドメインのリンカー及びスペーサの役目をする。C3b及びC3c構造をC3と比較すると、この分子は各蛋白質分解を伴う大幅な立体配座転位を受け、この分解によってTEDのみならず、細胞受

10

【0006】

貪食細胞の補体C3受容体

補体受容体には3つの遺伝子スーパーファミリー、即ち、CR1及びCR2をコードする短コンセンサスリピート(SCR: *short consensus repeat*)モジュール、ベータ-2インテグリンファミリーメンバーCR3及びCR4並びに免疫グロブリンIg-スーパーファミリーメンバーCRIgの存在が知られている。

【0007】

CR1は30の短コンセンサスリピート(SCR)からなる180乃至210kDaの糖蛋白質であり、免疫複合体のクリアランスにおいて主要な役割を果たしている。SCRは構造の剛性をもたらす2対のジスルフィド結合をそれぞれ含む約60個のアミノ酸のモジュール構造である。3つのSCRでそれぞれ構成される2つの異なる部位を介してC3b及びC4bの両者への高親和性結合が生じる(Krych-Goldberg及びAtkinson、*Immunol. Rev.* 180: p. 112-122(2001年))。CR1のSCR15乃至17(部位2)内に含まれるC3b結合部位の構造はMRIによって決定されており(Smithほか、*Cell* 108: p. 769-780(2002年))、その結果、これらの3つのモジュールは接合部16乃至17に屈曲性を有する頭-尾配置で伸びていることが明らかになっている。構造誘導変異誘発によって、C4b結合に重要なモジュール15の正荷電表面領域が特定された。この部位(patch)は、CR1の同じ面に露出されたモジュール16の塩基性側鎖と共に、C3b結合に必要である。最初免疫粘着受容体(*immune adherence receptor*)と呼ばれた(Rothmanほか、*J. Immunol.* 115: p. 1312-1315(1975年))CR1の主要な機能は、輸送及び肝臓によるクリアランスのための赤血球の表面のICを捕捉することにある(Taylor、*Clin. Immunol. Immunopathol.* 82: p. 49-59(1997年))。好中球のCR1には貪食における役割があるが、組織マクロファージにはない(Sengelovほか、*J. Immunol.* 153: p. 804-810(1994年))。免疫複合体のクリアランスにおける役割の他に、CR1は古典的及び代替経路活性化に対する、それぞれのコンパターゼとの相互作用を介する阻害因子である(Krych-Goldberg及びAtkinson、2001年、上記文献; Krych-Goldbergほか、*J. Biol. Chem.* 274: p. 31160-31168(1999年))。マウスでは、CR1及びCR2は選択的スプライシングにより形成された同じ遺伝子の2つの産物であり、主としてBリンパ球及び小胞樹状突起細胞と関係があり、主にB細胞反応の調節において機能している(Molinaほか、1996年)。マウスにおけるCR1の機能的等価体であるCrryは古典的及び代替経路の酵素を不活性化し、貪食受容体としてではなく、補体活性化の内因性調節因子として働く(Molinaほか、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: p. 3357-3361(1992年))。

20

30

40

【0008】

50

CR2 (CD21) は iC3b 及び C3dg を結合し、B 細胞免疫を増強する主要補体受容体である (Carroll, Nat. Immunol. 5: p. 981 - 986 (2004 年); Weis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: p. 881 - 885 (1984 年))。同族 B 細胞によって C3d 被覆抗原が取り込まれると、B 細胞抗原受容体を介したシグナルが増強される。従って、B 細胞抗原受容体と CD21 - CD19 - CD81 補助受容体とのコエンゲージメントは B 細胞活性化の閾値を低下させ、重要な生存シグナルをもたらす (Matsumoto ほか、J. Exp. Med. 173: p. 55 - 64 (1991 年))。iC3b の CR2 結合部位は TED ドメインと MG1 ドメインとの間の界面で部分的にマッピングされている (Clemenza 及び Isenman, J. Immunol. 165: p. 3839 - 3848 (2000 年))。

10

【0009】

CR3 及び CR4 はアルファサブユニット (それぞれ、CD11b もしくは α_M 及び CD11c もしくは α_X) 並びに共通ベータ鎖 (CD18 もしくは β_2) から構成される膜貫通ヘテロ二量体であり、細胞外マトリックス及び他の細胞への接着並びに iC3b の認識に参与している。これらはインテグリンファミリーに属し、貪食ばかりでなく、白血球の輸送及び遊走、シナプス形成並びに共刺激においても機能している (Ross, Adv. Immunol. 37: p. 217 - 267 (2000 年) に概説されている)。インテグリンの接着性は、細胞の中からのシグナル伝達 (inside-out signaling) と呼ばれる過程によって調節されており、その結果、これらのインテグリンは低親和性結合状態から高親和性結合状態に変わる (Liddington 及び Ginsberg, J. Cell. Biol. 158: p. 833 - 839 (2002 年))。さらに、リガンドが結合すると、シグナルが細胞外ドメインから細胞質へ伝達される。iC3b の結合部位は CR3 及び CR4 のアルファ鎖のいくつかのドメインにマッピングされている (Diamond ほか、J. Cell. Biol. 120: p. 1031 - 1043 (1993 年); Li 及び Zhang, J. Biol. Chem. 278: p. 34395 - 34402 (2003 年); Xiong 及び Zhang, J. Biol. Chem. 278: p. 34395 - 34402 (2001 年))。CR3 の複数のリガンド、即ち、iC3b、ベータ-グルカン及び ICAM-1 は CD11b の ID ドメイン内に含まれる部分的に重複する部位に結合するように思われる (Balsam ほか、1998 年; Diamond ほか、1990 年; Zhang 及び Plow, 1996 年)。C3b が蛋白質分解により不活性化された形態である iC3b に対するその特異的な認識は、補体調節プロテアーゼのファクター I による β_2 鎖開裂の際に生じる C3b 中の CUB ドメインの変性の際、露出されるようになる残基に CR3 結合部位を位置付けた構造研究から予測される (Nishida ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: p. 19737 - 19742 (2006 年))。

20

30

【0010】

CRIG は、A33 抗原及び JAM1 と相同性を有する新規なマクロファージ関連受容体である。ヒト CRIG 蛋白質は、ヒト JAM1 の保存 Ig ドメインを認識する縮重プライマーを用いてヒト胎児 cDNA ライブラリから初めてクローニングされた。数種のクローンの配列決定により、400 アミノ酸のオープンリーディングフレームが明らかになった。Blast 検索によって、1 型膜貫通蛋白質 Z39 Ig との類似性が裏付けられた (Langnaese ほか、Biochim. Biophys. Acta 1492 (2000 年) p. 522 - 525)。この分子の細胞外領域は、N 末端 V セットドメイン及び C 末端 C2 セットドメインを含む 2 つの Ig 様ドメインからなることが分かった。この新規なヒト蛋白質は、最初は「単一膜貫通型 Ig スーパーファミリーメンバーのマクロファージ関連」(huSTIgMA: single transmembrane Ig superfamily member macrophage associated) と命名された。(huSTIgMA)。その後、3' 及び 5' プライマーを用いて、膜貫通部位に隣接した IgC ドメインを欠損し、50 アミノ酸短い huSTIgMA のスブラ

40

50

イス変異体がクローニングされた。従って、このヒト蛋白質の短いスプライス変異体は *huSTIgMAshort* と命名された。*huSTIgMA* (*PRO362* と称する) のアミノ酸配列及びこれをコードするポリヌクレオチド配列は 2002 年 6 月 25 日発行の特許文献 1 に開示されている。さらに、*huSTIgMA* 及び *huSTIgMAshort* が、マウスの *STIgMA* (*muSTIgMA*) 蛋白質及び核酸配列と共に、2004 年 4 月 15 日公開の特許文献 2 に開示されている。

【0011】

肝洞様毛細血管の管腔内に存在するクップファー細胞 (KC) は体内で最大のマクロファージ集団を形成する。KC は他の組織に存在するマクロファージと共通のマーカを有するが、これは、消化管の微小血管系から流出する門脈血に存在する腸管由来の細菌、微生物残骸、細菌内毒素、免疫複合体及び死細胞の効率的クリアランスを対象とする特殊化した機能を行っている (Bilzer ほか、*Liver Int.* 26: p. 1175 - 1186 (2006 年))。KC 表面に病原体を効率的に結合することは、病原体に対する一次免疫防御において重要な段階である (Benacerraf、*J. Exp. Med.* 110: p. 27 - 48 (1959 年))。血中からの病原体の迅速なクリアランスに KC が中心的な役割を果たすことは、KC を枯渇させたマウスにおいて死亡率が有意に増加することが物語っている (Hirakata、*Infect. Immun.* 59: p. 289 - 294 (1991 年))。さらに、*CRlg* が同定されたことによって、血中病原体に対する一次免疫防御における補体及び KC の役割の重要性が強調されている。

【0012】

マウスの KC で同定された補体 C3 受容体は *CRlg* 及び *CR3* のみである (Helmy ほか、*Cell* 124: p. 915 - 927 (2006 年)) が、ヒトの KC はさらに *CR1* 及び *CR4* の発現を示す (Hinglais ほか、1989 年)。KC の *CRlg* 及び *CR3* はいずれも、インビトロにおいて *iC3b* によりオプソニン化された粒子への結合に寄与する (Helmy ほか、*Lab. Invest.* 61: p. 509 - 514 (2006 年))。インビボでは、*iC3b* 被覆病原体への結合における KC 発現 *CR3* の役割はあまりよく分かっていない。*CR3* は、好中球の動員及び好中球発現の *ICAM1* との相互作用を介して間接的に病原体のクリアランスに寄与すると提唱されている (Conlan 及び North、*Exp. Med.* 179: p. 259 - 268 (1994 年)) ; Ebe ほか、*Pathol. Int.* 49: p. 519 - 532 (1999 年) ; Gregory ほか、*J. Immunol.* 157: p. 2514 - 2520 (1996 年) ; Gregory 及び Wing、*J. Leukoc. Biol.* 72: p. 239 - 248 (2002 年) ; Rogers 及び Unanue、*Infect. Immun.* 61: p. 5090 - 5096 (1993 年))。これに対して、*CRlg* は、肝洞様毛細血管の管腔を通過する病原体を捕捉することにより直接的な役割を果たしている (Helmy ほか、2006 年、上記文献)。 *CR3* に対する *CRlg* の生物学における差違はこれらの 2 種の受容体の結合特性の差違によってある程度反映されている。KC 表面に発現される *CRlg* は単量体の C3 断片に構成的に結合するのに対して、*CR3* は *iC3b* によりオプソニン化された粒子に結合するのに過ぎない (Helmy ほか、2006、上記文献)。単量体 C3b 及び *iC3b* 並びに C3b / *iC3b* 被覆粒子を効率的に捕捉する *CRlg* の能力は、マクロファージの伸長膜の先端に集中した *CRlg* 分子 (Helmy ほか、2006、上記文献) と病原体表面に存在する C3b 及び *iC3b* の多量体との多価相互作用により生じる結合活性の増加を反映している。 *CR3* は *iC3b* 被覆粒子を結合するのに過ぎないが、*CRlg* は、血清によりオプソニン化された病原体の表面に形成される最初の C3 開裂産物である C3b にさらに結合する (Croize ほか、*Infect. Immun.* 61: p. 5134 - 5139 (1993 年))。病原体表面に結合した多数の C3b 分子は H 及び I 因子による開裂から保護される (Gordon ほか、*J. Infect. Dis.* 157: p. 697 - 704 (1988 年)) ので、*CRlg* により C3b リガンドが認識されると、迅速な結合及びクリアランスが確実なものとなる。従って、KC の表面には *CRlg* 及び *CR3* のいずれもが発現される

10

20

30

40

50

が、これらは異なるリガンド特異性、異なる結合特性及び異なる病原体クリアランス速度を示す。

【0013】

細胞に侵入するために細胞表面受容体を利用する病原体の例には、ヒト免疫不全ウイルス(HIV: human immunodeficiency virus)のようなウイルス、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium leprae、Yersinia pseudotuberculosis、Salmonella typhimurium及びListeria Monocytogenesのような細胞内細菌並びにprostigmatoid Leishmania majorのような寄生生物がある(Cossart及びSansonettti、Science 304: p. 242 - 248 (2004年); Galan、Cell 103: p. 363 - 366 (2000年); Hornefほか、Nat. Immunol. 3: p. 1033 - 1040 (2002年); Stoiberほか、Mol. Immunol. 42: p. 153 - 160 (2005年))。補体系は病原体を殺し、貪食を促進するようになっているが、これは、まだ知られていない補体受容体による病原体の細胞侵入をも媒介している。CRIgは、細胞内病原体の補体依存性細胞侵入を媒介する受容体類の1つとなっていると考えられる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

20

【特許文献1】米国特許第6,410,708号明細書

【特許文献2】国際公開第2004/031105号パンフレット

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

(発明の要旨)

本発明は、C3オプソニン化病原体の細胞表面への結合を遮断する抗CRIg抗体並びにそのような病原体の細胞侵入を防止し、及び/又は生存を阻止するためのその使用に関する。

30

【0016】

一態様において、本発明は、天然配列CRIgポリペプチドのC3b及び/又はiC3bとの結合を遮断し、並びに細胞内病原体のCRIg媒介補体依存性細胞侵入を阻害し、又は血液循環から細胞内病原体を除去するCRIgアンタゴニストに関する。

【0017】

一実施態様において、このアンタゴニストは抗CRIg抗体又はその断片であり、この場合、この抗体断片は、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、相補性決定領域(CDR)断片、直鎖状抗体、単鎖抗体分子、ミニボディ、ダイアボディ及び抗体断片から形成した多特異性抗体からなる群から選ぶことができる。

40

【0018】

別の実施態様において、上記CRIgアンタゴニストは、14G8(ATCC寄託番号PTA-8298)、3D10(ATCC寄託番号PTA-8299)及び2H1(ATCC寄託番号PTA-8300)又はこれらの断片からなる群から選ばれる抗CRIg抗体と同じエピトープに基本的に結合するモノクローナル抗体である。

【0019】

さらに別の実施態様において、上記CRIgアンタゴニストは、14G8(ATCC寄託番号PTA-8298)、3D10(ATCC寄託番号PTA-8299)及び2H1(ATCC寄託番号PTA-8300)又はこれらの断片からなる群から選ばれるモノクローナル抗CRIg抗体である。

50

【0020】

全ての実施態様において、上記抗体又は抗体断片はキメラ型、ヒト化型又はヒト型とすることができる。

【0021】

全ての実施態様において、上記細胞内病原体は、ウイルス、寄生生物、細菌、真菌及びプリオンからなる群から選ぶことができる。

【0022】

別の態様において、本発明は、本明細書の遮断抗CRIG抗体をコードする核酸又はその断片に関する。

【0023】

別の態様において、本発明は、担体と混合されたCRIGアンタゴニストを含む組成物に関する。

【0024】

別の態様において、本発明は、細胞内病原体のCRIG媒介補体依存性細胞侵入を阻害する方法であって、有効量のCRIGアンタゴニストを必要とする哺乳動物の対象に投与することを含む方法に関する。

【0025】

さらに別の態様において、本発明は、哺乳動物の対象の血液循環から細胞内病原体を除去する方法であって、有効量のCRIGアンタゴニストをこの対象に投与することを含む方法に関する。

【0026】

別の態様において、本発明は、感染症の予防又は治療の方法であって、有効量のCRIGアンタゴニストを必要とする哺乳動物の対象に投与することを含む方法に関する。

【0027】

全ての態様において、上記哺乳動物の対象はヒトであることが好ましく、上記CRIGアンタゴニストは遮断抗CRIG抗体であることが好ましい。

【0028】

別の態様において、本発明は、CRIGアンタゴニストとこのCRIGアンタゴニストを投与して感染症を治療するための使用説明書とを含むキットに関する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】399 - アミノ酸完全長鎖型天然ヒトCRIGのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(huCRIG、それぞれ配列番号1及び2)を示す図である。

【図2A】305 - アミノ酸短鎖型天然ヒトCRIGのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(huCRIG-short、それぞれ配列番号3及び4)を示す図である。

【図2B】305 - アミノ酸短鎖型天然ヒトCRIGのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(huCRIG-short、それぞれ配列番号3及び4)を示す図である。

【図3A】280 - アミノ酸天然マウスCRIGのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(muCRIG、それぞれ配列番号5及び6)を示す図である。

【図3B】280 - アミノ酸天然マウスCRIGのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(muCRIG、それぞれ配列番号5及び6)を示す図である。

【図3C】280 - アミノ酸天然マウスCRIGのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(muCRIG、それぞれ配列番号5及び6)を示す図である。

【図4】muCRIG-iC3b/C3b結合の遮断能に関するハイブリドーマ上清の特性を示す図である。

【図5】huCRIG-iC3b/C3b結合の遮断能に関するハイブリドーマ上清の特性を示す図である。

【図6】マウスCRIG発現CHO細胞へのiC3b結合の抗CRIG抗体2H1及び14G8による遮断を示す図である。

【図7】CRIG+腹膜マクロファージへのiC3bの結合の抗CRIG抗体2H1による遮断を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 8】インビトロにおける C R I g + 腹膜マクロファージへの *Listeria Monocytogenes* の結合の抗 C R I g 抗体 2 H 1 による阻害を示す図である。

【図 9】血液循環からの *Listeria Monocytogenes* のクリアランスの C R I g 抗体 1 4 G 8 による阻害を示す図である。

【図 10】血液循環からの *Staphylococcus aureus* strain M のクリアランスの抗 C R I g 抗体 1 4 G 8 による阻害によりもたらされる肝臓の細菌負荷の低下及び心臓、脾臓及び腎臓の細菌負荷の増大を示す図である。

【図 11 A】抗原誘発関節炎 (A I A) における抗 C R I g 抗体 1 4 G 8 の役割を示す図である。

【図 11 B】抗原誘発関節炎 (A I A) における抗 C R I g 抗体 1 4 G 8 の役割を示す図である。

【図 12】C R I g 発現細胞への抗 C R I g 抗体 3 D 1 0 の結合を示す図である。

【図 13 - 1】ヒト及びマウス C R I g を発現する細胞への i C 3 b 結合の抗 C R I g 抗体 3 D 1 0 による遮断を示す図である。

【図 13 - 2】表 1 は、抗 C R I g 抗体 3 D 1 0、2 H 1 及び 1 4 G 8 の特性をまとめた表である。

【発明を実施するための形態】

【0030】

I. 定義

「C R I g」、「P R O 3 6 2」、「J A M 4」及び「S T I g M A」という用語は同じ意味で用いており、天然配列及び変異体 C R I g ポリペプチドのことをいう。

【0031】

「天然配列」C R I g とは、その調製方法に無関係に、天然由来の C R I g ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドである。従って、天然配列 C R I g は天然から単離してもよく、組み換え及び/又は合成手段によって作製してもよい。「天然配列 C R I g」という用語は、具体的には、天然の切断型もしくは分泌型の C R I g (例えば、細胞外ドメイン配列)、天然の変異体型 (例えば、選択的スプライス型) 及び C R I g の天然の対立遺伝子変異体を包含する。天然配列 C R I g ポリペプチドとしては、具体的には、配列番号 2 の完全長の 399 アミノ酸長ヒト C R I g ポリペプチド (図 1 A - 1 B に示した h u C R I g) であって、N 末端シグナル配列を含むか含まないもの、1 位に開始メチオニンを含むか含まないもの、かつ、配列番号 2 の約 277 乃至 307 番目アミノ酸に膜貫通ドメインの一部もしくは全部を含むか含まないものが挙げられる。別の実施態様において、上記天然配列 C R I g ポリペプチドは、アミノ酸 305 個の短鎖型ヒト C R I g (図 2 A 及び 2 B に示した配列番号 4 の h u C R I g - s h o r t) であって、N 末端シグナル配列を含むか含まないもの、1 位に開始メチオニンを含むか含まないもの、かつ、配列番号 4 の約 183 乃至 213 番目アミノ酸に膜貫通ドメインの一部もしくは全部を含むか含まないものである。別の実施態様において、上記天然配列 C R I g ポリペプチドは、配列番号 6 の 280 アミノ酸長の完全長マウス C R I g ポリペプチド (図 3 A 乃至 3 C に示した m u C R I g) であって、N 末端シグナル配列を含むか含まないもの、1 位に開始メチオニンを含むか含まないもの、かつ、配列番号 6 の約 181 乃至 211 番目アミノ酸に膜貫通ドメインの一部もしくは全部を含むか含まないものである。高等霊長類及び哺乳類を含む他の非ヒト動物の C R I g ポリペプチドは、具体的にはこの定義内に含まれる。

【0032】

上記 C R I g 「細胞外ドメイン」又は「E C D : e x t r a c e l l u l a r d o m a i n」は、それぞれの完全長分子の膜貫通及び細胞質ドメインを基本的に含んでいない C R I g ポリペプチドの形態のことを指す。通常、この C R I g E C D はそのような膜貫通及び/又は細胞質ドメインを 1 % 未満有し、好ましくはそのようなドメインを 0.5 % 未満有する。C R I g E C D は、配列番号 2、4 又は 6 の 1 又は約 21 乃至 X 番目のアミノ酸残基を含むことができ、この場合、X は配列番号 2 における約 271 乃至 281 番目

10

20

30

40

50

の任意のアミノ酸、配列番号 4 における約 178 乃至 186 番目の任意のアミノ酸及び配列番号 6 における約 176 乃至 184 番目の任意のアミノ酸である。

【0033】

「CRIg アntagオニスト」という用語は、最も広い意味で用いており、天然配列 CRIg ポリペプチドの C3b 及び / 又は iC3b との結合を遮断し、天然配列 CRIg ポリペプチドの定性的生物活性を部分的又は完全に阻止又は中和する（ひとまとめにして、「阻害する」と称する）任意の分子を包含する。この生物活性は、好ましくは、細胞内病原体の補体依存性細胞侵入を媒介し、及び / 又は赤血球又は血小板の望ましくないクリアランスを防止する CRIg の能力である。従って、Antagオニストは細胞内病原体の CRIg 媒介補体依存性細胞侵入を阻害することが好ましい。好適な CRIg Antagオニスト分子としては、具体的には、抗体断片をふくむ遮断抗 CRIg 抗体、本明細書の天然配列 CRIg ポリペプチドの変異体及び融合体などの他のポリペプチド、ペプチド及び非ペプチド（有機）低分子並びにアンチセンスポリヌクレオチド分子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましいグループの CRIg Antagオニストとしては、天然 CRIg ポリペプチドに特異的に結合し、その C3b 及び / 又は iC3b との結合を遮断する、抗体断片を含む抗 CRIg 抗体が挙げられる。

10

【0034】

本明細書で定義する「遮断抗体」とは、天然配列 CRIg ポリペプチドの C3b 及び / 又は iC3b との結合を遮断し、天然配列 CRIg ポリペプチドの定性的生物活性を部分的又は完全に阻止又は中和する（ひとまとめにして、「阻害する」と称する）抗体である。この生物活性は、好ましくは、細胞内病原体の補体依存性細胞侵入を媒介する CRIg の能力である。従って、遮断抗体は、細胞内病原体の CRIg 媒介補体依存性細胞侵入を阻害し、及び / 又は赤血球又は血小板の望ましくないクリアランスを防止することが好ましい。

20

【0035】

「低分子」とは、本明細書では、分子量が約 600 未満、好ましくは約 1,000 未満、例えば、100 乃至 600 又は 100 乃至 1,000 ダルトンであるものと定義される。「非ペプチド低分子」という用語は、上記の分子量範囲の低分子有機化合物のことをいう。

【0036】

「抗体」(Ab) 及び「免疫グロブリン」(Ig) は同じ構造特性を有する糖蛋白質である。抗体が特定の抗原に対して結合特異性を示すのに対して、免疫グロブリンは抗体と抗原特異性を欠く他の抗体様分子との両方を包含する。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系において低レベルで、骨髄腫において高レベルで産生される。「抗体」という用語は、最も広い意味で用いており、具体的には、完全な状態のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも 2 種の完全な状態の抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び所望の生物活性を示す限りにおける抗体断片を対象として含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0037】

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」とは、通常、2 本の同一軽 (L: light) 鎖と 2 本の同一重 (H: heavy) 鎖とからなる約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖蛋白質である。各軽鎖は 1 つの共有ジスルフィド結合により重鎖に連結されているが、ジスルフィド結合の数は免疫グロブリンアイソタイプが異なる重鎖間で異なる。また、各重及び軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン (V_H) を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン (V_L) を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

40

【0038】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部分が、抗体間で配列が大幅に異なって

50

おり、その特定の抗原に対する各特定抗体の結合及び特異性に利用されているという事実のことをいう。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメイン全体にわたって均一には分布していない。これは、軽鎖及び重鎖の可変ドメインのいずれにおいても相補性決定領域（CDR）又は超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、大きくベータ-シートを構造をとり、このベータ-シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する、3つのCDRにより連結された4つのFR領域を含んでいる。各鎖のCDRは、FR領域によってごく近接して結合されており、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Kabataほか、N I H P u b l . N o . 9 1 - 3 2 4 2、第I巻、p . 6 4 7 - 6 6 9（1991年）参照）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、抗体依存性細胞毒性への抗体の関与といった種々のエフェクター機能を示す。

10

20

30

40

50

【0039】

「抗体断片」は、完全な状態の抗体の一部、好ましくは完全な状態の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(ScFv)₂、dAb、相補性決定領域（CDR）断片、直鎖状抗体、単鎖抗体分子、ミニボディ、ダイアボディ、抗体断片から形成した多特異性抗体及び、一般に、抗原に特異的に結合するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0040】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの明らかに異なる種類の一つに分類することができる。

【0041】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンを種々のクラスに分類することができる。免疫グロブリンには、5つの主要なクラス、即ち、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、これらのうちのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類することができる。これら各種クラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 、及び α と呼ばれる。各種クラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構造については公知である。

【0042】

本明細書に用いている「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことを指し、言い換えれば、この集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る、自然に起こる可能性のある突然変異を別にすれば、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位を標的とする。さらに、通常、種々の決定基（エピトープ）を標的とする種々の抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体はその抗原の単一の決定基を標的とする。特異性の他に、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンに汚染されないハイブリドーマ培養によって合成されるという点においても有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特徴を示すものであり、この抗体が任意の特定の方法によって作製される必要があると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerほか、Nature、256：p . 4 9 5（1975年）に最初に報告されたハイブリドーマ法によって作製してもよいし、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号参照）によって作製してもよい。また「モノクローナル抗体」は、例えばClacksonほか、Nature、352：p . 6 2 4 - 6 2 8（1991年）及びMarksほか、J . M o l . B i o l .、222：p . 5 8 1 - 5 9 7（1991年）に記載されている技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離してもよい。ファージミド及びファージベクターを用いた抗体の

調製について開示している米国特許第 5, 750, 373 号、同 5, 571, 698 号、同 5, 403, 484 号及び同 5, 223, 409 号をも参照されたい。

【0043】

本明細書のモノクローナル抗体としては、具体的には、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種から誘導されたか、特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同的であるが、この鎖（類）の残りの部分が、別の種から誘導されたか、別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同的である「キメラ」抗体、並びに所望の生物学的活性を示すのであれば、このような抗体の断片が挙げられる（米国特許第 4, 816, 567 号及び Morrison ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81: p. 6851 - 6855 (1984 年)）。

10

【0044】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はこれらの断片である。大部分において、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、そのレシピエントの相補性決定領域（CDR）のいくつか又は全てが、マウス、ラット、ウサギなどのヒト以外の種（ドナー抗体）の CDR に由来する所望の特異性、親和性及びキャパシティーを持つ残基で置換されている免疫グロブリンである。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの特定の Fv フレームワーク領域（FR）の残基を対応する非ヒト残基で置換させることもできる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入される CDR 又はフレームワーク配列にも存在しない残基を含むことができる。こうした修飾を施すことによって抗体の性能がさらに改良され、最大限に引き出される。一般に、ヒト化抗体は、CDR 領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FR 領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも 1 つ、通常 2 つの可変ドメインの実質的に全部を含有することになる。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、通常ヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含むのが最適であると考えられる。さらなる詳細については、Jones ほか、Nature、321: p. 522 - 525 (1986 年)；Reichmann ほか、Nature、332: p. 323 - 329 [1988 年]；及び Presta、Curr. Op. Struct. Biol、2: p. 593 - 596 (1992 年) を参照されたい。ヒト化抗体としては、抗体の抗原結合領域が、対象抗原でマカクザルを免疫化することにより産生される抗体に由来する「霊長類化」抗体が挙げられる。旧世界（Old World）ザル由来の残基を含有する抗体も本発明の範囲内で可能である。例えば、米国特許第 5, 658, 570 号、同 5, 693, 780 号、同 5, 681, 722 号、同 5, 750, 105 号及び 5, 756, 096 号を参照されたい。

20

30

【0045】

「一本鎖 Fv」又は「sFv」抗体断片は抗体の V_H 及び V_L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、この Fv ポリペプチドは、sFv が抗原結合のために望ましい構造を形成するのを可能にする、 V_H 及び V_L ドメイン間のポリペプチドリンカーをさらに含む。sFv の概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第 113 巻、Rosenburg 及び Moore 編、Springer-Verlag 社、New York、p. 269 - 315 (1994 年) を参照されたい。

40

【0046】

「ダイアボディ」という用語は、二つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片であって、同じポリペプチド鎖（ $V_H - V_L$ ）内で軽鎖可変ドメイン（ V_L ）に重鎖可変ドメイン（ V_H ）が結合している抗体断片のことをいう。極めて短いために同一鎖上でこれら二つのドメインの対形成を可能にすることができないリンカーを使用して、これらのドメインを別の鎖の相補性ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創出する。ダイアボディについては、例えば、EP 404, 097、WO 93/11161 及び Hol

50

linger ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90：p. 6444 - 6448 (1993年) にさらに十分に説明されている。

【0047】

本明細書に用いている「免疫付着因子」という用語は、異種蛋白質（「付着因子」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを併せ持つ抗体様分子を示す。構造的には、免疫付着因子は、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち、「異種」である）所望の結合特異性を有するアミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合体を含む。免疫付着因子の分子の付着因子部分は、通常、少なくとも受容体又はリガンドの結合部位を含む連続したアミノ酸配列である。この免疫付着因子の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG - 1、IgG - 2、IgG - 3 又は IgG - 4 サブタイプ、IgA (IgA - 1 及び IgA - 2 を含む)、IgE、IgD 又は IgM などの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

10

【0048】

「感染症」という用語は、本明細書では、感染性微生物によって引き起こされる任意の疾患を指して用いている。感染性微生物は、ウイルス（例えば、一本鎖RNAウイルス、一本鎖DNAウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、A、B 及び C 型肝炎ウイルス、単純疱疹ウイルス（HSV：herpes simplex virus）、サイトメガロウイルス（CMV：cytomegalovirus）、エプスタイン バーウイルス（EBV：Epstein-Barr virus）、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV：human papilloma virus））、寄生生物（例えば、Plasmodium 属、Leishmania 属（例えば、Leishmania major）、Schistosoma 属、Trypanosoma 属）、細菌（例えば、Mycobacterium 属（特に、M. tuberculosis、M. leprae）、Yersinia pseudotuberculosis、Salmonella typhimurium、Listeria monocytogenes、Streptococcus 属、E. coli、Staphylococcus 属）、真菌（例えば、Candida 属、Aspergillus 属）、Pneumocystis carinii 及びプリオンを含むことができる。

20

【0049】

「治療」とは、疾病の発症を予防し、又はその病状を改善することを意図して行う介入である。従って、「治療」とは、治療的処置及び予防的又は再発防止措置の両方を指す。治療を必要とする対象には、すでに疾患を有する対象、および疾患を予防すべきである対象が含まれる。

30

【0050】

本明細書に用いている「感染症発症の予防又は阻止」という用語は、感染症の発症が防止され、感染症の発症が遅延され、又は現存する感染症の伝染が食い止められる状況のことをいう。

【0051】

本明細書に用いている「寛解する（Ameliorate）」とは、本明細書では、好転する又は改善することと定義する。

40

【0052】

本明細書に用いている「哺乳動物」という用語は、哺乳類として分類される動物のことを指し、このようなものとしては、ヒト、非ヒト霊長類、家畜動物、及びウマ、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、フェレットなどの動物園用、スポーツ用又はペット用動物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の好ましい実施態様では、哺乳動物は高等霊長類、最も好ましくはヒトである。

【0053】

II. 詳細な説明

CRIG ポリペプチドのアンタゴニストの同定

CRIG ポリペプチドのアンタゴニストとは、天然配列 CRIG ポリペプチドの C3b

50

及び／又は i C 3 b との結合を遮断し、この天然配列 C R I g ポリペプチドの定性的生物活性を部分的又は完全に阻止、阻害又は中和する分子である。C R I g アンタゴニストとしては、抗 C R I g 抗体（抗体断片を含む）、ポリペプチド、ペプチド及び非ペプチド低分子並びにアンチセンス分子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。こうしたアンタゴニストは、標準的な結合及び／又は機能アッセイを含む、当該分野で公知の方法によって同定することができる。天然配列 C R I g ポリペプチドのアンタゴニストは、ウイルス、細菌、寄生生物などの細胞内病原体の細胞侵入を阻止することができるため、感染症の予防及び治療に有用である。

【 0 0 5 4 】

抗 C R I g 抗体は、上記及び実施例 1 に記載したような当該分野で周知の方法により作製することができる。C R I g 結合能を有する他の分子は、当該分野で公知の結合アッセイにおいて同定することができる。

【 0 0 5 5 】

アンタゴニストの結合アッセイは全て、これらが候補アンタゴニストを C R I g ポリペプチドと、これらの成分間の相互作用を可能にするのに十分な条件及び時間で接触させることを必要とする点で共通している。結合アッセイにおいて、この相互作用とは結合であり、形成された複合体は単離又は反応混合物中に検出することができる。特定の実施態様において、この C R I g ポリペプチド又は候補アンタゴニストを共有又は非共有結合によって固相、例えばマイクロタイタープレート上に固定化する。一般に、非共有結合は、C R I g ポリペプチドの溶液で固体表面を被覆し、乾燥させることにより達成することができる。或いは、固定化対象の C R I g ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を用いてこれを固体表面にしっかりと固定することができる。アッセイは、検出可能な標識により標識することができる非固定化成分を固定化成分、例えば固定化成分が固定されている被覆表面に添加することにより実施することができる。反応が完了すれば、反応しなかった成分を、例えば洗浄によって除去し、固体表面に固定された複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能標識を有する場合、この表面に固定化された標識を検出することにより、複合体形成が生じたことが分かる。最初の非固定化成分が標識を有しない場合、複合体形成は、例えば、この固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体を用いることによって、検出することができる。

【 0 0 5 6 】

上記候補化合物が C R I g と相互作用するが、結合しないポリペプチドである場合、C R I g とそれぞれのポリペプチドとの相互作用を、蛋白質 - 蛋白質相互作用を検出するための公知の方法によってアッセイすることができる。このようなアッセイとしては、例えば、架橋法、免疫共沈降法、勾配もしくはクロマトグラフィーカラムによる同時精製法などの従来の方法が挙げられる。さらに、蛋白質 - 蛋白質相互作用は、Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: p. 5789 - 5793 (1991 年) に開示されているように、Fieldsら (Fields and Song, Nature (London), 340: p. 245 - 246 (1989 年); Chienほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: p. 9578 - 9582 (1991 年)) によって報告された酵母ベースの遺伝子系を用いることにより測定することができる。酵母 G A L 4 などの多くの転写活性化因子は 2 つの物理的に異なるモジュールメインからなり、そのうちの 1 つは D N A 結合ドメインの機能を果たし、他の 1 つは転写活性化ドメインとして機能する。上記刊行物に記載されている酵母発現系（通常「ツーハイブリッドシステム」と称する）は、これを利用するものであり、2 種のハイブリッド蛋白質、即ち、標的蛋白質を上記の G A L 4 の D N A 結合ドメインと融合させた 1 種と候補活性化蛋白質を上記活性化ドメインと融合させた別の 1 種とを用いる。G A L 4 活性化プロモータの制御下の G A L 1 - l a c Z レポータ遺伝子の発現は蛋白質 - 蛋白質相互作用を介した G A L 4 活性の再構成に依存している。相互作用するポリペプチドを含有するコロニーは - ガラクトシダーゼの発色基質で検出される。ツーハイブリッド技術を用いて 2 種の特定の蛋白質間の蛋白質 - 蛋白質相

10

20

30

40

50

相互作用を同定するための完全キット (MATCHMAKER (商標)) が Clontech 社から市販されている。このシステムは、特定の蛋白質間相互作用に關与する蛋白質ドメインをマッピングし、こうした相互作用に不可欠なアミノ酸残基を突き止めるために拡張することができる。

【0057】

本明細書に記載したスクリーニングアッセイはもっぱら説明のためのものであることを強調しておく。スクリーニングするアンタゴニスト候補の種類 (例えば、ポリペプチド、ペプチド、非ペプチド有機低分子、核酸など) に応じて選択することができる種々の他のアッセイについては当業者には公知であり、同様に本発明の目的に適している。

【0058】

本明細書に具体的に記載したアッセイを用いて化合物のライブラリをスクリーニングすることができる、このようなライブラリとしては、化学ライブラリ、天然物ライブラリ (例えば、微生物、動物、植物などのコレクション) 並びにランダムペプチド、オリゴヌクレオチド又は有機低分子からなるコンビナトリアルライブラリが挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の実施態様において、本明細書のアッセイを用いて、限定されない例として未処置ヒト抗体、組み換え抗体、合成抗体及び半合成抗体のライブラリが挙げられる抗体ライブラリをスクリーニングする。上記抗体ライブラリは、例えば、ファージ粒子当たり平均 1 個の一本鎖抗体もしくは抗体断片を提示する一価ライブラリ及びウイルス粒子当たり平均 2 個以上の抗体もしくは抗体断片を提示する多価ライブラリを含むファージディスプレイライブラリとすることができる。しかしながら、本発明によるスクリーニングの対象となる抗体ライブラリはファージディスプレイライブラリに限定されるものではない。例えば、他のディスプレイ技術として、リボソームもしくは mRNA ディスプレイ (Mattheakis ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: p. 9022 - 9026 (1994 年); Hanes 及び Pluckthun、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: p. 4937 - 4942 (1997 年))、細菌ディスプレイなどの微生物細胞ディスプレイ (Georgiou ほか、Nature Biotech. 15: p. 29 - 34 (1997 年)) 又は酵母細胞ディスプレイ (Kieckhefer ほか、Protein Eng. 10: p. 1303 - 1310 (1997 年))、哺乳動物細胞におけるディスプレイ、胞子ディスプレイ、レトロウイルスディスプレイなどのウイルスディスプレイ (Urban ほか、Nucleic Acids Res. 33: p. e35 (2005 年))、蛋白質 - DNA 結合に基づくディスプレイ (Odegrip ほか、Proc. Acad. Natl. Sci. USA 101: p. 2806 - 2810 (2004 年); Reiersen ほか、Nucleic Acids Res. 33: p. e10 (2005 年)) 及びマイクロビーズディスプレイ (Sepp ほか、FEBS Lett. 532: p. 455 - 458 (2002 年)) が挙げられる。合成低分子のコンビナトリアルライブラリなどの他の分子のライブラリも同様にスクリーニングすることができる。

【0059】

C3b 及び / 又は iC3b との CRIg の結合を遮断する候補アンタゴニストの能力は細胞利用のアッセイで評価することができる。従って、CRIg 核酸を形質移入されてこれを発現する組換え CHO 細胞などの CRIg 発現細胞を C3b / iC3b 及びこれまでの実験で CRIg と結合することが分かっているいなくてもよい 1 種以上の候補アンタゴニストとインキュベートすることができ、その結果を、実施例 2 で説明するように、FACSscan などの当該分野で周知の方法により分析することができる。或いは、又はさらに、C3b 及び / 又は iC3b との CRIg の結合を遮断する候補アンタゴニストの能力は、腹膜マクロファージなどの天然に CRIg を発現する細胞を用いるアッセイで試験することができる。

【0060】

本明細書の一次結合 / 相互作用アッセイで得られた結果は、種々の感染のインビトロ及びインビボアッセイで確認し、補完することができる。或いは、感染又は感染症の治療に

10

20

30

40

50

おける有効性のインビトロ及び／又はインビボアッセイを一次アッセイとして用いて本明細書に記載のC R I g アнтаゴニストを同定することができる。従って、L y s t e r i a m o n o c y t o g e n e s などの病原菌とC R I g 発現腹膜マクロファージとのインビボでの結合の阻害については、実施例2で記載したようにして試験することができる。

【0061】

動物モデルを用いて本明細書に記載の抗体及び他のC R I g アнтаゴニストを試験することもできる。マウスの血中からのL i s t e r i a 及びS t a p h y l o c c o c c u s a u r e u s のクリアランスの阻害については実施例2で説明する。

【0062】

抗C R I g アнтаゴニスト抗体の調製

(i) 抗原の調製

任意選択的に他の分子に結合させた可溶性抗原又はその断片を抗体作製のための免疫原として用いることができる。受容体などの膜貫通分子の場合、こうしたものの断片（例えば、受容体の細胞外ドメイン）を免疫原として用いることができる。或いは、この膜貫通分子を発現する細胞を免疫原として用いることができる。このような細胞は天然の供給源（例えば、癌細胞株）から得ることができ、又はこの膜貫通分子を発現するように組換え技術により形質転換した細胞とすることができる。他の抗原及び抗体調製に有用なその形態については、当業者には明らかであろう。

【0063】

(i i) ポリクロナール抗体

ポリクロナール抗体は、動物を用いて関連する抗原およびアジュバントを皮下（s c ）もしくは腹腔内（i p ）注射を繰り返すことにより産生させることが好ましい。免疫化の対象とする種において免疫原性である蛋白質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン又は大豆トリブシンインヒビター）に二官能性薬剤もしくは誘導化剤（例えば、マレイミドベンゾイル・スルホサクシンイミド・エステル（システイン残基を介する結合用）、N - ヒドロキシサクシンイミド（リジン残基を介する結合用）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C I ₂ 又はR₁ N = C = N R（式中、R及びR₁は異なるアルキル基である））を用いて関連抗原を結合させることは有用と考えられる。

【0064】

上記抗原、免疫原性結合体もしくは誘導体に対する動物の免疫化は、例えば100 μ g もしくは5 μ g（それぞれ、ウサギもしくはマウスの場合）のこの蛋白質もしくは結合体を3容の完全フロインドアジュバントと混合し、この溶液を複数の部位に皮内注射することにより行う。1ヶ月後、こうした動物に対して、ペプチドもしくは結合体の完全フロインドアジュバント液の元の量の1/5乃至1/10を複数の部位に皮下注射することにより追加免疫を行う。7乃至14日後に、上記動物を瀉血し、血清の抗体価をアッセイする。この抗体価がプラトーに達するまで追加免疫を繰り返す。好ましくは、動物の追加免疫は、抗原は同一とするが、これに結合させる蛋白質および／またはこの結合に用いる架橋剤は別のものに変えた結合体を用いて行う。また、結合体は、組換え細胞の培養によって融合蛋白質として作製することができる。また、この免疫反応を高めるためにミョウバンなどの凝集剤を適切に用いる。

【0065】

(i i i) モノクロナール抗体

モノクロナール抗体は、K o h l e r ほか、N a t u r e、256: p. 495 (1975年)に最初に報告されたハイブリドーマ法を用いて作製することができ、または組換えDNA法（米国特許第4, 816, 567号）によって作製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス又はハムスター、マカクザルなどの他の適切な宿主動物を上記の方法で免疫化することにより、免疫化に用いた蛋白質に特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することができるリンパ球を誘導する。或いは、リンパ球をインビトロで免疫

10

20

30

40

50

化することもできる。次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いてリンパ球を骨髓腫細胞と融合させることによりハイブリドーマ細胞を形成させる (Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、p. 59 - 103 (Academic Press 社、1986年))。

【0066】

こうして作製したハイブリドーマ細胞は、好ましくは融合しなかった元の骨髓腫細胞の増殖もしくは生残を阻害する1種以上の物質を含む適切な培養培地に接種し、増殖させる。例えば、元の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRTもしくはHPRRT) を欠損している場合、上記ハイブリドーマの培養培地には、通常、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを添加し (HAT培地)、これらの物質によりHGPRT欠損細胞の増殖を防止する。

10

【0067】

骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定的な高レベルの産生を維持し、HAT培地のような培地に対して感受性であるものが好ましい。こうしたものの中でも、好ましい骨髓腫細胞株は、Saik Institute Cell Distribution Center 社、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国から入手可能なMOPC - 21及びMPC - 11マウス腫瘍並びにAmerican Type Culture Collection、ロックビル、メリーランド州、米国から入手可能なSP - 2もしくはX63 - Ag8 - 653細胞に由来するものなどのマウス骨髓腫細胞株である。ヒトモノクロナール抗体を産生させるためのヒト骨髓腫およびマウス - ヒト・ヘテロ骨髓腫細胞株についても報告されている (Kozbor、J. Immunol.、133: p. 3001 (1984年); Brodeurほか、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、p. 51 - 63 (Marcel Dekker 社、ニューヨーク州、1987年))。

20

【0068】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地について抗原に対するモノクロナール抗体の産生のアッセイを行う。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクロナール抗体の結合特異性は、免疫沈降法、又はラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素標識免疫定量法 (ELISA) などのインビトロ結合アッセイ法により測定することが好ましい。

30

【0069】

所望の特異性、親和性および/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を特定した後、このクローンは、限界希釈法によりサブクロニングし、標準的な方法 (Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、p. 59 - 103 (Academic Press 社、1986年)) を用いて増殖させることができる。この目的のための好適な培養培地としては、例えば、D - MEMもしくはRPMI - 1640が挙げられる。さらに、このハイブリドーマ細胞は、動物体内において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

40

【0070】

上記サブクローンにより分泌されたモノクロナール抗体は、通常、免疫グロブリン精製法、例えば、プロテインAセファロース、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析もしくはアフィニティ・クロマトグラフィーを用いて培養培地、腹水液もしくは血清から適切に分離することができる。

【0071】

モノクロナール抗体をコードするDNAは、通常の方法により (例えば、このモノクロナール抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチド・プローブを用いることによって) 容易に単離し、配列決定することができる。上記ハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの好ましい供給源となる。一旦単離したDNAは、発現ベクターに挿入した後、普通なら免疫グロブリン蛋白質を産生しない大腸

50

菌細胞、サルC O S細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、骨髓腫細胞などの宿主細胞内にこのベクターを形質移入することにより、この組換え宿主細胞にモノクロナール抗体を合成させることができる。以下に、抗体の組換え法による作製についてさらに詳細に説明する。

【0072】

別の実施態様において、抗体または抗体断片は、M c C a f f e r t y ほか、N a t u r e、348：p . 552 - 554（1990年）に報告されている技術を用いて作製された抗体ファージライブラリから単離することができる。

【0073】

C l a c k s o n ほか、N a t u r e、352：p . 624 - 628（1991年）及びM a r k s ほか、J . M o l . B i o l .、222：p . 581 - 597（1991年）に、ファージライブラリを用いてマウス及びヒト抗体をそれぞれ単離する方法が報告されている。その後の刊行物には、鎖シャフリング（c h a i n s h u f f l i n g）（M a r k s ほか、B i o / T e c h n o l o g y、10：p . 779 - 783（1992年））並びに超大型ファージライブラリ構築方法としてのコンビナトリアル感染及びインビボ組換え（W a t e r h o u s e ほか、N u c l A c i d s R e s .、21：p . 2265 - 2266（1993年））による高親和性（nM範囲）ヒト抗体の作製が報告されている。従って、これらの技術は、モノクロナール抗体の単離のための従来のモノクロナール抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別の方法である。

【0074】

また、上記DNAは、例えば、ヒト重及び軽鎖定常ドメインのコーディング配列をマウスの相同配列の代わりに用いる（米国特許第4,816,567号、M o r r i s o n ほか、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、81：p . 6851（1984年））ことにより、又は、非免疫グロブリンポリペプチドのコーディング配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンのコーディング配列に共有結合させることにより修飾することもできる。

【0075】

通常、抗体の定常ドメインをこのような非免疫グロブリンポリペプチドで置換し、又は、これを抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインで置換することにより、抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位と別の抗原に対して特異性を有する別の抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作製する。

【0076】

（i v）ヒト化及びヒト抗体

ヒト化抗体では非ヒトの供給源からの1種以上のアミノ酸残基がこれに導入されている。こうした非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と呼ばれることが多く、通常、「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、基本的に、W i n t e r 及び共同研究者（J o n e s ほか、N a t u r e、321：p . 522 - 525（1986年）；R i e c h m a n n ほか、N a t u r e、332：p . 323 - 327（1988年）；V e r h o e y e n ほか、S c i e n c e、239：p . 1534 - 1536（1988年））の方法に従い、齧歯動物のC D R又はC D R配列でヒト抗体の該当する配列を置換することにより実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、完全な状態のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は、通常、幾つかのC D R残基及び場合によっては幾つかのF R残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0077】

ヒト化抗体を作製するのに用いることになるヒト可変ドメインは軽鎖及び重鎖ともその選択が抗原性を低減するために極めて重要である。いわゆる「最良適合」法に従って、周知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してげっ歯類抗体の可変ドメイン配列をスクリーニングする。その結果、げっ歯類配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のヒトフ

10

20

30

40

50

フレームワーク (FR) として受け入れられる (Sims ほか、J. Immunol.、151: p. 2296 (1993年); Chothia ほか、J. Mol. Biol.、196: p. 901 (1987年))。別の方法では、特定のサブグループの軽鎖又は重鎖のヒト抗体全てのコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体に同じフレームワークを使用することができる (Carter ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89: p. 4285 (1992年); Presta ほか、J. Immunol.、151: p. 2623 (1993年))。

【0078】

抗原に対する高親和性および他の好ましい生物学的性質を保持させて抗体をヒト化することはさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法によって、元の配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した元の配列および種々の概念上のヒト化産物の分析のプロセスによってヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択した候補免疫グロブリン配列の有望な三次元配座構造を例示および表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらディスプレイの調査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性の高い役割の分析 (即ち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析) が可能となる。この方法では、標的抗原 (単数又は複数) に対する親和性の増大などの所望の抗体特性が達成されるように、レシピエントおよび移入配列から FR 残基を選択して組み合わせることができる。一般に、CDR 残基は、抗原結合に対する影響に直接かつ極めて大きく関与する。

【0079】

或いは、現在、免疫化時に内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の全レパートリーを産生することができる遺伝子導入動物 (例えば、マウス) を作製することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域 (J_H) 遺伝子のホモ接合性欠損によって内因性抗体産生が完全に阻害されることが報告されている。このような生殖系列変異マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを移入すると、抗原チャレンジ時にヒト抗体が産生されることになる。例えば、Jakobovits ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90: p. 2551 (1993年); Jakobovits ほか、Nature、362: p. 255-258 (1993年); Bruggemann ほか、Year in Immunol.、7: p. 33 (1993年); 及び Duchosal ほか、Nature 355: p. 258 (1992年) を参照されたい。ヒト抗体はファージディスプレイライブラリから得ることもできる (Hoogenboom ほか、J. Mol. Biol.、227: p. 381 (1991年); Marks ほか、J. Mol. Biol.、222: p. 581-597 (1991年); Vaughan ほか、Nature Biotech. 14: p. 309 (1996年))。抗体ファージディスプレイライブラリからのヒト抗体の作製については以下でさらに説明する。

【0080】

(v) 抗体断片

抗体断片の作製のための種々の技術が開発されている。従来から、こうした断片は、完全な状態の抗体の蛋白分解によって得られていた (例えば、Morimoto ほか、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: p. 107-117 (1992年) 及び Brennan ほか、Science、229: p. 81 (1985年) 参照)。しかしながら、現在、このような断片は、組換え宿主細胞によって直接産生させることができる。例えば、こうした抗体断片は上記の抗体ファージライブラリから単離することができる。或いは、Fab'-SH断片をE.coliから直接回収し、化学的に結合させることによりF(ab')₂断片を形成させることができる (Carter ほか、Bio/Technology 10: p. 163-167 (1992年))。下記実施例に記載した別の実施態様では、ロイシンジッパーGCN4を用いてF(ab')₂を形成させることにより、F(ab')₂分子の

構築を促進する。別の方法では、組換え宿主細胞培養物から直接 $F(a b')_2$ 断片を単離することができる。抗体断片作製の他の方法については熟練した実務者には明らかであろう。他の実施態様では、最適な抗体は一本鎖 F_v 断片 ($s c F_v$) である。W O 9 3 / 1 6 1 8 5 を参照されたい。

【0081】

(v i) 多特異性抗体

多特異性抗体は少なくとも2種のエピトープに対する結合特異性を有し、この場合のこれらのエピトープは通常異なる抗原に由来するものである。このような分子は、普通2種のエピトープに結合するに過ぎない(即ち、二重特異性抗体、 $B s A b : b i s p e c i f i c a n t i b o d y$) が、本明細書で用いる場合のこの表現には三重特異性抗体などの更なる特異性を有する抗体も包含される。 $B s A b$ の例としては、 $C R I g$ に向けられた1つのアームと、 $C R 1$ 、 $C R 2$ 、 $C R 3$ 及び $C R 4$ からなる群から選ばれるマクロファージ受容体のような免疫複合体クリアランスに關与する別の蛋白質に向けられた別のアームとを有するものが挙げられる。

【0082】

二重特異性抗体を作製する方法は、当該分野において周知である。従来より行われている完全長の二重特異性抗体の作製は2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づくものであり、この場合の2本の鎖は異なる特異性を有する($M i l l s t e i n$ ほか、 $N a t u r e$ 、305 : p . 537 - 539 (1983年))。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖が無作為に組み合わせられるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の抗体分子の混合物を産生すると考えられ、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。この正しい分子の精製は、通常親和性クロマトグラフィー工程によって行われるが、かなり面倒であり、産物の収率が低い。同様の手順がW O 9 3 / 0 8 8 2 9 及び $T r a u n e c k e r$ ほか、 $E M B O J .$ 、10 : p . 3655 - 3659 (1991年)に開示されている。別の方法では、所望の結合特異性(抗体 - 抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。この融合は、少なくともヒンジ部、 $C H 2$ 及び $C H 3$ 領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものであることが好ましい。少なくとも一つの融合には、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域($C H 1$)が存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体及び、必要に応じて、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主微生物へ同時形質移入する。これによって、上記構築に用いる3本のポリペプチド鎖の比率が異なることにより最適な収率が得られる場合の実施態様において、3つのポリペプチド断片の相互の割合を調整する際に大きな融通性が得られる。しかしながら、少なくとも2本のポリペプチド鎖を等しい比率で発現させることにより高収率が得られる場合、又はこれらの比率が特に重要ではない場合、2本もしくは3本全てのポリペプチド鎖のコーディング配列を1つの発現ベクターに挿入することは可能である。

【0083】

この方法の好ましい実施態様では、上記二重特異性抗体は、1つのアームとしての第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他のアームとしての(第2の結合特異性を示す)ハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対とから構成される。この非対称構造は、この二重特異性分子の半分のみ免疫グロブリン軽鎖が存在することにより容易な分離方法が得られるので、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。この方法については、W O 9 4 / 0 4 6 9 0 に開示されている。二重特異性抗体の作製についての更なる詳細については、例えば、 $S u r e s h$ ほか、 $M e t h o d s i n E n z y m o l o g y$ 、121 : p . 210 (1986年)を参照されたい。

【0084】

W O 9 6 / 2 7 0 1 1 に開示されている別の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体類の割合を最大にすることができる。この界面は、抗体定常ドメインの $C H 3$ ドメインの少なくとも一部を含むことが好まし

い。この方法では、第1の抗体分子の界面からの1個以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同一又は同様なサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖（単数又は複数）を小さいもの（アラニン又はスレオニン）と置き換えることによって、第2の抗体分子の界面に作り出す。これによって、ホモ二量体のような不要の他の最終産物よりもヘテロ二量体の収率を増大させるためのメカニズムがもたらされる。

【0085】

二重特異性抗体としては、架橋型又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が挙げられる。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体のうちの1つにはアビジンを、他の抗体にはビオチンを結合させることができる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞の的を望ましくない細胞（米国特許第4,676,980号）及びHIV感染の治療（WO91/00360、WO92/200373）に合わせさせるものであると提唱されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野で公知であり、いくつかの架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0086】

抗体断片から二重特異性抗体を作製する技術についても文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は化学結合を用いて調製することができる。Brennanほか、Science 229: p. 81 (1985年)には、完全な状態の抗体を蛋白質分解によって開裂させてF(ab')₂断片を作製する方法が記載されている。こうした断片はジチオール複合体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元させることにより、近接ジチオールが安定化され、分子間ジスルフィド形成が防止される。次いで、生成されたF(ab')断片をチオニトロ安息香酸(TNB)誘導体へ変換する。次に、こうしたF(ab')-TNB誘導体のうちの1種をメルカプトエチルアミンで還元してF(ab')-チオールへ再変換し、他のF(ab')-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成させる。この作製した二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化用薬剤として使用することができる。

【0087】

F(ab')SH断片をE.coliから直接回収し、化学的に結合させて二重特異性抗体を形成させることもできる。Shalabyほか、J. Exp. Med.、175: p. 217-225 (1992年)には、完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の作製について記載されている。各F(ab')断片をE.coliから別々に分泌させ、インビトロで定方向化学結合させて二重特異性抗体を形成させた。

【0088】

また、組換え細胞培養から直接に二重特異性抗体断片を作製し分離する様々な技術も報告されている。例えば、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体が作製されている。Kostelnyほか、J. Immunol.、148(5): p. 1547-1553 (1992年)。Fos及びJuntanパク質のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって2種の抗体のF(ab')部分に連結させた。こうした抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元してモノマーを形成させ、次いで再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成させた。この方法は、抗体ホモ二量体の作製に利用することもできる。Hollingerほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90: p. 6444-6448 (1993年)に報告されている「ダイアボディ」技術によって、二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムがもたらされている。こうした断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短かすぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(VL)と結合された重鎖可変ドメイン(VH)を含んでいる。従って、一つの断片のVH及びVLドメインを別の断片の相補的VL及びVHドメインと強制的に対形成させ、それによって2つの抗原結合部位を形成させる。一本鎖Fv(sFv)二量体を使用して二重特異性抗体断片を作製する別の方法についても報告されている。Gruberほか、J. Immunol.、152: p. 5368 (1994年)を参照されたい。

【0089】

10

20

30

40

50

三重特異性以上の抗体も想定している。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuftほか、J. Immunol. 147: p. 60 (1991年)。さらに、同じ抗原に対して2以上の結合特異性を有する多価（例えば、二価）抗体も本明細書の範囲内にある。

【0090】

(vii) エフェクター機能の設計

エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することにより、この抗体の有効性を高めることは望ましいと考えられる。例えば、システイン残基（単数又は複数）をFc領域に導入することによって、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にすることができる。このようにして作製したホモ二量体抗体では、インターナリゼーション能力を改善させ、及び/又は補体媒介殺細胞性及び抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を増大させることができる。Caronほか、J. Exp. Med. 176: p. 1191-1195 (1992年)及びShopes、B. J. Immunol. 148: p. 2918-2922 (1992年)を参照されたい。Wolfほか、Cancer Research 53: p. 2560-2565 (1993年)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して、抗腫瘍活性の増強されたホモ二量体抗体を調製することもできる。或いは、二重Fc領域を有し、それによって補体溶解及びADCC能が増強されたと考えられる抗体を設計することができる。Stevensonほか、Anti-Cancer Drug Design 3: p. 219-230 (1989年)を参照されたい。

10

20

【0091】

(viii) 抗体-サルベージ受容体結合エピトープ融合体

本発明の特定の実施態様では、例えば、腫瘍浸透を増大させるために、完全な状態の抗体ではなく、抗体断片を用いることが望ましいと考えられる。この場合、その血清半減期を増大させるために抗体断片を修飾することが望ましいと考えられる。これは、例えば、抗体断片内にサルベージ受容体結合エピトープを取り込ませることによって（例えば、抗体断片中の適切な領域に突然変異を生じさせることによって、又は例えばDNA合成またはペプチド合成によって、ペプチドタグ内にエピトープを取り込ませ、次いでこれを、抗体断片の末端又は中央に融合させることによって）達成することができる。

30

【0092】

このサルベージ受容体結合エピトープは、Fcドメインの1つ又は2つのループからの1以上の任意の残基が上記抗体断片の類似の位置に移されている領域を構成することが好ましい。このFcドメインの1つ又は2つのループからの残基は3以上移されることがより好ましい。さらにより好ましくは、このエピトープは上記Fc領域（例えば、IgGの）のCH2ドメインから得て、上記抗体のCH1、CH3もしくはV_H領域又は2以上のそのような領域に移す。或いは、このエピトープは上記Fc領域のCH2ドメインから得て、上記抗体断片のCL領域もしくはV_L領域又はこれらの両者に移す。

【0093】

(ix) 抗体の他の共有結合修飾

抗体の共有結合修飾は本発明の範囲に含まれる。これは、該当する場合、化学合成又はこの抗体の酵素的もしくは化学的開裂によって行うことができる。この抗体の他の種類の共有結合修飾は、特定の側鎖又はN-もしくはC-末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と上記抗体の標的アミノ酸残基とを反応させることによって分子中に導入する。共有結合修飾の例については、特に引用により本明細書に組み込まれている米国特許第5,534,615号に記載されている。上記抗体の好ましい種類の共有結合修飾は、米国特許第4,640,835号、同4,496,689号、同4,301,144号、同4,670,417号、同4,791,192号又は同4,179,337号に記載の方法で各種非蛋白質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール又はポリアルキレン）のうちの1種に上記抗体を連結させることを含む。

40

【0094】

50

(×) 合成抗体ファージライブラリからの抗体の作製

好ましい実施態様において、本発明は、特別なファージディスプレイ法を用いて新規な抗体を作製し、選択する方法を提供する。この方法は、単一フレームワーク鑄型に基づく合成抗体ファージライブラリを作製し、可変ドメイン内に十分な多様性を設計し、多様化した可変ドメインを有するポリペプチドをディスプレイさせ、抗原を標的とする高親和性を有する候補抗体を選択し、選択した抗体を単離するものである。

【0095】

ファージディスプレイ法の詳細は例えば2003年12月11日公開のWO03/102157に見出すことができ、その内容全体が引用により本明細書に明確に組み込まれている。

10

【0096】

一態様では、本発明において使用される抗体ライブラリは抗体可変ドメインの少なくとも1つのCDRにおいて溶媒接近可能な及び/又は高度に多様性の位置を変異させることによって作製することができる。こうしたCDRのいくつか又は全てを本明細書に示した方法を使用して突然変異させることができる。一部の実施態様では、CDRH1、CDRH2及びCDRH3中の位置を突然変異させて単一のライブラリを形成するか、又はCDRL3及びCDRH3中の位置を突然変異させて単一のライブラリを形成するか、又はCDRL3及びCDRH1、CDRH2及びCDRH3中の位置を突然変異させて単一のライブラリを形成することにより、多様な抗体ライブラリを作製することが好ましいと考えられる。

20

【0097】

例えば、CDRH1、CDRH2及び/又はCDRH3の溶媒接近可能な及び/又は高度多様性の位置に突然変異を有する抗体可変ドメインのライブラリを作製することができる。CDRL1、CDRL2及び/又はCDRL3に突然変異を有する別のライブラリを作製することができる。これらのライブラリを互いに連結して用いることにより所望の親和性のバインダーを作製することができる。例えば、標的抗原への結合に関して重鎖ライブラリを1回以上選択した後に、軽鎖ライブラリを重鎖バインダーの集団中に置き換えてさらに選択の回数を重ねることにより、こうしたバインダーの親和性を増大させることができる。

【0098】

上記ライブラリは重鎖配列の可変領域のCDRH3領域において元のアミノ酸を変異アミノ酸で置換することにより作製することが好ましい。得られるライブラリは複数の抗体配列を含み得、この場合、配列多様性は主として重鎖配列のCDRH3領域にある。

30

【0099】

一態様では、ライブラリは、ヒト化抗体4D5配列、又はヒト化抗体4D5配列のフレームワークアミノ酸の配列との関連で作製する。好ましくは、このライブラリはDVKコドンセットによってコードされるアミノ酸で重鎖の少なくとも残基95乃至100aを置換することにより作製し、この場合、このDVKコドンセットを用いてこれらの位置の個々の全てについて一組の変異アミノ酸をコードする。これらの置換をもたらすのに有用なオリゴヌクレオチドセットの一例は配列(DVK)₇を含む。一部の実施態様では、ライブラリは、DVKとNNKの双方のコドンセットによってコードされるアミノ酸で残基95乃至100aを置換することにより作製する。これらの置換をもたらすのに有用なオリゴヌクレオチドセットの例は配列(DVK)₆(NNK)を含む。別の実施態様では、ライブラリは、DVKとNNKの双方のコドンセットによってコードされるアミノ酸で少なくとも残基95乃至100aを置換することにより作製する。これらの置換をもたらすのに有用なオリゴヌクレオチドセットの別の例は配列(NNK)₆を含む。好適なオリゴヌクレオチド配列の他の例については、本明細書に記載した基準に従って当業者が決定することができる。

40

【0100】

50

別の実施態様では、異なったCDRH3設計を用いて高親和性バインダーを単離し様々なエピトープに対するバインダーを単離する。このライブラリにおいて作製したCDRH3の長さの範囲はアミノ酸11個乃至13個であるが、これとは異なった長さも作製することができる。H3多様性は、NNK、DVK及びNVKコドンセットを使用し、並びにN及び/又はC末端での多様性をより制限して、拡張することができる。

【0101】

多様性はCDRH1及びCDRH2においてももたらすことができる。CDR-H1及びH2の多様性の設計は、上述の天然抗体レパートリーを模倣するターゲティングの方法に従い、これまでの設計よりも天然の多様性に対してより厳密に適合する多様性に焦点を当てた改変を行う。

10

【0102】

CDRH3での多様性に対しては、複数のライブラリを、異なった長さのH3を用いて別個に構築し、次いで、標的抗原に対するバインダーを選択するために組み合わせる。これらの複数のライブラリをプールし、以前に報告され、以下の本明細書記載したような固体支持体選別及び溶液ソーティング方法を用いて選別することができる。複数のソーティング方法を用いることができる。例えば、1つの変法は、固体に結合した標的によってソートした後、上記融合ポリペプチドに存在させることができるタグ（例えば、抗gDタグ）についてソートし、次いで固体に結合した標的によってさらにソートするものである。別法として、ライブラリを固体表面に結合した標的によって先ずソートすることができ、次いで溶出したバインダーを標的抗原の濃度を減少させた溶液相結合によってソートする。異なるソーティング方法を併用することによって、高度に発現される配列のみを選択することが最小限に抑えられ、多くの異なる高親和性クローンが選択される。

20

【0103】

上記標的抗原に対する高親和性バインダーはこれらのライブラリから単離することができる。H1/H2領域における多様性を制限することによって縮重が約1/10⁴乃至1/10⁵に減少し、H3多様性を増大させることができることにより、より多くの高親和性バインダーが得られる。CDRH3において異なったタイプの多様性を持つライブラリを利用することにより（例えばDVK又はNVTを利用して）、標的抗原の異なったエピトープに結合することができるバインダーの単離が可能となる。

【0104】

上述のプールしたライブラリから単離したバインダーに関して、軽鎖の多様性を制限することにより親和性を更に改善することができることを見出された。軽鎖の多様性は、この実施態様では以下のように生じる。即ち、CDRL1においては28番目のアミノ酸がRDTによりコードされ、29番目のアミノ酸がRKTによりコードされ、30番目のアミノ酸がRVWによりコードされ、31番目のアミノ酸がANWによりコードされ、32番目のアミノ酸がTHTによりコードされ、任意選択的に33番目のアミノ酸がCTGによりコードされ、CDRL2においては50番目のアミノ酸がKBGによりコードされ、53番目のアミノ酸がAVCによりコードされ、任意選択的に55番目のアミノ酸がGMAによりコードされ、CDRL3においては91番目のアミノ酸がTMT又はSRT又はこれらの両者によりコードされ、92番目のアミノ酸がDMCによりコードされ、93番目のアミノ酸がRVTによりコードされ、94番目のアミノ酸がNHTによりコードされ、96番目のアミノ酸がTWT又はYKG又はこれらの両者によりコードされる。

30

40

【0105】

別の実施態様では、CDRH1、CDRH2及びCDRH3領域に多様性を有するライブラリ又はライブラリ群を作製する。この実施態様では、CDRH3の多様性は様々な長さのH3領域を用い、主にコドンセットXYZ及びNNK又はNNSを用いてもたらす。ライブラリは個々のオリゴヌクレオチドを使用して形成させ、プールすることができ、又は、オリゴヌクレオチドをプールしてライブラリのサブセットを形成させることができる。この実施態様のライブラリは固体に結合させた標的に対してソートすることができる。複数回のソーティングから単離されるクローンはELISAアッセイを使用して特異性及

50

び親和性についてスクリーニングすることができる。特異性の場合、これらのクローンを所望の標的抗原並びに他の非標的抗原に対してスクリーニングすることができる。次いで、上記標的抗原に対するバインダーを溶液結合競合 E L I S A アッセイ又はスポット競合アッセイで親和性についてスクリーニングすることができる。高親和性バインダーは上記のようにして調製した X Y Z コドンセットを使用してライブラリから単離することができる。こうしたバインダーは、抗体又は抗原結合断片として細胞培養物中に高収量で容易に生成させることができる。

【 0 1 0 6 】

一部の実施態様では、C D R H 3 領域の長さにより大きな多様性を有するライブラリを作製することが望ましいと考えられる。例えば、アミノ酸約 7 乃至 1 9 個の範囲の C D R H 3 領域を有するライブラリを作製することが望ましいと考えられる。

10

【 0 1 0 7 】

これらの実施態様のライブラリから単離される高親和性バインダーは、細菌及び真核細胞培養において高収量で容易に作製することができる。ベクターは、g D タグ、ウイルスコート蛋白質成分配列などの配列を容易に除去することができ、及び / 又は定常領域配列を加えて完全長抗体又は抗原結合断片を高収量で生成することができるよう設計することができる。

【 0 1 0 8 】

C D R H 3 に変異を有するライブラリは、例えば C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3、C D R H 1 及び / 又は C D R H 2 などの他の C D R の変異型を含むライブラリと組み合わせることができる。従って、例えば、一実施態様では、C D R H 3 ライブラリは、所定のコドンセットを用いて 2 8、2 9、3 0、3 1、及び / 又は 3 2 番目の位置に変異アミノ酸を有するヒト化 4 D 5 抗体配列との関連で作製した C D R L 3 ライブラリと組み合わせる。別の実施態様では、C D R H 3 に対する突然変異を有するライブラリを変異 C D R H 1 及び / 又は C D R H 2 重鎖可変ドメインを含むライブラリと組み合わせることができる。一実施態様では、この C D R H 1 ライブラリは、2 8、3 0、3 1、3 2 及び 3 3 番目の位置に変異アミノ酸を有するヒト化抗体 4 D 5 配列を用いて作製する。C D R H 2 ライブラリは、所定のコドンセットを用いて 5 0、5 2、5 3、5 4、5 6 及び 5 8 番目の位置に変異アミノ酸を有するヒト化抗体 4 D 5 の配列を用いて作製することができる。

20

【 0 1 0 9 】

30

(x i) 抗体変異体

ファージライブラリから作製した新規の抗体を、さらに修飾して、元の抗体に対して改善された物理学的、化学的及び / 又は生物学的性質を有する抗体変異体を作製することができる。使用するアッセイが生物学的活性アッセイである場合、抗体変異体は、選択したアッセイにおける生物活性がこのアッセイにおけるその元の抗体の生物活性よりも少なくとも約 1 0 倍、好ましくは少なくとも約 2 0 倍、より好ましくは少なくとも約 5 0 倍、時として少なくとも約 1 0 0 倍又は 2 0 0 倍優れていることが好ましい。例えば、抗 C R I g 抗体変異体は、C R I g に対する結合親和性とその元の抗体の結合親和性よりも少なくとも約 1 0 倍、好ましくは少なくとも約 2 0 倍、より好ましくは少なくとも約 5 0 倍、時として少なくとも約 1 0 0 倍又は 2 0 0 倍強いことが好ましい。

40

【 0 1 1 0 】

抗体変異体を作製するためには、元の抗体の 1 つ以上の超可変領域に 1 つ以上のアミノ酸改変 (例えば、置換) を導入する。或いは、又はさらに、元の抗体にフレームワーク領域の残基の 1 つ以上の改変 (例えば、置換) を導入することができ、この場合、こうした改変は第 2 の哺乳動物種からの抗原に対する抗体変異体の結合親和性の改善をもたらす。修飾すべきフレームワーク領域残基の例としては、抗原を非共有結合で直接結合するもの (A m i t ほか、(1 9 8 6 年) S c i e n c e 2 3 3 : p . 7 4 7 - 7 5 3)、C D R の高次構造と相互作用し、 / これに影響を及ぼすもの (C h o t h i a ほか、(1 9 8 7 年) J . M o l . B i o l . 1 9 6 : p . 9 0 1 - 9 1 7) 及び / 又は V_L - V_H 界面に關与するもの (E P 2 3 9 4 0 0 B 1) が挙げられる。特定の実施態様では、1

50

個以上のそのようなフレームワーク領域残基を修飾することによって、第2の哺乳動物種由来の抗原に対する抗体の結合親和性が増強される。例えば、本発明のこの実施態様では約1個乃至約5個のフレームワーク残基を改変することができる。時として、これは、超可変領域の残基が何ら改変されていない場合でさえ、前臨床試験に使用するのに適した抗体変異体をもたらすのに十分な場合がある。しかしながら、通常は、この抗体変異体は更に超可変領域の改変（単数又は複数）を含むことになる。

【0111】

改変される超可変領域残基は、特に元の抗体の出発結合親和性が、無作為に作製された抗体変異体を容易にスクリーニングすることができるほどのものである場合には、無作為に変化させることができる。

【0112】

そのような抗体変異体を作製するための一つの有用な方法は、「アラニンスキャンニング突然変異誘発法」（Cunningham及びWells（1989年）Science 244：p. 1081-1085）と呼ばれる。この場合、1個以上の超可変領域残基（単数又は複数）をアラニン又はポリアラニン残基（単数又は複数）によって置換することにより、第2の哺乳動物由来の抗原とこれらのアミノ酸との相互作用が影響される。次いで、置換に対する機能的感受性を示すこうした超可変領域残基（単数又は複数）を、置換部位において、又はこうした部位に対して更なる又は他の突然変異を導入することによって改良する。従って、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異の種類自体は予め決める必要はない。このようにして作製したala変異体については、本明細書に記載したようにしてその生物活性をスクリーニングする。

【0113】

通常は、「好ましい置換」と題して以下に示したもののような保存的置換で始める。このような置換により生物活性（例えば、結合親和性）に変化が生じる場合には、下表で「例示的な置換」と称し、又はさらにアミノ酸クラスを基準として以下に記載したより大きな変更を導入し、得られる生成物をスクリーニングにかける。

【0114】

好ましい置換：

【0115】

【化1-1】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換

【0116】

10

20

30

【化 1 - 2】

Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

【化 1 - 3】

Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu
---------	------------------------------------	-----

抗体の生物学的性質の更により実質的な修飾は、(a) 例えばシートもしくはヘリカル構造としての、置換領域のポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位の分子の電荷もしくは疎水性、又は(c) 側鎖の嵩の維持に対する効果が有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然の残基は共通の側鎖特性に基づいて以下のように群分けされる：

10

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性の親水性：cys, ser, thr；

(3) 酸性：asp, glu；

(4) 塩基性：his, lys, arg；

(5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro；及び

(6) 芳香族：trp, tyr, phe。

【0118】

非保存的置換は、これらのクラスの一つのメンバーを他のクラスのものと交換するものである。

20

【0119】

別の実施態様では、修飾のために選択した部位をファージディスプレイ（上記参照）を使用して親和性成熟させる。

【0120】

アミノ酸配列変異体をコードしている核酸分子は当該分野で周知の様々な方法により調製される。これらの方法としては、元の抗体の先に調製された変異体又は非変異体型のオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発が挙げられるが、これらに限定されるものではない。変異体を作製するための好ましい方法は部位特異的突然変異誘発（例えば、Kunkel（1985年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: p. 488参照）である。

30

【0121】

特定の実施態様では、抗体変異体は単に、単一の超可変領域残基が置換されたものとなる。他の実施態様では、元の抗体の2個以上の超可変領域残基が置換され、例えば、約2乃至約10個の超可変領域置換である。

【0122】

通常、生物学的性質が改善された抗体変異体は、元の抗体の重鎖又は軽鎖の何れかの可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に関する同一性又は類似性は、これらの配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入して最大の配列同一性百分率とした後の、元の抗体の残基と同一（即ち、同じ残基）又は同様（即ち、共通の側鎖特性に基づく同じグループのアミノ酸残基、上記参照）である、候補配列におけるアミノ酸残基の百分率と本明細書では定義する。可変ドメインの外側の抗体配列中へのN末端、C末端もしくは内部の伸長、欠失、又は挿入は、何れも配列同一性又は類似性に影響を及ぼすものとは見なさないものとする。

40

【0123】

抗体変異体の作製後、その分子の生物活性を元の抗体と比較して測定する。上述のように、これは、抗体の結合親和性及び/又は他の生物活性を測定するものである。本発明の好ましい実施態様では、抗体変異体のパネルを調製し、抗原又はその断片に対する結合親和性についてスクリーニングする。この最初のスクリーニングから選択した抗体変異体のうちの1種以上を任意選択的に1種以上の別の生物活性アッセイにかけて、この結合親和

50

性が増強された抗体変異体（類）が、（例えば前臨床研究に）実際に有用であることを確認する。

【0124】

このようにして選択した抗体変異体（類）は、多くの場合、抗体の目的とする用途に応じて更に修飾することができる。このような修飾は、アミノ酸配列をさらに改変し、異種ポリペプチド（単数又は複数）と融合させ、及び／又は以下に詳述するような共有結合により修飾するものである。アミノ酸配列改変については例示的な修飾を上記で詳細に説明した。例えば、抗体変異体の固有の高次構造を維持することに関与しない任意のシステイン残基を（一般にはセリンで）置換して、分子の酸化安定性を改善し異常な架橋を防止することもできる。逆に、システイン結合（単数又は複数）を抗体に付加することによって、（特に抗体がFv断片のような抗体断片である場合）その安定性を改善することができる。別のタイプのアミノ酸変異体はグリコシル化パターンが改変されたものである。これは、抗体に存在する炭水化物部分を1つ以上欠失させ、及び／又は抗体に存在しないグリコシル化部位を1つ以上加えることにより達成される。抗体のグリコシル化は、通常、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン（ここで、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）が炭水化物部分をアスパラギン側鎖に酵素的に結合させるための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、グリコシル化部位を生じさせることが可能である。O結合グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニン（但し5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた使用できる）へ糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース又はキシロースのうちの1つが結合することを意味する。抗体へのグリコシル化部位の付加は、それが上述のトリペプチド配列のうちの1つ以上を含むようにアミノ酸配列を改変することによってうまく具合に達成される（N結合グリコシル化部位の場合）。この改変は、元の抗体の配列への1個以上のセリン又はスレオニン残基の付加又は置換によって行うこともできる（O結合グリコシル化部位の場合）。

【0125】

（xii）抗体の組換え法による作製

抗体の組換え法による作製のために、これをコードする核酸を単離し、複製可能なベクター中に挿入してさらにクローニング（DNAの増幅）するか、発現させた。上記モノクロナール抗体をコードしているDNAは、容易に単離することができ、通常の手順を用いて（例えば、この抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチド・プローブを用いて）配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分としては、一般に、次のうちの1種以上が挙げられるが、これらに限定されるものではない：シグナル配列、複製起点、1種以上のマーカ遺伝子、エンハンサー配列、プロモータ、及び転写終結配列（これらは、例えば、特に引用により本明細書に組み込まれている米国特許第5,534,615号に記載されている）。

【0126】

本明細書に記載のベクター中のDNAをクローニングし又は発現させるための好適な宿主細胞は、上述の原核、酵母、又は高等真核細胞である。この目的のための好適な原核細胞としては、グラム陰性又はグラム陽性微生物（例えば、*Escherichia*属（例えば、*E. coli*）、*Enterobacter*属、*Erwinia*属、*Klebsiella*属、*Proteus*属、*Salmonella*属（例えば、*Salmonella typhimurium*）、*Serratia*属（例えば、*Serratia marcescans*）、及び*Shigella*属）などの腸内細菌科細菌並びに*Bacillus*属（例えば、*B. subtilis*及び*B. licheniformis*（例えば、1989年4月12日公開のDD266,710に開示されている*B. licheniformis* 41P））、*Pseudomonas*属（例えば、*P. aeruginosa*）及び*Streptomyces*属などの真正細菌が挙げられる。一つの好ましいE

. coli クローニング宿主は *E. coli* 294 (ATCC 31, 446) であるが、他の *E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC 31, 537) 及び *E. coli* W3110 (ATCC 27, 325) などの株も好適である。これらの例は単なる例示に過ぎず、限定的なものではない。

【0127】

原核性細胞の他に、糸状菌または酵母等の真核性微生物も、抗体コードベクターの好適なクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* 又は通常のパン酵母は、下等真核性宿主微生物の中では最も一般的に使用されている。しかしながら、*Schizosaccharomyces pombe*；例えば、*K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC 36, 906)、*K. thermotolerans* 及び *K. marxianus* などの *Kluyveromyces* 宿主；*Yarrowia* (EP 402, 226)；*Pichia pastoris* (EP 183, 070)；*Candida*；*Trichoderma reesia* (EP 244, 234)；*Neurospora crassa*；*Schwanniomyces occidentalis* などの *Schwanniomyces*；並びに、例えば *Neurospora*、*Penicillium*、*Tolypocladium*、及び *A. nidulans*、*A. niger* などの *Aspergillus* 宿主などの糸状菌のような多くの他の属、種及び株が一般的に入手可能であり、本明細書において有用である。

【0128】

グリコシル化抗体の発現のための好適な宿主細胞は多細胞生物由来である。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多くのバキュロウイルス株及び変異体とこれに対応する許容状態の昆虫宿主細胞として、*Spodoptera frugiperda* (イモ虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ) 及び *Bombyx mori* 等の宿主から細胞が特定されている。例えば *Autographa californica* NPV の L-1 変異体及び *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株等の形質移入用の多くのウイルス株が公的に入手可能であり、このようなウイルスは、本発明に従って本明細書のウイルスとして、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞の形質移入のために使用することができる。綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物培養細胞も宿主として利用することができる。

【0129】

しかしながら、最も関心が持たれているのは脊椎動物細胞であり、培養（組織培養）で脊椎動物細胞を増殖させるのは常法になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例には、SV40 により形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎細胞系 (293 または懸濁培養で増殖のためにサブクローニングされた 293 細胞、Graham ほか、*J. Gen. Virol.* 36: p. 59 (1977 年))；仔ハムスター腎細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Urlaub ほか、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: p. 4216 (1980 年))；マウスセトリ細胞 (TM4、Mather、*Biol. Reprod.* 23: p. 243-251 (1980 年))；サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト頸部腫瘍細胞 (HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)；バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞 (Hep G2、HB 8065)；マウス乳癌 (MMT 060562、ATCC CCL 51)；TRI 細胞 (Mather ほか、An

nal . N . Y . Acad . Sci . 383 : p . 44 - 68 (1982 年)) ; M R C 5 細胞 ; F S 4 細胞 ; 並びにヒト肝癌系 (Hep G 2) がある。

【 0130 】

宿主細胞は、抗体作製用の上記発現又はクローニングベクターで形質転換し、プロモータを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜改良した通常の栄養培地で培養する。

【 0131 】

本発明の抗体を作製するために用いる宿主細胞は種々の培地で培養することができる。Ham's F10 (Sigma社)、Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma社)、RPMI - 1640 (Sigma社)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Sigma社などの市販の培地がこうした宿主細胞を培養するのに適切である。さらに、Hamほか、Meth. Enz. 58 : p . 44 (1979年)、Barnesほか、Anal. Biochem. 102 : p . 255 (1980年)、米国特許第4,767,704号、同4,657,866号、同4,927,762号、同4,560,655号もしくは同5,122,469号、WO 90/03430、WO 87/00195又は米国再発行特許第30,985号に記載されている培地のいずれかを上記宿主細胞の培養培地として用いることができる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子 (例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類 (例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、緩衝剤 (例えばHEPES)、ヌクレオチド (例えば、アデノシン及びチミジン)、抗生物質 (例えば、GENTAMYCIN (商標))、微量元素 (最終濃度が通常マイクロモル範囲で存在する無機化合物として定義される) 及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者には周知であると思われる適当な濃度で含めることができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選ばれる宿主細胞に対してこれまでに用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【 0132 】

組換え法を用いた場合、上記抗体は細胞内、細胞周辺腔内で産生させ、又は直接培地内に分泌させることができる。この抗体を細胞内で産生させる場合、第一の工程として、宿主細胞又は溶解細胞のいずれであれ、粒子状デブリを、例えば、遠心分離又は限外濾過によって除去する。抗体を培地中に分泌させる場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販の蛋白質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pellicon限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の工程のいずれかに含めて、蛋白質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含ませて外来性の汚染菌の増殖を防止してもよい。

【 0133 】

こうした細胞から調製した抗体組成物は、例えばヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを用いて精製することができる。親和性クロマトグラフィーが好ましい精製法である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適切性は、この抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプによって決まる。プロテインAは、ヒト 1, 2 または 4 重鎖 (Lindmarkほか、J. Immunol. Meth. 62 : p . 1 - 13 (1983年)) に基づいている抗体を精製するために用い得る。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプ及びヒト・ガンマ3 (Gussほか、EMBO J. 5 : p . 1567 - 1575 (1986年)) に対して推奨される。親和性リガンドが結合するマトリックスは、最も一般的にはアガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。調整細孔性ガラス又はポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスによって、アガロースを用いて達成できるよりも早い流速及び短いプロセッシング時間が可能となる。上記抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX (商標) 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ.) が精製のために有用である。

イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE（商標）上でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂上でのクロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラムなど）、等電点電気泳動、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他の蛋白質精製法も、回収対象の抗体に応じて利用可能である。

【0134】

CRIgアンタゴニストの用途

遮断抗CRIg抗体及びその断片を初めとする本発明のCRIgアンタゴニストは、細胞内病原体の細胞内侵入を阻止し、及び/又は血中から病原体を除去するのに用いることができる。従って、本明細書のCRIgアンタゴニストはこのような病原体によって起こる感染症を予防し、及び/又は治療するのに用いることができる。そのような感染症としては、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV:)、A型、B型及びC型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、エプスタインバーウイルス(EBV)、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)などのウイルス疾患；Plasmodium属、Leishmania属（例えば、Leishmania major）、Schistosoma属、Trypanosoma属などの寄生生物によって起こる疾患；並びにMycobacterium属（特に、M. tuberculosis、M. leprae）、Yersinia pseudotuberculosis、Salmonella typhimurium、Listeria monocytogenes、Streptococcus属、E. coli、Staphylococcus属によって起こる感染などの細菌感染症及びCandida属、Aspergillus属、Pneumocystis cariniiによって起こるような真菌感染が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

20

【0135】

さらに、遮断抗CRIg抗体及びその断片を初めとする本発明のCRIgアンタゴニストは、補体受容体CRIgを介する赤血球又は血小板の望ましくないクリアランスを防止するのに用いることができる。その結果、本明細書のアンタゴニストは溶血性貧血及び/又は血小板減少症の予防又は治療に有用である。

【0136】

本明細書の化合物の治療用製剤は、所望の純度を有する（抗体などの）同定された化合物を、任意選択的に、生理学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences、上記文献）と混合して凍結乾燥ケーキ又は水溶液とすることにより保存用に調製する。許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに毒性がないものであり、このようなものとしては、リン酸、クエン酸及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を初めとする抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなどの蛋白質ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、リジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；及び/又はTween、Pluronic、PEGなどの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

30

40

【0137】

インビボ投与に使用される化合物は無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及びそれからの戻しの前又は後に、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0138】

治療用組成物は、滅菌アクセスポート、例えば、皮下注射針が貫通可能なストッパーを有する静脈内投与溶液バッグ又はバイアルを有する容器に入れることができる。

【0139】

投与経路は、既知の方法、例えば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内もし

50

くは病巣内経路による注射もしくは注入、局所投与又は下記のような持続放出製剤による投与によく適合する。

【0140】

脳内使用の場合、上記化合物はCNSの液リザーバ中に注入により連続的に投与することができるが、急速静注が適格である。こうした化合物は、脳室内に投与するか、そうでない場合はCNSもしくは脊髄液内に導入することが好ましい。投与はポンプなどの連続投与手段を用いて留置カテーテルによって実施することができ、又は持続放出ビヒクルの埋め込み、例えば脳内埋め込みによって投与することができる。より具体的には、上記化合物は、慢性的に埋め込んだカニューレを介して注射するか、浸透圧ミニポンプの助けを借りて慢性的に注入することができる。小チューブを介して脳室に蛋白質を送達させる皮下ポンプが利用可能である。高度に精巧なポンプは皮膚を通して補充することができ、その送達速度は外科的な介入なしに設定することができる。皮下ポンプ装置又は完全埋め込み型薬物送達装置を介する連続脳室内注入を含む好適な投与プロトコール及び送達システムの例には、Harbaugh、J. Neural Transm. Suppl. 24: p. 271 (1987年)及びDeYebenesほか、Mov. Disord. 2: p. 143 (1987年)に記載されている、アルツハイマー病患者及びパーキンソン病の動物モデルに対するドーパミン、ドーパミン作動性アゴニスト及びコリン作動性アゴニストの投与に用いられるものがある。

10

【0141】

持続放出製剤の好適な例としては、成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスが挙げられる。持続放出マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸とガンマ-エチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidmanほか、1983、Biopolymers 22: p. 547)、ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)(Langerほか、1981、J. Biomed. Mater. Res. 15: p. 167及びLanger、1982、Chem. Tech. 12: p. 98)、エチレン酢酸ビニル(Langerほか、同上)又はポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸(EP 133,988A)が挙げられる。持続放出組成物としては、自体公知の方法により調製することができる(Epsteinほか、Proc. Natl. Acad. Sci. 82: p. 3688 (1985年); Hwangほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: p. 4030 (1980年); 米国特許第4,485,045号及び同4,544,545号並びにEP 102,324A)リポソームに取り込ませた化合物が挙げられる。通常、こうしたリポソームは、小さな(約200乃至800オングストローム)単層型であり、その脂質含量は30モル%コレステロール超であるが、最適治療のために特定の割合を調整する。

20

30

【0142】

治療的に用いる活性化合物の有効量は、例えば、治療対象、投与経路及び患者の状態によって決まることになる。従って、治療専門家は、最適な治療効果を得るために必要とされるように、投薬量を力価測定し、投与経路を変更する必要があることになる。代表的な1日投与量は、上述の要因に応じて約1 µg/kg乃至最大100 mg/kg以上の範囲とすることができる。通常、臨床医は、神経機能を修復し、維持し、任意選択的に回復させる投与量が達成されるまで、活性化合物を投与することになる。この治療の経過は通常のアッセイによって容易にモニターすることができる。

40

【0143】

本発明の更なる詳細については以下の実施例によって説明するが、これらに限定されるものではない。

【実施例】

【0144】

(実施例1)

muCRIg及びhuCRIg-shortに対するモノクローナル抗体の作製

50

マウスC R I g (m u C R I g) に対するモノクローナル抗体は、免疫付着因子マウス (m u) C R I g - m F c (P U R 9 4 6 5、マウスI g G 1 のC末端F c部分に融合させたマウスC R I g) 2 μ g 含有モノホスホリル脂質A / トレハロースジコリノミコレートアジュバント (C o r i x a 社、ハミルトン、モンタナ州) をB 6 (K O) マウスJ a m 4 6 E 3 (G e n e n t e c h 社) の足蹠に11回注射することによって作製した。マウスの膝窩リンパ節をP 3 X 6 3 A g . U . 1 (A T C C # C R L - 1 9 5 7) 骨髓腫細胞と融合させた。ハイブリドーマ細胞は、m u C R I g に対する結合親和性について m u C R I g - L F H (P U R 9 0 5 2、ロイシンジッパー、フラッグ及び (8 x) ヒスチジンタグに結合させたマウスC R I g) に対してスクリーニングした。抗体産生細胞株を限界希釈法によってクローニングした。

10

【0145】

別の実験において、m u C R I g 及びh u C R I g - s h o r t に対するモノクローナル抗体を、m u C R I g - h F c (P U R 9 4 6 0、マウスI g G 1 のC末端F c部分を含むマウスC R I g) 及びh u C R I g - s h o r t - h u F c (P U R 1 0 1 2 5、ヒトI g G 1 のC末端F c部分を含むヒトC R I g 短縮型) 各2 μ g 含有モノホスホリル脂質A / トレハロースジコリノミコレートアジュバント (C o r i x a 社、ハミルトン、モンタナ州) をB 6 (K O) マウスJ a m 4 6 E 3 の足蹠に11回注射することでm u C R I g - h F c とh u C R I g - s h o r t - h u F c とを同時免疫することによって作製した。マウスの膝窩リンパ節をP 3 X 6 3 A g . U . 1 骨髓腫細胞と融合させた。ハイブリドーマ細胞は、m u C R I g、h u C R I g - s h o r t 又はこれらの両方に対する結合親和性についてm u C R I g 及びh u C R I g - s h o r t に対してスクリーニングした。抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングした。

20

【0146】

マウスC R I g - i C 3 b / C 3 b 又はヒトC R I g - i C 3 b / C 3 b 結合の遮断能に関するハイブリドーマ上清の特性を図4及び図5に示した。

【0147】

(実施例 2)

m u C R I g 及びh u C R I g - s h o r t に対するモノクローナル抗体の更なる特性の決定

抗C R I g 遮断抗体とインキュベートしたC R I g 発現C H O 細胞に対するi C 3 b 結合の障害：400,000個のC H O 細胞をこうした抗体で425分間被覆し、1×洗浄した。5 μ g / m l (27 n M) のi C 3 b を4で30分間添加した後、洗浄し、F A C S c a n で分析した。その結果は図6に示した。

30

【0148】

C R I g + 腹膜マクロファージに対するi C 3 b 結合の遮断：腹膜細胞を洗浄し、一度遠心し、1%ゼラチン、1 m M C a ⁺⁺ 及び1 m M M g ⁺⁺ (G V B ⁺⁺) を含有するペロナール緩衝液に再懸濁した。細胞を、内毒素を含まないモノクローナル抗体 (抗C R I g m A b、クローン2 H 1 及びアイソタイプ対照) と共に、又はこれなしにインキュベートした。30分間インキュベートした後、細胞を種々の濃度のA 4 8 8 標識i C 3 b (A d v a n c e d R e s e a r c h T e c h n o l o g i e s 社) とインキュベートした。次いで、細胞を (上記のように) F c R 媒介結合について遮断し、17 C 9 - A 6 4 7 及びF 4 / 8 0 - P E について染色した。C R I g ^{h i g h} F 4 / 8 0 ^{h i g h} 及びC R I g ^{n e g} F 4 / 8 0 ^{h i g h} 細胞に対する補体蛋白質の結合について評価した。その結果は図7に示した。

40

【0149】

インビトロにおけるC R I g + 腹膜マクロファージへのL i s t e r i a M o n o c y t o g e n e s 結合の障害：腹膜細胞を洗浄し、M 1 / 7 0 又は2 H 1 モノクローナル抗体と共に、又はこれなしにインキュベートした。L M - A 4 8 8 をハンクス平衡塩類溶液 (H B S S : H a n k ' s b a l a n c e d s a l t s o l u t i o n) に懸濁し、C 3 ノックアウトもしくは野生型マウス血清 (10%) と混合した後、37で30

50

分間回転させた。次いで、血清オプソニン化 LM - A 4 8 8 を RPM に添加し、ロッカで 3 7 3 0 分間混和した。細胞を氷上で冷やし、FcR 媒介結合について遮断した後、1 7 C 9 - A 6 4 7 及び F 4 / 8 0 - P E について染色した。さらに、細胞を 7 - A A D とインキュベートして死細胞及びデブリを検出した。氷上で数分間インキュベートした後に、細胞を 2 度洗浄して未結合の 7 - A A D 及び抗体を除去した。細胞を H B S S に懸濁し、1 % ホルムアルデヒドで 1 6 時間固定した後、4 色フローサイトメトリー装置を通した。その結果は図 8 に示した。

【0150】

血中からの *Listeria Monocytogenes* のクリアランスの阻害：マウスに対して、*Listeria M.* を感染させる前日に 1 4 G 8 遮断抗体 1 0 0 μ g を 2 回注射した。注射の間隔は 6 時間とした。1 日後、マウスに 2×10^7 CFU の *Listeria Monocytogenes* を感染させた。1 0 分後に採血し、脳心臓浸出物プレートで一夜増殖させたコロニーを計数することで細菌の有無を分析した。その結果は図 9 に示した。

10

【0151】

血中からの *Staphylococcus aureus* M 株のクリアランスの阻害：この実験に用いた方法は、*Listeria Monocytogenes* の代わりに 2×10^7 CFU の *Staphylococcus aureus* M 株を i . v . 注射した以外は、上記の通りとした。図 1 0 に示した結果から、試験した C R I g 遮断抗体が血中からの *Staphylococcus aureus* M 株のクリアランスを阻害することにより、肝臓の細菌負荷が低下し、心臓、脾臓及び腎臓の細菌負荷が増大することが分かる。

20

【0152】

遮断マウス C R I g 抗体による処置によって受動関節炎のマウスモデルの足腫脹が抑制される (図 1 1 A 、 B) 。動物は全て滅菌病原体除去条件下に維持し、動物実験は Genentech 社の施設内動物管理使用委員会により承認された。関節炎は 6 週令の Balb / c マウス (The Jackson Laboratory 社) に関節炎を発症させるモノクローナル抗体混合物を注射して誘発させた。簡単に言えば、マウスに抗 I I 型コラーゲン抗体 2 m g を静脈内注射し、3 日後に L P S 2 5 μ g を腹腔内注射した。抗体注射の前日に 4 m g / k g の C R I g - F c 又は g p - 1 2 0 に対する抗体 (I g G 1 アイソタイプ、対照 - F C) による処置を開始した。臨床的評点づけは、治療の種類について知らされていない訓練された要員によって実施された。

30

【0153】

マウス及びヒト C R I g の両方に結合する遮断抗体。マウス C R I g (m u C R I g) 又は短鎖及び長鎖型ヒト C R I g (h u C R I g (S) 、 h u C R I g (L)) を発現する CHO 細胞を A l e x a - 4 8 8 結合抗体と共に 4 で 2 5 分間インキュベートし、洗浄して F A C S c a n で分析した。その結果は図 1 2 に示した。

【0154】

C 3 断片とのマウス及びヒト C R I g の結合の交差遮断モノクローナル抗体による阻害。抗 C R I g 遮断抗体とインキュベートしたマウス C R I g 発現 CHO 細胞及びヒト C R I g 発現 T H P - 1 細胞に対する i C 3 b 結合の阻害：4 0 0 , 0 0 0 個の CHO 細胞又は T H P - 1 を上記抗体で 4 2 5 分間被覆し、1 x 洗浄した。5 μ g / m l (2 7 n M) i C 3 b を 4 で 3 0 分間添加した後、洗浄して F A C S c a n で分析した。その結果は図 1 3 に示した。

40

【0155】

表 1 に、マキシソーププレートに被覆された C R I g 融合蛋白質への結合、フローサイトメトリーにより観察した細胞表面の C R I g への結合及び C R I g - C 3 b / i C 3 b 相互作用の遮断に基づく C R I g 抗体の特性解析結果をまとめた。

【0156】

その後、抗 C R I g 抗体をコードする c D N A をブダペスト条約の条項に従って A m e

50

rican Type Culture Collection、10801 University Blvd.、Manassas、VA 20110 - 2209、米国 (ATCC) に寄託した。

【0157】

材料	ATCC 寄託番号	寄託日
14G8	PTA - 8298	2007年3月27日
3D10	PTA - 8299	2007年3月27日
2H1	PTA - 8300	2007年3月27日

これらの寄託は、特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則 (ブダペスト条約) に従って行った。これは、寄託日から30年間、寄託の生存可能な培養物の維持を保証する。寄託物はブダペスト条約の条項の下で、Genentech社とATCCとの間の合意を条件として、ATCC によって入手可能となり、これは、適切な米国特許が発行された時点、またはあらゆる米国または外国特許出願が公開された時点のどちらが先にきても、寄託物の培養物の子孫を、公衆が永続的に無制限に入手できることを保証する。そして、35 USC § 122 およびそれに準ずる Commissioner's rules (886 OG 683 に特に言及している 37 C. F. R. § 1.14 を含む) によって、米国特許庁長官によってその権利があると決定されたものが子孫を入手できることを保証する。本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が適切な条件下で培養されている時に死滅または失われたまたは破壊された場合、通知に基づいて直ちにもう1つの同じものと交換することに同意した。寄託した材料の入手可能性は、あらゆる政府の権威のもとでその特許法に従って授与された権利に違反して本発明を実施するライセンスとは解釈されるべきではない。

10

20

【0158】

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献は、その全体が引用により本明細書に明確に組み込まれている。

【0159】

本発明を具体的な実施態様であると考えられるものに関して説明してきたが、本発明をこのような実施態様に限定するものでないことは言うまでもない。これとは逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲の精神及び範囲内に含まれる種々の修正及び均等物を保護しようとするものである。

30

【 1 A 】

1 GAACTGAC CTGGTCTTA TGAATAGAG GCTTGAGAA TACTCTGCG TGTATGGCG ACTTACTGCG GCGTCTTACT CTGCGGACG
 GGTGAGTGG GAGGAGAT ACTATCTCT GAGCTTCTT ATGGAGGCG AGCTATGCG TGAATAGAG GAGATATGA GAGGCGCTG
 1 M G I L L G L L L L G H
 "MET"

101 CTAAAGTGG AACTATGCG GCGTCTGCT CTGAGATGG GAGAGATGG AGAGAGAT TGAAGATCT TGGTGGAG TATGAGCGG
 GATTTGAC TGTATAGAG GCGAGGATG GAGCTTGGG GCTCTTGGA ACTTTGGG TACTTTAG AGAGATGCG ATATCGGCG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L

201 TGAAGATGA CAGAGGCTG GGTGATGAG AGTGGTGA GAGTGGTGA GAGTCTTCT AGGATCTCT TGTGAGAGG ATATGGAGA
 AGTTGGAT GTGGTGGAG AGAGATCTA GAGAGATCT TGAAGATCT TGAAGATCT GAGAGAGA TGAATCTGAG AGAGATCTG TATGGATCT
 47 G G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q

301 GCGAGATGG GAGGCGCGG TGAATGAG GAGAGATCT GAGAGATG TATGCTGA ATGGAGCG GGTGAGTGG ATGAGGAGG GAGTGGAGG
 GGTATGAG GCGGCGGCGG AGTATGCT GGTGCTGA ATGGAGATCT TACTTCTGCG TACTTCTGCG TACTTCTGCG TACTTCTGCG
 80 A K Y G G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T

401 TGAAGATGA CTGAGAGG TGTATGAG AGAGATGAG TGAAGATGA GATTAAGAG CTGGTCTGCG AGAGATCTG TGTGAGAGG TGTGAGAGG
 AGATTAAGT GAGAGATCTG AGAGATCTG TGTGAGAG TGTGAGAGT ACTCTTAT CTATGATC GAGGAGAG TGTGAGAG AGAGATCTG GGTGATCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V R K I T E L R V Q K L S V S K P T V T

501 GAGTGGAG GGTATGCG TTAAGTGG GAGAGATCT GAGATGAG CTGATGCG AGCTGGCGG TGTGCTGCG ATATCTATA TTTGATATA
 GTTATGCTG GGTATGCG AGTGGAGG GGTGCTGA CTGATGAG GAGTGGAG TGAAGCGG AGAGAGGCG TGAAGATCT
 147 T G S G Y G F T V P O G M R I S L Q C A R G S P P I S Y I N Y K

FIG. 1A

【 1 B 】

601 GAGAGATCT ATATGAGG AGGAGATGA AGTATGAG CTATGATCT TACTCTGA GGTGCTGGG ATAGGAGAT GAGCTCTTA TTTCTGACT
 CTCTCTGA TATATGCG TTTGATCT TATGCTGG GATTAAGA ATGAGATCT GCGAGGAC ATGGCTGGA CTGAGATCTA TTTCTGACT
 180 G E T A G P G K S L P V F A I I L I S L C C M V V F T M A Y I M L

701 GCGAGCGCG AGTTGCTGCT TGAAGAGG AGGAGATG TGAATCTG GTGAGAGG TGTGAGAG TGTGAGAG GAGTGGAG GAGTCTGAA
 GGTGCTGCG TGAAGAGG ATGCTGCTG TGTGCTGAG ACTCTTAT GATTAAGA GAGTCTGAG AGAGATCTG AGAGATCTG
 213 A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E A P T T

801 GGTGATGA GGTGATGA GAGATCTA GGTGAGGA GGTGCTGAG TGAAGATG AGTATGAG CTATCTGA GAGAGATG CTGCGGAGG
 GGTATGAG GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 247 M T V P L K A T S T V K S S W D W T T D M D G Y L G E I S A G P G

901 AGAGAGCTG CTGCTCTG CTATGATCT CATATCTG TTTGCTGTA TGTGCTTT TACTATGCG TATATGCG TGTGCTGGA GAGTCTGAA
 TGTGCTGGA GAGAGATCT GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 280 K S L P V F A I I L I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q

1001 GAGAGATCT ATATGAGG AGGAGATGA AGTATGAG CTATGATCT TACTCTGA GGTGCTGGG ATAGGAGAT GAGCTCTTA TTTCTGACT
 CTCTCTGA TATATGCG TTTGATCT TATGCTGG GATTAAGA ATGAGATCT GCGAGGAC ATGGCTGGA CTGAGATCTA TTTCTGACT
 313 G E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F A S G C S S D

1101 ATAGAGAG TGTGAGAG GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 TACTGCTG AGAGATCT GAGTGGAG GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 347 E P T S O N L G N N Y S D E P C I G E Y Q I E A I F

1201 GGTGATGA AGAGATCTG TGAATATGA GTTCTGCG ACTGAGGGA AGAGTGTG TTAATATCG GGTATGAG GAGATCTG TGAATATG
 TGAATATG AGAGATCT GAGTGGAG GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 380 L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

1301 TGAATATG CTGAGAGG TTTGCGGGA TGGCGAGT TGTATGCG GGTATGAGT GGTATGAGT
 ATATGAGG GAGTCTGAG AGGCGGCT AGGCTGTA AGATATGAG TGAATATGA GGTATGTA TT

FIG. 1B

【 2 A 】

1 GTGAGATCG AGCTGCTG TATGAGAG AGGCTGGAG AGGAGATGA AGTATGCTG GGTGATGAG GAGTCTTACT GGTGCTCTTA CTCTGCGCG
 GAGTGGAG TGAAGAGAG ATGATATCG TGGAGCTG TTTGCTGCT TATGAGAG GAGATCTAG GGTATATGA GCGAGAGCGG GAGAGAGCGG
 1 M G I L L G L L L L G H
 "挿入は、この位置で"

101 AGTATAGAT GAGATCTAT GCGGCTGGA TCTGAGAT GCGAGATGT GTAGAGAG CTGAGAGAG GGTATGAT CTCTGCTGA CCTATAGCC
 TGAATATGA CTGTGATTA GCGGAGGCT AGAGCTCTA GGTCTCTGA GATCTGCTG GAGCTCTTG CCTATCTTA GAGAGAGAT GAGTATGCG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P

201 CTGAGAGG TGAAGAGAG TCTGATGGA GTGCTGCTA GAGTGGT GAGAGCTGT GAGATCTTT CTATGATCT CTCTGAGGA GGTATAGAG
 GAGTCTGCG ATGAGCTGCT AGAGAGATCT GAGAGATCT GGTGAGGA GGTGAGGA GATGATCTA GAGAGCTCT GGTATAGCT
 46 L G G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q

301 GAGAGATGT AGAGAGGCGG CTGATGAG AGGAGAGG TGAATGCTG CTATGAGGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 79 Q A K Y G G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T

401 GGTGATGT GAGTGGAG ACTGATGAG GAGAGATGT AGATATCTG AGATCTGCT GAGAGAGAG TGTGAGAG TGTGAGAG TGTGAGAG
 GAGATCTGA GGTGATGCT TGAAGATCT GGTGATCTA GGTGATCTA TGTATAGAG TGAAGAGGA GGTGCTGCTG AGAGATCTG ATAGCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V R D K I T E L R V Q K H S S K L L K T

501 GAGAGATG GAGTCTGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA GGTGATGA
 GTTCTGCTG GGTGATGT GGTGATGT GGTGATGT GGTGATGT GGTGATGT GGTGATGT GGTGATGT GGTGATGT
 146 K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G

FIG. 2A

【 2 B 】

601 GAGAGATG CTGCGGAG AGAGAGCTG CTGCTGCTG CTATCTCT TGTGCTGA TGTGCTTT TACTATGCG TATATATCG
 CTCTGCTAG GAGCGGCTG TTTGCTGAG GGTATGAG GTATGAGG AGAGAGAT AGAGAGAA TGTATGCG ATATATGAG
 178 E T S A G P G K S L P V F A I I L I S L C C M V V F T M A Y I M L

701 TGTGATGA GATATGGA GAGAGATG TGTAGAGG AGGAGGGA GGTGAGAG AGGAGAGGA CTCTGAGGA AGATGAGG TGGCATCT
 AGAGAGCTT CTGTAGCTT GTTCTGCT AGTATCTG TGTGCTGCT GTAGCTGCT TGTGCTGT GAGATCTT TGTATCTGCG AGGATGAA
 213 C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F

801 GCGAGATGCT TGTGATGAG ATAGGAGAG ACTATCTGA CTGCGGAGA CTGAGATCT TGAAGCTGCT ATAGAGAG GATAGAGAT CATGCGGAG
 GGTGATGAG AGAGATGAG TACTGCTG GAGGCTGCT TGTATGAGT ACTGCGGAG TATCTGCTG TATGCTGTA ATAGCTGTA GGTGATGCG
 246 A S G C S S D E P T S O N L G N N Y S D E P C I G E Y Q I I A Q

901 ATATGAGGA ACTAGCGCG CTGCTGAG AGAGTCTG TGAATATGA GTTCTGCG ACTGAGGGA AGAGTGTG TTAATATCG CCTATAGCG
 TATGATGCT TATGCTGCG GAGAGATG TGTGAGAG AGATATCT GAGAGAGG TGTGCTGCT TTTGAGAG ATTTTATGAG GGTATGCG
 278 I N G N Y A R L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

1001 GAGATCTG TGAATATG TGAATATG TGAATATG TGAATATG TGAATATG TGAATATG TGAATATG TGAATATG TGAATATG
 GGTGATGAG ACTGATGAG ATCTGATG GAGTCTGAG AGGCGGCT AGGCTGTA AGATATGAG TGAATATGA GGTATGTA
 "挿入は、この位置で"

FIG. 2B

【 3 A 】

1 GTGACATG AGCTGGTTC TATGATGCG AATTCGGCG CACTGGCGG ATGCTCTGA GATCTCGGA CCGTGGACG CCGTGGACG
 CAGTTGAGG TGGCGGAG ATACAGAC TACCGGCT GTACCGCGC TACAGATC CTAGGAGCT GAGCTGGCT GTGACGTC GTCTTCGC

101 ATGAGAGT GATGAGAGT AGCTGAGT AGCTGAGG TGTCTGAGG CTTGCTGTC GTGGCGAGC TAAATGCT GACTATGCG CAGCGAGC
 TACTCTGA CTATCTCTA TGGAGTTA TCTACTCT AGGATGTC GAGGAGAG GAGCGGCTG ATATAGGA GTGATAGCG GTGGCTGCG

102
 M E I S G L L F L G H L I V L T Y G H P T L
 A E T

201 TAAAGAGC TGAAGTGTG AGGAGAGT GAAAGAGG TGTAGAGT GAGTGTCT ATGATGCT GAGAGCTAC AGGAGATT TGTGAAATG
 ATTTTGTG ACTCTGAG TGTGCTGCT GTTCTGCT ACATCTTA GTAGATGAA TACTAGGGA CTTGCGATG TGTGTTGAA AGCATTTAC

24 K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R Q V L V K W

301 GTGTAGAA GAGCTGTC ACTGCTGAC CATCTCTGA CTTGCTGCA GTGAGAGG TATCGAGAG TATCGAGAG GAGAGTAC GAGCGGCT GAAATGAGC
 GAGCATCT GTGGCGGAG TACGAGAG GTAGAGAGT GAGCTGCT ATAGTGTG GTTGTGCT GTGGCGGAG CTTACTGCG

57 L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y R G R L K V S

401 CAGAGTGT CAGAGAGT GTGCTGCGA ATAGAGC TGAAGTGA TGAAGAGT GACTATGAT GTGAGTAC GTGAGTAC GTGAGTAC
 GTTGTGAG GTCTCTGA CAGGAGTT TATTATGCG AGTATGCT ACTGCTTA GTGATGTA CACTGATG GAGCTGATG GAGCTGATG

90 H K V P G D V S L Q I N T L O M D D R N H Y T C E V T W O T P D G N

FIG. 3A

【 3 B 】

501 AGGAGTAT AGGATATG ATATGAGC TGTGTGTG GAAATATAT CAGCTAGAA TGAATAGTA AGGAGTACA AGCTGAGT CCGTCTTGA
 TGTGTTA TCTCTATC TATGATCG AGGAGAGC CTTATATTA GGTGATCT ATATGCT TGTGATGT TGTGATGTA GAGAGAGT

124 Q V I R D K I I E L R V R K Y N P P R I N T E A P T T L H S S L E

601 AGGAGAGT ATATGAGT CTTGAGCT ATGTGATG GAAAGTGA GAGAGAT CTTGCTGAG GAGAGATGT GCGATCTTT
 TGTGTGTA TATTAAGA GTTGGAGT GAGTGTGTA TACCTGAG CTTTGAGT CCGTGTGTA GAGAGATG CCGTCTGTA GGTATGAA

157 A T T I M S S T S D L T T N O T G K L E E T I A G S G R N L P I F

701 GCGATGCT TATCATGTC CTTTGTGZ ATAGATGZ TATATGTC TGTGCTGA GAGATGTA CAGATGAT GGTATGTA
 GGTATGTA AGTATGAG GAAAGAGG TATCATGAG ATGTGATG ATATAGAG AGGAGAGT CCGTGAAG TGTCTGTA GAGATGTC

190 A I I F I I S L C C I V A V T I P Y I L F R C R T F Q G E Y V Y G V

801 TGGAGAGT GTTGGAGG AGGAGAGA ACTGTGAG AGGAGAGG GTAGTACA TGGAGTGA TGAAGTAT TGGAGTGT TATATGTA
 ACTGTGCA GAAAGTGC TGTGTGT TGGAGTGT GAGTATGT AGGATGCT ACTGTGTA AGGATGAG ACTATGCT

224 S R V F A R K T S H S E E T I R V T T I A T D E P D S Q A L I S D

901 CTATGATG GATCTGTGZ TGGCGGGA GTAGAGTA AGGATGAT GAAATGTC TATGTGTG TGTGAGAG TGTGAGAG ACTTACAG
 GATGAGTA CTGAGAGG AGTGTGTCT GATGTGTA TGTATGTA GTTGTGAG ATAGAGAG AGGATGTC TGTGAGAG TGTGAGAG TGTGAGAG

267 Y S D P C L S Q E Y Q I T I R S T M S I P A C O

1001 TCTGTGAG TGAAGAGT AGATGCTGT AATATGCG AGTATGAG CCGTATGAG CTTGTTA TTTACTAT GCTGTGAG
 AGAGAGTG ACTGTGTTA TGTAGAGA TTTTACGCG TGTGATGAG GCGATGAG GAGATGAG AATATGAG GCGAGTGT

FIG. 3B

【 3 C 】

1101 TATGTTTTC CTTGCTTTC TTCTCTTA GAGAGCTTA AGTATCTAT TATCTGCGA ATTCGCGCG CATTAGAAA TCTGTGTT GGTATGAGT
 ATGAGAG GAGCGGAGS AAGAGAGT CTTGTGAT TATAGTAG ATGAGGCT TACAGCGCG GTAAGCTTT AGGAGCGAA CGATCTTA

1201 ATACTAGT CACTGAGA AACTAGCT CTTGCTTCA CCGAGAGAA TTTCTGCT AGGCTTCA CAGCTCTT CCGAGAGA GGAATTCG
 TATGATAG GTGAGTCT TTAGTAGA GAGCGAGT GGTCTGTGT AAGAGAGA TCGCGAGT GTTAGAGGA GTTGTGCT CTTCTTAGG

1301 ATAGAGTAG AGTCTCTTA TATGCTGTC AGAGAGGTG AGTGTGTC CTAGAGCTC AGAGAGCAG ATGCTGTAG GATCTCT CTTCTCTAG
 TATGTCATC TCGAGAGT AGTACGAG TGTGTGCG TTAGTAGAG GATCTTGA TGTGTGTG TACCGAGTC CTATAGGA GAGAGATC

1401 GCGAGAGA CTTTATG ATATAGT TGTAGATTA TGAATGAT GAGATGAT TCTTGTGT TATATAG TTTATGAG ACTAGAAA
 CGGCTACT GAAATTAAC TATATGATA AGATGAT ACTAGATTA GGTATGATA AGAGAGAC AATATTAG TGTATGAT TGTATGTTT

1501 AAAAAAAAA AGCGCGCGC GCGACTCTAG AGTGAAGTG CAGTAGAGT AGAGAGTAA TACCTTGC CGCATATGCG CAGCTGTT
 TTTTTTTT TCGCGCGCG GCTGAGTC TACCTGAG TGTGCTGTA TGTGCTAT ATGAGAG GCGATAGCG GTTAGAGA

FIG. 3C

*PKS122126

iC3bとのマウスSTIgMAの結合を
遮断する抗体の評価

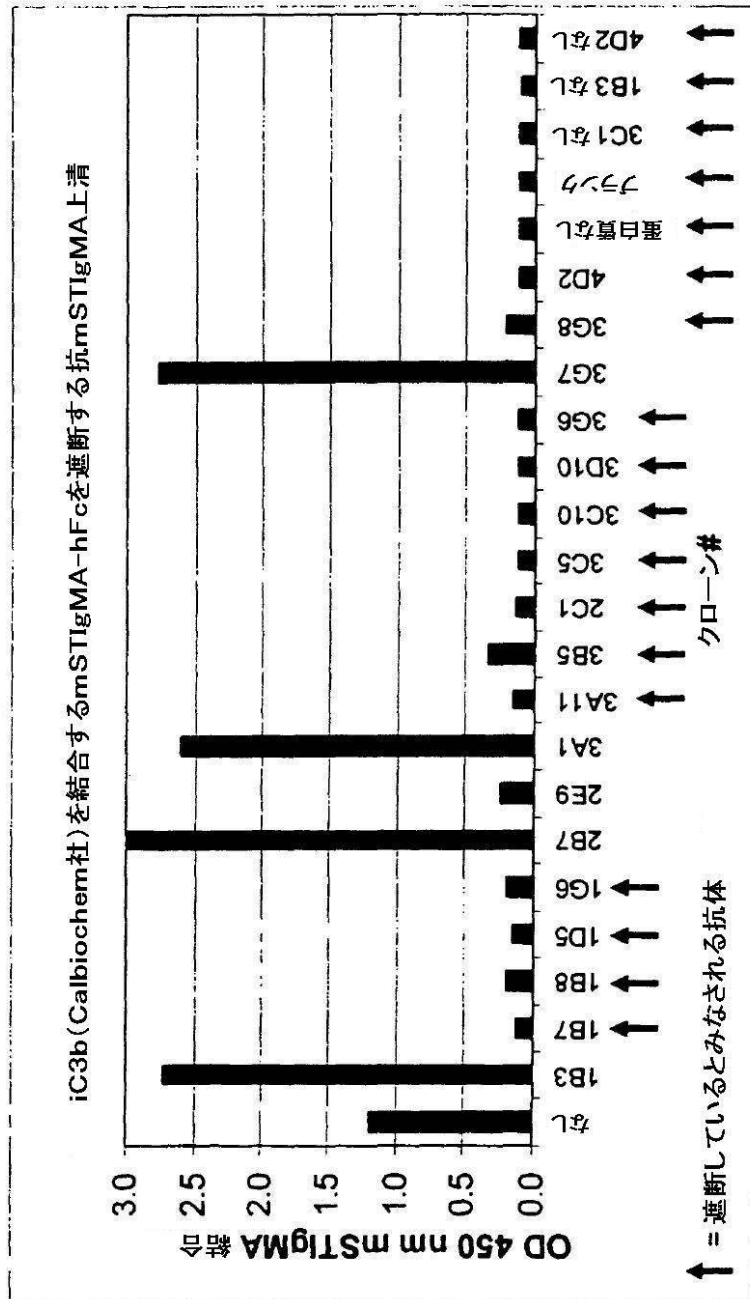


FIG. 4

iC3bとのヒトSTIgMAの結合を 遮断する抗体の評価

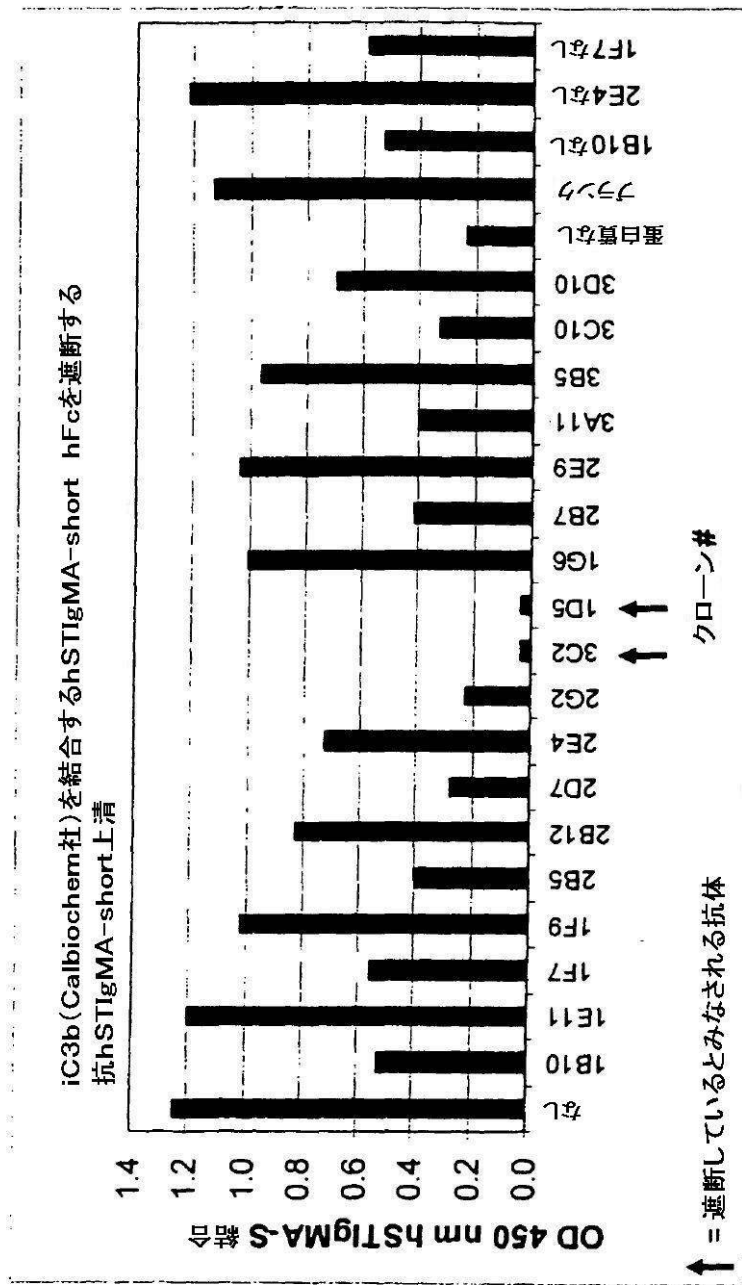


FIG. 5

【図 6】

muCRIg発現CHO細胞へのiC3b結合の mAbによる遮断

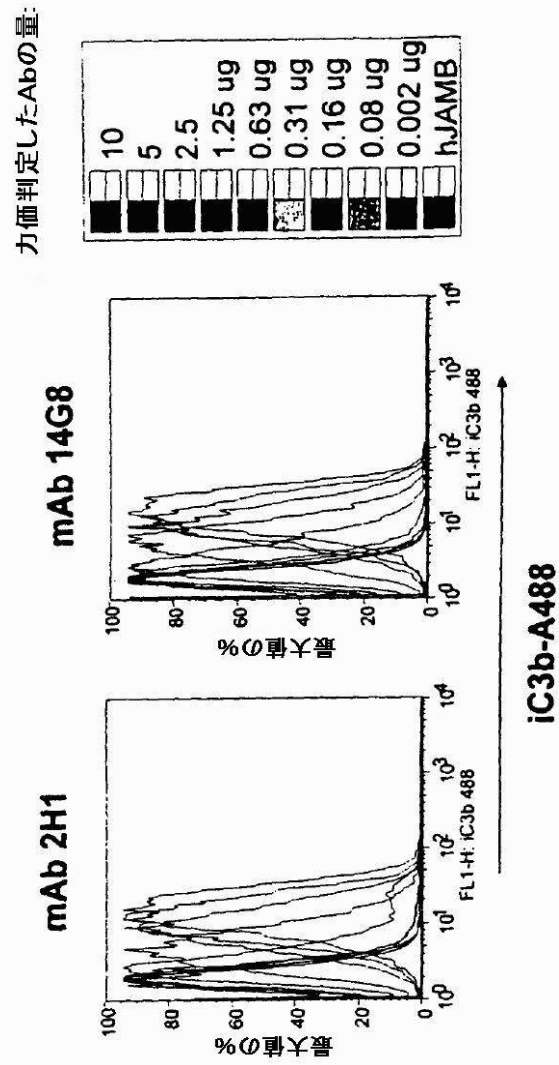
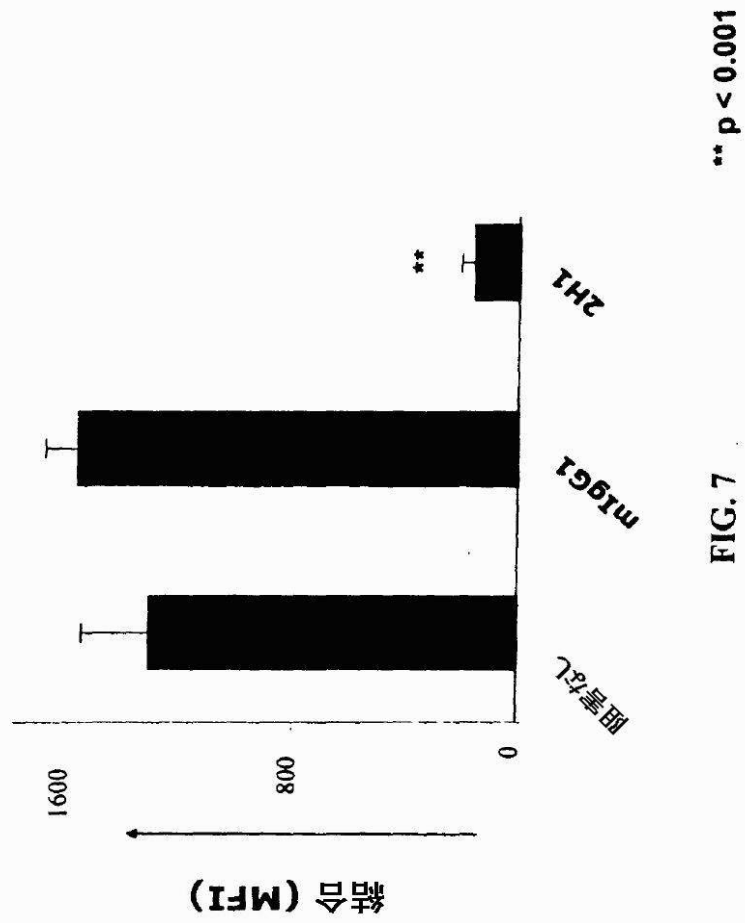


FIG. 6

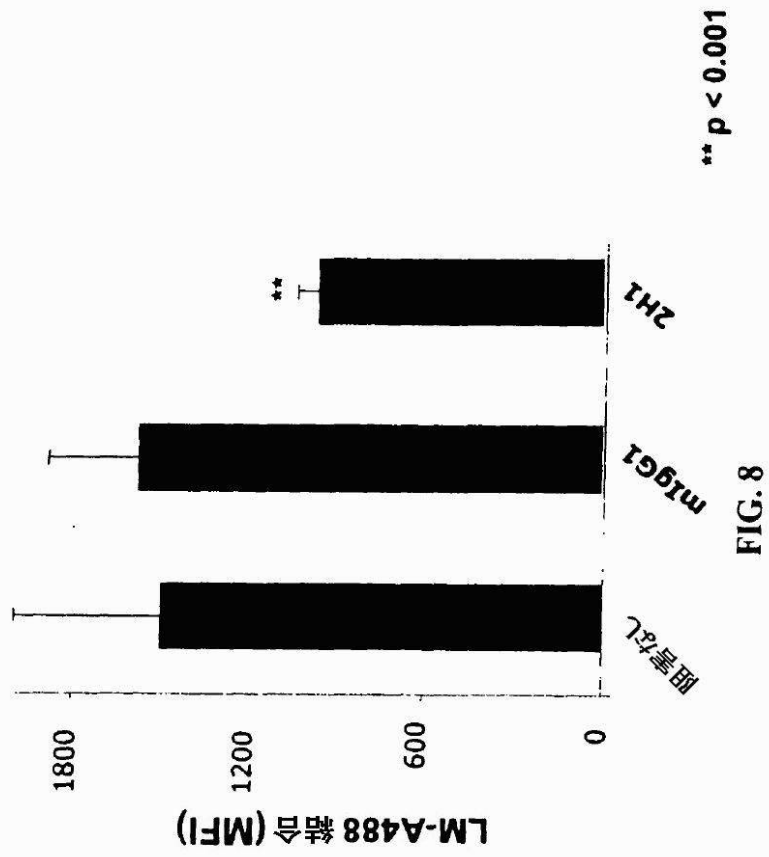
【図 7】

抗体2H1はCRIg+腹膜マクロファージ
へのiC3bの結合を遮断する



【図 8】

抗体2H1は腹膜マクロファージへのListeria
Monocytogenesの結合を遮断する



【図 9】

抗体14G8は血中からのListeria M. の
取り込みを遮断する

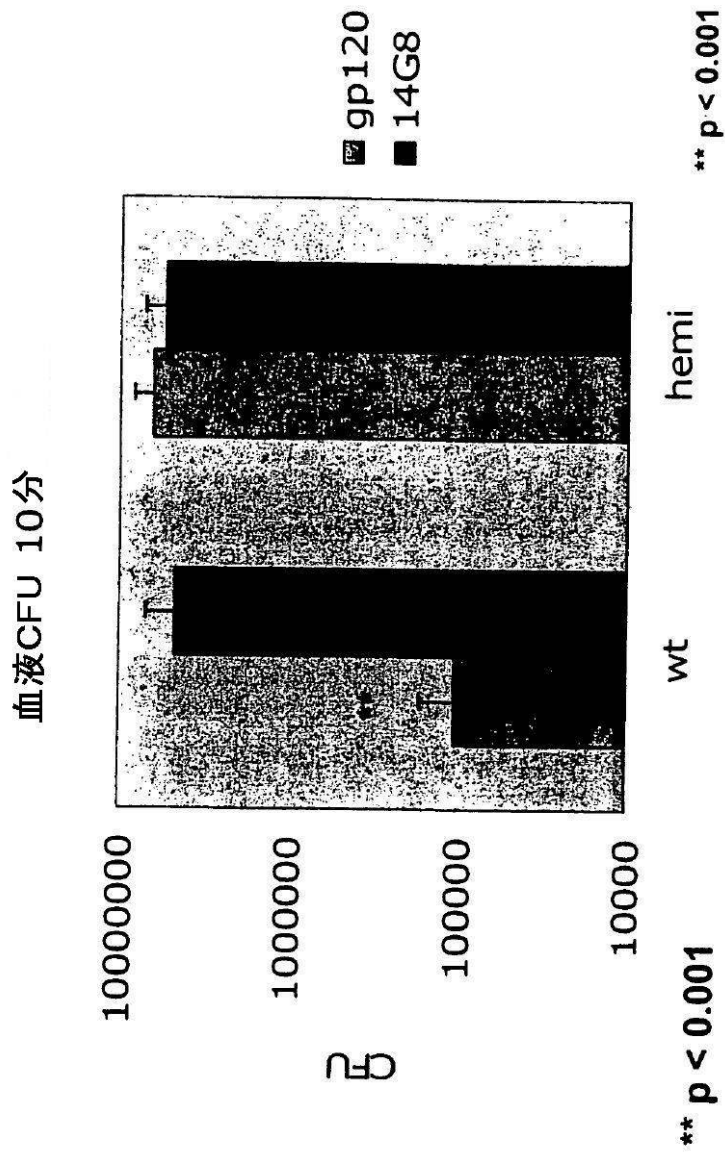


FIG. 9

【図 10】

抗体14G8は血中からのStaphylococcus
AureusM株の取り込みを遮断する

臓器から回収されたStaph. Aureus CFU - 10分
(2×10^7 用量)

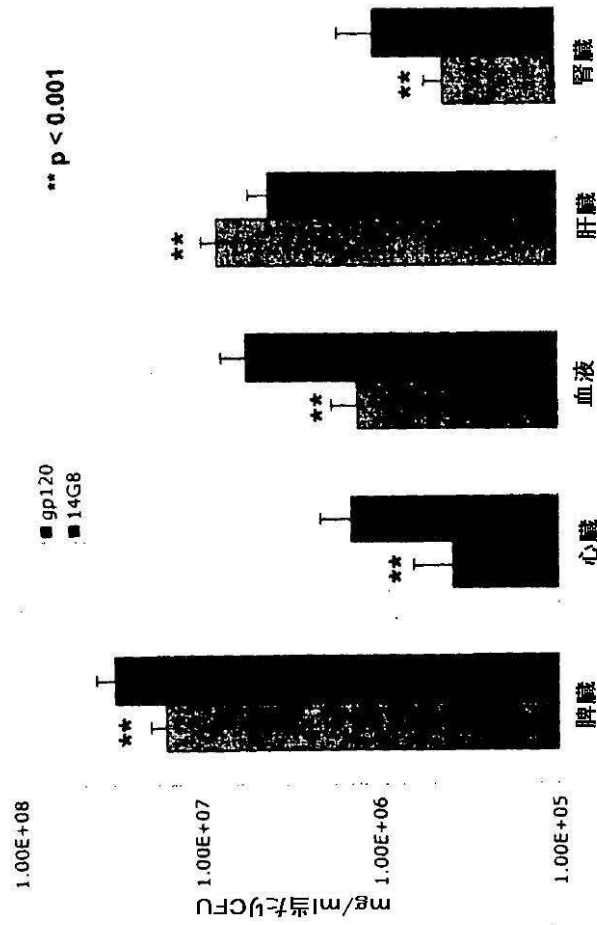


FIG. 10

【図 1 1 A】

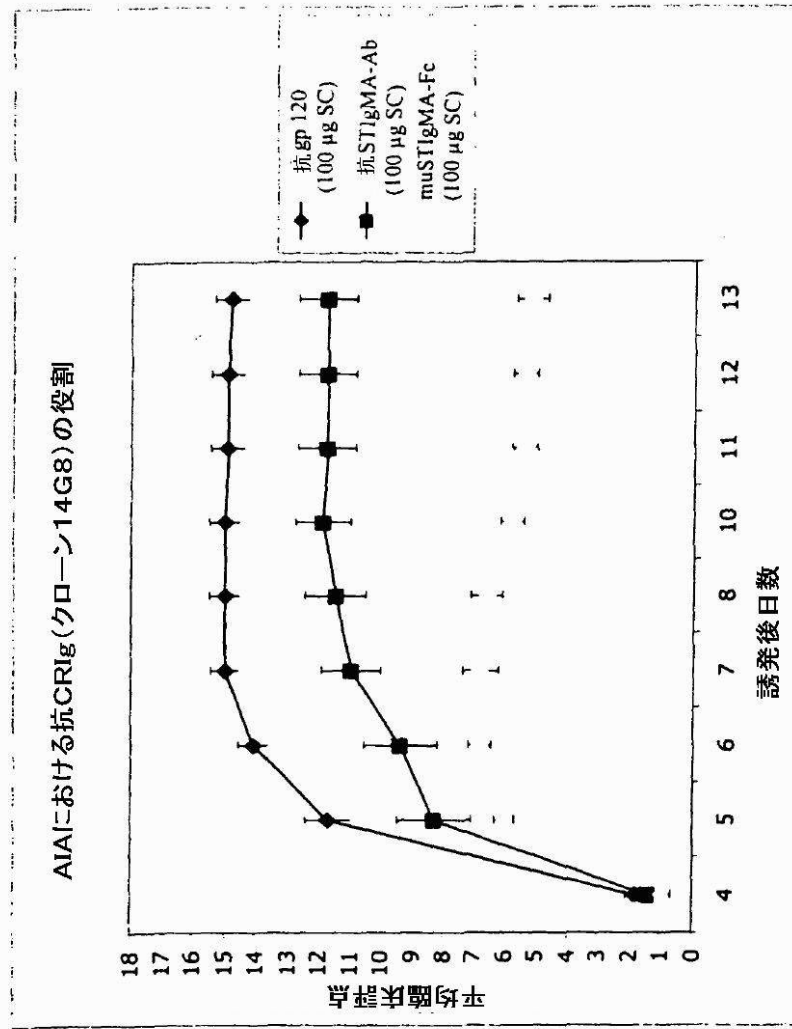


FIG. 11A

【図 11 B】

06-0385 A

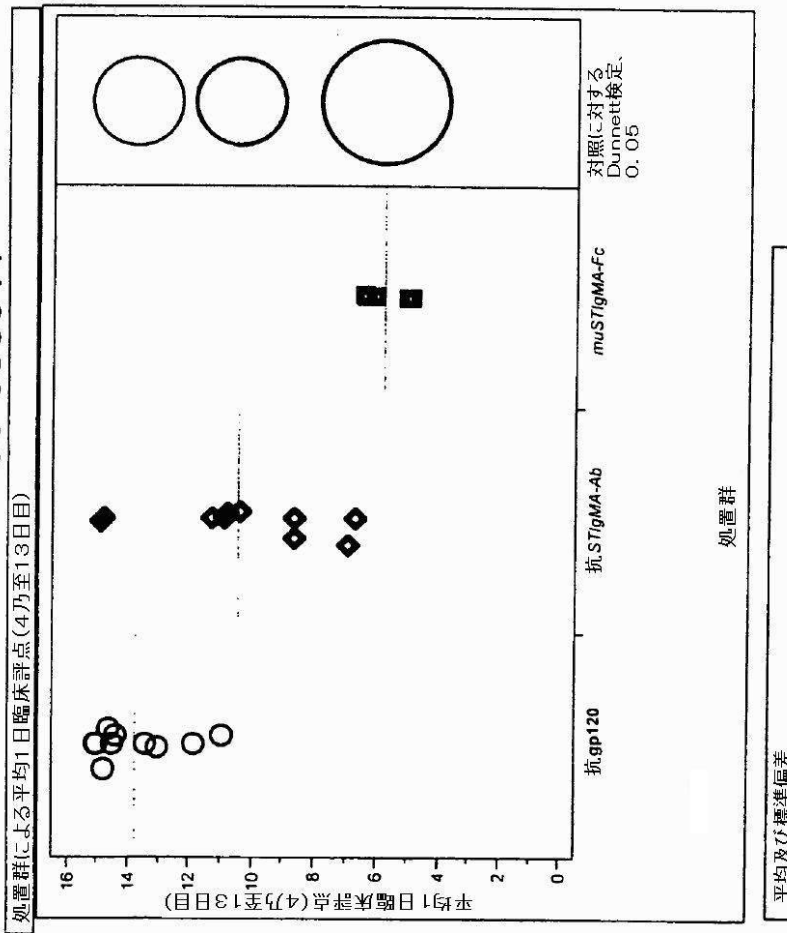


FIG. 11B

CRIg発現細胞への3D10の結合

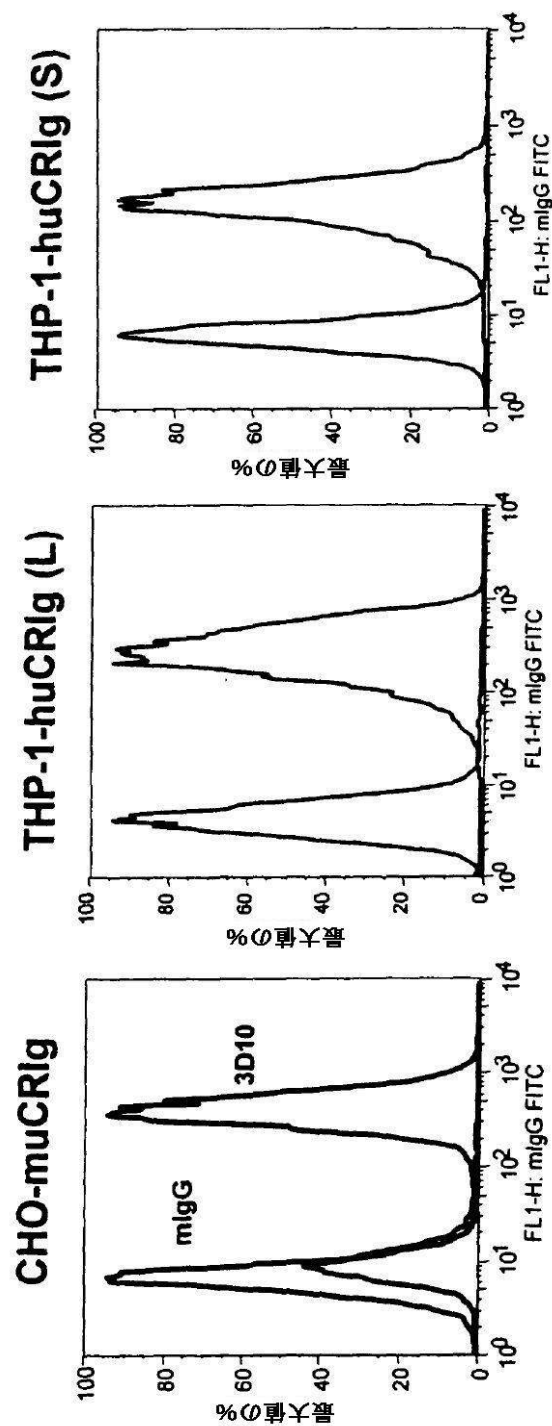


FIG. 12

【図 13 - 1】

mAb3D10はヒト及びマウスCRlgを
発現する細胞へのiC3b結合を遮断する

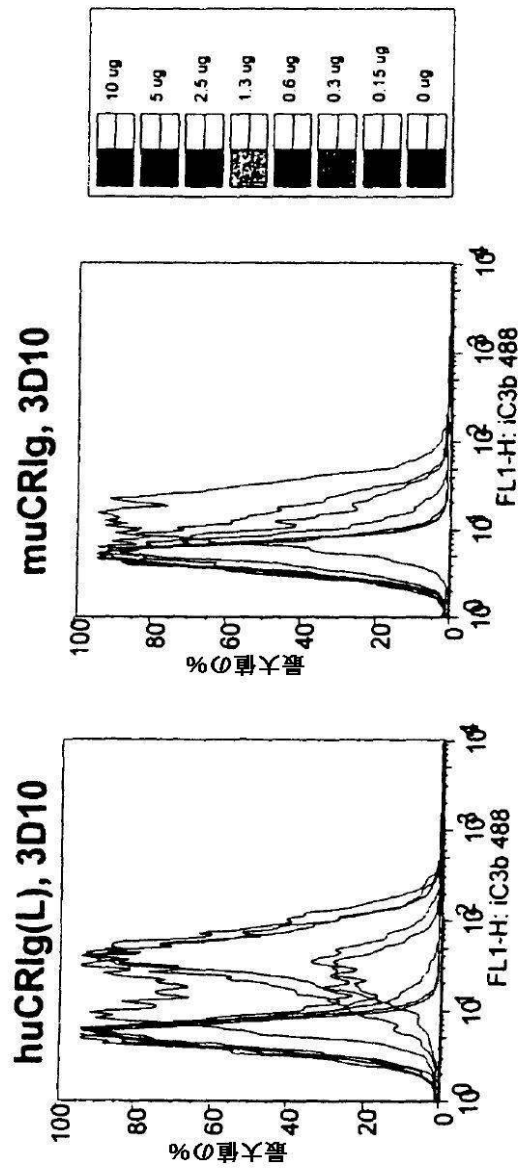


FIG. 13

【図 1 3 - 2】

抗体特性のまとめ

精製クローン	アイソタイプ	FACS mCRlg CHO	FACS hCRlg(S) THP-1	FACS hCRlg(L) THP-1	iC3b 遮断 mCRlg CHO	iC3b 遮断 hCRlg(S) THP-1	iC3b 遮断 hCRlg(L) THP-1
		mgG1	mgG1	mgG1	mgG1	mgG1	mgG1
3D10	mgG1	++	++	++	+	+	+
2H1	mgG1	++	-	-	+	-	-
14G8	mgG1	++	-	-	+	-	-

表 1

【配列表】

2010526076000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/061513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HELMY KARIM Y ET AL: "CR1g: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 124, no. 5, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 915-927, XP002471199 ISSN: 0092-8674 the whole document	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to, an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 August 2008		Date of mailing of the international search report 19/08/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kalsner, Inge

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/061513

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAMPAGNE ET AL: "Complement receptor CR1g is a selective inhibitor of the alternative pathway" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 44, no. 1-3, 30 October 2006 (2006-10-30), page 252, XP005840292 ISSN: 0161-5890 the whole document	1
A	WIESMANN CHRISTIAN ET AL: "Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK, vol. 444, no. 7116, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 217-220, XP002471200 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-27
A	VAN LOOKEREN CAMPAGNE ET AL: "F.45. CR1g Inhibits the Alternative Pathway of Complement in Mouse Models of Arthritis" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 119, 1 January 2006 (2006-01-01), page S66, XP005438367 ISSN: 1521-6616 abstract	
A	WO 2006/042329 A (GENENTECH INC [US]; ASHKENAZI AVI [US]; HELMY KARIM YUSSEF III [US]; F) 20 April 2006 (2006-04-20) examples 3,21	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2008/061513

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006042329 A	20-04-2006	AU 2005295131 A1	20-04-2006
		CA 2584293 A1	20-04-2006
		EP 1802325 A2	04-07-2007
		JP 2008515999 T	15-05-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 33/00 (2006.01)		A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)		A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)		A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)		A 6 1 P 31/20	
		A 6 1 K 39/395	N

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

(72)発明者 バン ルッカレン カンバーニュ, メンノ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 7, サンフランシスコ, モリモ ドライブ 2 6
1

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA04 DA02 GA03
4C084 AA17 NA14 ZA752 ZB332 ZB352 ZB372 ZC552
4C085 AA13 AA14 CC22 DD62 EE01
4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74