(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2017-536101
(P2017-536101A)
(43)公表日　平成29年12月7日(2017.12.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C076
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 77 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-520318 (P2017-520318)
(86)(22)出願日　平成27年10月19日 (2015.10.19)
(85)翻訳文提出日　平成29年6月13日 (2017.6.13)
(86)国際出願番号　PCT/EP2015/074178
(87)国際公開番号　WO2016/059253
(87)国際公開日　平成28年4月21日 (2016.4.21)
(31)優先権主張番号　14189374.3
(32)優先日　平成26年10月17日 (2014.10.17)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　510168852
グレンマーク　ファーマシューティカルズ，　エセ．アー．
スイス国　ツェーハー　２３００　ラ　ショー－ド－フォン，　シュマン　ド　ラ　コンベタ　５
(74)代理人　230104019
弁護士　大野　聖二
(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷　優子
(74)代理人　100114465
弁理士　北野　健
(74)代理人　100149076
弁理士　梅田　慎介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＣＲ６と結合する抗体およびその使用

(57)【要約】
本発明は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片に関する。より具体的には、本発明は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３２、配列番号１９０、配列番号２３９、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２５４または配列番号２５５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号３４、配列番号１９１、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６または配列番号２５６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３５、配列番号２４７、配列番号２４８または配列番号２５７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３６または配列番号１９２または配列番号１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３２、配列番号１９０、配列番号２３９、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２５４または配列番号２５５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号３４、配列番号１９１、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６または配列番号２５６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３５、配列番号２４７、配列番号２４８または配列番号２５７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３６または配列番号１９２または配列番号１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片。
【請求項２】
マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項１に記載の抗体またはその断片。
【請求項３】
配列番号３７、配列番号２４９または前記重鎖可変領域配列のいずれかの非ＣＤＲ領域と少なくとも８０％同一の配列からなるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含み、かつ／あるいは配列番号３８、配列番号２５１、配列番号２５３または前記軽鎖可変領域配列のいずれか１つの非ＣＤＲ領域と少なくとも８０％同一の配列のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項１に記載の抗体またはその断片。
【請求項４】
重鎖ＣＤＲの少なくとも１つおよび／または軽鎖ＣＤＲの少なくとも１つが、少なくとも１つのアミノ酸改変を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。
【請求項５】
ヒト重鎖および／または軽鎖定常領域を含み、ヒト重鎖定常領域が、ＩＧＨＧ１、非フコシル化ＩＧＨＧ１およびＩＧＨＧ４からなるヒト免疫グロブリンの群から選択される、請求項１に記載の抗体またはその断片。
【請求項６】
抗体が、全長抗体、またはＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｄ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ’）２、ｓｃＦｖ、２重特異性単鎖Ｆｖ２量体、ダイアボディ、トリアボディおよび同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合したｓｃＦｖからなる群より選択される抗体断片である、請求項１から５のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。
【請求項７】
請求項１から６のいずれか一項に記載の抗体と同じエピトープと結合する、ヒトＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片。
【請求項８】
請求項１から７のいずれか一項に記載の抗体と結合する、可溶性ヒトＣＣＲ６上のエピトープ。
【請求項９】
請求項１から５のいずれか一項に記載の抗体またはその断片をコードする単離核酸。
【請求項１０】
請求項９に記載の単離核酸を含む宿主細胞。
【請求項１１】
核酸が発現され、抗体が生成されるように、請求項１０に記載の宿主細胞を培養することを含む、ヒトＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を生成する方法。
【請求項１２】
請求項１から６のいずれか一項に記載の抗体またはその断片と、薬学的に許容される担体とを含む組成物。
【請求項１３】

治療剤に連結した請求項１から６のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲート。
【請求項１４】
医薬品として用いるための、請求項１から６のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。
【請求項１５】
関節リウマチ、多発性硬化症（ＭＳ）、乾癬、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、ループス、ＣＯＰＤ、視神経炎、加齢黄斑変性、ＳＬＥ、シェーグレン症候群、強皮症、全身性強皮症、慢性腎臓疾患、肝線維症、結核、特発性肺線維症、結核誘発性肺線維症、後腹膜線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、心内膜心筋線維症、心房性線維症、縦隔線維症、骨髄線維症（骨髄）、後腹膜線維症、進行性塊状線維症、腎原性全身性線維症、関節線維症、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、アテローム動脈硬化症、移植片拒絶、中枢神経系損傷、乾癬、白血病またはリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、アテローム動脈硬化症、肺および結腸癌からなる群から選択される疾患を処置する医薬品として用いるための、請求項１から６のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＣＣＲ６と結合する改善された抗体またはその断片に関する。より具体的には、本発明は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３２、配列番号１９０、配列番号２３９、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２５４または配列番号２５５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号３４、配列番号１９１、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６または配列番号２５６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３５、配列番号２４７、配列番号２４８または配列番号２５７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３６または配列番号１９２または配列番号１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片に関する。本発明は、特定する抗ＣＣＲ６抗体を含む医薬品および関連する物質ならびに疾患を処置するためのそれらの使用にも関する。
【背景技術】
【０００２】
ケモカインは、免疫系の恒常性および活性化に必須の化学誘引性で炎症誘発性のサイトカインのファミリーである。ケモカインは、炎症および感染の部位への免疫細胞の遊走を導く。ケモカインは、７回膜貫通型ドメインのファミリーに属する特定の細胞表面受容体である、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）と結合する。
【０００３】
ＣＣＲ６は、ＧＰＣＲスーパーファミリーのクラスＡに属するケモカイン受容体であり、ヒト樹状細胞、メモリーＴ細胞およびＢ細胞上に発現される（Ｚａｂａｌｌｏｓら、（１９９６）Ｂｉｏｃｈｅｍ＆Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍ、２２７：８４６～８５３；Ｇｒｅａｖｅｓら、（１９９７）Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ、１８６：８３７～８４４；Ｐｏｗｅｒら、（１９９７）Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １８６：８２５～８３５；Ｌｉａｏら、（１９９９）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６２：１８６～９４）。ＣＣＲ６に対する唯一知られているリガンドは、ＭＩＰ－３α、ＬＡＲＣまたはｅｘｏｄｕｓとしても知られるケモカインＣＣＬ２０である（Ｒｏｓｓｉら、（１９９７）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５８：１０３３～１０３６）。ＣＣＲ６受容体は、最初にヒトゲノムＤＮＡからオーファン受容体としてクローニングされた（Ｚａｂａｌｌｏｓら、既出）。ノーザンブロット分析により、ＣＣＲ６が、様々なヒト組織のうちで脾臓、リンパ節、胸腺、虫垂およびＰＢＭＣにおいて主に発現されることが明らかになっている（Ｂａｂａら、（１９９７）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ、２７２：１４８９３～１４８９８）。様々な白血球サブセットのうち、ＣＣＲ

６　ｍＲＮＡは、リンパ球（ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞およびＢ細胞）において検出されているが、ナチュラルキラー細胞、単球または顆粒球では検出されていない（Ｂａｂａら、既出）。ケモカインリガンド／受容体のペア、ＣＣＬ２０／ＣＣＲ６は興味深い。なぜなら、これらの分子は、恒常性および活性化の両方の機能の特徴を示し、これらの二重の特徴は、免疫応答の予備刺激およびエフェクター段階におけるＣＣＲ６の役割を示唆するからである。

【０００４】

Ｔｈ１７細胞上で発現されるので（Ｒｏｍａｇｎａｎｉ　Ｓら、（２００９）Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　４７：３～７）、ＣＣＲ６は、自己免疫性および炎症性疾患の過多、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、菌状息肉症、乾癬、慢性肝炎、歯周病、ＨＰＶ、ＩＢＤ、関節リウマチ、アレルギー性喘息、ＣＯＰＤ、遅延型過敏症、Ｂ細胞悪性腫瘍、乳腺癌、肝細胞癌、膵臓腺癌、甲状腺乳頭癌および膠芽腫に関与する。

【０００５】

研究者は、様々な方法、例えばファージディスプレイを用いて、ＣＣＲ６に対する抗体を作製しているＷＯ２０１３１８４２１８（ＭＳＭ　ＰＲＯＴＥＩＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ）。抗ＣＣＲ６抗体は、慣習的な免疫化方法を用いても作製されているＷＯ２００１０１７５５８Ａ３（ＳＣＨＥＲＩＮＧ　ＣＯＲＰＯＲＡＴＩＯＮ）。このような従来技術の抗体は全て、治療用抗体として適切になり得るために必要な特性を有していない。つまり、これらの抗体のいくつかまたは全ては、ヒトＣＣＲ６に対する結合親和性を有するが、ヒトＣＣＲ６受容体の活性を調節する能力、例えばＣＣＲ６依存性細胞遊走を防止する能力を有さないかまたは有することが示されていない。そのような従来技術の抗体は、ＣＣＲ６特異的でないので、診断用抗体として用いるために適切であることも示されていない。

【０００６】

よって、多様な免疫性および炎症性疾患および障害の処置および診断において用いることができる組成物に対して当技術分野において必要性がまだ存在する。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、全般的に、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片、それらの調製のための方法、およびＣＣＲ６媒介性障害を処置するための方法を含む使用に関する。ＣＣＲ６と結合する本発明の抗体またはその断片は、多数の望ましい特性を示し、それらに限定されないが、炎症性疾患および／または自己免疫疾患を含む様々な疾患の処置に有用であり得る。

【０００８】

一態様では、本開示は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３２、配列番号１９０、配列番号２３９、配列番号２４０、配列番号２４１または配列番号２４２のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号３４、配列番号１９１、配列番号２４４、配列番号２４５または配列番号２４６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３５、配列番号２４７、配列番号２４８または配列番号２５７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３６または配列番号１９２または配列番号１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。

【０００９】

本開示の別の態様によると、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号２４１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号２４５のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号１９１のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片が提供される。

【００１０】
さらなる態様では、本発明は、配列番号７、３７、３９、４０、４１、４２、７５、１７７、１７８、１７９、２４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。
【００１１】
好ましくは、配列番号７、３７、７５、１７７、１７８および１７９、最も好ましくは配列番号７、３７または２４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片である。
【００１２】
さらなる態様では、本発明は、ＩＧＨＶ３－１１*０４（配列番号７７）、ＩＧＨＶ３－１１*０１（配列番号７８）、ＩＧＨＶ３－４８*０３（配列番号７９）、ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）およびＩＧＨＶ３－６６*０４（配列番号８１）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。最も好ましくは、ヒト遺伝子はＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）であり、重鎖可変フレームワーク領域は、対応するマウスまたは中間抗体配列の重鎖可変領域の、対応するフレームワーク領域と比較して少なくとも１つのアミノ酸改変を含む。
【００１３】
本発明によると、中間抗体は、少なくとも１残基が元の抗体と異なる、任意のバージョンの出発抗体を意味し、特に、マウス抗体のヒト化または改善により本発明に従って作製される抗体の１または複数のことをいう。
【００１４】
さらなる態様では、本発明は、配列番号８、３８、４３、４４、４５、４６、１８１、１８２、２５０、２５１、２５２または２５３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変配列を含む抗体またはその断片を提供する。
【００１５】
好ましくは、配列番号８、３８、１８１、１８２、２５０、２５１、２５２または２５３、最も好ましくは配列番号８、３８、２５１または２５３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片である。
【００１６】
さらなる態様では、本発明は、生殖系列ＦＷ領域ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）、ＩＧＫＶ２－３０*０１（配列番号８３）、ＩＧＫＶ２Ｄ－３０*０１（配列番号８４）、ＩＧＫＶ２－２９*０２（配列番号８５）およびＩＧＫＶ２－２９*０３（配列番号８６）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。
【００１７】
さらなる態様では、本発明は、ヒト遺伝子ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む抗体またはその断片であって、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体または中間抗体配列の軽鎖可変領域の、対応するフレームワーク領域からの少なくとも１つのアミノ酸改変を含む抗体またはその断片を提供する。
【００１８】
さらなる態様では、本発明は、配列番号１０、１９、２０、２１、２２、２３、２４、１７３、１７５、１８３、１８４、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２１、２２４、２２７、２３０、２３３および２３５からなる群より選択される重鎖配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、配列番号２５、２６、２７、２８、２９、３０、１７６、１８６、１８７、１９５、１９７、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５、２１７、２１９、２２２

、２２５、２２８、２３１および２３６からなる群より選択される軽鎖配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。

【００１９】

さらなる態様では、本発明は、

（ａ）配列番号１９、２４、２１４または２１６のアミノ酸配列を含む重鎖配列と、

（ｂ）配列番号２５、３０、２１５または２１７のアミノ酸配列を含む軽鎖配列と

を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。

【００２０】

さらなる態様では、本発明は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、前記抗体が、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域を含み、前記抗体が、Ｆｃ媒介性細胞傷害活性を有さない、抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、前記抗体が、ヒトＩＧＨＧ１　Ｆｃ領域を含み、前記抗体が、抗体依存性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）などの細胞傷害作用機序について必要な能力を有する、抗体またはその断片を提供する。好ましい態様では、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片は、非フコシル化ＩＧＨＧ１　Ｆｃ領域を有し、ＡＤＣＣなどのＦｃ媒介性細胞傷害作用機序が増進している。

【００２１】

別の態様では、本発明は、ヒトＣＣＲ６と結合し、カニクイザルＣＣＲ６とも結合する交差反応性抗体またはその断片を提供する。「交差反応性抗体」は、１種、例えばヒトからの抗原と結合し、異なる種、例えばアカゲザル（Ｍａｃａｃｃａ　Ｍｕｌａｔａ）およびカニクイザル（Ｍａｃａｃｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）の対応する抗原とも結合する抗体を意味する。

【００２２】

別の態様では、本発明の開示は、対応するキメラ抗体と同様の親和性でＣＣＲ６と結合する、例えば対応するキメラ抗体のＣＣＲ６結合親和性（K_D）の少なくとも８５％を保持するか、または対応するキメラ抗体と比較した場合に少なくとも等しいかもしくはより高いＣＣＲ６結合親和性（K_D）を有する、ヒト化抗体またはその断片についても記載する。

【００２３】

別の態様では、本発明は、ＣＣＲ６を発現する細胞集団のＣＣＬ２０媒介性遊走を阻害できる、抗ＣＣＲ６抗体またはその断片にも関する。本発明者らは、驚くべきことに、本発明による抗体が、ＣＣＲ６を発現する細胞のＣＣＬ２０により媒介される走化性を阻害し、いくつかの場合では完全に抑止する、予期せぬ特性を有することを見出した。

【００２４】

別の態様では、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＣＲ６へのＣＣＬ２０結合に影響する、抗ＣＣＲ６抗体またはその断片にも関する。本発明者らは、驚くべきことに、本発明による抗体が、ＣＣＲ６とそのリガンドであるＣＣＬ２０との結合に相互作用して、リガンド受容体結合を低減し、いくつかの場合では完全に防止することを見出した。

【００２５】

別の態様では、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏでＣＣＲ６に対してアンタゴニストとして作用する、抗ＣＣＲ６抗体またはその断片にも関する。

【００２６】

別の態様では、本発明は、熱安定性が増進している、抗ＣＣＲ６抗体またはその断片にも関する。

【００２７】

本発明の開示は、ＣＣＲ６と結合する抗体およびその断片をコードする単離核酸、ベクターならびに前記核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。抗ＣＣＲ６抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む組成物、および治療剤に連結した抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートも提供される。

【００２８】

本開示は、ＣＣＲ６媒介性障害を処置するための方法も提供する。一態様では、ＣＣＬ２０誘導細胞遊走のｉｎ　ｖｉｔｒｏモデルにおいて、抗ＣＣＲ６抗体またはその断片は、ＣＣＬ２０に応答する、ＣＣＲ６を発現する細胞の遊走を効率的に抑制した。

【００２９】

本開示は、抗ＣＣＲ６抗体またはその断片と、希釈剤または賦形剤などの担体とを含む医薬組成物も提供する。

【００３０】

本開示は、抗体もしくはその断片、組成物またはイムノコンジュゲートを含む、ＣＣＲ６媒介性障害の処置のためのキットおよび製造品も提供する。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】ハイブリドーマ候補のフローサイトメトリー分析。ヒストグラムプロットは、蛍光強度の幾何平均（Ｙ軸）およびクローンＩＤ（Ｘ軸）を示す。ハイブリドーマ候補の結合は、ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞（図１Ａ）または無関係のタンパク質を発現するＢＡＦ（図１Ｂ）で評価した。

【図２】ＣＣＲ６－バイオアッセイにおけるキメラ４Ｈ１１の阻止効果の試験。　（Ａ）Ｄｉｓｃｏｖｅｒｘバイオアッセイにおけるキメラ４Ｈ１１の阻止能力の試験。この図は、キメラ４Ｈ１１を用いる機能性Ｄｉｓｃｏｖｅｒｘ　ＣＣＲ６－バイオアッセイからの結果を示す。このアッセイでは、５つの異なる濃度（２０、６．７、２、０．７および０．２μｇ／ｍｌ）にて用いたキメラ４Ｈ１１の存在下で、ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ成分を含有する細胞上でＣＣＬ２０誘導化学発光活性を測定した。相対発光単位（ＲＬＵ）のパーセンテージは、キメラＩｇＧ１アイソタイプ対照を用いる条件下での化学発光シグナルを１００％の発光活性とみなして算出した。　（Ｂ）ＣＣＬ２０誘導走化性アッセイにおけるキメラ４Ｈ１１の阻止能力の試験。この図は、キメラ４Ｈ１１を用いる機能性ＣＣＲ６依存性遊走アッセイからの結果を示す。組換えヒトＣＣＬ２０に応答する、全長ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞の遊走を、３つの異なる濃度（１０、２および０．４μｇ／ｍｌ）にて用いたキメラ４Ｈ１１の存在下で評価した、６．５ｍｍ　Ｔｒａｎｓｗｅｌｌプレートを用いる遊走アッセイである。陽性対照として、市販の抗ＣＣＬ２０抗体を１０μｇ／ｍｌにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【図３】キメラ４Ｈ１１抗体のフローサイトメトリー分析。　（Ａ）ヒト活性化末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）での染色。ヒストグラムプロットは、それぞれの試験した抗体（Ｘ軸）に対応する幾何平均蛍光強度（Ｙ軸における幾何平均）を示す。ヒトＣＣＲ６とのキメラ４Ｈ１１の結合は、抗ヒトＩｇＧ－ＰＥを用いて検出した。ヒトＣＣＲ６への市販の抗体の結合を検出するために、抗マウス－ＰＥ　２次抗体を用いた。　（Ｂ）カニクイザル末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）での染色。カニクイザルＣＣＲ６へのキメラ４Ｈ１１抗体の結合は、フローサイトメトリーにより評価した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、カニクイザルから回収した全血から単離し、2×10^5細胞を、１０μｇ／ｍｌの対照抗体またはキメラ４Ｈ１１抗体のいずれかとインキュベートした。カニクイザルＣＣＲ６への４Ｈ１１の結合は、抗ヒトＩｇＧ－ＰＥを用いて検出した。カニクイザルＣＣＲ６への市販の抗体の結合を検出するために、抗マウス－ＰＥ　２次抗体を用いた。

【図４】ヒト／マウスＣＣＲ６ハイブリッドトランスフェクタントを用いたキメラ４Ｈ１１抗体の結合領域の評価。ヒト／マウスＣＣＲ６ハイブリッド構築物へのキメラ４Ｈ１１抗体の結合は、フローサイトメトリーにより評価した。ヒト／マウスＣＣＲ６トランスフェクタントを計数し、2×10^5細胞を、１０μｇ／ｍｌのキメラ４Ｈ１１抗体とインキュベートした。４Ｈ１１の結合活性は、抗ヒトＩｇＧ－ＰＥを用いて検出した。細胞上でのヒト／マウスキメラの良好な発現を評価するために、ヒトおよびマウスＣＣＲ６を指向する２つの市販の抗体を用いた。ヒストグラムプロットは、フローサイトメトリーにより測定した蛍光強度の幾何平均（Ｙ軸）を示す。

【図５】ＣＣＲ６のＮ末端領域内のキメラ４Ｈ１１抗体のエピトープの評価。ＣＣＲ６の

Ｎ末端領域のヒト／マウスハイブリッドへのキメラ４Ｈ１１抗体の結合は、図４に示すように、フローサイトメトリーにより評価した。

【図６】細胞ＥＬＩＳＡによるヒト化抗ヒトＣＣＲ６候補の試験。ヒト化４Ｈ１１候補の結合は、ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を用いて評価した。この実験では、ＰＢＳで１μｇ／ｍｌに希釈した１００μｌのポリ－Ｄで９６ウェルプレートを予め被覆した。次の日に、細胞を洗浄し、１×１０^{6}細胞／ウェルにて播種し、様々な濃度（１０～０．０１３７μｇ／ｍｌの範囲）のヒト化４Ｈ１１候補とインキュベートし、４％ＰＦＡ中で固定した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識ヤギ抗ヒトＩｇＦｃ断片特異的－ＨＲＰを２次抗体として用いた。ＴＭＢ基質を用いて抗体結合活性を明らかにし、H_2SO_4を加えることにより反応を停止し、光学密度を４５０ｎＭ（ＯＤ４５０ｎＭ）にて読み取った。

【図７】機能性Ａｂ　Ｈｕｎｔｅｒ　ＣＣＲ６バイオアッセイにおけるヒト化４Ｈ１１抗ヒトＣＣＲ６候補の試験。ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ成分を含有する細胞を、様々な濃度（１０、３、１および０．３μｇ／ｍｌ）の、２つの異なるヒトＩｇＧ主鎖でのヒト化４Ｈ１１候補とインキュベートした。ＣＣＬ２０での細胞活性化およびＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ検出試薬の添加の後に、化学発光活性を測定した。ヒト化４Ｈ１１候補の中和活性を、最大相対発光単位（ＲＬＵ）（最大ＲＬＵは、最大刺激における光放射である）のパーセンテージを算出することにより評価した。

【図８】固定化された組換えヒトＮ末端ＣＣＲ６　Ｆｃに対する直接結合ＥＬＩＳＡ。ＣＣＲ６のヒトＮ末端断片に対するヒト化４Ｈ１１　Ｈ５Ｌ１抗体の結合を、直接ＥＬＩＳＡにより測定した。様々な濃度（１０～０．００００６μｇ／ｍｌの範囲）のＩｇＧ１およびＩｇＧ４ＨＳ主鎖でのヒト化４Ｈ１１　Ｈ５Ｌ１を、９６ウェルプレートにおいて４℃で一晩被覆した、２μｇ／ｍｌの組換えヒトＮｔｅｒＣＣＲ６－Ｆｃタグ付加タンパク質（図８Ａ）または組換えカニクイザルＮ末端ペプチドＦｃ（図８Ｂ）のいずれかとインキュベートした。Ｎｔｅｒ　ＣＣＲ６－Ｆｃタンパクへのヒト化４Ｈ１１　Ｈ５Ｌ１抗体の結合は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート抗ヒト（Ｆａｂ）’２特異的抗体により検出した。

【図９】４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳ抗体の表面プラスモン共鳴測定。この図は、Ｆｃ融合したヒト（図９Ａ）およびカニクイザル（図９Ｂ）ＣＣＲ６　Ｎ末端ペプチド上で、分析物としてヒト化４Ｈ１１（ＶＨ５／ＶＬ１）Ｆａｂ抗体を用いて測定した動的結合親和性定数（ＫＤ）を示す。データは、時間（Ｘ軸）に対する応答回数（ＲＵと省略する；Ｙ軸）として表す。

【図１０】ヒト－マウスハイブリッドＣＣＲ６トランスフェクタントを用いる遊走アッセイにおける４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳ抗体の試験。この図は、１０μｇ／ｍｌにて用いた４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳの存在下で、組換えヒトＣＣＬ２０（グラフの左部分）またはマウスＣＣＬ２０（グラフの右部分）のいずれかに応答するヒト－マウスキメラＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞の遊走を評価した、６．５ｍｍ　Ｔｒａｎｓｗｅｌｌプレートを用いる遊走アッセイからの結果を示す。対照抗体として、市販の抗マウスＣＣＬ２０抗体を１０μｇ／ｍｌにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【図１１】ＣＣＲ６をトランスフェクトした細胞を用いるフローサイトメトリーによる４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳ抗体の中和能力の試験。ＣＣＲ６をトランスフェクトした細胞を、０．１％のアジ化物を含有するＦＡＣＳ緩衝液で系列希釈（１００～０．００００１μｇ／ｍｌ）したヒト化４Ｈ１１－ＶＨ５／ＶＬ１と４℃にて２０分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、０．５μｇ／ｍｌの組換えヒトＣＣＬ２０と４℃にて２０分間インキュベートした。ＣＣＲ６と結合したＣＣＬ２０を検出するために、細胞をビオチン化ヤギ抗ヒトＣＣＬ２０とインキュベートした後に、０．１％のアジ化物を含有するＦＡＣＳ緩衝液で１／１００に希釈したアロフィコシアニン（ＡＰＣ）標識ストレプトアビジンとインキュベートした。ヒト化４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳの

阻止能力を評価するために、抗体の各濃度にてＣＣＬ２０のパーセンテージを測定した。ＣＣＲ６へのＣＣＬ２０の最大結合活性を、アイソタイプ対照について観察されるもののパーセンテージとして算出した。

【図１２】ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトした細胞を用いるフローサイトメトリーによる１価および２価フォーマットでの４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１抗体の試験。ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞への１価および２価４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１抗体の結合活性を、フローサイトメトリーにより評価した。ヒトＣＣＲ６を発現するＢＡＦ細胞を計数し、2×10^{5}細胞を、様々な濃度（３～０．０１μｇ／ｍｌの範囲）の１価または２価いずれかの４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１抗体とインキュベートした。両方の抗体の結合活性は、抗ヒトＩｇＧ－ＰＥを用いて検出した。対照として、無関係のヒトＩｇＧ抗体を３μｇ／ｍｌにて用いた。ヒストグラムプロットは、フローサイトメトリーにより測定した蛍光強度の幾何平均（Ｙ軸）を示す。

【図１３】ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトした細胞を用いる遊走アッセイにおける１価および２価フォーマットでの４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１抗体の試験。２価および１価４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１抗体の阻止能力を、６．５ｍｍ　Ｔｒａｎｓｗｅｌｌプレートを用いる遊走アッセイにおいて評価した。このアッセイでは、ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞を計数し、1×10^{5}細胞を、様々な濃度（５０～０．４μｇ／ｍｌの範囲）の１価または２価いずれかの４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１抗体の存在下で組換えヒトＣＣＬ２０とインキュベートした。対照抗体として、無関係のヒトＩｇＧ抗体を５０μｇ／ｍｌにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【図１４】ファージディスプレイライブラリーからのＶＨ５／ＶＬ１　ｓｃＦｖバリアントのオフレート解析。　図１４Ａ：ＣＤＲ－Ｈ２ライブラリーから単離したｓｃＦｖ断片。　図１４Ｂ：ＣＤＲ－Ｌ３ライブラリーから単離したｓｃＦｖ断片。

【図１５】ＣＤＲ－Ｌ１　２８および２９位でのＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢバリアントの表面プラスモン共鳴測定。この図は、分析物としてＦＡＢバリアントを用いて、Ｆｃ融合したヒトＣＣＲ６　Ｎ末端ペプチド上で測定したＳＰＲデータを示す。データは、時間（Ｘ軸）に対する応答回数（ＲＵと省略する；Ｙ軸）として表す。

【図１６】示差走査熱量測定を用いるＶＨ５／ＶＬ１　Ｌ１－Ｇ２９Ａ　ＦＡＢの熱安定性測定。データは、温度（℃；Ｘ軸）に対する過剰モル熱容量（Ｃｐ［ｋｃａｌ／ｍｏｌ／℃］と省略する；Ｙ軸）として表す。

【図１７】工学改変ＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢ断片の配列の詳細ならびに親和性および機能性試験のために用いた抗体フォーマット。

【図１８】ＳＰＲにより工学改変ＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢ断片について測定した結合定数。　図１８Ａ：ヒトおよびカニクイザルＣＣＲ６融合タンパク質に対する結合定数のまとめ。　図１８Ｂ：４つの異なる工学改変ＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢ断片の間のオフレートの比較。

【図１９】ＣＣＬ２０誘導走化性アッセイにおける親和性成熟２価および１価４Ｈ１１－ＶＨ５／ＶＬ１候補の阻止能力の試験。この図は、４つの異なる濃度（２０、６．６７、２．２および０．７５μｇ／ｍｌ）にて試験した様々な親和性成熟ＶＨ５／ＶＬ１バリアントを用いる遊走アッセイからの結果を示す。このアッセイでは、下部のチャンバに加えたＣＣＬ２０に対して応答する、ＨＴＳ　Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（登録商標）－９６透過性支持体を通しての全長ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞の遊走を、２価ＩｇＧまたは１価Ｆａｂ親和性成熟ＶＨ５／ＶＬ１候補のいずれかの存在下で評価した。対照として、非親和性成熟４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１　ｍＡｂを２０μｇ／ｍｌにて用いた。ヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照は、アッセイにおいて２０μｇ／ｍｌにて用いた。遊走は、フローサイトメータを用いて、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの上部および下部のチャンバ中の細胞を計数することにより評価した。

【発明を実施するための形態】

【００３２】

本開示は、治療剤または診断試薬の一部として用いるために適切な、ＣＣＲ６と結合する新規な抗体およびその断片に関する。

【００３３】

用語「ＣＣＲ６」は、本明細書で用いる場合、ＣＣＲ６のバリアント、アイソフォームおよび種ホモログを含む。したがって、本開示の抗体は、ヒトＣＣＲ６と結合することがあり、ヒト以外の種、例えばマウス、ラットまたはカニクイザルからのＣＣＲ６と交差反応することがある。あるいくつかの実施形態では、抗体は、１または複数のヒトＣＣＲ６タンパク質に完全に特異的であってよく、種またはその他の型の非ヒト交差反応性を示さないことがある。例示的なヒトＣＣＲ６の完全アミノ酸配列は、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｐ５１６８４（ＣＣＲ６＿ＨＵＭＡＮ；配列番号７１）を有する。ＣＣＲ６は、Ｃ－Ｃ　ＣＫＲ－６、ＣＣ－ＣＫＲ－６、ＣＣＲ－６、ＬＡＲＣ受容体、ＧＰＲ－ＣＹ４、ＧＰＲＣＹ４、ケモカイン受容体類似体３、ＣＫＲ－Ｌ３、ＤＲＹ６またはＧＰＣＲ２９としても知られる。ＣＣＲ６には、最近、ＣＤ１９６（表面抗原分類１９６）が割り当てられた。ヒトＣＣＲ６には、Ｅｎｔｒｅｚ　ＧｅｎｅによりＧｅｎｅＩＤ：１２３５、およびＨＧＮＣによりＨＧＮＣ：１６０７が割り当てられている。ＣＣＲ６は、ＣＣＲ６と表される遺伝子によりコードされ得る。例示的なマウスＣＣＲ６の完全アミノ酸配列は、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｏ５４６８９（ＣＣＲ６＿ＭＯＵＳＥ；配列番号７２）を有する。マウスＣＣＲ６には、Ｅｎｔｒｅｚ　ＧｅｎｅによりＧｅｎｅＩＤ：１２４５８が割り当てられている。例示的なラットＣＣＲ６の完全アミノ酸配列は、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｑ５ＢＫ５８（Ｑ５ＢＫ５８＿ＲＡＴ；配列番号７３）を有する。ラットＣＣＲ６には、Ｅｎｔｒｅｚ　ＧｅｎｅによりＧｅｎｅＩＤ：３０８１６３が割り当てられている。例示的なアカゲザルＣＣＲ６（ｍａｃａｃａ　ｍｕｌａｔｔａ）の完全アミノ酸配列は、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｑ８ＨＺＲ７（Ｑ８ＨＺＲ７＿ＭＡＣＭＵ；配列番号７４）を有する。アカゲザルＣＣＲ６には、Ｅｎｔｒｅｚ　ＧｅｎｅによりＧｅｎｅ　ＩＤ：５７４３３５が割り当てられている。Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔデータベースは、ｈｔｔｐ：／／ｓｗｉｓｓｍｏｄｅｌ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ、Ａｒｎｏｌｄ　Ｋら、（２００６）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２２（２）：１９５～２０１にて入手可能である。

【００３４】

本明細書における「ＣＣＲ６」の使用は、ＣＣＲ６、好ましくはヒトＣＣＲ６の全ての既知またはまだ見出されていない対立遺伝子および多型を包含する。用語「ヒトＣＣＲ６」または「ＣＣＲ６」は、本明細書において等価に用いられ、そうでないと具体的に示さないならば、「ヒトＣＣＲ６」を意味する。

【００３５】

用語「ＣＣＲ６リガンド」または「ＣＣＬ２０」は、本明細書において等価に用いられ、ヒトＣＣＲ６に対するリガンドを具体的に含む。ＣＣＬ２０は、ＣＣケモカインファミリーに属する小サイトカインであり、ＭＩＰ－３α、ＬＡＲＣまたはＥｘｏｄｕｓとしても知られる。ＣＣＬ２０は、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｐ７８５５６（ＣＣＬ２０＿ＨＵＭＡＮ；配列番号７６）を有し、Ｅｎｔｒｅｚ　ＧｅｎｅによりＧｅｎｅ　ＩＤ：６３６４が割り当てられている。ＣＣＬ２０は、いくつかの組織で発現され、最高の発現が末梢血リンパ球、リンパ節、肝臓、虫垂および胎生期肺で観察され、より低いレベルが胸腺、精巣、前立腺および腸で観察される。

【００３６】

用語「ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片」は、本明細書で用いる場合、８５０ｐＭ以下、好ましくは７００ｎＭ以下、より好ましくは３００ｎＭ以下、より好ましくは２６０ｎＭ以下、さらにより好ましくは２５０ｎＭ以下の親和性（K_D）でＣＣＲ６、例えば単離形のヒトＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を含む。

【００３７】

用語「ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片」は、抗体またはその抗原結合断片を含む。用語「拮抗性抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、本明細書において等価に用い

られ、例えば、ＣＣＲ６とそのリガンドとの結合を阻止するかもしくは結合を実質的に低減し、よって、ＣＣＲ６により引き起こされるシグナル伝達経路を阻害または低減し、かつ／あるいはＢ系列成熟、抗原駆動型Ｂ細胞分化ならびに／または炎症および免疫応答中の樹状およびＴ細胞の遊走および動員の調節のようなＣＣＲ６媒介性細胞応答を阻害または低減することにより、ＣＣＲ６の生物学的シグナル伝達活性を阻害および／または中和できる抗体を含む。

【００３８】

用語「抗体」は、本明細書で言及する場合、抗体全体およびその任意の抗原結合断片または単鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合で相互接続された少なくとも２つの重（Ｈ）鎖と２つの軽（Ｌ）鎖とを含む糖タンパク質またはその抗原結合断片のことをいう。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてＶＨと略記する）と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてＶＬと略記する）と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、ＣＬで構成される。ＶＨおよびＶＬ領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）とよばれる超可変性の領域にさらに細分化でき、ＣＤＲは、配列が超可変性であり、かつ／または抗原認識に関与し、かつ／またはより保存されたフレームワーク領域（ＦＲまたはＦＷ）とよばれる領域に散在している、構造が規定されたループを通常形成する。それぞれのＶＨおよびＶＬは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置される３つのＣＤＲおよび４つのＦＷで構成される：ＦＷ１、ＣＤＲ１、ＦＷ２、ＣＤＲ２、ＦＷ３、ＣＤＲ３、ＦＷ４。ＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３およびＦＷ４のアミノ酸配列は全て一緒に、本明細書で言及する場合、ＶＨまたはＶＬの「非ＣＤＲ領域」または「非拡張ＣＤＲ領域」を構成する。

【００３９】

用語「重鎖可変フレームワーク領域」は、本明細書で言及する場合、１または複数（例えば１、２、３および／または４つ）の重鎖フレームワーク領域配列（例えばフレームワーク１（ＦＷ１）、フレームワーク２（ＦＷ２）、フレームワーク３（ＦＷ３）および／またはフレームワーク４（ＦＷ４））を含み得る。好ましくは、重鎖可変領域フレームワークは、ＦＷ１、ＦＷ２および／またはＦＷ３、より好ましくはＦＷ１、ＦＷ２およびＦＷ３を含む。用語「軽鎖可変フレームワーク領域」は、本明細書で言及する場合、１または複数（例えば１、２、３および／または４つ）の軽鎖フレームワーク領域配列（例えばフレームワーク１（ＦＷ１）、フレームワーク２（ＦＷ２）、フレームワーク３（ＦＷ３）および／またはフレームワーク４（ＦＷ４））を含み得る。好ましくは、軽鎖可変領域フレームワークは、ＦＷ１、ＦＷ２および／またはＦＷ３、より好ましくはＦＷ１、ＦＷ２およびＦＷ３を含む。

【００４０】

重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的な補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）を含む宿主組織または因子との結合を媒介できる。

【００４１】

抗体は、定常領域により遺伝子的に決定される、アイソタイプともよばれるクラスに群分けされる。ヒト定常軽鎖は、カッパ（ＣＫ）およびラムダ（Ｃλ）軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー（μ）、デルタ（δ）、ガンマ（γ）、アルファ（α）またはイプシロン（ε）として分類され、それぞれＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡおよびＩｇＥとして抗体のアイソタイプを定義する。よって、「アイソタイプ」は、本明細書で用いる場合、それらの定常領域の化学的および抗原的特徴により定義される免疫グロブリンのクラスおよび／またはサブクラスのいずれかを意味する。既知のヒト免疫グロブリンアイソタイプは、ＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）、ＩｇＧ２（ＩＧＨＧ２）、ＩｇＧ３（ＩＧＨＧ３）、ＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）、ＩｇＡ１（ＩＧＨＡ１）、ＩｇＡ２（ＩＧＨＡ２）、ＩｇＭ（ＩＧＨＭ）、ＩｇＤ（ＩＧＨＤ）およびＩｇＥ（ＩＧＨＥ）である。いわゆるヒト免疫グロブリン偽ガンマＩＧＨＧＰ遺伝子は、配列決定されているが、スイッチ領域の変更により

タンパク質をコードしないさらなるヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子を表す（Ｂｅｎｓｍａｎａ Ｍら、（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６（７）：３１０８）。スイッチ領域が変更されているにもかかわらず、ヒト免疫グロブリン偽ガンマＩＧＨＧＰ遺伝子は、全ての重鎖定常ドメイン（ＣＨ１～ＣＨ３）およびヒンジについてのオープンリーディングフレームを有する。その重鎖定常ドメインについての全てのオープンリーディングフレームは、予測される構造特徴を有する全てのヒト免疫グロブリン定常ドメインと良好に整列されるタンパク質ドメインをコードする。このさらなる偽ガンマアイソタイプは、本明細書において、ＩｇＧＰまたはＩＧＨＧＰという。ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインイプシロンＰ１およびＰ２偽遺伝子（ＩＧＨＥＰ１およびＩＧＨＥＰ２）などの他の偽免疫グロブリン遺伝子が、報告されている。ＩｇＧクラスは、治療目的のために最も一般的に用いられている。ヒトにおいて、このクラスは、サブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含む。マウスにおいて、このクラスは、サブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ２ｃおよびＩｇＧ３を含む。

【００４２】

用語「マウス抗体」は、本明細書で用いる場合、可変領域配列および定常領域配列がマウスに由来する抗体を含む。

【００４３】

用語「キメラ抗体」は、本明細書で用いる場合、可変領域配列がある種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を含む。

【００４４】

用語「ヒト化抗体」または「ヒト化抗ＣＣＲ６抗体」は、本明細書で用いる場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体を含む。さらなるフレームワーク領域改変を、ヒトフレームワーク配列内および別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列内で作製してよい。

【００４５】

用語「Ｆａｂ」または「Ｆａｂ領域」は、本明細書で用いる場合、ＶＨ、ＣＨ１、ＶＬおよびＣＬ免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドを含む。Ｆａｂは、単離されたこの領域または全長抗体もしくは抗体断片の関係におけるこの領域のことをいうことがある。

【００４６】

用語「Ｆｃ」または「Ｆｃ領域」は、本明細書で用いる場合、第１定常領域免疫グロブリンドメインを除外した抗体の定常領域を含むポリペプチドを含む。よって、Ｆｃは、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＧの最後の２つの定常領域免疫グロブリンドメインと、ＩｇＥおよびＩｇＭの最後の３つの定常領域免疫グロブリンドメインと、これらのドメインからＮ末端側にあるフレキシブルヒンジとのことをいう。ＩｇＡおよびＩｇＭについて、Ｆｃは、Ｊ鎖を含むことがある。ＩｇＧについて、Ｆｃは、免疫グロブリンドメインであるＣガンマ２およびＣガンマ３（Ｃγ２およびＣγ３）と、Ｃガンマｌ（Ｃγｌ）とＣガンマ２（Ｃγ２）との間のヒンジとを含む。Ｆｃ領域の境界は変動し得るが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、残基Ｃ２２６またはＰ２３０をそのカルボキシル末端に含むと通常定義される（番号付けはＥＵ番号付けシステムに従う）。ヒトＩｇＧ１について、Ｆｃ領域は、本明細書において、残基Ｐ２３２をそのカルボキシル末端に含むと定義される（番号付けはＥＵ番号付けシステムに従う）（Ｅｄｅｌｍａｎ ＧＭら、（１９６９）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、６３（１）：７８～８５）。Ｆｃは、単離されたこの領域またはＦｃポリペプチド、例えば抗体の関係におけるこの領域のことをいうことがある。

【００４７】

用語「ヒンジ」または「ヒンジ領域」または「抗体ヒンジ領域」は、本明細書において、抗体の第１定常ドメインと第２定常ドメインとの間のアミノ酸を含むフレキシブルポリペプチドを含む。「ヒンジ領域」は、本明細書で言及する場合、６～６２アミノ酸長で、

ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＧのみに存在し、２つの重鎖を橋かけするシステイン残基を包含する配列領域である。構造的には、ＩｇＧ　ＣＨ１ドメインは、ＥＵ位２２０にて終了し、ＩｇＧ　ＣＨ２ドメインは、ＥＵ位２３７の残基にて開始する。よって、ＩｇＧについて、抗体ヒンジは、本明細書において、２２１位（ＩｇＧ１におけるＤ２２１）～２３１位（ＩｇＧ１におけるＡ２３１）を含むと定義される（番号付けはＥＵ番号付けシステムに従う）（Ｅｄｅｌｍａｎ　ＧＭら、既出）。

【００４８】

用語「親抗体」または「親免疫グロブリン」は、本明細書で用いる場合、バリアントを作製するために後で改変される、未改変の抗体を含む。前記親抗体は、自然に存在する抗体、または自然に存在する抗体のバリアントもしくは工学改変バージョンであり得る。親抗体は、抗体自体、親抗体を含む組成物または親抗体をコードするアミノ酸配列のことをいうことがある。「親抗ＣＣＲ６抗体」は、本明細書で用いる場合、リガンドＣＣＬ２０と結合し、バリアントを作製するために改変される抗体または免疫グロブリンを意味する。「対応するマウス抗体」は、本明細書で用いる場合、ＣＣＲ６と結合し、バリアントを作製するために改変できるマウス抗体または免疫グロブリン、具体的には本明細書で開示するマウス抗体４Ｈ１１を意味する。「対応するキメラ抗体」は、本明細書で用いる場合、ＣＣＲ６と結合し、バリアントを作製するために改変できるキメラ抗体または免疫グロブリンを意味する。

【００４９】

用語「バリアント抗体」または「抗体バリアント」は、本明細書で用いる場合、親と比較して少なくとも１つのアミノ酸改変により親抗体配列のものと異なる抗体配列を含む。バリアント抗体配列は、本明細書において、親抗体配列と好ましくは少なくとも約８０％、最も好ましくは少なくとも約９０％、より好ましくは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性を有する。抗体バリアントは、抗体自体、抗体バリアントを含む組成物または抗体バリアントをコードするアミノ酸配列のことをいうことがある。

【００５０】

核酸またはその断片に言及する場合の用語「同一性」または「実質的同一性」または「実質的に同一」は、別の核酸（またはその相補鎖）と適当なヌクレオチド挿入または欠失を有して最適に整列させた場合に、以下に論じるように、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴまたはＧＡＰなどの配列同一性の任意のよく知られているアルゴリズムにより測定される、ヌクレオチド塩基の少なくとも約８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％においてヌクレオチド配列同一性があることを示す。

【００５１】

ポリペプチドに当てはめる場合、用語「実質的類似性」または「実質的に類似」は、２つのペプチド配列が、例えばデフォルトギャップ重みを用いるプログラムＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴにより最適に整列させた場合に、少なくとも８０％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９０％、９５％、９８％または９９％の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基の位置は、保存アミノ酸置換により異なる。

【００５２】

用語「アミノ酸改変」は、本明細書において、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含む。「アミノ酸置換」または「置換」は、本明細書において、親ポリペプチド配列中の特定の位置での別のアミノ酸へのアミノ酸の置き換えを意味する。例えば、置換Ｒ９４Ｋは、バリアントポリペプチド、この場合、９４位のアルギニンがリシンで置き換えられた重鎖可変フレームワーク領域バリアントのことをいう。前出の例について、９４Ｋは、９４位でのリシンへの置換を示す。本明細書における目的のために、複数の置換は、斜線により典型的に分けられる。例えば、Ｒ９４Ｋ／Ｌ７８Ｖは、置換Ｒ９４ＫおよびＬ７８Ｖを含む２重バリアントのことをいう。「アミノ酸挿入」または「挿入」は、本明細書で用いる場合、親ポリペプチド配列中の特定の位置でのアミノ酸の付加を意味する。例えば、挿入－９４は、９４位での挿入を示す。「アミノ酸欠失」または「欠失」は、本明細書で用いる場合、親ポリペプチド配列中の特定の位置でのアミノ

酸の除去を意味する。例えば、Ｒ９４－は、９４位でのアルギニンの欠失を示す。

【００５３】

本明細書で用いる場合、用語「保存改変」または「保存配列改変」は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に著しく影響しないかまたは前記特徴を著しく改変しないアミノ酸改変のことをいうことを意図する。このような保存改変は、アミノ酸置換、挿入および欠失を含む。改変は、本発明の抗体に、部位特異的突然変異誘発およびＰＣＲ媒介突然変異誘発などの当技術分野において知られる標準的な技術により導入できる。保存アミノ酸置換は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基でアミノ酸残基を置き換えるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。よって、本発明の抗体のＣＤＲ領域内またはフレームワーク領域内の１または複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変化した抗体（バリアント抗体）を、保持された機能について試験できる。

【００５４】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原の領域のことをいう。エピトープは、構造的または機能的に定義できる。機能的エピトープは、一般的に、構造的エピトープの部分集合であり、相互作用の親和性に直接貢献する残基を有する。エピトープは、立体的であってもよく、つまり、非直鎖状アミノ酸で構成されてもよい。あるいくつかの実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基またはスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面基である決定基を有してもよく、あるいくつかの実施形態では、特異的３次元構造特性および／または特異的電荷特性を有してよい。

【００５５】

全てのヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインについて、番号付けは、「ＥＵ番号付けシステム」に従う（Ｅｄｅｌｍａｎ　ＧＭら、（１９６９）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ、６３（１）：７８～８５）。

【００５６】

ヒトカッパ免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（ＩＧＫＣ）について、番号付けは、「ＥＵ番号付けシステム」に従う（Ｅｄｅｌｍａｎ　ＧＭら、既出）。

【００５７】

ヒトラムダ免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（ＩＧＬＣ１、ＩＧＬＣ２、ＩＧＬＣ３、ＩＧＬＣ６およびＩＧＬＣ７）について、番号付けは、Ｄａｒｉａｖａｃｈ　Ｐら、（１９８７）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ、８４（２４）：９０７４～８およびＦｒａｎｇｉｏｎｅ　Ｂら、（１９８５）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ、８２（１０）：３４１５～９により記載されるように、「Ｋａｂａｔ番号付けシステム」に従う（Ｋａｂａｔ　ＥＡら、（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｅｓｔ．第５版－ＵＳ　Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ出版第９１－３２４２号）。

【００５８】

用語「可変ドメイン」は、抗原結合を媒介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義するドメインのことをいう。自然に存在する抗体では、抗原結合部位は、特異性を定義する２つの可変ドメイン（一方は重鎖（ＶＨ）中にあり、他方は軽鎖（ＶＬ）中にある）からなる。いくつかの場合では、特異性は、ラクダにおいて見出される重鎖抗体からの単一ドメイン抗体のように、２つのドメインの一方のみにもっぱら帰することがある。

Ｖ領域は、通常、約１１０アミノ酸長であり、９～１２アミノ酸長の「超可変領域」とよばれる非常に可変性のより短い領域で分けられた、１５～３０アミノ酸のフレームワーク領域（ＦＲ）とよばれる比較的不変のアミノ酸配列の連続からなる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、ループを形成する３つの超可変領域により接続されたベータシート構造を全般的に採用する４つのＦＲを含む。各鎖中の超可変領域は、ＦＲにより接近して一緒にされ、他の鎖からの超可変領域と一緒に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Ｋａｂａｔ　ＥＡら、既出を参照されたい）。用語「超可変領域」は、本明細書で用いる場合、抗原結合を担う、抗体のアミノ酸残基のことをいう。超可変領域は、配列可変性が最高であり、かつ／または抗原認識に関与する「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」からのアミノ酸残基を一般的に含む。全ての可変ドメインについて、番号付けは、Ｋａｂａｔに従う（Ｋａｂａｔ　ＥＡら、既出）。

【００５９】

いくつかのＣＤＲ定義を本明細書において用い、包含する。Ｋａｂａｔ定義は、配列可変性に基づき、最も一般的に用いられる（Ｋａｂａｔ　ＥＡら、既出）。Ｃｈｏｔｈｉａは、代わりに、構造ループの場所に言及する（Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣおよびＬｅｓｋ　ＡＭ（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～９１７）。ＡｂＭ定義は、ＫａｂａｔとＣｈｏｔｈｉａ定義との間の折衷案であり、Ｏｘｆｏｒｄ　ＭｏｌｅｃｕｌａｒのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェアにより用いられている（Ｍａｒｔｉｎ　ＡＣＲら、（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：９２６８～７２；Ｍａｒｔｉｎ　ＡＣＲら、（１９９１）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．２０３：１２１～１５３；Ｐｅｄｅｒｓｅｎ　ＪＴら、（１９９２）Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ、１：１２６～１３６；Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ　Ｍ．Ｊ．Ｅ．（編）、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ．Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、１４１～１７２中のＲｅｅｓ　ＡＲら、（１９９６））。接触による定義は最近導入され（ＭａｃＣａｌｌｕｍ　ＲＭら、（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２～７４５）、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａｂａｎｋにおいて入手可能な、入手可能な複合体構造の分析に基づく。ＩＭＧＴ（登録商標）、すなわちｔｈｅ　ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ　ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（登録商標）（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ）によるＣＤＲの定義は、全ての免疫グロブリンおよび全ての種のＴ細胞受容体Ｖ領域についてＩＭＧＴ番号付けに基づく（ＩＭＧＴ（登録商標）、ｔｈｅ　ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ　ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（登録商標）；Ｌｅｆｒａｎｃ　ＭＰら、（１９９１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２７（１）：２０９～１２；Ｒｕｉｚ　Ｍら、（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８（１）：２１９～２１；Ｌｅｆｒａｎｃ　ＭＰ（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９（１）：２０７～９；Ｌｅｆｒａｎｃ　ＭＰ（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３１（１）：３０７～１０；Ｌｅｆｒａｎｃ　ＭＰら、（２００５）Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９（３）：１８５～２０３；Ｋａａｓ　Ｑら、（２００７）Ｂｒｉｅｆｉｎｇｓ　ｉｎ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ＆Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ、６（４）：２５３～６４）。

【００６０】

本発明において論じる全ての相補性決定領域（ＣＤＲ）は、好ましくはＩＭＧＴ（登録商標）に従って定義される。これらのＣＤＲのそれぞれについての可変ドメイン残基は、以下のとおりである（番号付けは、Ｋａｂａｔ　ＥＡら、既出に従う）：ＬＣＤＲ１：２７～３２、ＬＣＤＲ２：５０～５２、ＬＣＤＲ３：８９～９７、ＨＣＤＲ１：２６～３５、ＨＣＤＲ２：５１～５７およびＨＣＤＲ３：９３～１０２。ＶＬ領域の「非ＣＤＲ領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列：１～２６（ＦＲ１）、３３～４９（ＦＲ２）、５３～８８（ＦＲ３）および９８～およそ１０７（ＦＲ４）を含む。ＶＨ領域の「非ＣＤＲ領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列：１～２５（ＦＲ１）、３６～５０（ＦＲ２）、５８～９２（ＦＲ３）および１０３～およそ１１３（ＦＲ４）を含む。

【００６１】
本発明のＣＤＲは、上記の定義に基づき、以下の可変ドメイン残基を有する「拡張ＣＤＲ」を含むことがある：ＬＣＤＲ１：２４～３６、ＬＣＤＲ２：４６～５６、ＬＣＤＲ３：８９～９７、ＨＣＤＲ１：２６～３６、ＨＣＤＲ２：４７～６５、ＨＣＤＲ３：９３～１０２。これらの拡張ＣＤＲも、Ｋａｂａｔら、既出に従って番号付けされる。ＶＬ領域の「非拡張ＣＤＲ領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列：１～２３（ＦＲ１）、３７～４５（ＦＲ２）、５７～８８（ＦＲ３）および９８～およそ１０７（ＦＲ４）を含む。ＶＨ領域の「非拡張ＣＤＲ領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列：１～２５（ＦＲ１）、３７～４６（ＦＲ２）、６６～９２（ＦＲ３）および１０３～およそ１１３（ＦＲ４）を含む。

【００６２】
用語「全長抗体」は、本明細書で用いる場合、可変および定常領域を含む抗体の自然の生物学的な形を構成する構造を含む。例えば、ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳動物では、ＩｇＧクラスの全長抗体は、４量体であり、２つの免疫グロブリン鎖の２つの同一の対からなり、各対は、１つの軽鎖および１つの重鎖を有し、各軽鎖は、免疫グロブリンドメインＶＬおよびＣＬを含み、各重鎖は、免疫グロブリンドメインＶＨ、ＣＨ１（Ｃγ１）、ＣＨ２（Ｃγ２）およびＣＨ３（Ｃγ３）を含む。いくつかの哺乳動物、例えばラクダおよびラマでは、ＩｇＧ抗体は、２つの重鎖のみからなることがあり、各重鎖は、Ｆｃ領域に付いた可変ドメインを含む。

【００６３】
抗体断片は、それらに限定されないが、（ｉ）Ｆａｂ’およびＦａｂ’－ＳＨを含む、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなるＦａｂ断片、（ｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｉｉ）単一抗体のＶＬおよびＶＨドメインからなるＦｖ断片；（ｉｖ）単一可変領域からなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ　ＥＳら、（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ、３４１：５４４～５４６）、（ｖ）２つの連結されたＦａｂ断片を含む２価断片であるＦ（ａｂ’）２断片、（ｖｉ）ＶＨドメインとＶＬドメインとが、２つのドメインが会合して抗原結合部位を形成できるようにするペプチドリンカーで連結された単鎖Ｆｖ分子（ｓｃＦｖ）（Ｂｉｒｄ　ＲＥら、（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４２：４２３～４２６；Ｈｕｓｔｏｎ　ＪＳら、（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８５：５８７９～８３）、（ｖｉｉ）２重特異性単鎖Ｆｖ２量体（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０９９６５）、（ｖｉｉｉ）遺伝子融合により構築された多価または多重特異性断片である「ダイアボディ」または「トリアボディ」（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ　ＩおよびＨｏｌｌｉｎｇｅｒ　Ｐ（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３２６：４６１～７９；ＷＯ９４／１３８０４；Ｈｏｌｌｉｇｅｒ　Ｐら、（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：６４４４～４８）および（ｉｘ）同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合されたｓｃＦｖ（Ｃｏｌｏｍａ　ＭＪおよびＭｏｒｒｉｓｏｎ　ＳＬ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５（２）：１５９～１６３）を含む。

【００６４】
用語「エフェクター機能」は、本明細書で用いる場合、抗体Ｆｃ領域とＦｃ受容体またはリガンドとの相互作用に起因する生化学的事象を含む。エフェクター機能は、ＡＤＣＣ（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用）およびＡＤＣＰ（抗体依存性細胞媒介性食作用）などのＦｃγＲ媒介性エフェクター機能、ならびにＣＤＣ（補体依存性細胞傷害作用）などの補体媒介性エフェクター機能を含む。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃ受容体または補体成分などのエフェクター分子についての抗体の親和性を変更、すなわち増進または低減、好ましくは増進することにより変更できる。エフェクター機能は、１または複数の細胞ベースまたはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイを用いて決定できる。このようなアッセイは、抗体に対する細胞の応答、例えば細胞生存、細胞死、細胞形態の変化または天然遺伝子もしくはレポーター遺伝子の細胞発現などの転写活性化をモニタリングすることを頻繁に含む。例えば、このようなアッセイは、ＡＤＣＣ、ＡＤＣＰまたはＣＤＣを誘発する抗体の能

力を測定してよい。いくつかのアッセイについて、標的細胞に加えて追加の細胞または構成要素、例えば血清補体または末梢血単球（ＰＢＭＣ）、ＮＫ細胞、マクロファージなどのようなエフェクター細胞を加えることが必要になることがある。エフェクター機能の増強は、変更された抗体のエフェクター機能を対照抗体と比較し、例えば、１または複数の上記のアッセイにより測定されるＡＤＣＣ、ＡＤＣＰまたはＣＤＣの増加を検出することにより決定できる。

【００６５】

結合親和性は、エフェクター分子結合部位を改変することにより一般的に変動され、この場合、対象の部位を置き、前記部位の少なくとも一部を適切な方法で改変することが適当である。エフェクター分子についての抗体の結合部位における変更は、全体的な結合親和性を著しく変更する必要はないが、相互作用の幾何学的配置を変更して、非生産的結合におけるようにエフェクター機序を無効にすることも構想される。エフェクター分子結合に直接関与しないがエフェクター機能の性能に関与する部位を改変することにより、エフェクター機能を変更することもさらに構想される。抗体のエフェクター機能を変更することにより、免疫応答の様々な態様を制御すること、例えば免疫系の様々な反応を増進または抑制することが可能になり、診断および治療において有益な効果を有する可能性がある。

【００６６】

本明細書で用いる場合、用語「ＣＣＲ６媒介性障害」は、なかでも関節リウマチ、多発性硬化症（ＭＳ）、乾癬、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、ループス、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、視神経炎、加齢黄斑変性、ＳＬＥ、シェーグレン症候群、強皮症、全身性強皮症、慢性腎臓疾患、肝線維症、結核、特発性肺線維症、結核誘発性肺線維症、後腹膜線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、心内膜心筋線維症、心房性線維症、縦隔線維症、骨髄線維症（骨髄）、後腹膜線維症、進行性塊状線維症、腎原性全身性線維症、関節線維症、炎症性腸疾患（例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病）、アテローム動脈硬化症、移植片拒絶、中枢神経系損傷、乾癬、白血病またはリンパ腫（例えば慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ））、アテローム動脈硬化症ならびに肺および結腸癌を含むがんならびに炎症性疾患および／または自己免疫疾患のような状態を含む。

【００６７】

本明細書で用いる場合、用語「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。好ましくは、対象はヒトである。

【００６８】

抗ＣＣＲ６抗体

第１の態様では、本発明は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３２、配列番号１９０、配列番号２３９、配列番号２４０、配列番号２４１、配列番号２４２、配列番号２５４または配列番号２５５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号３４、配列番号１９１、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４６または配列番号２５６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、および／または配列番号３５、配列番号２４７、配列番号２４８または配列番号２５７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および／または配列番号３６または配列番号１９２または配列番号１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。

【００６９】

本発明の第１の態様に従って、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２４１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、および配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、ならびに／あるいは配列番号２４５のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号２４８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２、および配列番号１９２または配列

番号１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片が提供される。

【００７０】

本発明のこの態様に従って、本発明は、本開示の様々な態様において詳細に説明する重鎖および軽鎖ＣＤＲを含む抗ＣＣＲ６抗体にも関する。

【００７１】

好ましくは、抗体またはその断片は、ヒトＣＣＲ６と結合し、マウスまたはラットまたはカニクイザルＣＣＲ６と交差反応性である。

【００７２】

ＣＤＲ１および／またはＣＤＲ２ドメイン（複数可）とは独立してＣＤＲ３ドメイン単独で同族抗原についての抗体の結合特異性を決定できること、および同じ結合特異性を有する複数の抗体を、共通のＣＤＲ３配列に基づいて予想通りに作製できることが当技術分野においてよく知られている。例えばＫｌｉｍｋａ Ａら、（２０００）Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、８３（２）：２５２～２６０（マウス抗ＣＤ３０抗体Ｋｉ－４の重鎖可変ドメインＣＤＲ３のみを用いるヒト化抗ＣＤ３０抗体の生成について記載している）；Ｂｅｉｂｏｅｒ ＳＨら、（２０００）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９６：８３３～８４９（親マウスＭＯＣ－３１抗ＥＧＰ－２抗体の重鎖ＣＤＲ３配列のみを用いる組換え上皮糖タンパク質－２（ＥＧＰ－２）抗体について記載している）；Ｒａｄｅｒ Ｃら、（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ、９５：８９１０～８９１５（マウス抗インテグリンαｖβ３抗体ＬＭ６０９の重鎖および軽鎖可変ＣＤＲ３ドメインを用いる一連のヒト化抗インテグリンαｖβ３抗体であって、それぞれのメンバー抗体が、ＣＤＲ３ドメインの外側に異なる配列を含み、親マウス抗体と同じエピトープに、親マウス抗体と同等以上の親和性で結合できる抗体について記載している）；Ｂａｒｂａｓ Ｃら、（１９９４）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１６：２１６１～６２（ＣＤＲ３ドメインが抗原結合に最も著しく寄与することを開示する）を参照されたい。

【００７３】

したがって、本発明は、１または複数の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインを含む、特に配列番号３３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３および／または配列番号３６、１９２または１９３のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体およびその断片であって、抗体がＣＣＲ６と結合できる、抗体およびその断片を提供する。いくつかの実施形態では、非ヒト抗体からの１または複数の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインを含むこのような発明の抗体は、対応する親非ヒト抗体、例えばマウス抗体と（ａ）結合について競合でき、（ｂ）前記抗体の機能的特徴を保持し、（ｃ）前記抗体と同じエピトープと結合し、かつ／または（ｄ）前記抗体と同様の結合親和性を有する。

【００７４】

さらなる態様では、本発明は、配列番号７、３７、３９、４０、４１、４２、７５、１７７、１７８、１７９および２４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含むＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号８、３８、４３、４４、４５、４６、１８１、１８２、２５０、２５１、２５２または２５３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。いくつかの実施形態では、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片は、配列番号３７または２４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列と、配列番号３８または２５０、２５１、２５２または２５３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列とを含む。好ましくは、抗体またはその断片は、ヒトＣＣＲ６と結合し、カニクイザルＣＣＲ６と交差反応性である。

【００７５】

別の態様では、本発明は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片のバリアントを提供する。よって、本発明は、重鎖または軽鎖のいずれかの親抗体の重鎖および／または軽鎖可変領域配列の、例えばそれぞれ配列番号７、３７、３９、４０、４１、４２、７５、１

７７、１７８、１７９、２４９または配列番号８、３８、４３、４４、４５、４６、１８１、１８２、２５０、２５１、２５２または２５３におけるような重鎖および軽鎖可変領域配列のいずれかの、非ＣＤＲ領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一である（少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する）重鎖および／または軽鎖可変領域配列の非ＣＤＲ領域のアミノ酸配列を有する、抗体またはその断片を提供する。重鎖または軽鎖のいずれかの親抗体の重鎖および／または軽鎖可変領域配列の非拡張ＣＤＲ領域のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖および／または軽鎖可変領域配列の非拡張ＣＤＲ領域のアミノ酸配列を有する抗体またはその断片も、本発明により提供される。重鎖および／または軽鎖可変領域配列の非ＣＤＲ領域または非拡張ＣＤＲ領域のアミノ酸配列同一性は、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％、特に９６％、より特には９７％、さらにより特には９８％、最も特には９９％であり、例えば８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％および１００％を含む。アミノ酸配列に関する同一性または相同性は、本明細書において、配列を整列させ、必要であればギャップを導入して最大限のパーセント配列同一性を達成した後の、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。よって、配列同一性は、２つのポリペプチドのアミノ酸の位置の類似性を比較するために一般的に用いられる標準的な方法により決定できる。ＢＬＡＳＴまたはＦＡＳＴＡなどのコンピュータプログラムを用いて、２つのポリペプチドを、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な一致のために整列させる（一方もしくは両方の配列の全長にわたって、または一方もしくは両方の配列の予め決定された部分にわたって）。これらのプログラムは、デフォルトのオープニングペナルティおよびデフォルトのギャップペナルティを提供し、ＰＡＭ２５０（標準的スコア行列；Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、第５巻、補遺３号中のＤａｙｈｏｆｆ ＭＯら、（１９７８）を参照されたい）などのスコア行列をコンピュータプログラムとともに用いることができる。例えば、パーセント同一性は、同一の一致の総数に１００を乗じ、一致したひと続き内の長いほうの配列の長さと、２つの配列を整列させるために長いほうの配列に導入したギャップの数との和で除することにより算出できる。

【００７６】

いくつかの実施形態では、本開示は、よって、配列番号７７、７８、７９、８０、８１のフレームワーク領域配列と少なくとも６５％同一である重鎖可変フレームワーク領域配列ならびに／または配列番号８２、８３、８４、８５、８６のフレームワーク領域配列と少なくとも７５％同一である軽鎖可変フレームワーク領域配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号８０のフレームワーク領域配列と少なくとも７５％同一である重鎖可変フレームワーク領域配列ならびに／または配列番号８２のフレームワーク領域配列と少なくとも８２％同一である軽鎖可変フレームワーク領域配列を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。

【００７７】

別の態様では、本発明は、上記の重鎖および軽鎖ＣＤＲを含み、ＩＧＨＶ３－１１*０４（配列番号７７）、ＩＧＨＶ３－１１*０１（配列番号７８）、ＩＧＨＶ３－４８*０３（配列番号７９）、ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）およびＩＧＨＶ３－６６*０４（配列番号８１）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域をさらに含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。重鎖可変フレームワーク領域は、これらのヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する１または複数（例えば１、２、３および／または４つ）の重鎖フレームワーク領域配列（例えばフレームワーク１（ＦＷ１）、フレームワーク２（ＦＷ２）、フレームワーク３（

ＦＷ３）および／またはフレームワーク４（ＦＷ４））を含むことがある。好ましくは、重鎖可変領域フレームワークは、ＩＧＨＶ３－１１*０４（配列番号７７）、ＩＧＨＶ３－１１*０１（配列番号７８）、ＩＧＨＶ３－４８*０３（配列番号７９）、ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）およびＩＧＨＶ３－６６*０４（配列番号８１）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来するＦＷ１、ＦＷ２および／またはＦＷ３、より好ましくはＦＷ１、ＦＷ２およびＦＷ３を含む。重鎖フレームワーク領域配列は、本明細書で用いる場合、ＦＷ１（１位～２５位）、ＦＷ２（３６位～４９位）、ＦＷ３（６６位～９４位）およびＦＷ４（１０３位～１１３位）（ここで、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔに規定されている番号付けシステムを利用して示されている）を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号１０、１７３、１７５、１８３、１８４、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、２２１、２２４、２２７、２３０、２３３および２３５のアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む抗体またはその断片であって、その重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも１つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

【００７９】

好ましくは、アミノ酸改変は、２４位、４９位および６２位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含む（ここで、各群メンバーのアミノ酸位置は、Ｋａｂａｔ番号付けに従って示されている）。

【００８０】

別の態様では、本発明は、ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）、ＩＧＫＶ２－３０*０１（配列番号８３）、ＩＧＫＶ２Ｄ－３０*０１（配列番号８４）、ＩＧＫＶ２－２９*０２（配列番号８５）、ＩＧＫＶ２－２９*０３（配列番号８６）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。軽鎖可変領域フレームワーク領域は、これらのヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する１または複数（例えば１、２、３および／または４つ）の軽鎖フレームワーク領域配列（例えばフレームワーク１（ＦＷ１）、フレームワーク２（ＦＷ２）、フレームワーク３（ＦＷ３）および／またはフレームワーク４（ＦＷ４））を含むことがある。好ましくは、軽鎖可変領域フレームワークは、ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）、ＩＧＫＶ２－３０*０１（配列番号８３）、ＩＧＫＶ２Ｄ－３０*０１（配列番号８４）、ＩＧＫＶ２－２９*０２（配列番号８５）、ＩＧＫＶ２－２９*０３（配列番号８６）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来するＦＷ１、ＦＷ２および／またはＦＷ３、より好ましくはＦＷ１、ＦＷ２およびＦＷ３を含む。軽鎖フレームワーク領域配列は、本明細書で用いる場合、ＦＷ１（１位～２３位）、ＦＷ２（３５位～４９位）、ＦＷ３（５７位～８８位）およびＦＷ４（９８位～１０８位）（ここで、アミノ酸の位置は、Ｋａｂａｔに規定されている番号付けシステムを利用して示されている）を含む。

【００８１】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト遺伝子ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む抗体またはその断片であって、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも１つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

【００８２】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号３０、１７６、１８６、１８７、１９５、１９７、１９９、２０１、２０３、２０５、２０７、２０９、２１１、２１３、２１５

、２１７、２１９、２２２、２２５、２２８、２３１および２３６のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む抗体またはその断片を提供する。あるいはその代わりに、軽鎖配列の軽鎖可変フレームワーク領域は、対応するマウス抗体の対応する軽鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも１つのアミノ酸改変を含む。

【００８３】

アミノ酸改変は、３６位および４６位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含んでよい（ここで、各群メンバーのアミノ酸位置は、Ｋａｂａｔ番号付けに従って示されている）。

【００８４】

特に好ましくは、いずれのアミノ酸改変も有さない配列番号３０、２１１または２１３のアミノ酸配列を含む軽鎖配列である。

【００８５】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片は、ＩＧＨＶ３－１１*０４（配列番号７７）、ＩＧＨＶ３－１１*０１（配列番号７８）、ＩＧＨＶ３－４８*０３（配列番号７９）、ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）およびＩＧＨＶ３－６６*０４（配列番号８１）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域と、ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）、ＩＧＫＶ２－３０*０１（配列番号８３）、ＩＧＫＶ２Ｄ－３０*０１（配列番号８４）、ＩＧＫＶ２－２９*０２（配列番号８５）、ＩＧＫＶ２－２９*０３（配列番号８６）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域と、ヒト遺伝子ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域とを含む。上記の異なるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域、および／または上記の異なるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変領域フレームワーク領域の組み合わせも、本発明に包含される。

【００８６】

ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖系列ＤＮＡ配列は、「ＶＢａｓｅ」ヒト生殖系列配列データベース（ｗｗｗ．ｍｒｃｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｖｂａｓｅにてインターネットで利用可能）、ならびにＫａｂａｔ　ＥＡら、既出；Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ　ＩＭら、（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６～７９８およびＣｏｘ　ＪＰＬら、（１９９４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：８２７～８３６で見出すことができる。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖系列ＤＮＡ配列は、Ｇｅｎｂａｎｋデータベースで見出すことができる。

【００８７】

別の態様では、本開示は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、重鎖ＣＤＲの少なくとも１つおよび／または軽鎖ＣＤＲの少なくとも１つが少なくとも１つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。部位特異的突然変異誘発またはＰＣＲ媒介突然変異誘発を行って、改変（複数可）を導入でき、抗体結合またはその他の対象の機能的特性に対する影響を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイにおいて評価できる。好ましくは、保存改変を導入する。改変（複数可）は、アミノ酸置換、付加または欠失であり得るが、好ましくは置換である。典型的に、５以下、好ましくは４以下、より好ましくは３以下、さらにより好ましくは２以下、最も好ましくは１以下のアミノ酸改変をＣＤＲ領域内で行う。

【００８８】

あるいくつかの実施形態では、フレームワーク配列を用いて可変領域を工学改変して、バリアント抗体を生成できる。本発明のバリアント抗体は、ＶＨおよび／またはＶＫ内のフレームワーク残基に対して改変を行って、例えば抗体の特性を改良するものを含む。典型的に、このようなフレームワーク改変を行って、抗体の免疫原性を低減する。例えば、

あるアプローチは、１もしくは複数のフレームワーク残基を対応するマウス配列に「逆変異」させるか、または１もしくは複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「逆変異」させることである。本発明の文脈において、用語逆変異は、これらの操作のいずれかを意味するように交換可能に用いられ、より全般的には、免疫原性のようなその特性を変更するような抗体のアミノ酸配列における１または複数の残基の連続的な改変のことをいう。

【００８９】

よって、さらなる態様では、本開示は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、抗体またはその断片の重鎖可変領域のフレームワーク領域配列の少なくとも１つが、対応するマウス抗体の重鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも１つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。好ましくは、アミノ酸改変は、アミノ酸置換である。典型的に、７以下、好ましくは６以下、好ましくは５以下、好ましくは４以下、より好ましくは３以下、さらにより好ましくは２以下、最も好ましくは１以下のアミノ酸改変をフレームワーク領域内で行う。

【００９０】

本開示は、また、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、抗体またはその断片の軽鎖可変領域のフレームワーク領域配列の少なくとも１つが、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも１つのアミノ酸改変を含み得る、抗体およびその断片を提供する。好ましくは、アミノ酸改変は、アミノ酸置換である。典型的に、２以下、より好ましくは１以下および最も好ましくは０のアミノ酸改変をフレームワーク領域内で行う。

【００９１】

これらの重鎖および軽鎖可変領域配列のそれぞれがＣＣＲ６と結合できることに鑑みて、重鎖および軽鎖可変領域配列を「様々に組み合わせて」〔mixed and matched〕、本発明の抗ＣＣＲ６結合分子を創出できる。このような「様々に組み合わせた」抗体のＣＣＲ６結合は、例えば実施例に記載する結合アッセイを用いて試験できる。

【００９２】

本開示の一実施形態では、抗体またはその断片はヒト化抗体である。好ましくは、抗体またはその断片は、ヒト化モノクローナル抗体である。

【００９３】

本開示は、ＣＣＲ６と結合する１価抗体またはその断片、すなわち単一抗原結合腕からなる抗体も提供する。本開示は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｄ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ’）２、ｓｃＦｖ、２重特異性単鎖Ｆｖ２量体、ダイアボディ、トリアボディおよび同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合したｓｃＦｖからなる群より選択される、ＣＣＲ６と結合する抗体の断片も提供する。好ましい断片は、ｓｃＦｖ、２重特異性単鎖Ｆｖ２量体およびダイアボディである。本開示は、ＣＣＲ６と結合する全長抗体も提供する。

【００９４】

本開示は、重鎖および／または軽鎖定常領域、特にヒト重鎖および／またはヒト軽鎖定常領域をさらに含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片も提供する。ヒト重鎖定常領域は、ＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）、ＩｇＧ２（ＩＧＨＧ２）、ＩｇＧ３（ＩＧＨＧ３）、ＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）、ＩｇＡ１（ＩＧＨＡ１）、ＩｇＡ２（ＩＧＨＡ２）、ＩｇＭ（ＩＧＨＭ）、ＩｇＤ（ＩＧＨＤ）またはＩｇＥ（ＩＧＨＥ）からなるヒト免疫グロブリンの群より選択でき、ヒト重鎖定常領域ＩｇＧ、特にＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）が好ましい。ヒト軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域からなるヒト免疫グロブリンの群より選択でき、ヒトカッパ定常領域が好ましい。好ましい実施形態では、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片は、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）重鎖定常ドメインとヒト軽鎖カッパ定常ドメインとを含む。

【００９５】

フレームワーク領域またはＣＤＲ領域内に作製する改変に加えてまたは前記改変の代わ

りに、本発明の抗体を、Ｆｃ領域内に改変を含むように工学的に改変して、血清半減期、補体結合、Ｆｃ受容体結合および／または抗原依存性細胞傷害作用のような抗体の１または複数の機能特性を典型的に変更してよい。さらに、本発明の抗体を化学的に改変（例えば１または複数の化学的部分を抗体に付けることができる）またはそのグリコシル化を変更するように改変してよい。これらの実施形態のそれぞれは、以下にさらに詳細に記載する。以下に概説するＦｃ領域内の改変は、Ｆｃ領域中の残基のＥＵ番号付けに従う。一実施形態では、ＣＨ１のヒンジ領域を、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変更、例えば増加または減少されるように改変する。このアプローチは、Ｂｏｄｍｅｒらによる米国特許第５，６７７，４２５号にさらに記載されている。ＣＨ１のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変更して、例えば軽鎖と重鎖の集合を容易にするか、または抗体の安定性を増加もしくは減少させる。別の実施形態では、抗体のＦｃヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、抗体のブドウ球菌プロテインＡ（ＳｐＡ）結合が天然のＦｃ－ヒンジドメインＳｐＡ結合と比べて損なわれるようにＦｃ－ヒンジ断片のＣＨ２－ＣＨ３ドメイン界面領域中に１または複数のアミノ酸変異を導入する。このアプローチは、Ｗａｒｄらによる米国特許第６，１６５，７４５号にさらに詳細に記載されている。別の実施形態では、抗体を改変して、その生物学的半減期を増加させる。様々なアプローチが可能である。例えば、Ｗａｒｄへの米国特許第６，２７７，３７５号に記載されるように、以下の変異の１または複数を導入できる：Ｔ２５２Ｌ、Ｔ２５４Ｓ、Ｔ２５６Ｆ。代わりに、生物学的半減期を増加させるために、Ｐｒｅｓｔａらによる米国特許第５，８６９，０４６号および第６，１２１，０２２号に記載されるように、ＩｇＧのＦｃ領域のＣＨ２ドメインの２つのループから得たサルベージ受容体結合エピトープを含有するようにＣＨ１またはＣＬ領域内で抗体を変更できる。さらなる実施形態では、少なくとも１つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えて、抗体のエフェクター機能（複数可）を変更することによりＦｃ領域を変更する。例えば、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変更されるが、親抗体の抗原結合能力を抗体が保持するように、アミノ酸残基２３４、２３５、２３６、２３７、２９７、３１８、３２０および３２２から選択される１または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性が変更されるエフェクターリガンドは、例えば、Ｆｃ受容体または補体のＣ１成分であり得る。このアプローチは、ともにＷｉｎｔｅｒらによる米国特許第５，６２４，８２１号および第５，６４８，２６０号にさらに詳細に記載されている。別の例では、抗体のＣ１ｑ結合が変更され、かつ／または補体依存性細胞傷害作用（ＣＤＣ）が低減もしくは廃止されるようにアミノ酸残基３２９、３３１および３２２から選択される１または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。このアプローチは、Ｉｄｕｓｏｇｉｅらによる米国特許第６，１９４，５５１号にさらに詳細に記載されている。別の例では、ＣＨ２ドメインのＮ末端領域中の２３１位～２３８位のアミノ酸内の１または複数のアミノ酸残基を変更し、そのことにより、補体と結合する抗体の能力を変更する。このアプローチは、ＢｏｄｍｅｒらによるＰＣＴパンフレットＷＯ１９９４／２９３５１にさらに記載されている。なお別の例では、以下の位置での１もしくは複数のアミノ酸を改変することによりＦｃ領域を改変して、抗体依存性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）を媒介する抗体の能力を増加させ、かつ／またはＦｃγ受容体に対する抗体の親和性を増加させる：２３８、２３９、２４８、２４９、２５２、２５４、２５５、２５６、２５８、２６５、２６７、２６８、２６９、２７０、２７２、２７６、２７８、２８０、２８３、２８５、２８６、２８９、２９０、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９８、３０１、３０３、３０５、３０７、３０９、３１２、３１５、３２０、３２２、３２４、３２６、３２７、３２９、３３０、３３１、３３３、３３４、３３５、３３７、３３８、３４０、３６０、３７３、３７６、３７８、３８２、３８８、３８９、３９８、４１４、４１６、４１９、４３０、４３４、４３５、４３７、４３８または４３９。このアプローチは、ＰｒｅｓｔａによるＰＣＴパンフレットＷＯ２０００／４２０７２にさらに記載されている。

【００９６】

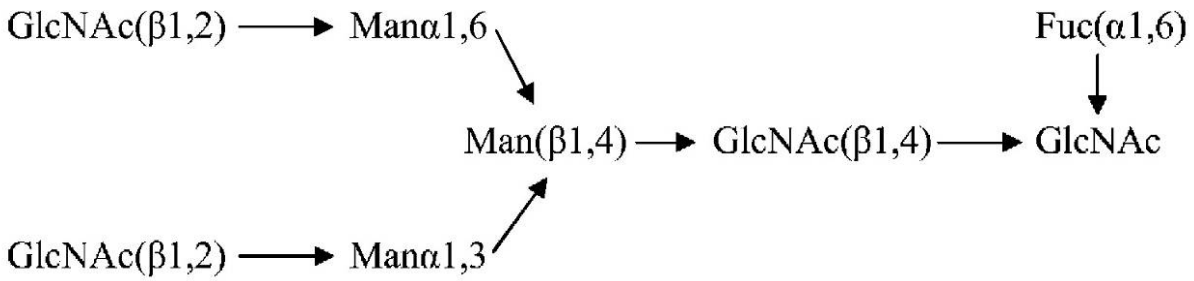
本開示は、ヒト重鎖および／または軽鎖定常領域を含むＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、ヒト重鎖定常領域が、ヒトＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）からのＣＨ１領域、ヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を含むアイソタイプバリアントを含み、ヒンジ領域が、２２８位のセリンからプロリンへの置換を含む、抗体またはその断片も提供する。好ましくは、アイソタイプバリアントを含む抗体は、全長抗体である。ヒトＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）からのＣＨ１と、Ｓ２２８Ｐ置換を有するヒトＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）からのヒンジと、ヒトＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）からのＣＨ２およびＣＨ３とを含むアイソタイプバリアントを含む、ＣＣＲ６と結合する特に好ましい抗体またはその断片。アイソタイプバリアントは、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）（これは、通常、天然のヒトＩｇＧ１である）からのヒト重鎖定常領域を含む、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片と比較して、すなわち改変された重鎖定常領域に関してアイソタイプバリアントから異なるだけである、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片と比較して、ＡＤＣＣのようなＦｃ媒介性細胞傷害作用機序を示さないことが見出されている。

【００９７】

本開示は、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域を含むＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片であって、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域に付いた成熟コア炭水化物構造がフコースを欠く（本明細書において、代わりに「非フコシル化」という）、抗体またはその断片も提供する。用語「成熟コア炭水化物構造」は、本明細書で用いる場合、以下に模式的に示す二分岐オリゴ糖に典型的な炭水化物構造ＧｌｃＮＡｃ（フコース）－ＧｌｃＮＡｃ－Ｍａｎ－（Ｍａｎ－ＧｌｃＮＡｃ）$_2$から全般的になるＦｃ領域に付いた加工コア炭水化物構造を含む：

【００９８】

【化１】



【００９９】

この用語は、β１，２ＧｌｃＮＡｃ残基を欠くコア成熟炭水化物構造のＧ－１形を含む。しかし、好ましくは、コア炭水化物構造は、両方のβ１，２ＧｌｃＮＡｃ残基を含む。本明細書における成熟コア炭水化物構造は、全般的に、過剰マンノース化されていない。成熟コア炭水化物構造を、糖タンパク質のＦｃ領域に、通常はＦｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７へのＮ結合を介して付ける。

【０１００】

本発明の一実施形態では、抗体は、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）Ｆｃ領域を含み、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）Ｆｃ領域に付いた成熟コア炭水化物構造は、フコースを欠く。より好ましくは、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）Ｆｃ領域に付いた成熟コア炭水化物構造がフコースを欠く、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）Ｆｃ領域を含む全長抗体である。ＷＯ０３／０３５８３５から、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域に付いた成熟コア炭水化物構造中のフコースの欠如は、ＡＤＣＣを増進し得ることが知られている。よって、さらなる実施形態では、本開示の抗体またはその断片は、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）Ｆｃ領域を含み、ヒトＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）Ｆｃ領域に付いた成熟コア炭水化物構造は、フコースを欠き、フコースを欠く抗体は、フコースを欠かない親抗体またはその断片と比較して、ＡＤＣＣの増進を示す。フコースを欠く抗体を作製する方法は、例えば（ａ）細胞内で発現されるタンパク質をフコース化する能力が低減される（またはフコース化できない）ようにフコース代謝

が欠損している工学改変または変異宿主細胞の使用；（ｂ）フコース化を防止もしくは低減する条件下での細胞の培養；（ｃ）フコースの翻訳後除去（例えばフコシダーゼ酵素を用いて）；（ｄ）例えば非グリコシル化糖タンパク質の組換え発現後の所望の炭水化物の翻訳後付加；または（ｅ）フコース化されていない産物を選択するような糖タンパク質の精製である。好ましく用いられるものは、ＷＯ２０１０／０９５０３１の実施例１４に記載される方法、例えばＬｏｎｇｍｏｒｅら、（１９８２）Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．３６５～９２またはＩｍａｉ－Ｎｉｓｈｉｙａら、（２００７）、ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７：８４に記載される方法である。

【０１０１】

本発明は、配列番号７、３７、３９、４０、４１、４２、７５、１７７、１７８、１７９、２４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変配列および配列番号８、３８、４３、４４、４５、４６、１８１、１８２、２５０、２５１、２５２または２５３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変配列を含む抗体と同じエピトープと結合する、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片も提供する。ＣＣＲ６ポリペプチドのこの特定の領域またはエピトープは、本発明が提供する抗体のいずれか１つと組み合わせた、当技術分野において知られる任意の適切なエピトープマッピング方法により同定できる。このような方法の例は、ＣＣＲ６に由来する様々な長さのペプチドを、本発明の抗体との結合について、抗体により認識されるエピトープの配列を含有する抗体と特異的に結合できる最小の断片を用いてスクリーニングすることを含む。ＣＣＲ６ペプチドは、合成により、またはＣＣＲ６ポリペプチドのタンパク質分解消化により生成できる。抗体と結合するペプチドは、例えば質量分析により同定できる。別の例では、ＮＭＲ分光法またはＸ線結晶学を用いて、本発明の抗体と結合するエピトープを同定できる。一端同定されると、本発明の抗体と結合するエピトープ断片を、所望により、免疫原として用いて、同じエピトープと結合するさらなる抗体を得ることができる。

【０１０２】

抗ＣＣＲ６抗体特性

例えばＥＬＩＳＡ、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）、ウェスタンブロット、ＲＩＡおよびフローサイトメトリー分析を含む、例えばＣＣＲ６に対する抗体の結合能力を評価するための標準的なアッセイは、当技術分野において知られている。適切なアッセイは、実施例に詳細に記載する。抗体の結合動態（例えばＫＤのような結合親和性）も、スキャッチャードまたはＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）システム分析によるなどの当技術分野において知られる標準的なアッセイにより評価できる。相対的結合親和性K_iは、当技術分野において知られる標準的な競合アッセイにより評価できる。

【０１０３】

さらなる態様では、本発明は、ＥＬＩＳＡまたはＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）法により視覚化されるように、ヒト、マウス、ラットおよびカニクイザルＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。結合ＥＬＩＳＡを、実施例３に従って行って測定できる。

【０１０４】

さらなる態様では、本発明は、組換えまたは自然に生成されるヒトＣＣＲ６と結合し、ＣＤ４　Ｔリンパ球による活性化およびサイトカイン分泌を防止する抗体またはその断片を提供する。

【０１０５】

さらなる態様では、本発明は、実施例５に詳細に記載するように、分析物として用いるヒト可溶性ＣＣＲ６ポリペプチド（配列番号１０１によりコードされる）を有するプロテインＡ結合ＣＭ５研究グレードセンサチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ；ＢＲ－１０００－１４）上に抗体を捕捉することにより、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）により測定される、８５０ｐＭ以下、好ましくは７００ｎＭ以下、より好ましくは３００ｎＭ以下、より好ましくは２６０ｎＭ以下、さらによ

り好ましくは２５０ｎＭ以下の親和性（K_D）でＣＣＲ６、特に単離形のＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。好ましい態様では、本発明は、対応するキメラ抗体のＣＣＲ６結合親和性（K_D）の少なくとも８５％を保持するヒト化抗体またはその断片を提供する。好ましくは、ヒト化抗体またはその断片は、対応するキメラ抗体のＣＣＲ６結合親和性（K_D）の少なくとも９０％、より好ましくは対応するキメラ抗体の結合親和性（K_D）の少なくとも９５％を保持する。好ましくは、ヒト化抗体またはその断片は、対応するキメラ抗体と等価な親和性でヒトＣＣＲ６と結合する。「等価な親和性」は、対応するキメラ抗体のＣＣＲ６結合親和性の±１０％の範囲内である親和性の値を意味する。より好ましくは、本発明は、対応するキメラ抗体より高い親和性でヒトＣＣＲ６と結合するヒト化抗体またはその断片を提供する。好ましくは、ヒト化抗体またはその断片は、対応するキメラ抗体より２倍高い親和性、より好ましくは対応するキメラ抗体より３倍高い親和性でヒトＣＣＲ６と結合する。本発明の好ましい態様では、実施例７に詳細に記載するように、分析物として用いるヒト可溶性ＣＣＲ６ポリペプチド（配列番号１０１によりコードされる）を有するプロテインＡ結合ＣＭ５研究グレードセンサチップ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｅｕｒｏｐｅ ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ；ＢＲ－１０００－１４）上に抗体を捕捉することにより、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）装置（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｅｕｒｏｐｅ ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）により測定される、５００ｎＭ以下、好ましくは２５０ｎＭ以下、より好ましくは１００ｎＭ以下、より好ましくは５０ｎＭ以下、さらにより好ましくは４８ｎＭ以下の結合親和性（K_D）を有する、ヒトＣＣＲ６と結合するヒト化抗体またはその断片が提供される。

【０１０６】

本発明のさらなる態様は、良好な熱安定性を有する、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を提供する。好ましい実施形態では、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片は、７０℃を超え、好ましくは７５℃を超え、さらにより好ましくは８０℃を超えるＦＡＢ断片耐熱温度を有する。ＦＡＢ断片耐熱性の分析のために示差走査熱量分析測定を用い、前記測定では、全長ＩｇＧの関係におけるＦＡＢ断片の中間融解温度が同定される。これらの種類の熱量測定は、当業者に知られており、実施例５にさらに記載するように、例えばＧａｒｂｅｒ ＥおよびＤｅｍａｒｅｓｔ ＳＪ（２００７）、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ、３５５：７５１～７に従って行うことができる。

【０１０７】

核酸、ベクターおよび宿主細胞

本開示は、ＣＣＲ６と結合する抗体およびその断片をコードする単離核酸、ベクターおよび核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。核酸は、細胞全体、細胞溶解物または部分的に精製もしくは実質的に精製された形で存在することがある。核酸は、アルカリ／ＳＤＳ処理、ＣｓＣｌバンド分け、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野においてよく知られている他のものを含む標準的な技法により、他の細胞構成成分または他の混入物、例えば他の細胞性核酸またはタンパク質から精製分離された場合に、「単離」または「実質的に純粋に」されている。例えばＦ．Ａｕｓｕｂｅｌら編（１９８７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照されたい。本発明の核酸は、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得、イントロン配列を含んでも含まなくてもよい。好ましい実施形態では、核酸は、ｃＤＮＡ分子である。

【０１０８】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学技法を用いて得ることができ、例えば抗体の軽鎖および重鎖をコードするかまたはＶＨおよびＶＬセグメントをコードするｃＤＮＡは、標準的ＰＣＲ増幅またはｃＤＮＡクローニング技法により得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリー（例えばファージディスプレイ技法を用いて）から得られる抗体について、抗体をコードする１または複数の核酸をライブラリーから回収できる。外因性核

酸を宿主細胞に導入する方法は、当技術分野においてよく知られており、用いる宿主により変動する。技法は、それらに限定されないが、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、塩化カルシウム処理、ポリエチレンイミン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルスまたはファージ感染、リポソームへのポリヌクレオチド（複数可）の封入、および核へのＤＮＡの直接マイクロインジェクションを含む。哺乳動物細胞の場合、トランスフェクションは一過性または安定性のいずれかであってよい。

【０１０９】

本発明の好ましい核酸分子は、配列番号８８、９０、９２、９４、９６、９８からなる群より選択される重鎖配列、ならびに／または配列番号８７、８９、９１、９３、９５、９７からなる群より選択される軽鎖配列をコードするものである。

【０１１０】

本発明の好ましい核酸分子は、配列番号７、３７または２４９の重鎖可変領域、ならびに／または配列番号８、３８、２５０、２５１、２５２または２５３の軽鎖可変領域をコードするものである。

【０１１１】

ＶＨおよびＶＬセグメントをコードするＤＮＡ断片が一旦得られると、これらのＤＮＡ断片を、標準的な組換えＤＮＡ技法によりさらに操作して、例えば可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子またはＦａｂ断片遺伝子もしくはｓｃＦｖ遺伝子のような上記の断片に対応する断片遺伝子に変換できる。これらの操作では、ＶＬまたはＶＨをコードするＤＮＡ断片は、抗体定常領域またはフレキシブルリンカーのようななどの別のタンパク質をコードする別のＤＮＡ断片に作動可能に連結している。用語「作動可能に連結する」は、この文脈で用いる場合、２つのＤＮＡ断片によりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように２つのＤＮＡ断片をつなぐことを意味する。ＶＨ領域をコードする単離ＤＮＡは、重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子にＶＨをコードするＤＮＡを作動可能に連結することにより、全長重鎖遺伝子に変換できる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野において知られており（例えばＫａｂａｔ ＥＡら、既出を参照されたい）、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的なＰＣＲ増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）、ＩｇＧ２（ＩＧＨＧ２）、ＩｇＧ３（ＩＧＨＧ３）、ＩｇＧ４（ＩＧＨＧ４）、ＩｇＡ１（ＩＧＨＡ１）、ＩｇＡ２（ＩＧＨＡ２）、ＩｇＭ（ＩＧＨＭ）、ＩｇＤ（ＩＧＨＤ）またはＩｇＥ（ＩＧＨＥ）定常領域であり得るが、最も好ましくはＩｇＧ１（ＩＧＨＧ１）定常領域である。Ｆａｂ断片重鎖遺伝子について、ＶＨをコードするＤＮＡは、重鎖ＣＨ１定常領域のみをコードする別のＤＮＡ分子に作動可能に連結できる。ＶＬ領域をコードする単離ＤＮＡは、軽鎖定常領域、ＣＬをコードする別のＤＮＡ分子にＶＬをコードするＤＮＡを作動可能に連結することにより、全長軽鎖遺伝子（およびＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換できる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において知られており（例えばＫａｂａｔ ＥＡら、既出を参照されたい）、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的なＰＣＲ増幅により得ることができる。好ましい実施形態では、軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域、好ましくはカッパ定常領域であり得る。ｓｃＦｖ遺伝子を創出するために、ＶＨおよびＶＬをコードするＤＮＡ断片を、フレキシブルリンカーをコードする、例えばアミノ酸配列（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）３をコードする別の断片に作動可能に連結して、ＶＬおよびＶＨ領域がフレキシブルリンカーによりつながれた連続単鎖タンパク質としてＶＨおよびＶＬ配列が発現できるようにする（例えばＢｉｒｄ ＲＥら、（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４２：４２３～４２６；Ｈｕｓｔｏｎ ＪＳら、（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８５：５８７９～８３；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ Ｊら、（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ、３４８：５５２～５５４を参照されたい）。抗体の抗体断片生成のために様々な技法が開発されている。伝統的に、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク質分解消化により導かれた（例えばＭｏｒｉｍｏｔｏ Ｋら、（１９９２）Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．＆Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２４：１０７

～１１７およびＢｒｅｎｎａｎ Ｍら、（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２９：８１～３を参照されたい）。しかし、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞により直接生成できる。例えば、抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離できる。あるいはその代わりに、Ｆａｂ’－ＳＨ断片は、Ｅ．ｃｏｌｉから直接回収でき、化学的にカップリングさせてＦ（ａｂ’）$_2$断片を形成できる（Ｃａｒｔｅｒ Ｐら、（１９９２）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１０：１６３～１６７）。別のアプローチによると、Ｆ（ａｂ’）２断片は、組換え宿主細胞培養から直接単離できる。抗体断片の生成のための他の技法は、当業者にとって明らかである。別の実施形態では、選択される抗体は、単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である。例えばＷＯ１９９３／１６１８５；米国特許第５，５７１，８９４号および米国特許第５，５８７，４５８号を参照されたい。抗体断片は、例えば米国特許第５，６４１，８７０号に例えば記載される「直鎖抗体」であってもよい。

【０１１２】

本発明の抗体をコードする核酸は、タンパク質を発現するためにベクター、好ましくは発現ベクターに組み込むことができる。様々な発現ベクターをタンパク質発現のために利用できる。発現ベクターは、自己複製染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターを含み得る。発現ベクターは、宿主細胞型と適合するように構築される。よって、本発明において用いることができるベクター、好ましくは発現ベクターは、それらに限定されないが、哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞、酵母においておよびｉｎ ｖｉｔｒｏ系においてタンパク質発現を可能にするものを含む。当技術分野において知られるように、抗体を発現するために本発明において用いることができる様々な発現ベクターが市販または他の方法で入手可能である。

【０１１３】

発現ベクターは、典型的に、制御もしくは調節配列、選択マーカー、任意の融合パートナーおよび／またはさらなるエレメントに作動可能に連結したタンパク質を含む。本明細書において「作動可能に連結」とは、核酸が別の核酸配列と機能的関係にあることを意味する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する他の発現制御エレメント（例えばポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えばＧｏｅｄｄｅｌ（Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ（１９９０））に記載される。一般的に、これらの発現ベクターは、抗体をコードする核酸に作動可能に連結した転写および翻訳調節核酸を含み、タンパク質を発現するために用いる宿主細胞にとって典型的に適当である。一般に、転写および翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含み得る。これもまた当技術分野において知られるように、発現ベクターは、選択遺伝子またはマーカーを典型的に含有して、発現ベクターを含有する形質転換宿主細胞の選択を可能にする。選択遺伝子は当技術分野において知られており、用いる宿主細胞により変動する。例えば、典型的に、選択マーカー遺伝子は、Ｇ４１８、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に与える。好ましい選択可能マーカーは、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子（メトトレキセート選択／増幅を用いるｄｈｆｒ－宿主細胞において用いるため）およびｎｅｏ遺伝子（Ｇ４１８選択のため）を含む。

【０１１４】

クローニングまたは本明細書におけるベクター中でのＤＮＡの発現のために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的のために適切な原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物を含む真正細菌、例えばＥｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ、例えばＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ、例えばＥ．ｃｏｌｉ、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、例えばＳａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、例えばＳｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓおよびＳｈｉｇｅｌｌａ、ならびにＢａｃｉｌｌｉ、例えば

Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、例えばＰ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、ならびにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓを含む。適切なＥ．ｃｏｌｉクローニング宿主は、Ｅ．ｃｏｌｉ ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｂ、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）およびＥ．ｃｏｌｉ Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７，３２５）を含む。原核生物に加えて、糸状菌または酵母のような真核微生物は、適切なクローニングまたは発現宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたは一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物のうちで最も一般的に用いられる。しかし、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｒｉｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ；Ｋ．ｌａｃｔｉｓ、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ（ＡＴＣＣ１２，４２４）、Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ（ＡＴＣＣ１６，０４５）、Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ（ＡＴＣＣ２４，１７８）、Ｋ．ＷａＩｔＨ（ＡＪＣＣ５６，５００）、Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｍａｒｕｍ（ＡＴＣＣ３６，９０６）、Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓまたはＫ．ｍａｒｘｉａｎｕｓｙａｒｒｏｗｉａ（ＥＰ４０２２６）を含むＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ宿主；Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ（ＥＰ１８３０７０）；Ｃａｎｄｉｄａ；Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｉａ（ＥＰ２４４２３４）；Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ；Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ、例えばＳｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ；およびＮｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ、ＴｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍまたはＡ．ｎｉｄｕｌａｎｓもしくはＡ．ｎｉｇｅｒのようなＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ宿主を含む糸状菌のなどのいくつかの他の属、種および株が一般的に利用可能であり、有用である。

【０１１５】

本発明の抗体の発現のために適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例は、プラリル〔plaril〕および昆虫細胞を含む。多数のバキュロウイルス株およびバリアント、ならびにＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ（イモムシ）、Ａｅｄｅｓ ａｕｇｙｐｔｉ（カ）、Ａｅｄｅｓ ａｌｂｏｐｉｃｔｕｓ（カ）、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ（ショウジョウバエ）およびＢｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉなど宿主からの対応する許容される昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための様々なウイルス株、例えばＡｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ ＮＰＶのＬ－１バリアントおよびＢｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ ＮＰＶのＢｍ－５株が公共で利用可能であり、このようなウイルスは、特にＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞のトランスフェクションのために用いることができる。ワタ、トウモロコシ、バレイショ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物も宿主として利用できる。

【０１１６】

本発明の組換え抗体の発現のための宿主細胞は、好ましくは哺乳動物宿主細胞であり、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Ｕｒｌａｕｂ ＧおよびＣｈａｓｉｎ ＬＡ（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ，ＵＳＡ、７７：４２１６～４２２０に記載されるｄｈｆｒ-ＣＨＯ細胞を含む、例えばＫａｕｆｍａｎ ＲＪおよびＳｈａｒｐ ＰＡ（１９８２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、１５９：６０１～６２１に記載されるようにＤＨＦＲ選択可能マーカーとともに用いられる）、ＮＳＯ骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞およびＳＰ２細胞を含む。特に、ＮＳＯ骨髄腫細胞とともに用いるために、別の好ましい発現系は、ＷＯ８７／０４４６２（Ｗｉｌｓｏｎ）、ＷＯ８９／０１０３６（Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎ）およびＥＰ３３８８４１（Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎ）に開示されるＧＳ遺伝子発現系である。組換え抗体遺伝子を哺乳動物宿主細胞に導入した場合、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現を可能にするためまたはより好ましくは宿主細胞が成長する培養培地への抗体の分泌を可能にするために十分な期間、宿主細胞を培養することにより生成される。ＣＣＲ６と結合する抗体を生成するために有用な宿主細胞は、様々な培地で培養できる。ハムＦ１０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、最少必須培地（ＭＥＭ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ ＧｍｂＨ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ

ＧｍｂＨ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）およびダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＧｍｂＨ）など市販で入手可能な培地は、宿主細胞の培養のために適切である。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培養培地から回収できる。

【０１１７】

抗体は、融合パートナーに作動可能に連結して、発現されたタンパク質の標的化、精製、スクリーニング、ディスプレイなどができるようにしてよい。融合パートナーは、リンカー配列により抗体配列に連結してよい。リンカー配列は、少数、典型的に１０未満のアミノ酸を一般的に含むが、より長いリンカーも用いてよい。典型的に、リンカー配列は、フレキシブルで分解に対して耐性であるように選択される。当業者により認識されるように、多様な配列のいずれもリンカーとして用いることができる。例えば、一般的なリンカー配列は、アミノ酸配列G_4Sを含む。融合パートナーは、抗体および任意の付随する融合パートナーを所望の細胞の場所または細胞外培地に向ける標的化またはシグナル配列であってよい。当技術分野において知られるように、あるいくつかのシグナル配列は、タンパク質を成長培地または細胞の内膜と外膜との間にある細胞膜周辺腔に分泌されるように標的化させることがある。融合パートナーは、精製および／またはスクリーニングを可能にするペプチドまたはタンパク質をコードする配列であってもよい。このような融合パートナーは、それらに限定されないが、ポリヒスチジンタグ（Ｈｉｓタグ）（例えばＨ６およびＨ１０または固定化金属親和性クロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）系（例えばNi^{+2}親和性カラム）とともに用いるための他のタグ）、ＧＳＴ融合、ＭＢＰ融合、Ｓｔｒｅｐタグ、細菌酵素ＢｉｒＡのＢＳＰビオチン化標的配列、および抗体が標的にするエピトープタグ（例えばｃ－ｍｙｃタグ、ｆｌａｇタグなど）を含む。当業者により認識されるように、このようなタグは、精製、スクリーニングまたはその両方のために有用であり得る。

【０１１８】

抗体の構築および生成

ＣＣＲ６ポリペプチドに対して作製された抗体は、よく知られており日常的なプロトコールを用いて、動物の免疫化、すなわち動物、好ましくは非ヒト動物へのポリペプチドの投与によりにより得ることができる。例えばＨａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｗｅｉｒ　ＤＭ（編）、第４巻、Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌａｎｄ、１９８６）を参照されたい。ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ラクダまたはブタなどの多くの温血動物を免疫できる。しかし、マウス、ウサギ、ブタおよびラット、特にマウスは、一般的に最も適切である。抗体は、当業者に知られる組換えＤＮＡ技法によっても生成できる。さらに、抗体は、自然に存在する抗体の酵素または化学的切断により生成できる。本発明のヒト化抗体は、非ヒト動物（例えばマウス）からのＶＨおよび／またはＶＬ領域からの１もしくは複数のＣＤＲまたはその一部を、ヒトＶＨおよび／またはＶＬ領域からの１または複数のフレームワーク領域に移行することにより構築できる。場合によって、このようにＶＨおよび／またはＶＬ領域中に存在するヒトフレームワーク残基は、抗体の免疫原性を減少させ、かつ／または結合親和性を維持するために必要または所望される場合に、対応する非ヒト（例えばマウス）残基で置き換えることができる。場合によって、ＣＤＲ中に存在する非ヒトアミノ酸残基は、ヒト残基で置き換えてよい。本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のようにして調製した非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製できる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするＤＮＡは、対象の非ヒトハイブリドーマから得て、非マウス（例えばヒト）免疫グロブリン配列を含有するように、標準的な分子生物学的技法を用いて工学改変できる。例えば、キメラ抗体を創出するために、当技術分野において知られる方法を用いて、マウス可変領域をヒト定常領域に連結できる（例えばＣａｂｉｌｌｙらへの米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）。ヒト化抗体を創出するために、当技術分野において知られる方法を用いて、マウスＣＤＲ領域をヒトフレームワークに挿入できる（例えばＷｉｎｔｅｒへの米国特許第５，２２５，５３９号、Ｑｕｅｅｎらへの米国特許第５，５３０，１０１号；第５，５８５，

０８９号；第５，６９３，７６２号および第６，１８０，３７０号を参照されたい）。

【０１１９】

重鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子を、可能性のあるアクセプター分子可変領域とマウス抗体の重鎖可変領域との間の相同性を考慮して選択して、本発明のヒト化抗体を構築してよい。生殖系列候補ヒトアクセプター分子は、可能性のある免疫原性を低減するので好ましい。生殖系列データベースは、重鎖ＦＷ３領域の端および部分的にＣＤＲ３配列内まで通して読んだ抗体配列でつくられている。ＦＷ４領域の選択のために、選択された生殖系列分子に由来する成熟抗体配列のデータベースを検索できるか、またはヒトドナーからの選択された生殖系列分子に由来する抗体配列を用いることができる。ヒトアクセプター分子は、マウスドナー分子と同じ重鎖クラスから好ましく選択され、マウスドナー分子の可変領域と同じ基準構造クラスのものである。重鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子の選択のための２次的な考慮は、マウスドナー分子とヒトアクセプター分子との間のＣＤＲ長における相同性を逃れる。ヒトアクセプター抗体分子は、Ｖ－ＢＡＳＥデータベースでの相同性検索により選択されることが好ましいが、Ｋａｂａｔおよび公共ＮＣＢＩデータベースなどの他のデータベースも用いてよい。

【０１２０】

軽鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子を、可能性のあるアクセプター分子可変領域とマウス抗体の軽鎖可変領域との間の相同性を考慮して選択して、本発明のヒト化抗体を構築してよい。生殖系列候補ヒトアクセプター分子は、可能性のある免疫原性を低減するので好ましい。生殖系列データベースは、重鎖ＦＷ３領域の端および部分的にＣＤＲ３配列内まで通して読んだ抗体配列でつくられている。ＦＷ４領域の選択のために、選択された生殖系列分子に由来する成熟抗体配列のデータベースを検索できるか、またはヒトドナーからの選択された生殖系列分子に由来する抗体配列を用いることができる。ヒトアクセプター分子は、マウスドナー分子と同じ軽鎖クラスから好ましく選択され、マウスドナー分子の可変領域と同じ基準構造クラスのものである。軽鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子の選択のための２次的な考慮は、マウスドナー分子とヒトアクセプター分子との間のＣＤＲ長における相同性を含む。ヒトアクセプター抗体分子は、Ｖ－ＢＡＳＥデータベースでの相同性検索により選択されることが好ましいが、Ｋａｂａｔおよび公共ＮＣＢＩデータベースなどの他のデータベースも用いてよい。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、以下の実施例６を含んで本明細書に記載する。

【０１２１】

本発明は、ＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を生成する方法であって、核酸が発現され、抗体が生成されるように、ＣＣＲ６と結合する抗体もしくはその断片をコードする単離核酸またはＣＣＲ６と結合する抗体もしくはその断片をコードする単離核酸を含むベクターを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法を提供する。好ましくは、抗体は、単離される。宿主細胞、核酸およびベクターについて、上記のものを用いることができる。核酸の発現は、例えば、当技術分野においてよく知られ（例えばＭｏｒｒｉｓｏｎ Ｓ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２）、上でさらに概説する組換えＤＮＡ技法と遺伝子トランスフェクション方法との組み合わせにより得ることができる。例えば抗体またはその抗体断片を発現するために、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするＤＮＡを、標準的な分子生物学的技法を用いて得て（例えばＰＣＲ増幅または対象の抗体を発現するハイブリドーマを用いるｃＤＮＡクローニング）、ＤＮＡを発現ベクターのようなベクターに挿入できる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入できるか、またはより典型的には、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子を発現ベクターに、標準的な方法により挿入する（例えば抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しないならば平滑端ライゲーション）。本明細書に記載する抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用いて任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を創出でき、このことは、ＶＨセグメントがベクター内のＣＨ１セグメント（複数可）に作動可能に連結し、ＶＫセグメントがベクター内のＣＫ

セグメントに作動可能に連結するように、所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域を予めコードする発現ベクターに本明細書に記載する抗体の軽鎖および重鎖可変領域を挿入することによる。

【０１２２】

抗ＣＣＲ６抗体の特徴決定および精製

抗体についてのスクリーニングを、ヒトＣＣＲ６との結合を測定するためのアッセイおよび／またはＣＣＲ６とそのリガンドとの結合を阻止する能力を測定するためのアッセイを用いて行うことができる。結合アッセイの例は、特に、プレート上に固定化されたヒトＣＣＲ６とヒトＦｃとの融合タンパク質を用い、融合タンパク質と結合した抗ＣＣＲ６抗体を検出するためのコンジュゲート２次抗体を採用するＥＬＩＳＡである。阻止アッセイの例は、ＢＡＦをトランスフェクトした細胞上のＣＣＲ６へのリガンドタンパク質の結合の阻止を測定する、ＣＣＬ２０媒介性遊走アッセイである。このアッセイは、上清中の抗体が、ＣＣＬ２０に応答してＣＣＲ６発現細胞の遊走を阻止するにつれてのシグナルの低減を求める。阻止アッセイのさらなる例は、ＣＣＲ６活性化の阻止を化学発光により測定するアッセイである。

【０１２３】

本発明の抗体は、当業者に知られる様々な方法で単離または精製できる。標準的な精製方法は、大気圧またはＦＰＬＣおよびＨＰＬＣのようなシステムを用いて高圧で行う、イオン交換、疎水性相互作用、親和性、サイズ分けまたはゲルろ過および逆相を含むクロマトグラフィー技法を含む。精製方法は、電気泳動、免疫学的、沈降、透析および等電点電気泳動の技法も含む。タンパク質濃縮とともに限外ろ過およびダイアフィルトレーション技法も有用である。ＣＣＲ６抗体を精製するために、選択された宿主細胞を、例えばモノクローナル抗体精製のためにスピナーフラスコ中で成長させることができる。上清をろ過し、濃縮した後に、プロテインＡ－セファロース（Ｐｈａｒｍａｃｉａ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いて親和性クロマトグラフィーを行う。溶出された抗体をゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーにより確認して、純度を確認できる。本発明の好ましい抗体は、よって、ＣＣＲ６と結合する単離および／または精製抗体である。

【０１２４】

イムノコンジュゲート

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）または放射性毒素のような治療剤に連結した、ヒトＣＣＲ６と結合するＣＣＲ６抗体またはその断片を提供する。このようなコンジュゲートは、本明細書において、「イムノコンジュゲート」という。１または複数の細胞毒を含むイムノコンジュゲートは、「免疫毒素」という。細胞毒または細胞傷害性薬剤は、細胞に有害な（例えば死滅させる）任意の薬剤を含む。例は、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログを含む。治療剤は、例えば、代謝拮抗薬（例えばメトトレキセート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えばメクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣならびにシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えばダウノルビシン（旧名ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えばダクチノマイシン（旧名アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（ＡＭＣ））および有糸分裂阻害剤（例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン）も含む。本発明の抗体と連結できる治療用細胞毒の他の例は、デュオカルマイシン、カリチアマイシン、マイタンシンおよびオーリスタチン、ならびにそれ

らの誘導体を含む。カリチアマイシン抗体コンジュゲートの例は、市販で入手可能である（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標）；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｈｏｍｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）。細胞毒は、本発明の抗体と、当技術分野において利用可能なリンカー技法を用いて連結できる。細胞毒と抗体とをコンジュゲートするために用いられているリンカーの型の例は、それらに限定されないが、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィドおよびペプチド含有リンカーを含む。例えばリソソーム区画内の低ｐＨによる切断に感受性またはカテプシン（例えばカテプシンＢ、Ｃ、Ｄ）のような腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼのようなプロテアーゼによる切断に感受性であるリンカーを選択できる。細胞毒の型、リンカーおよび治療剤と抗体をコンジュゲートする方法についてのさらなる議論について、Ｓａｉｔｏ Ｇら、（２００３）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５５：１９９～２１５；Ｔｒａｉｌ ＰＡら、（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５２：３２８～３３７；Ｐａｙｎｅ Ｇ（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ、３：２０７～２１２；Ａｌｌｅｎ ＴＭ（２００２）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，２：７５０～７６３；Ｐａｓｔａｎ ＩおよびＫｒｅｉｔｍａｎ ＲＪ（２００２）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ｄｒｕｇｓ、３：１０８９～１０９１；Ｓｅｎｔｅｒ ＰＤおよびＳｐｒｉｎｇｅｒ ＣＪ、（２００１）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５３：２４７～２６４も参照されたい。本発明の抗体は、放射活性同位体に連結して、ラジオイムノコンジュゲートともよばれる細胞傷害性放射性医薬品を作製することもできる。診断または治療用に用いるために抗体とコンジュゲートできる放射活性同位体の例は、それらに限定されないが、ヨウ素^{131}、インジウム^{111}、イットリウム^{90}およびルテニウム^{177}を含む。ラジオイムノコンジュゲートを調製するための方法は、当技術分野において確立されている。ラジオイムノコンジュゲートの例は、Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）（ＥＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）およびＢｅｘｘａｒ（登録商標）（Ｃｏｒｉｘａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）を含んで市販で入手可能であり、同様の方法を用いて、本発明の抗体を用いてラジオイムノコンジュゲートを調製できる。本発明の抗体イムノコンジュゲートを用いて所定の生物学的応答を改変でき、薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってよい。このようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素もしくはジフテリア毒素のような酵素活性毒素またはその活性断片；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン－γのようなタンパク質；あるいは例えばリンホカイン、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、インターロイキン－２（ＩＬ－２）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）もしくは他の増殖因子のような生物学的応答改変物質を含むことがある。

【０１２５】

このような治療剤を抗体に連結する技法はよく知られており、例えば、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編）、２４３～５６（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）中のＡｒｎｏｎら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第２版）、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編）、６２３～５３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）中のＨｅｌｌｓｔｒｏｍら、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編）、４７５～５０６（１９８５）中のＴｈｏｒｐｅ、「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｂａｌｄｗｉｎら（編）、３０３～１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）中の「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ

Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」ならびにＴｈｏｒｐｅ ＰＥおよびＲｏｓｓ ＷＣ（１９８２）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．６２：１１９～５８を参照されたい。

【０１２６】

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）または放射性毒素のような治療剤と一緒に投与される、ＣＣＲ６と結合するＣＣＲ６抗体またはその断片を提供する。

【０１２７】

医薬組成物

別の態様では、本発明は、本発明の抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む組成物、例えば医薬組成物を提供する。このような組成物は、１もしくは組み合わせ（例えば２以上の異なる）抗体、および／または本発明のイムノコンジュゲート、および／または上記のような細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）もしくは放射性毒素のような治療剤を含むことがある。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープと結合するか、または相補的な活性を有する抗体の組み合わせ（またはイムノコンジュゲート）を含み得る。本発明の医薬組成物は、併用治療において投与することもでき、すなわち他の薬剤と組み合わせることができる。例えば、併用治療は、少なくとも１つの他の抗炎症剤または免疫抑制剤と組み合わせた本発明のＣＣＲ６抗体を含み得る。

【０１２８】

本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される担体」は、任意のそして全ての生理的に適合する溶剤、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張化および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば注射または注入による）のために適切である。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち抗体またはイムノコンジュゲートをある材料中にコーティングして、化合物を不活性化できる酸およびその他の自然の状態から化合物を保護してよい。薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射用液または分散液の即時調製用の滅菌粉末を含む。医薬活性物質のためのこのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において知られている。任意の従来の媒体または作用物質が活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるこれらの使用が構想される。補助的活性化合物も組成物に組み込むことができる。

【０１２９】

別の態様では、本発明は、治療剤に連結したＣＣＲ６と結合する抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。用いることができるイムノコンジュゲートおよび治療剤については、上で記載している。

【０１３０】

別の態様では、本発明は、別の医薬活性薬剤をさらに含む本発明の抗体またはその断片を含む組成物を提供する。好ましくは、別の医薬活性薬剤は、ａ）ＣＣＲ６に対する別のアンタゴニスト、ｂ）抗炎症剤、ｃ）免疫抑制剤、例えばＴＮＦαアンタゴニスト、コルチゾンもしくはステロイドなど）および／またはｄ）抗アレルギー剤の１または複数である。

【０１３１】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤も含んでよい。薬学的に許容される抗酸化剤の例は、（１）アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどのような水溶性抗酸化剤；（２）パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアルコール（ＢＨＡ）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ－トコフェロールなどのような脂溶性抗酸化剤；および（３）クエン酸、エチレンジアミン４酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などのような金属キレート化剤を含む。本発明の医薬組成物において採用できる適切な水性および非水性担体の例は、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセ

ロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、オリーブ油のような植物油ならびにオレイン酸エチルのような注射用有機エステルを含む。適当な流動性は、例えばレシチンのようなコーティング材料の使用、分散液の場合に、要求される粒径の維持および界面活性剤の使用により維持できる。これらの組成物は、保存剤、湿潤化剤、乳化剤および分散剤のような補助剤も含有してよい。微生物の存在は、上記の滅菌化手順および様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの添加の両方により確実に防止できる。糖、塩化ナトリウムなどのような等張化剤を組成物に含めることが望ましいこともある。さらに、注射用医薬形の吸収の延長を、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる作用物質を含めることによりもたらしてもよい。

【０１３２】

治療用およびその他の使用

本発明の抗体は、ＣＣＲ６媒介性障害の診断および処置を含む、多数のｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの診断および治療用の利用性がある。例えば、これらの分子は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｅｘ　ｖｉｖｏで培養中の細胞に、または例えばｉｎ　ｖｉｖｏでヒト対象に投与して、様々なＣＣＲ６媒介性障害を処置、防止および診断できる。好ましい対象はヒトであり、ＣＣＲ６活性により媒介される障害（ＣＣＲ６媒介性障害）を有する患者を含む。本発明の中和抗体は、天然のＴ細胞集団と比較したときの、活性化されたＴ細胞集団におけるＣＣＲ６発現の増加またはメモリーＴ細胞集団上でのＣＣＲ６発現の増加またはＴｈ１７　Ｔ細胞集団上でのＣＣＲ６発現の増加のような、異常ＣＣＲ６状態を患者が有するかとは独立して、患者を処置するために効果的であり得る。より好ましい対象はヒトであり、高レベルのＣＣＲ６を発現する患者を含む。

【０１３３】

本発明の目的のための「患者」は、ヒトおよびその他の動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを含む。よって、本発明の抗体は、ヒト治療および獣医学的用途の両方を有する。本発明における用語「処置」または「処置する」は、疾患または障害についての治療的処置および予防的または抑制的措置を含むことを意味する。よって、例えば疾患の発症前の抗体投与の成功は、疾患の処置をもたらす。別の例として、疾患の症状と闘うための疾患の臨床的顕性化の後の抗体の投与の成功は、疾患の処置を構成する。「処置」および「処置する」は、疾患を根絶するための疾患の出現の後の抗体の投与も包含する。起こり得る臨床症状の低減と、おそらく疾患の改善とを伴う、発症後および臨床症状が生じた後の抗体の投与の成功は、疾患の処置を構成する。「処置を必要とする」者としては、疾患または障害を既に有する哺乳動物が挙げられ、また疾患または障害を有しやすい哺乳動物もであり、疾患または障害を防止しようとする哺乳動物も挙げられる。

【０１３４】

特定の実施形態では、抗体をｉｎ　ｖｉｖｏで用いて、様々なＣＣＲ６媒介性障害を処置、防止または診断する。よって、本発明は、対象におけるＣＣＲ６媒介性障害を処置するための方法であって、対象に治療上有効量の抗体またはその断片を投与するステップを含む方法を提供する。例示的なＣＣＲ６媒介性障害は、それらに限定されないが、炎症性疾患および／または自己免疫疾患、例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、関節リウマチ、ＭＳ、１型および２型糖尿病、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、アトピー性皮膚炎；例えば喘息およびアレルギー性肺炎症を含むアレルギー反応または状態；がん、アテローム動脈硬化症、感染、神経変性疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）および循環器障害／疾患を含む。好ましくは、ＣＣＲ６媒介性障害は、なかでも炎症性腸疾患（例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病）、関節リウマチ、ＭＳおよびアテローム動脈硬化症、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、視神経炎、加齢黄斑変性、ＳＬＥ、シェーグレン症候群、強皮症、全身性強皮症、慢性腎臓疾患、肝線維症、結核、特発性肺線維症、結核誘発性肺線維症、後腹膜線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、心内膜心筋線維症、心房性線維症、縦隔線維症、骨髄線維症（骨髄）、後腹膜線維症、進行性塊状線維症、腎原性全身性線維症、関節線維症を含む、炎症性疾患および／または自

己免疫疾患を含む。

【０１３５】

本発明の抗体を用いて処置される好ましいＣＣＲ６媒介性障害は、炎症性腸疾患、多発性硬化症、関節リウマチおよび喘息からなる群より選択される。本発明の抗体を用いて処置される特に好ましいＣＣＲ６媒介性障害は、炎症性腸疾患である。

【０１３６】

一実施形態では、本発明の抗体は、ＣＣＲ６のレベル、または細胞膜表面上にＣＣＲ６を含有する細胞のレベルを検出するために使用することができ、前記レベルは、よって、ある疾患症状につながることができる。あるいはその代わりに、抗体は、ＣＣＲ６機能を阻害または阻止するために使用することができ、そのことは今度は、ある疾患症状の防止または改善につながることができ、それによってＣＣＲ６を疾患のメディエーターとして関係づけることができる。このことは、試料および対照試料を、ＣＣＲ６抗体と、抗体とＣＣＲ６との間の複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより達成できる。抗体とＣＣＲ６との間で形成された任意の複合体を検出し、試料および対照において比較する。本発明の抗体とＣＣＲ６との特異的結合に鑑みて、本発明の抗体は、細胞の表面上のＣＣＲ６発現を特異的に検出するために使用することができ、例えば前記抗体はＣＣＲ６の発現レベルが低いまたは高い患者を検出するために使用することができる。本発明の抗体は、免疫親和性精製によりＣＣＲ６を精製するために使用することもできる。

【０１３７】

別の実施形態では、本発明の抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの治療用または診断用の使用に付随する結合活性について初期に試験できる。例えば、本発明の組成物は、フローサイトメトリー分析を用いて試験できる。

【０１３８】

本開示は、医薬品としての抗体またはその断片の使用、およびＣＣＲ６媒介性障害の処置のための医薬品の調製における抗体またはその断片の使用をさらに提供する。さらなる実施形態では、本開示は、医薬品として使用するための抗体またはその断片を提供する。本開示は、ＣＣＲ６媒介性障害を処置するための方法において使用するための抗体またはその断片も提供する。ＣＣＲ６媒介性障害は、上記のものである。本発明の抗体またはその断片は、患者の共刺激状態とは独立して、ＣＣＲ６媒介性障害を処置するために特に有用であり得る。好ましい実施形態では、抗体またはその断片は、例えば患者が高レベルのＣＣＲ６を発現するＣＣＲ６媒介性障害を処置するために使用することができる。

【０１３９】

以前に記載するように、本発明の抗ＣＣＲ６抗体は、１または複数の他の治療剤、例えば細胞傷害性薬剤、放射毒性薬剤または免疫抑制剤と共投与できる。抗体は、薬剤と連結できる（上記のようなイムノコンジュゲートとして）か、または薬剤と分けて投与できる。後者（分けた投与）の場合、抗体は、薬剤の前、後もしくは薬剤と同時に投与できるか、または他の既知の治療、例えば抗がん治療、例えば放射線照射と共投与できる。

【０１４０】

抗体の投与のために、投与量は、約０．０００１から１００ｍｇ／ｋｇ宿主体重まで、より通常は０．０１から１０ｍｇ／ｋｇ宿主体重までの範囲である。例示的な処置計画は、週１回、２週間ごとに１回、３週間ごとに１回、４週間ごとに１回、１カ月に１回、３カ月ごとに１回または３～６カ月ごとに１回の投与を必要とする。抗体は、複数の機会に通常投与される。単独投与間の間隔は、例えば、毎週、毎月、３カ月ごと、または毎年であり得る。間隔は、患者において標的抗原に対する抗体の血中レベルを測定することにより示されるように不定期的でもあり得る。いくつかの方法では、投与量は、約１～１０００μｇ／ｍｌ、いくつかの方法では約２５～３００μｇ／ｍｌの血漿抗体濃度を達成するように調整される。あるいはその代わりに、抗体は、持続放出製剤として投与でき、この場合、要求される投与頻度がより低い。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変動する。投与の投与量および頻度は、処置が予防的または治療的であるかに依存して変動できる。予防的用途では、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的頻

繁でない間隔で投与される。残りの寿命にわたって処置を受け続ける患者もいる。治療的用途では、疾患の進行が低減または終結するまで、比較的短い間隔での比較的高い用量が時折要求される。

【０１４１】

本発明の医薬組成物中の活性成分、すなわち抗体の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性にならずに、特定の患者、組成物および投与方法について所望の治療応答を達成するために効果的な活性成分の量を得るように変動できる。選択された投与量レベルは、採用される本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、採用される特定の抗体の排出速度、処置持続期間、採用される特定の組成物と組み合わせて用いる他の薬物、化合物および／または物質、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および以前の医療履歴などの、医療の分野においてよく知られている因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。

【０１４２】

「治療上有効量の」本発明のＣＣＲ６抗体は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、無疾患症状期間の頻度および持続期間の増加、ならびに／または疾患の苦痛による障害もしくは機能障害の防止をもたらす。ＣＣＲ６媒介性障害の処置についての化合物の能力は、ヒトにおける効力を予測できる動物モデル系において評価できる。代わりに、組成物のこの特性は、細胞成長を阻害する化合物の能力を調べることにより評価でき、このような阻害は、当業者に知られるアッセイによりｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定できる。当業者は、このような量を、対象のサイズ、対象の症状の重症度および選択される特定の組成物または投与経路のような因子に基づいて決定できる。

【０１４３】

本発明の抗体または組成物は、１または複数の投与経路により、当技術分野において知られる様々な方法の１または複数を用いて投与できる。当業者により認識されるように、投与の経路および／または方法は、所望の結果に依存して変動する。好ましい投与経路は、静脈内、筋内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば注射もしくは注入による他の非経口投与経路を含む。より好ましい投与経路は、静脈内または皮下である。「非経口投与」との句は、本明細書で用いる場合、通常注射による、経腸および局所投与以外の投与の方法を意味し、限定することなく、静脈内、筋内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、真皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入を含む。代わりに、本発明の抗体は、局所、表皮または粘膜投与経路、例えば鼻内、口腔、膣、直腸、舌下または局所によるような非経口でない経路により投与できる。

【０１４４】

製造品およびキット

本開示の別の実施形態では、ＣＣＲ６媒介性障害の処置のための、本発明の抗体もしくはその断片、組成物またはイムノコンジュゲートを含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含むことがある。適切な容器は、例えば瓶、バイアルまたはシリンジを含む。容器は、ガラスまたはプラスチックのような様々な材料から形成してよい。容器は、状態を処置するために効果的であり得る組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有することがある（例えば容器は、皮下注射針が突き刺すことができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも１つの活性薬剤は、本明細書に記載する抗体であってよい。ラベルまたは添付文書は、組成物を、がんのような所望の状態を処置するために用いることができることを示してよい。一実施形態では、ラベルまたは添付文書は、抗体を含む組成物を用いてＣＣＲ６媒介性障害を処置できることを示してよい。

【０１４５】

さらに、製造品は、（ａ）組成物を含有する第１容器であって、組成物が、本明細書の抗体を含む第１容器と、（ｂ）組成物を含有する第２容器であって、組成物が、抗体以外の治療剤を含む第２容器とを含むことがある。本開示の本実施形態の製造品は、第１およ

び第２組成物を組み合わせて用いて、ＣＣＲ６媒介性疾患または障害を処置できることを示す添付文書をさらに含んでよい。このような治療剤は、先行する項において記載する任意の補助治療であってよい（例えば血栓溶解剤、血小板凝集抑制薬、化学療法剤、血管新生抑制薬、抗ホルモン化合物、心臓保護剤および／またはサイトカインを含む、哺乳動物における免疫機能の調節物質）。代わりにまたはさらに、製造品は、注射用の静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液およびブドウ糖液のような薬学的に許容される緩衝液を含む第２（または第３）容器をさらに含んでよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針およびシリンジを含む、商業的および使用者の視点から望まれる他の物質をさらに含んでよい。

【０１４６】

本発明の抗体、組成物またはイムノコンジュゲートと使用説明書とを含むキットも本発明の範囲内である。キットは、免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤もしくは放射毒性剤、または１もしくは複数の本発明のさらなる抗体（例えば、第１抗体とは異なるＣＣＲ６上のエピトープと結合する、相補的活性を有する抗体）のような１または複数のさらなる試薬をさらに含有できる。

【０１４７】

さらなる記載なしで、当業者は、先行する記載および以下の説明的な実施例を用いて、本開示の薬剤を利用して、特許請求の範囲に記載される方法を実施できると考えられる。以下の実行実施例は、本開示の実施を容易にするために与えられ、残りの本開示をいずれの様式でも限定すると解釈されない。

【実施例】

【０１４８】

［実施例１］

安定ヒトＣＣＲ６発現ＣＨＯおよびＢＡＦ／３細胞の樹立

構築物のクローニング：

ヒトＣＣＲ６についての遺伝子は、Ｉｍａｇｅｎｅｓ（現ＳｏｕｒｃｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ、Ｎｏｔｔｉｎｇｈａｍ、ＵＫ）に注文した。Ｉｍａｇｅｎｅｓにより構築物に付された名称は、ＩＲＡＴｐ９７０Ｅ０７５７Ｄであった。クローニングのための標的ベクターは、マウスＣＭＶプロモーターの制御下の発現カセットを有する、Ｇｌｅｎｍａｒｋが所有権を持つベクターであるｐＧＬＥＸ３３［ＩＲＥＳ－ＲＥＰ］であった。マルチクローニングサイト（ＭＣＳ）により、対象の遺伝子であるＣＣＲ６のクローニングが可能になった。ＭＣＳ（よって、最終構築物では、ＣＣＲ６のオープンリーディングフレーム）の後に、ＩＲＥＳと、レポータータンパク質（ＲＥＰ）をコードする第２オープンリーディングフレームとが続いた。

【０１４９】

ＣＣＲ６のオープンリーディングフレーム（配列番号１０１）をｐＧＬＥＸ３３［ＩＲＥＳ－ＲＥＰ］にクローニングするために、ＩＲＡＴｐ９７０Ｅ０７５７Ｄの構築物を、オープンリーディングフレームの５’および３’に簡便な制限部位（ＮｈｅＩ／ＣｌａＩ）を付加する特異的プライマー対（ＧｌｎＰｒ８６３およびＧｌｎＰｒ８６４）を用いるＰＣＲのための鋳型として用いた。ＮｈｅＩ／ＣｌａＩを用いてアンプリコンを切断し、同じ酵素を用いてＭＣＳで切断しかつ再閉環を防ぐためにＣＩＰ処理したｐＧＬＥＸ３３［ＩＲＥＳ－ＲＥＰ］の主鎖にクローニングした。得られた構築物をｐＧＬＥＸ３３［ＣＣＲ６－ＩＲＥＳ－ＲＥＰ］と命名し、配列決定（Ｆａｓｔｅｒｉｓ、Ｇｅｎｅｖａ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により確認した。

【０１５０】

ＣＨＯ［ｈｓＣＣＲ６］

チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ－Ｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ、ＵＳＡ）を、４ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ａｐｐｌｉｃｈｅｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を補ったＰｏｗｅｒＣＨＯ－２　ＣＤ培地（Ｌｏｎｚａ、Ｖｅｒｖｉｅｒｓ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）中で懸濁培養し、振とうインキュベータ（２．５ｃｍの環状往復運動で２００

ｒｐｍ）中で３７℃、５％CO_2および湿度８０％にてインキュベートした。

【０１５１】

ＣＨＯ－Ｓ細胞の継代培養は、新鮮な培地中で０．５＊１０^{6}生存細胞／ｍｌの播種密度を用いて３～４日ごとに定期的に行った。ガス交換を可能にする透過性フィルタを含有する５０ｍｌバイオリアクタチューブ（Ｔｕｂｅｓｐｉｎ　Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ　５０；ＴＰＰ、Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中で、１０ｍｌの培地を用いて細胞を培養した。細胞生存および濃度は、トリパンブルー細胞色素排除法を用いるＣｏｕｎｔｅｓｓ自動化細胞計数器（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ、ＵＳＡ）を用いて決定した。細胞濃度は、ＣＨＯ－Ｓ細胞について、ＰＣＶチューブ（ＴＰＰ、Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いる血中血球容積（ＰＣＶ）法の決定により確認した。

【０１５２】

ＣＨＯ－Ｓ細胞のトランスフェクションは、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ；ＪｅｔＰＥＩ、Ｐｏｌｙｐｌｕｓ－ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ、Ｉｌｌｋｉｒｃｈ、Ｆｒａｎｃｅ）を用いて行った。ＰＥＩは、ＤＮＡのような負に荷電した分子と複合体を形成できるカチオンポリマーである。正に荷電したＤＮＡ－ＰＥＩ複合体は、負に荷電した細胞表面と結合し、エンドサイトーシスにより内部に取り込まれる。これは、リソソーム区画に達し、そこから溶解により核に放出される。ＤＮＡ－ＰＥＩ複合体を用いる高いトランスフェクション効率は、ＰＥＩがリソソーム分解からＤＮＡを保護する能力による。細胞は、製造者により提供されるマニュアルに従ってトランスフェクトした。

【０１５３】

対象の遺伝子およびレポーター遺伝子を発現するｐＧＬＥＸ３３［ＣＣＲ６－ＩＲＥＳ－ＲＥＰ］、および選択マーカーであるピューロマイシンに対する耐性をもたらすＰＡＣ遺伝子を発現する第２ベクターの、２つのプラスミドを同時にトランスフェクトした。これらのベクターはともに、安定的トランスフェクションの前に直鎖状にし、安定細胞集団の作製を可能にすることが知られている比率でトランスフェクトした。

【０１５４】

トランスフェクションの次の日に、選択培地で異なる濃度に細胞を希釈し、９６ウェルプレートに分配して、ミニプールとよばれる安定細胞集団を作製した。用いた選択培地は、安定株化細胞の選択を可能にすることが知られている特定の濃度でピューロマイシンを補ったＰｏｗｅｒＣＨＯ－２、４ｍＭグルタミンであった。

【０１５５】

トランスフェクションの７日後に、細胞に選択培地を加えることにより、選択の厳密さを更新した。９６ウェルプレート中のコロニーがコンフルエントになるとすぐに、蛍光リーダーを用いて、レポーター遺伝子発現についてプレートを分析した。４８個の最高の発現を示すものを、２４ウェルプレートの規模で増殖させた。この規模にて、ＦＡＣＳおよびヒトＣＣＲ６特異的抗体を用いてヒトＣＣＲ６発現について細胞を試験した。５つのクローン＃１２、１６、２５、３７および４７は、ＣＣＲ６の最も均質な発現かつ最高の発現を示した。これらの細胞を、それぞれ１０個の凍結保存バイアルでの研究細胞バンク〔research cell bank〕調製物のためにさらに増殖させた。タンパク質発現および株化細胞開発グループの細胞バンクにおいて－８０℃にてＲＣＢを維持した。

【０１５６】

ＢＡ／Ｆ３［ＣＣＲ６］

ＢＡ／Ｆ３は、おそらくＣ３Ｈマウスに由来する、ＩＬ－３依存性マウスプロＢ株化細胞である。注文番号ＡＣＣ３００の細胞をＤＳＭＺ（Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）から購入した。ＢＡ／Ｆ３成長培地（８０％ＲＰＭＩ（ｖｏｌ．／ｖｏｌ．））、１０％熱不活化ＦＣＳ（ｖｏｌ．／ｖｏｌ．）、ＷＥＨＩ－３Ｂ株化細胞の１０％（ｖｏｌ．／ｖｏｌ．）馴化培地（ＤＳＭＺカタログ番号ＡＣＣ　２６）を用いてＴフラスコ中で定期的に細胞を培養し、静置インキュベータ（３７℃、５％CO_2および湿度８０％）でインキュベートした。

【０１５７】
ＢＡ／Ｆ３細胞の継代培養は、新鮮な培地中で０．１＊１０^{6}生存細胞／ｍｌの播種密度を用いて３～４日ごとに定期的に行った。Ｔ－１５０フラスコ（ＴＰＰ、Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中で２０ｍｌの培地を用いて細胞を培養した。細胞生存および濃度は、トリパンブルー細胞色素排除法を用いるＣｏｕｎｔｅｓｓ自動化細胞計数器（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ、ＵＳＡ）を用いて決定した。

【０１５８】
ＢＡ／Ｆ３細胞のトランスフェクションは、ＮＥＯＮ装置（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を用いるエレクトロポレーションを用いて行った。エレクトロポレーション条件（パルス数、パルス長、電圧）は、ＮＥＯＮ装置のマニュアルで提供される指示を用いて最適化した。

【０１５９】
対象の遺伝子およびレポーター遺伝子を発現するｐＧＬＥＸ３３［ＣＣＲ６－ＩＲＥＳ－ＲＥＰ］、および選択マーカーであるピューロマイシンに対する耐性をもたらすＰＡＣ遺伝子を発現する第２ベクターの、２つのプラスミドを同時にトランスフェクトした。これらのベクターはともに、安定的トランスフェクションの前に直鎖状にし、安定細胞集団の作製を可能にすることが知られている比率でトランスフェクトした。

【０１６０】
異なる濃度に成長培地で細胞を希釈し、９６ウェルプレートに分配した。次の日に、別の容量の選択培地を細胞に加えた。用いた選択培地は、ピューロマイシンを補ったＢＡ／Ｆ３成長培地であった。異なる濃度でのＢＡ／Ｆ３細胞の希釈とピューロマイシン処置との組み合わせは、安定株化細胞の選択を可能にすることが知られていた。

【０１６１】
９６ウェルプレート中のコロニーがコンフルエントになるとすぐに、蛍光リーダーを用いて、レポーター遺伝子発現についてプレートを分析した。９６個の最高の発現を示すものを、２４ウェルプレートの規模で増殖させた。この規模にて、ＦＡＣＳおよびヒトＣＣＲ６特異的抗体を用いてヒトＣＣＲ６発現について細胞を試験した。５つのクローン＃７、１７、２１および４８は、ＣＣＲ６の最も均質な発現かつ最高の発現を示した。これらの細胞を、それぞれ１０個の凍結保存バイアルでの研究細胞バンク調製物のためにさらに増殖させた。タンパク質発現および株化細胞開発グループの細胞バンクにおいて－８０℃にてＲＣＢを維持した。

>Glnpr863　配列番号９９
GAGGCTAGCCACCATGAGCGGGGAATCAATGAA
>Glnpr864　配列番号１００
AGGGGCATCGATTCACATAGTGAAGGACGACGC
>hsCCR6　配列番号１０１
ATGAGCGGGGAATCAATGAATTTCAGCGATGTTTTCGACTCCAGTGAAGATTATTT
TGTGTCAGTCAATACTTCATATTACTCAGTTGATTCTGAGATGTTACTGTGCTCCTT
GCAGGAGGTCAGGCAGTTCTCCAGGCTATTTGTACCGATTGCCTACTCCTTGATCT
GTGTCTTTGGCCTCCTGGGGAATATTCTGGTGGTGATCACCTTTGCTTTTTATAAG
AAGGCCAGGTCTATGACAGACGTCTATCTCTTGAACATGGCCATTGCAGACATCCT
CTTTGTTCTTACTCTCCCATTCTGGGCAGTGAGTCATGCCACCGGTGCGTGGGTTT
TCAGCAATGCCACGTGCAAGTTGCTAAAAGGCATCTATGCCATCAACTTTAACTGC
GGGATGCTGCTCCTGACTTGCATTAGCATGGACCGGTACATCGCCATTGTACAGGC
GACTAAGTCATTCCGGCTCCGATCCAGAACACTACCGCGCAGCAAAATCATCTGCC
TTGTTGTGTGGGGGCTGTCAGTCATCATCTCCAGCTCAACTTTTGTCTTCAACCAA
AAATACAACACCCAAGGCAGCGATGTCTGTGAACCCAAGTACCAGACTGTCTCGG
AGCCCATCAGGTGGAAGCTGCTGATGTTGGGGCTTGAGCTACTCTTTGGTTTCTTT
ATCCCTTTGATGTTCATGATATTTTGTTACACGTTCATTGTCAAAACCTTGGTGCAA

GCTCAGAATTCTAAAAGGCACAAAGCCATCCGTGTAATCATAGCTGTGGTGCTTGT
GTTTCTGGCTTGTCAGATTCCTCATAACATGGTCCTGCTTGTGACGGCTGCAAATT
TGGGTAAAATGAACCGATCCTGCCAGAGCGAAAAGCTAATTGGCTATACGAAAAC
TGTCACAGAAGTCCTGGCTTTCCTGCACTGCTGCCTGAACCCTGTGCTCTACGCTT
TTATTGGGCAGAAGTTCAGAAACTACTTTCTGAAGATCTTGAAGGACCTGTGGTGT
GTGAGAAGGAAGTACAAGTCCTCAGGCTTCTCCTGTGCCGGGAGGTACTCAGAAA
ACATTTCTCGGCAGACCAGTGAGACCGCAGATAACGACAATGCGTCGTCCTTCACT
ATGTGAA

【０１６２】

マウス抗ヒトＣＣＲ６抗体の作製およびスクリーニング

ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＣＨＯおよびＢＡＦ細胞をＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳに再懸濁した。１回目の免疫化のために、ＣＣＲ６をトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を０．５ｍＬインスリンシリンジ（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に移し、ＢＡＬＢ／ｃ動物（Ｈａｒｌａｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を、10×10^{6}のトランスフェクトした細胞を用いて後肢の肉趾、尾の基部および首に皮下免疫した。免疫化は、ＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦを用いて同じ注射経路に従って２週間後に反復した。

【０１６３】

免疫化マウス血清中の循環抗ヒトＣＣＲ６抗体の存在は、トランスフェクトしたＢＡＦ細胞および陰性対照としての偽ＢＡＦを用いてフローサイトメトリーにより評価した。異なるマウス血清の系列希釈（１：１００から１：１０９まで）を細胞に加え、結合した抗体を、ＰＥ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ　２次抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて検出した。1×10^{6}のＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞を用いる最後の皮下ブースター注射を、最良の抗ヒトＣＣＲ６　ＩｇＧ血清力価を示す動物において行い、３日後に屠殺した。

【０１６４】

動物を安楽死させ、鼠径、腋窩、上腕、膝窩および坐骨リンパ節を回収して、リンパ節の構造を、ＤＮＡｓｅ（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ（Ｓｃｈｗｅｉｚ）ＡＧ、Ｒｏｔｋｒｅｕｚ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）およびコラゲナーゼ（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ（Ｓｃｈｗｅｉｚ）ＡＧ、Ｒｏｔｋｒｅｕｚ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）溶液中で２本の２５Ｇ針を用いて壊すことにより、単細胞懸濁液を調製した。単細胞懸濁液を、骨髄腫株化細胞Ｘ６３ＡＧ８．６５３（マウスＢＡＬＢ／ｃ骨髄腫株化細胞；ＡＴＣＣ受託番号：ＣＲＬ１５８０；Ｋｅａｒｎｅｙ　ＪＦら、（１９７９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２３（４）：１５４８～１５５０）と、７：１の比率（融合パートナー対採集されたリンパ節細胞）で、ポリエチレングリコール１５００（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ（Ｓｃｈｗｅｉｚ）ＡＧ、Ｒｏｔｋｒｅｕｚ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて融合した。融合細胞を、１０％胎仔ウシ血清（ＦＢＳ、ＰＡＡ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００Ｕ／ｍｌ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）ペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＡＧ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、５０μＭβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＨＡＴ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）および１％増殖因子（ハイブリドカイン、Ｉｎｔｅｒｃｈｉｍ／Ｕｐｔｉｍａ、Ｍｏｎｔｌｕｃｏｎ、Ｆｒａｎｃｅ）を補ったＤＭＥＭ－１０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＡＧ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中にマウスマクロファージを含有する、９６ウェル平底プレートに播種した。

【０１６５】

融合からのおよそ８００のウェルを、ヒトＣＣＲ６を認識するマウスＩｇＧの存在について、ＦＡＣＳによりスクリーニングした。陽性ウェルを増殖させ、２回のサブクローニ

ングに供した。細胞を回収し、重鎖および軽鎖をクローニングして配列決定した。

【０１６６】

［実施例２］

ハイブリドーマ細胞からの抗ＣＣＲ６抗体のＶＨおよびＶＬ鎖のクローニングおよび配列決定

ＲＮＡをハイブリドーマから単離し、ｃＤＮＡに逆転写し、ＶＨおよびＶＬ遺伝子をＰＣＲにより増幅した。これらのＰＣＲ産物をレスキューベクターにライゲーションし、個別のＰＣＲ産物の配列決定およびハイブリドーマのモノクローン性またはポリクローン性の決定を可能にした。この目的のために用いたｐＤｒｉｖｅベクター（Ｑｉａｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）は、挿入断片が存在しない場合にＬａｃＺα－ペプチドをコードした。このことにより、ＩＰＴＧおよびＸ－ｇａｌ含有ＬＢ寒天プレート上で青色／白色選択が可能になった（挿入断片がないコロニーは、ＬａｃＺα－ペプチドによるＸ－ｇａｌの分解のために青色であった）。白色のコロニーを増幅し、ミニプレップを行ってプラスミドを単離し、そのプラスミドはベクターにアニールする標準的なプライマー（Ｍ１３ｒｅｖ、Ｍ１３ｆｗｄ、Ｔ７またはＳＰ６）を用いて配列決定した。配列は、３つの異なるソフトウェア、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ、Ｃｌｏｎｅ　ＭａｎａｇｅｒおよびＢｉｏＥｄｉｔを用いて分析した。得られた配列を、次いで、対象の抗体の組換え発現のための発現ベクターにサブクローニングした。

【０１６７】

１．ＲＮＡ単離

ハイブリドーマからのトータルＲＮＡを、２～１０×10^6細胞から、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－ＮａｇｅｌからのＮｕｃｅｌｏｓＳｐｉｎ　ＲＮＡ　ＩＩキット（Ｇｅｒｍａｎｙ、カタログ番号７４０９５５）を用いて、製造者のプロトコールに従って（６００μｌ　ＲＡ１緩衝液、カラム均質化に加えてシリンジ均質化、および溶出のための６０μｌ　ＲＮアーゼフリーH_2O（キットとともに提供される）を用いて）単離した。

【０１６８】

ＲＮＡ調製物の収量は、ＮａｎｏＤｒｏｐＮＤ－１０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＵＳＡ）を用いて定量した。

【０１６９】

２．ワンステップＲＴ－ＰＣＲ

上記のトータルＲＮＡ調製物を、ｃＤＮＡにさらに逆転写し、ＶＨおよびＶＬ断片をＰＣＲにより、縮合プライマーの２つの異なる混合物を用いて増幅した。それぞれの混合物は、マウス免疫グロブリン重鎖可変断片および可変重鎖接合領域の全ての異なるサブファミリーの回収、または全てのマウス免疫グロブリン軽鎖カッパ可変断片および可変軽鎖カッパ接合領域の回収を可能にした。逆転写およびＰＣＲ増幅はともに、ＱｉａＧｅｎワンステップＲＴ－ＰＣＲキット（Ｑｉａｇｅｎ、ドイツ、カタログ番号２１０２１２）を用いて同時に行った。この技法は特異的プライマーを用いたので、それぞれのｍＲＮＡ試料を、次いで、二重に処理して、ＶＨまたはＶＬ断片のいずれかの個別の逆転写および増幅を可能にした。

【０１７０】

ＲＮアーゼフリーに３０μｌの最終容量で溶解した２μｇのトータルＲＮＡを、１０μｌのＱｉａＧｅｎワンステップＲＴ－ＰＣＲ緩衝液の５×ストック溶液、２μｌのｄＮＴＰミックス（１０ｍＭの濃度）、３μｌのプライマーミックス（１０μＭの濃度）および２μｌのＱｉａＧｅｎワンステップＲＴ－ＰＣＲ酵素ミックスと混合した。最終溶液をＰＣＲチューブに入れ、以下の設定を用いてＰＣＲサーモサイクラー（ＢｉｏＲａｄ　ｉＣｙｃｌｅｒバージョン４．００６、ＢｉｏＲａｄ、ＵＳＡ）でサイクルにかけた：

５０℃にて３０分

９５℃にて１５分

４０サイクル：９４℃にて３０秒

５５℃にて３０秒

７２℃にて１分
７２℃にて１０分
４℃にて保持
【０１７１】
３．ｐＤｒｉｖｅクローニング
ＰＣＲ産物を２％アガロースゲルに載せ、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ ＮｕｃｌｏＳｐｉｎゲルおよびＰＣＲクリーンアップキット（Ｇｅｒｍａｎｙ、カタログ番号７４０６０９）を用いて、対象の産物（およそ４５０ｂｐ）をゲルから切り出した。ＤＮＡ配列決定のために、抽出したＰＣＲ産物をレスキューベクター（ｐＤｒｉｖｅベクター、Ｑｉａｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ、カタログ番号２３１１２４）にクローニングし、Ｅ．ｃｏｌｉ ＴＯＰ１０コンピテント細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＡＧ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ、番号Ｃ４０４００６）を形質転換した。
【０１７２】
ミニプレップ抽出
陽性コロニーを、ＭＮ方形ウェルブロック（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ．、カタログ番号７４０４８８）において１．５ｍｌ ＬＢ＋１００μｇ／ｍｌアンピシリン中で増幅させ、ミニプレップ抽出を、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ ９６プラスミドキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ．、カタログ番号７４０６２５）を用いて行った。
【０１７３】
４．配列決定
試料を、ＤＮＡ配列決定のために、標準的なプライマーＭ１３ｒｅｖ、Ｍ１３ｆｗｄ、Ｔ７またはＳＰ６を用いるＤＮＡ配列決定サービス業者であるＦａｓｔｅｒｉｓ（Ｐｌａｎ－ｌｅｓ－Ｏｕａｔｅｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に送った。
【０１７４】
５．配列分析
配列の分析のために、Ｇｅｎｅｉｏｕｓクローンマネージャ９プロフェッショナル版およびＢｉｏＥｄｉｔ配列アラインメントエディタ（Ｈａｌｌ，Ｔ．Ａ．１９９９．ＢｉｏＥｄｉｔ：ａ ｕｓｅｒ－ｆｒｉｅｎｄｌｙ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｅｄｉｔｏｒ ａｎｄ ａｎａｌｙｓｉｓ ｐｒｏｇｒａｍ ｆｏｒ Ｗｉｎｄｏｗｓ９５／９８／ＮＴ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．４１：９５～９８）を用いた。
【０１７５】
６．組換えキメラ抗体発現のための発現ベクターのクローニング
哺乳動物細胞での組換え発現のために、単離マウスＶＨおよびＶＬ断片を、アセンブリベースのＰＣＲ法を用いて、キメラ免疫グロブリンとしてフォーマットした。これらのキメラ抗体は、マウス重可変ドメインがヒトＩｇＧ１重鎖定常ドメイン（γ１、ヒンジ、γ２およびγ３領域）と融合した重鎖と、マウス軽可変ドメインがヒトカッパ定常ドメイン（Ｃκ）と融合した軽鎖とからなる。全てのキメラ抗体を、発現のための自前の哺乳動物発現ベクターｐＧＬＥＸ１８ベクターにクローニングし、ＨＥＫ－２９３（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ－１５７３）を一過的にトランスフェクトした。
【０１７６】
最も初めのキメラ（ＨＣおよびＬＣのため）は、オーバーラッピングＰＣＲにより生成した。可変部分および定常部分はともにＰＣＲにより増幅し、次いで２回目のＰＣＲ反応により一緒に融合した。これらを、次いで、ＢｓｐＥＩ制限部位の上流にリーダーペプチドを含有する１つの自前のベクターに、インフレームでＢｓｐＥＩ／ＮｏｔＩを用いてクローニングした。得られたコード配列（リーダーペプチド、可変部分、定常部分）は、ＨｉｎｄＩＩＩ／ＸｈｏＩ（ＬＣのため）またはＨｉｎｄＩＩＩ／ＸｂａＩ（ＨＣのため）を用いてｐＧＬＥＸ１８発現ベクターにサブクローニングした。ＲｓｒＩＩ（ＬＣのため）およびＢｂｖＣＩ（ＨＣのため）についての制限部位は、抗体の可変部分と定常部分と

の間に、オーバーラッピングＰＣＲ中に付加した。次のキメラのために、ＶＬおよびＶＨをＰＣＲにより増幅し、ＬＣのためにＢｓｐＥＩ／ＲｓｒＩＩおよびＨＣのためにＢｓｐＥＩ／ＢｂｖＣＩを用いて、リーダーペプチドおよび対応する定常部分を含有するｐＧＬＥＸ１８主鎖にインフレームで直接クローニングした。

【０１７７】

逆転写および増幅のために用いたプライマーは、Ｍｉｃｒｏｓｙｎｔｈ、（Ｂａｌｇａｃｈ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により合成して、ＨＰＬＣ精製した。プライマー配列は、表１に見出すことができる。

【０１７８】

【表１－１】

表1

プライマーミックス VH back 100uM（100uMストックから）（配列番号 102～120）

GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C CAG GTG CAG CTG AAG SA**R** TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC	4μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C CAG GTY CAR CTG CAG CA**R** TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C CAG GTC CAC GTG AAG CA**R** TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTG AAS STG GTG GA**R** TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAV GTG AWG **S**TG GTG GAG TC	4μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTG CAG S**T**G GTG GA**R** TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAK GTG CAM CTG GTG GA**R** TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTG CAR CTT GTT GA**R** TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAR GTR AAG CTT CTC GA**R** TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAA GTG AAR STT GAG GA**R** TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC	3μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC	2μl
GTGATC gcc atg gc**g tcg ac**C GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC	2μl

プライマーミックス VH for 100uM（100uMストックから）（配列番号 121～124）

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT	9.5μl
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	9.5μl
CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	9.5μl
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT	9.5μl

プライマーミックス VL back 100uM（100uMストックから）（配列番号 125～144）

GGCGGTGGC **gct agc GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC**	3μl

【表１－２】

GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC**	3μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC**	3μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC**	4μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC**	4μl
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC	2μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC**	2μl
GGCGGTGGC**gct agc GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC**	3μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT STR ATG ACC CAR TC**	4μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC**	4μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC**	4μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC**	1μl
GGCGGTGGC **gct agc GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC**	2μl
GGCGGTGGC **gct agc CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC**	2.8μl

プライマーミックス VL back 100uM（100uM ストックから）（配列番号 145～148）

ATGCTGAC **gc ggc cgc** ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG	1.9μl
ATGCTGAC **gc ggc cgc** ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG	9.5μl
ATGCTGAC **gc ggc cgc** ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG	9.5μl
ATGCTGAC **gc ggc cgc** ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG	2μl

【０１７９】

表２に示す以下の配列決定プライマーを用いた。

【０１８０】

【表２】

表 **2:**

M13-Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT (配列番号 149)
M13-Rev	AACAGCTATGACCATG (配列番号 150)
T7	TAATACGACTCACTATAGG (配列番号 151)
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG (配列番号 152)

【０１８１】

［実施例３］

抗ヒトＣＣＲ６抗体の生物学的特徴決定

フローサイトメトリーによるＣＣＲ６特異的抗体検出

ハイブリドーマおよび組換え抗体候補による抗体力価、特異性および生成を、フローサイトメトリーにより決定した。簡単に述べると、ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞（これらのトランスフェクトした細胞の作製は、実施例１で詳細に説明されている）を培養し、２×１０^{5}細胞を９６ウェルＶ底プレート（ＴＰＰ、Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に分配し、１３００ｒｐｍにて３分間遠心分離した。上清を捨て、細胞を回収し、以下に記載するようにしてフローサイトメトリーにより分析した。細胞を、５０μｌのハイブリドーマ上清または５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、２％ＦＢＳ、１０％ Ｖｅｒｓｅｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＳＡ））に、５μｇ／ｍＬのアイソタイプ対照または市販のマウス抗ヒトＣＣＲ６抗体（クローン１１Ａ９、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）とともに再懸濁した。細胞を３０分間氷上でインキュベートし、２回洗浄し、５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。１／２００に希釈した抗マウスＩｇＧ－フィコエリトリン－ＰＥ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて、ＣＣＲ６特異的マウスハイブリドーマおよびアイソタイプ対照抗体を検出した。細胞を１５分間氷上でインキュベートし、１回洗浄し、４００μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦＡＣＳ装置（Ｃｙａｎ、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓ．Ａ．、Ｎｙｏｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で分析した。図１は、様々なクローンの親のハイブリドーマ上清が、トランスフェクトしたＢＡＦ細胞の表面上で発現されるヒトＣＣＲ６タンパク質を認識する（図１Ａ）が、偽ＢＡＦ細胞上では認識しない（図１Ｂ）ことを示す。

【０１８２】

４Ｈ１１は、以下に詳細に説明する全ての選択された組換え候補（ｎ＝５）のなかでも、ハイブリドーマ安定性およびよりよい機能的特性の点で他の候補よりも優れた特性を示したので、選択した。

【０１８３】

４Ｈ１１キメラ抗体は、ＤｉｓｃｏｖｅｒｘバイオアッセイにおいてＣＣＲ６媒介性細胞活性化を中和する

ＣＣＲ６受容体の活性化の際にキメラ４Ｈ１１がβ－アレスチンの動員を中和するかを決定するために、Ａｂ Ｈｕｎｔｅｒ抗ＣＣＲ６キット（ＤｉｓｃｏｖｅＲｘ ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ、ＵＫ）を用いるバイオアッセイを、製造者の仕様書に従って評価した。化学発光活性は、マイクロプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ、ＵＳＡ；流通業者：ＷＩＴＴＥＣ ＡＧ、Ｌｉｔｔａｕ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて読み取った。アッセイでは、キメラ４Ｈ１１を５つの異なる濃度（２０、６．７、２、０．７および０．２μｇ／ｍｌ）にて用いた。キメラＩｇＧ１アイソタイプ対照および抗ＣＣＬ２０（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＵＳＡ）は、それぞれ陰性および陽性対照として２０μｇ／ｍｌにて用いた。相対発光単位（ＲＬＵ）のパーセンテージは、キメラＩｇＧ１アイソタイプ対照を用いる条件での化学発光シグナルを１００％の発光活性とみなして算出した。図２Ａは、キメラ４Ｈ１１が、アイソタイプ一致対照と比較して、用量依存的な様式でＣＣＲ６受容体シグナル伝達を著しく低減することを示す。さらに、キメラ４Ｈ１１は、低濃度（０．２μｇ／ｍｌ）にてまだ活性である。

【０１８４】

ＣＣＲ６発現ＢＡＦ細胞のＣＣＬ２０誘導遊走の阻害

ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞の作製は、実施例１で詳細に説明されている。ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞の、ヒトＣＣＬ２０に応答しての遊走を中和するキメラ４Ｈ１１の能力を試験した。簡単に述べると、１×１０^{6}細胞／ｍｌにて希釈した１００μｌのＢＡＦ－ＣＣＲ６を、３つの用量のキメラ４Ｈ１１（１０、２および０．４μｇ／ｍｌ）とプレインキュベートし、８．０μｍ孔ポリカーボネートメンブレンインサート［Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｃｈｅｍｉｅ Ｂｒｕｎｓｃｈｗｉｇ ＡＧ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ］を有する６．５ｍｍ Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（登録商標）の上部

チャンバに加えた。Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの下部チャンバは、５００μｌのＢＡＦ培地（１０％のＦＣＳ（Ａｍｉｍｅｄ、Ｂｉｏｃｏｎｃｅｐｔ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄにより流通）を含有するＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ ＧｍｂＨ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ））で１０ｎｇ／ｍｌに希釈した、組換えヒトＣＣＬ２０（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）を含有した。インキュベーションの後に、下部および上部チャンバから細胞を採集し、Ｇｕａｖａ Ｅａｓｙｃｙｔｅ ＨＴ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ ＡＧ、Ｚｕｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて計数した。キメラＩｇＧ１アイソタイプおよび抗ＣＣＬ２０（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）は、それぞれ陰性および陽性対照として１０μｇ／ｍｌにて用いた。遊走比は、下部チャンバ中の細胞の数を、上部および下部チャンバ中の細胞の総数で除することにより算出した。遊走の阻害のパーセンテージは、アイソタイプ対照について観察されたもののパーセンテージとして算出した。図２Ｂは、キメラ４Ｈ１１が、ヒトＣＣＬ２０により誘導されるＢＡＦＣＣＲ６細胞の遊走を、アイソタイプ対照と比較して、０．４μｇ／ｍｌでさえ低減したことを証明する。

【０１８５】

［実施例４］

フローサイトメトリーによる、ヒトおよび他の動物種の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に対する４Ｈ１１候補の結合

ヒト細胞

ヒト白血球を含有するフィルタを、Ｌａ Ｃｈａｕｘ－ｄｅ－Ｆｏｎｄｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄの血液採取センター（Ｃｅｎｔｒｅ ｄｅ Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ Ｓａｎｇｕｉｎｅ ｅｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｉｒｅ ｄｅ Ｓｅｒｏｌｏｇｉｅ、ｒｕｅ Ｓｏｐｈｉｅ－Ｍａｉｒｅｔ ２９、ＣＨ－２３００）から回収した。細胞を、１０Ｕ／ｍＬのリケミン（Ｄｒｏｓｓａｐｈａｒｍ ＡＧ、Ｌｕｃｅｒｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を含有する６０ｍＬのＰＢＳを逆に流すことにより、フィルタから取り出した。ＰＢＭＣを、次いで、製造者の使用説明に従って５０ｍＬ Ｂｌｏｏｄ－Ｓｅｐ－Ｆｉｌｔｅｒチューブ（Ｂｒｕｎｓｃｈｗｉｇ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて精製した。細胞は、ＦＢＳ（ＰＡＡ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）を含むロズウェルパーク記念研究所（ＲＰＭＩ、ＰＡＡ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）培地で３回洗浄した。細胞を計数し、2×10^5細胞を９６ウェルＶ底プレート（ＴＰＰ、Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に分配し、１３００ｒｐｍにて３分間遠心分離した。細胞を回収し、以下に記載するようにしてフローサイトメトリーにより分析した。

【０１８６】

上記のようにして調製したヒトＰＢＭＣ細胞を、５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、２％ＦＢＳ、１０％ Ｖｅｒｓｅｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＳＡ）に、１０μｇ／ｍＬのキメラ４Ｈ１１抗体、１０μｇ／ｍＬもしくは適当なアイソタイプ対照または１０μｇ／ｍＬの市販の抗ヒトＣＣＲ６抗体（クローンＲ６Ｈ９、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｖｉｅｎｎａ、Ａｕｓｔｒｉａ）とともに再懸濁した。細胞を３０分間氷上でインキュベートし、１回洗浄し、５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。１／２００に希釈した抗ヒトＩｇＧ－フィコエリトリン－ＰＥおよび抗マウスＩｇＧ－フィコエリトリン－ＰＥ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）をそれぞれ用いて、キメラ４Ｈ１１抗体および市販の抗ヒトＣＣＲ６抗体を検出した。細胞を１５分間氷上でインキュベートし、１回洗浄し、４００μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦＡＣＳ装置（Ｃｙａｎ、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓ．Ａ．、Ｎｙｏｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で分析した。

【０１８７】

カニクイザル初代細胞

カニクイザルからの全血（Ｅｒｉｃ Ｒｏｕｉｌｌｅｒ教授、神経生理学研究室、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｆｒｉｂｏｕｒｇ、Ｆｒｉｂｏｕｒｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎ

ｄから得た）をクエン酸塩チューブ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に回収した。２ｍＬのＰＢＳを３ｍＬの血液と混合し、混合物を１０ｍｌの８５：１５Ｆｉｃｏｌｌ：ＰＢＳ混合物（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の上に重層した。試料を２０分間、室温にて中断なく遠心分離した。ＰＢＭＣ層を回収し、ＰＢＳで３回洗浄した。細胞をダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、ＰＡＡ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）、１０％ＦＢＳ（ＰＡＡ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）、非必須アミノ酸（ＰＡＡ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）１ｍＭピルビン酸ナトリウム（ＰＡＡ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）、２ｍＭウルトラグルタミン（Ｌｏｎｚａ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）に再懸濁した。細胞を計数し、2×10^{5}細胞を９６ウェルＶ底プレート（ＴＰＰ、Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に分配し、１３００ｒｐｍにて３分間遠心分離した。キメラ４Ｈ１１、アイソタイプ対照または市販の抗ヒトＣＣＲ６非ヒト霊長類交差反応性抗体（クローン１１Ａ９、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を１０μｇ／ｍＬにてウェルに加えた。細胞を洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝液中で１／２００に希釈した抗ヒトＩｇＧ－フィコエリトリン－ＰＥおよび抗マウスＩｇＧ－フィコエリトリン－ＰＥ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて、それぞれキメラ４Ｈ１１抗体および市販の抗ヒトＣＣＲ６抗体を検出した。細胞を１５分間氷上でインキュベートし、１回洗浄し、４００μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦＡＣＳ装置（Ｃｙａｎ、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｓ．Ａ．、Ｎｙｏｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で分析した。図３は、キメラ４Ｈ１１がヒト（図３Ａ）およびカニクイザル（図３Ｂ）リンパ球の表面で発現されるＣＣＲ６受容体を認識でき、よって、薬物開発のために高く所望される交差反応特性を提供することを示す。

【０１８８】

［実施例５］

ＣＣＲ６エピトープマッピング研究

本研究は、キメラ４Ｈ１１ｍＡｂの結合のために重要なヒトＣＣＲ６配列（ｈｓＣＣＲ６）の小領域および個別のアミノ酸を同定するために評価した。キメラ４Ｈ１１は、マウスＣＣＲ６受容体（ｍｍＣＣＲ６）を認識しないので、ヒトＣＣＲ６受容体のＮ末端領域および細胞外ループが等価なマウス領域で置き換えられたヒト－マウスハイブリッドを用いる直鎖アプローチを用いて、このｍＡｂのエピトープを決定した。

【０１８９】

マウス－ヒトハイブリッドＣＣＲ６変異体の作製

ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ１と称する第１変異体は、アミノ酸１０５～１１９（ｈｓＣＣＲ６の細胞外ループ１）がｍｍＣＣＲ６配列のアミノ酸９７～１１１（ｍｍＣＣＲ６の細胞外ループ１）で置き換えられたｈｓＣＣＲ６の配列に相当する。ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ２と称する第２変異体は、アミノ酸１８１～２１１（ｈｓＣＣＲ６の細胞外ループ２）がｍｍＣＣＲ６配列からのアミノ酸１７３～２０３（ｍｍＣＣＲ６の細胞外ループ２）で置き換えられたｈｓＣＣＲ６の配列に相当する。ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ３と称する第３変異体は、アミノ酸２８０～３０３（ｈｓＣＣＲ６の細胞外ループ３）がｍｍＣＣＲ６配列からのアミノ酸２７２～２９５（ｍｍＣＣＲ６の細胞外ループ３）で置き換えられたｈｓＣＣＲ６の配列に相当する。

【０１９０】

第１変異体ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ１について、ｈｓＥＣＬ１配列は、融合ＰＣＲ（３回のＰＣＲを用いて）によりｍｍＥＣＬ１配列で置き換えた。

【０１９１】

１回目のＰＣＲ（ＰＣＲ１）は、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１７７８（ＮｈｅＩ制限部位およびｈｓＣＣＲ６配列の始まりを含有する）およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１９４７（ｈｓＥＣＬ１の前の２４ｂｐのｈｓＣＣＲ６、およびｍｍＥＣＬ１の最初の３４ｂｐを含有する）を用いて行った。

【０１９２】

２回目のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、１回目のＰＣＲと並行し、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１９４８（ｍｍＥＣＬ１の最後の３３ｂｐ、およびｈｓＥＣＬ１の後の２５ｂｐのｈｓＣＣＲ６を含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１７７９（ｈｓＣＣＲ６配列の端部およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いて行った。

【０１９３】

３回目のＰＣＲ（ＰＣＲ３）は、鋳型としてのＰＣＲ１およびＰＣＲ２（オーバーラップ２２ｂｐ）ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのＧｌｎＰｒ１７７８およびＧｌｎＰｒ１７７９を用いて行った。

【０１９４】

第２変異体ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ２について、ｈｓＥＣＬ２配列は、融合ＰＣＲ（３回のＰＣＲを用いて）によりｍｍＥＣＬ２配列で置き換えた。

【０１９５】

１回目のＰＣＲ（ＰＣＲ１）は、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１７７８（ＮｈｅＩ制限部位およびｈｓＣＣＲ６配列の始まりを含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１９４９（ｈｓＥＣＬ２の前の２８ｂｐのｈｓＣＣＲ６、およびｍｍＥＣＬ２の最初の５４ｂｐを含有する）を用いて行った。

【０１９６】

２回目のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、１回目のＰＣＲと並行し、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１９５０（ｍｍＥＣＬ２の最後の５７ｂｐ、およびｈｓＥＣＬ２の後の２５ｂｐのｈｓＣＣＲ６を含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１７７９（ｈｓＣＣＲ６配列の端部およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いて行った。

【０１９７】

３回目のＰＣＲ（ＰＣＲ３）は、鋳型としてのＰＣＲ１およびＰＣＲ２（オーバーラップ１８ｂｐ）ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのＧｌｎＰｒ１７７８およびＧｌｎＰｒ１７７９を用いて行った。

【０１９８】

第３変異体ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ３について、ｈｓＥＣＬ３配列は、融合ＰＣＲ（３回のＰＣＲを用いて）によりｍｍＥＣＬ３配列で置き換えた。

【０１９９】

１回目のＰＣＲ（ＰＣＲ１）は、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１７７８（ＮｈｅＩ制限部位およびｈｓＣＣＲ６配列の始まりを含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１９５１（ｈｓＥＣＬ３の前の２５ｂｐのｈｓＣＣＲ６、およびｍｍＥＣＬ３の最初の４６ｂｐを含有する）を用いて行った。

【０２００】

２回目のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、１回目のＰＣＲと並行し、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１９５２（ｍｍＥＣＬ３の最後の４４ｂｐ、およびｈｓＥＣＬ３の後の２７ｂｐのｈｓＣＣＲ６を含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１７７９（ｈｓＣＣＲ６配列の端部およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いて行った。

【０２０１】

３回目のＰＣＲ（ＰＣＲ３）は、鋳型としてのＰＣＲ１およびＰＣＲ２（オーバーラッ

プ１８ｂｐ）ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのＧｌｎＰｒ１７７８およびＧｌｎＰｒ１７７９を用いて行った。

【０２０２】

３つ全ての変異体について、ＰＣＲ産物をｐＴ１ベクター（ＧＳＤ９８０）に、ユニークＮｈｅＩおよびＸｈｏＩ制限部位を用いて挿入した。次いで、ＤＮＡでＥ．Ｃｏｌｉ細菌を形質転換し、アンピシリンプレートに播種した。次の日に、変異体あたり２～４個のクローンを選択し、それらのＤＮＡを抽出し、配列決定のためにＦａｓｔｅｒｉｓに送った。配列決定の結果に基づいて、各変異体について１つのクローン、すなわちＧＳＢ２０２を用いて変異体ｐＴ１－ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ１、ＧＳＢ２０８を用いて変異体ｐＴ１－ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ２、およびＧＳＢ２０６を用いて変異体ｐＴ１－ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＥＣＬ３を選択した。

【０２０３】

ＨＥＫ細胞における一過性トランスフェクションのために３つ全ての変異体についてミディプレップを行った。

【０２０４】

プライマー配列：

GlnPr1778: GATCGCTAGCCACCATGAGCGGGGAATCAATGAA（配列番号１５３）

GlnPr1779: GATCCTCGAGTCATCACATAGTGAAGGACGACG（配列番号１５４）

GlnPr1947: CATCGCTGAAAACCCAAGTGTTGGTGGCATGAGTCACTGCCCAGAATGGGAGAGT
AAG（配列番号１５５）

GlnPr1948: AACACTTGGGTTTTCAGCGATGCACTGTGTAAATTGCTAAAAGGCATCTATGCCAT
CA（配列番号１５６）

GlnPr1949: CTCACAGACATCACGATCCTGCAGCTCGTATTTCTTGTTGAAGATAAATGTAGGGC
TGGAGATGATGACTGACAGCCCCCAC（配列番号１５７）

GlnPr1950: GATCGTGATGTCTGTGAGCCACGGTACAGGTCTGTCTCAGAGCCCATCACGTGGA
AGCTGCTGATGTTGGGGCTTGAGCTAC（配列番号１５８）

GlnPr1951: CGAGGACTTTCTCGGTGCTGCAGCTCCGGCCCACTTTGCCCGTGTTTGCAGCCGTC
ACAAGCAGGACCATG（配列番号１５９）

GlnPr1952: GCACCGAGAAAGTCCTCGCCTACACCAGGAACGTGGCCGAGGTCCTGGCTTTCCT
GCACTGCTGCCTGAAC（配列番号１６０）

【０２０５】

２つの他のヒト／マウス変異体を作製した。変異体４は、マウスＮ末端領域を含有するヒトＣＣＲ６受容体からなり、変異体５は、ヒトＮ末端領域を含有するマウスＣＣＲ６受容体に相当する。

【０２０６】

ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＮ－ｔｅｒｍと称する変異体４は、アミノ酸１～４７（第１膜貫通ドメインまでのｈｓＣＣＲ６のＮ末端）がｍｍＣＣＲ６配列のアミノ酸１～３９（第１膜貫通ドメインまでのｍｍＣＣＲ６のＮ末端）で置き換えられたｈｓＣＣＲ６の配列に相当する。ｍｍＣＣＲ６／ｈｓＮ－ｔｅｒｍと称する変異体５は、アミノ酸１～３９（第１膜貫通ドメインまでのｍｍＣＣＲ６のＮ末端）がｈｓＣＣＲ６配列のアミノ酸１～４７（第１膜貫通ドメインまでのｈｓＣＣＲ６のＮ末端）で置き換えられたｍｍＣＣＲ６の配列に相当する。

【０２０７】

変異体ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＮ－ｔｅｒｍについて、ｈｓＮ－ｔｅｒｍ配列は、融合ＰＣＲ（３回のＰＣＲを用いて）によりｍｍＮ－ｔｅｒｍ配列で置き換えた。

【０２０８】

１回目のＰＣＲ（ＰＣＲ１）は、鋳型としてのｍｍＣＣＲ６（ＧＳＤ３６３）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ８６６（ＮｈｅＩ制限部位およびｍｍＣＣＲ６配列の始まりを含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１９８３（ｍｍＮ－ｔｅｒｍ配列の端部およびｈｓＣＣＲ６第１膜貫通ドメインの始まりを含有する）を用いて行った。

【０２０９】
２回目のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、１回目のＰＣＲと並行し、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１９８４（ｍｍＮ－ｔｅｒｍ配列の端部およびｈｓＣＣＲ６第１膜貫通ドメインの始まりを含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１７７９（ｈｓＣＣＲ６配列の端部およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いて行った。
【０２１０】
３回目のＰＣＲ（ＰＣＲ３）は、鋳型としてのＰＣＲ１およびＰＣＲ２（オーバーラップ４０ｂｐ）ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのＧｌｎＰｒ８６６およびＧｌｎＰｒ１７７９を用いて行った。
【０２１１】
変異体ｍｍＣＣＲ６／ｈｓＮ－ｔｅｒｍについて、ｍｍＮ－ｔｅｒｍ配列は、融合ＰＣＲ（３回のＰＣＲを用いて）によりｈｓＮ－ｔｅｒｍ配列で置き換えた。
【０２１２】
１回目のＰＣＲ（ＰＣＲ１）は、鋳型としてのｈｓＣＣＲ６（ＧＳＤ４９１）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１７７８（ＮｈｅＩ制限部位およびｈｓＣＣＲ６配列の始まりを含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１９８５（ｈｓＮ－ｔｅｒｍ配列の端部およびｍｍＣＣＲ６第１膜貫通ドメインの始まりを含有する）を用いて行った。
【０２１３】
２回目のＰＣＲ（ＰＣＲ２）は、１回目のＰＣＲと並行し、鋳型としてのｍｍＣＣＲ６（ＧＳＤ３６３）、フォワードプライマーＧｌｎＰｒ１９８６（ｈｓＮ－ｔｅｒｍ配列の端部およびｍｍＣＣＲ６第１膜貫通ドメインの始まりを含有する）、およびリバースプライマーＧｌｎＰｒ１９８７（ｍｍＣＣＲ６配列の端部およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いて行った。
【０２１４】
３回目のＰＣＲ（ＰＣＲ３）は、鋳型としてのＰＣＲ１およびＰＣＲ２（オーバーラップ３３ｂｐ）ならびにフォワードおよびリバースプライマーとしてのＧｌｎＰｒ１７７８およびＧｌｎＰｒ１９８７を用いて行った。
【０２１５】
変異体４および５の両方について、ＰＣＲ産物をｐＴ１ベクター（ＧＳＤ９８０）に、ユニークＮｈｅＩおよびＸｈｏＩ制限部位を用いて挿入した。次いで、ＤＮＡでＥ．Ｃｏｌｉ細菌を形質転換し、アンピシリンプレートに播種した。次の日に、変異体あたり４個のクローンを選択し、それらのＤＮＡを抽出し、配列決定のためにＦａｓｔｅｒｉｓに送った。配列決定の結果に基づいて、各変異体について１つのクローン、すなわちＧＳＢ２１０を用いて変異体ｐＴ１－ｈｓＣＣＲ６／ｍｍＮ－ｔｅｒｍ、およびＧＳＢ２１５を用いて変異体ｐＴ１－ｍｍＣＣＲ６／ｈｓＮ－ｔｅｒｍを選択した。
【０２１６】
ＢＡＦ細胞を用いる安定株化細胞の樹立のために、両方の変異体についてマキシプレップを行った。
プライマー配列：
GlnPr866: AGAGGCTAGCCACCATGAATTCCACAGAGTCCTA（配列番号１６１）
GlnPr1983: CAAGGAGTAGGCAATCGGTACAAATACCTTGGTGAAGTTTCTGAC（配列番号１６２）
GlnPr1984: AAACTTCACCAAGGTATTTGTACCGATTGCCTACTCCTTGATCTG（配列番号１６３）
GlnPr1779: GATCCTCGAGTCATCACATAGTGAAGGACGACG（配列番号１５４）
GlnPr1778: GATCGCTAGCCACCATGAGCGGGGAATCAATGAA（配列番号１５３）
GlnPr1985: CAATTGGCACAAATAGCCTGGAGAACTGCCTGACCTCCTG（配列番号１６４）
GlnPr1986: TCAGGCAGTTCTCCAGGCTATTTGTGCCAATTGCCTACTC（配列番号１６５）
GlnPr1987: CCGCGATCCTCGAGTCATTACATGGTAAAGGACGATGCATTATCA（配列番号１６６）
【０２１７】
上記の５つ全ての変異体のまとめを、以下の表３に示す。

【０２１８】
【表３】

表 3:エピトープマッピングのために用いたヒト/マウス CCR6 ハイブリッド変異体のまとめ



hsCCR6 - 配列番号 71、mmCCR6 - 配列番号 72、hsCCR6/mmECL1 - 配列番号 13、hsCCR6/mmECL2 - 配列番号 15、hsCCR6/mmECL3 - 配列番号 17、hsCCR6/mmN-term - 配列番号 168、mmCCR6/hsN-term - 配列番号 170

【０２１９】
フローサイトメトリー

ＣＣＲ６をトランスフェクトしたＣＨＯ細胞の表面へのＭＡｂの結合は、フローサイトメトリーを用いて評価した。２×１０^{5}細胞を９６ウェルＶ底プレートに分配し、１３００ｒｐｍにて３分間遠心分離した。細胞を回収し、５０μｌの容量のＦＡＣＳ緩衝液中で１０μｇ／ｍｌの最終濃度にて適当なｍＡｂとインキュベートした。細胞を３０分間氷上でインキュベートし、２回洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝液で１／２００に希釈した５０μｌのＰＥ標識２次抗体に再懸濁した。細胞を１５分間氷上でインキュベートし、１回洗浄し、４００μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦＡＣＳ装置（Ｃｙａｎ、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）でチャネルＦＬ－２において分析した。図４のＦＡＣＳ分析は、全てのトランスフェクタントが市販の抗マウスまたは抗ヒトＣＣＲ６抗体により認識されたので、ＣＣＲ６のマウス－ヒトハイブリッド変異体が細胞表面上で正しく発現されたことを示した。図４に示すように、キメラ４Ｈ１１　ｍＡｂは、ヒトＮ末端領域を含有する全てのハイブリッド変異体を認識したが（図Ａ、Ｄ、ＥおよびＦ）、マウスＮ末端領域を含有するキメラ構築物と結合せず（図４Ｃ）、このことは、ヒトＣＣＲ６のＮ末端領域がＣＣＲ６とキメラ４Ｈ１１　ｍＡｂとの間の相互作用に必須であることを示唆した。

【０２２０】
ＣＣＲ６のＮ末端領域へのキメラ４Ｈ１１　ｍＡｂの結合のために重要な鍵となる残基を同定するために、２つの他の変異体をＮ末端領域内で作製した。
【０２２１】
ＣＣＲ６のＮ末端領域内でのマウス－ヒトハイブリッド変異体の作製
目的は、マウスＣＣＲ６（ｍｍＣＣＲ６）のＮ末端配列内の２つの小領域（「ブロック」）をそれらのヒト（ｈｓＣＣＲ６）対応物で置き換えて、これらのハイブリッド構築物に対するキメラ４Ｈ１１抗体の結合活性をＦＡＣＳにより評価することであった。
【０２２２】
２つの異なる場所を同定し、アミノ酸３～１１（ｍｍＣＣＲ６）のブロック１およびアミノ酸８～１６のブロック２と命名した。ｍｍＣＣＲ６ブロック１　ｈｓＣＣＲ６と称する第１変異体は、アミノ酸３～１１がｈｓＣＣＲ６配列のアミノ酸２１～２７で置き換えられたｍｍＣＣＲ６の配列に相当する。ｍｍＣＣＲ６ブロック２　ｈｓＣＣＲ６と称する第２変異体は、アミノ酸８～１６がｈｓＣＣＲ６配列のアミノ酸２９～３５で置き換えられたｍｍＣＣＲ６の配列に相当する。
【０２２３】
変異体「ブロック１」について、ｍｍＣＣＲ６配列は、鋳型としてのｍｍＣＣＲ６（ＧＳＤ３６３ａ）、ならびにプライマーＧｌｎＰｒ２１８８（ｈｓＣＣＲ６配列およびＮＨｅＩ制限部位を含有する）およびプライマーＧｌｎＰｒ２１８９（コドン停止およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いるＰＣＲによりｈｓＣＣＲ６配列で置き換えた。
【０２２４】
変異体「ブロック２」について、ｍｍＣＣＲ６配列は、鋳型としてのｍｍＣＣＲ６（ＧＳＤ３６３ａ）を用いる融合ＰＣＲによりｈｓＣＣＲ６配列で置き換えた。プライマーＧｌｎＰｒ２１９０（コドン開始およびＮＨｅＩ制限部位を含有する）およびプライマーＧｌｎＰｒ２１９１（ｈｓＣＣＲ６配列を含有する）を用いて、第１生成物を創出した。並行して、プライマーＧｌｎＰｒ２１９２（ｈｓＣＣＲ６配列を含有する）およびプライマーＧｌｎＰｒ２１９３（コドン停止およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）を用いて、第２生成物を創出した。２つのＰＣＲ産物が２７ｂｐのオーバーラップを有することがわかっているので、これらを、２つの最も外側のプライマーＧｌｎＰｒ２１９０（コドン開始およびＮＨｅＩ制限部位を含有する）およびＧｌｎＰｒ２１９３（コドン停止およびＸｈｏＩ制限部位を含有する）とともに２回目のＰＣＲのための鋳型として用いた。
【０２２５】
両方の変異体（「ブロック１」および「ブロック２」）について、ＰＣＲ産物をｐＴ１ベクター（ＧＳＤ９８０）に、ユニークＮｈｅＩおよびＸｈｏＩ制限部位を用いて挿入した。次いで、ＤＮＡでＥ．Ｃｏｌｉ細菌を形質転換し、アンピシリンプレートに播種した。次の日に、変異体あたり４個のクローンを選択し、それらのＤＮＡを抽出し、配列決定のためにＦａｓｔｅｒｉｓに送った。配列決定の結果に基づいて、各変異体について１つのクローン、すなわちＧＳＡ３２を用いて変異体ｐＴ１－ｍｍＣＣＲ６ブロック１　ｈｓＣＣＲ６およびＧＳＡ３３を用いて変異体ｐＴ１－ｍｍＣＣＲ６ブロック２　ｈｓＣＣＲ６を選択した。
【０２２６】
ＣＨＯ細胞の一過性トランスフェクション
ＰＥＩ試薬を用いてＣＨＯ細胞にｍｍＣＣＲ６変異体をトランスフェクトした。このために、トランスフェクションの前日に、１．１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度が得られるよう細胞を分けた。トランスフェクションの日に、細胞をスピンダウンし、２．１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度（１０．１０^{6}細胞をスピンダウンしなければならなかった）まで５ｍＬのトランスフェクション培地（ＧｉｂｃｏからのＯｐｔｉ－ＭＥＭ）に再懸濁した。１２．５μｇのＤＮＡを２５０μＬの１５０ｍＭ　ＮａＣｌに加えた。並行して、２５μｇのＰＥＩを２５０μＬの１５０ｍＭ　ＮａＣｌに加えた。両方の溶液を混合し、ＲＴにて１０分間インキュベートして、複合体を形成させた。ＤＮＡカクテルを細胞に注ぎ、細胞を

振とう器（１０５ｒｐｍ、５％ＣＯ２）上で３７℃にて４～５時間インキュベートした。５ｍＬの成長培地（４ｍＭグルタミンを含有するＬｏｎｚａからのＰｏｗｅｒ　ＣＨＯ２）を細胞に加えて、１．１０^{6}細胞／ｍＬの最終密度を得た。最後に、細胞を振とう器（３７℃、１０５ｒｐｍ、５％ＣＯ２）上で４日間インキュベートした後にＦＡＣＳで分析した。

【０２２７】

図５からの結果は、キメラ４Ｈ１１が、マウスＣＣＲ６受容体中にヒトブロック１を含有する変異体１と結合したが、ヒトＣＣＲ６受容体中のヒトブロック２配列からなる変異体２と結合しなかったことを示す。よって、４Ｈ１１のエピトープは、ＣＣＲ６受容体のＮ末端領域内、より正確には１８位のＰｈｅと１６位のＧｌｕとの間の９残基で構成される配列内にある。

【０２２８】

Ｎ末端ヒト／マウスハイブリッド構築物のまとめを以下の表４に示す。

【０２２９】

【表４】

表 4:エピトープマッピングに用いたハイブリッドヒト/マウス N 末端 CCR6 配列のまとめ

HsCCR6 N 末端	MNFSDVFDSS DYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEVRQFSRL
MoCCR6 N 末端	MNSTESYFGTDDYDNTEYYSPPDHGPCSLEEVRNFTKV
変異体 mmCCR6 ブロック 1	ヒト　マウス MNFSDVFDSS DYDNTEYYSPPDHGPCSLEEVRNFTKV
変異体 mmCCR6 ブロック 2	マウス　ヒト MNSTESYFGTDDYDNTEYYSVDSEML CSLEEVRNFTKV

hsCCR6 N 末端配列 - 配列番号 172、mmCCR6 N 末端配列 - 配列番号 174、変異体 mmCCR6 ブロック 1 hsCCR6 - 配列番号 180、変異体 mmCCR6 ブロック 2 hsCCR6 - 配列番号 185

【０２３０】

［実施例６］

マウスモノクローナル抗体４Ｈ１１のヒト化

ヒトアクセプターフレームワーク、逆変異、ならびにヒトＣＤＲグラフト化アクセプターフレームワークの結合特性を実質的に保持および／または改善する変異の選択を含む、抗ヒトＣＣＲ６マウス抗体４Ｈ１１のヒト化についてここに記載する。

【０２３１】

再整形した可変領域の設計

相同性一致を用いて、４Ｈ１１　ＣＤＲにグラフトするヒトアクセプターフレームワークを選択した。データベース、例えばヒトおよびマウスの免疫グロブリン遺伝子座からの生殖系列可変遺伝子のデータベース（ＩＭＧＴデータベース、既出）もしくはＶＢＡＳＥ２（Ｒｅｔｔｅｒ　Ｉら、（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３３、データベース版Ｄ６７１～Ｄ６７４）もしくはＫａｂａｔデータベース（ＪｏｈｎｓｏｎＧら、（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８：２１４～２１８）または出版物（例えばＫａｂａｔ　ＥＡら、既出）を用いて、マウス重鎖および軽鎖Ｖ領域（それぞれ配列番号７および８）が属するヒトサブファミリーを同定し、アクセプター分子として用いるために最もよくフィットするヒト生殖系列フレームワークを決定できる。ア

クセプターとして用いるためのこれらのサブファミリー内での重鎖および軽鎖可変配列（ＶＨおよびＶＬ）の選択は、配列相同性および／またはグラフト後に６つのＣＤＲの適当な相対的提示を保存する助けとなるＣＤＲ１およびＣＤＲ２領域の構造の一致に基づくことができる。

【０２３２】

例えば、ＩＭＧＴデータベースを用いることにより、４Ｈ１１重鎖可変ドメインフレームワークとヒト重鎖可変ドメインサブファミリー３のメンバーとの間の良好な相同性が示される。ＣＤＲおよびフレームワーク配列両方の最高の相同性および同一性は、生殖系列配列：ＩＧＨＶ３－１１*０４（配列番号７７）、ＩＧＨＶ３－１１*０１（配列番号７８）、ＩＧＨＶ３－４８*０３（配列番号７９）、ＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）およびＩＧＨＶ３－６６*０４（配列番号８１）について観察され、これらは全て、ＣＤＲ３までの配列全体について７４％を超える配列同一性を有した。ＩＧＨＶ３－１１*０４およびＩＧＨＶ３－１１*０１は、７６％の配列同一性を示し、ＩＧＨＶ３－４８*０３およびＩＧＨＶ３－２３*０４は、７５％の配列同一性を示した。ＩＧＨＶ３－２３*０４を、その安定性のために、ＶＨフレームワークとして選択した。

【０２３３】

同じアプローチを用いて、４Ｈ１１軽鎖可変ドメイン配列は、ヒト軽鎖可変ドメインカッパサブファミリー２のメンバーと良好な相同性を示した。ＣＤＲおよびフレームワーク配列両方の最高の相同性および同一性は、以下の生殖系列配列について観察された：ＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）およびＩＧＫＶ２－３０*０１（配列番号８３）は、それぞれ８２％および８１％の最高の同一性を示し、全て７８％を超える配列同一性を示したＩＧＫＶ２Ｄ－３０*０１（配列番号８４）、ＩＧＫＶ２－２９*０２（配列番号８５）およびＩＧＫＶ２－２９*０３（配列番号８６）からなる別の群が僅差で続いた。

【０２３４】

ヒト化プロセスの開始点として、ヒトＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）およびＩＧＫＶ２－３０*０２（配列番号８２）可変ドメインを、４Ｈ１１　ＣＤＲへのアクセプターとして選択した。ヒトガンマ１アイソタイプの第１ヒト化抗体を調製した（以下を参照されたい）。抗体は、ヒト－マウスハイブリッド重鎖可変ドメインおよびヒト－マウスハイブリッド軽鎖可変ドメインを包含した。前記ハイブリッド重鎖可変ドメインは、生殖系列ＣＤＲ１および２がそれぞれ４Ｈ１１重鎖ＣＤＲ１および２を置き換えているヒト重鎖可変ドメインＩＧＨＶ３－２３*０４に基づいた。ヒトアクセプターフレームワークと最良に一致するＪＨセグメント配列を、上記のＩＭＧＴ検索から同定した。得られたヒト－マウスハイブリッド重鎖可変配列はヒトＩＧＨＶ３－２３*０４フレームワーク領域、４Ｈ１１マウスＣＤＲおよび最良に一致するＪＨセグメントを有する。同様に、ヒト－マウスハイブリッド軽鎖可変ドメインは、ヒトＩＧＫＶ２－３０*０２フレームワーク領域、４Ｈ１１マウスＣＤＲおよびヒトアクセプターと最良に一致するＪＫを有する。ヒトアクセプターフレームワーク上にＣＤＲを収容するために、ヒト残基をマウス残基に置換することにより、鍵となる位置を改変した。このプロセスは逆変異とよばれ、モノクローナル抗体のヒト化において最も予測不可能な手順である。これは、親和性を保存し、同時にヒト化抗体における免疫原性の可能性を最小限にするために、保持する必要があるマウス抗体からの重要なフレームワーク残基の同定および選択を必要とする。

【０２３５】

ＣＤＲ高次構造および／または可変ドメイン間パッキングに最も影響を与え得る残基を同定するために、可変ドメインのヒト－マウスハイブリッドＶＨ１－ＶＬ１ペアの３Ｄモデルを、自動化モードに設定した構造相同性モデル化サーバＳＷＩＳＳ－ＭＯＤＥＬ（Ａｒｎｏｌｄ　Ｋら、（２００６）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２２（２）：１９５～２０１；ｈｔｔｐ：／／ｓｗｉｓｓｍｏｄｅｌ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ）を用いて算出した。モデル分析により、ＣＤＲ領域および／または重鎖－軽鎖可変ドメインパッキングに対する影響の推定に基づく位置の部分集合を選択できた。この位置の部分集合は、可変重鎖位置：２４および４９、ならびに可変軽鎖位置：３６および４６（Ｋａｂａｔ番号付け

）からなった。
【０２３６】
新しく設計した可変ドメインは、本明細書において、配列番号７５を有する重鎖可変ドメインＶＨ１、および配列番号３８を有する軽鎖可変ドメインＶＬ１という。ＶＨ１およびＶＬ１を包含する第１ヒト化抗体は、本明細書においてＶＨ１／ＶＬ１抗体と省略する。
【０２３７】
第１ヒト化抗体プロトタイプの生成
ＶＨ１およびＶＬ１についてのコードＤＮＡ配列（ｃＤＮＡ）を、ｓｃＦｖフォーマットにおいてＧＥＮＥＡＲＴ　ＡＧ（Ｒｅｇｅｎｓｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）により合成して、そのことにより、単一ｃＤＮＡ配列が両方の可変ドメイン（配列番号１６７）を包含することを可能にした。個別の可変ドメインｃＤＮＡは、このｓｃＦｖ構築物からＰＣＲにより引き出し、ＰＣＲアセンブリ技法を用いて、それらのそれぞれの定常ドメインｃＤＮＡ配列（複数可）の上流でさらに組み立てた。最後に、完全重鎖および軽鎖ｃＤＮＡを、ＣＭＶプロモーターおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを有する改変ｐｃＤＮＡ３．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＣＡ、ＵＳＡ）に基づく独立ベクターにライゲーションした。軽鎖特異的ベクターは、対象の軽鎖可変ドメインｃＤＮＡをカッパ軽鎖定常ドメインｃＤＮＡの前にＢａｍＨＩおよびＢｓｉＷＩ制限酵素部位を用いてライゲーションすることにより、ヒトカッパアイソタイプ軽鎖の発現を可能にしたが、重鎖特異的ベクターは、工学改変して、対象の重鎖可変ドメインｃＤＮＡを、ヒトＩＧＨＧ１ＣＨ１、ＩＧＨＧ１ヒンジ領域、ＩＧＨＧ１　ＣＨ２およびＩＧＨＧ１　ＣＨ３定常ドメインをコードするｃＤＮＡ配列の前に、ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩ制限酵素部位を用いてライゲーションできるようにした。重鎖および軽鎖両方の発現ベクターにおいて、分泌は、ＢａｍＨＩ部位を含有するマウスＶＪ２Ｃリーダーペプチドにより駆動した。ＢｓｉＷＩ制限酵素部位はカッパ定常ドメイン中にあり、ＳａｌＩ制限酵素部位はＩＧＨＧ１ＣＨ１ドメイン中で見出される。
【０２３８】
ＶＨ１／ＶＬ１抗体（配列番号１７３の重鎖および配列番号３０の軽鎖を有する）は、等量の重鎖および軽鎖ベクターを、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ、Ｓｉｇｍａ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて、懸濁馴化ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ１細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）カタログ番号：ＣＲＬ－１０８５２）に同時トランスフェクトすることにより、一過的に生成した。典型的には、１ｍｌあたり８０～１２０万の細胞の密度の１００ｍｌの懸濁された細胞に、５０μｇの重鎖をコードする発現ベクターと５０μｇの軽鎖をコードする発現ベクターとを含有するＤＮＡ－ＰＥＩ混合物をトランスフェクトする。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが宿主細胞に導入されると、細胞を４～５日の期間さらに培養して、０．１％プルロニック酸、４ｍＭグルタミンおよび０．２５μｇ／ｍｌジェネテシンを補った培養培地（ＥＸ－ＣＥＬＬ２９３、ＨＥＫ２９３血清フリー培地；Ｓｉｇｍａ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）への分泌を可能にすることにより、抗体を生成する。
【０２３９】
ＶＨ１／ＶＬ１抗体を、無細胞上清から、組換えプロテインＡストリームライン媒体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて精製し、アッセイの前にリン酸塩緩衝食塩水に緩衝液交換した。
【０２４０】
ヒトＣＣＲ６を発現するＣＨＯ細胞に対する細胞ＥＬＩＳＡ
ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を、実施例１に記載するようにして作製した。ＣＨＯ細胞で発現するＣＣＲ６とのヒト化候補の相互作用を検出するために、細胞ＥＬＩＳＡを開発した。簡単に述べると、９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｃｏｓｔａｒ、ＵＳＡ；流通業者ＶＷＲ　ＡＧ、Ｎｙｏｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）をＰＢ

Ｓ中１μｇ／ｍｌでの１００μｌのポリＤリシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で被覆し、４℃にて一晩インキュベートした。次の日に、プレートを洗浄し、ＣＣＲ６発現ＣＨＯ細胞を１３００ｒｐｍにて３分間遠心分離し、１０％ＦＢＳ（ＰＡＡ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）、２ｍＭ Ｌ－グルタミン（Ｌｏｎｚａ、Ｌｅｕｖｅｎ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ、Ｂｅｒｌｉｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を補ったダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、ＰＡＡ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）中、1×10^{6}細胞／ウェルで３７℃、５％CO_2にて一晩播種した。次の日に、細胞を様々な濃度（１０～０．０１３７μｇ／ｍｌの範囲）のヒト化４Ｈ１１候補と、室温にて１時間インキュベートした。細胞インキュベーションの後に、試料を、１０％ＦＣＳを含有するＤＭＥＭで３回洗浄し、４％のＰＦＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を含有する５０μｌのＰＢＳで、室温にて１５分間固定した。細胞を、２％ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン、ＰＡＡ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）を含有するＰＢＳで洗浄し、２００μｌの同じ緩衝液を用いて室温にて１時間ブロッキングした。試料を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識ヤギ抗ヒトＩｇ Ｆｃ断片特異的－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ Ｅｕｒｏｐｅ Ｌｔｄ、Ｎｅｗｍａｒｋｅｔ、ＵＫ）とインキュベートした。細胞を、２％ＢＳＡを含有するＰＢＳで５回洗浄し、プレートをＴＭＢ基質（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｅ ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）とインキュベートして、抗体結合を明らかにした。吸光度をマイクロプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ、ＵＳＡ；流通業者：ＷＩＴＴＥＣ ＡＧ、Ｌｉｔｔａｕ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により読み取った。

【０２４１】

マウスからヒト残基への逆変異

ＶＨ１／ＶＬ１抗体はキメラ抗体に匹敵する結合を導いたので、ＶＨ１およびＶＬ１をさらなる突然変異誘発の開始点として用いた。４Ｈ１１の免疫原性能力を低減するために、ＶＨ中の２４位および４９位ならびにＶＬ中の３６位および４６位のフレームワークマウス残基をヒト残基に逆変異させることにより、さらなるヒト化候補を設計した。さらなるバリアントは、マウス残基であるトレオニンがヒト残基であるセリンで置換された、６２位でのＣＤＲ Ｈ２における保存的変異を含む。

【０２４２】

抗体発現および精製は、上記の方法に従った。ヒト化抗体候補は、それらの結合について、以前に記載するようにして細胞ＥＬＩＳＡによりアッセイした。

【０２４３】

図６は、ヒト化バリアントのうちでＶＨ５／ＶＬ１抗体が、ＣＨＯ発現ヒトＣＣＲ６に対して他の候補と同様またはそれらよりもよい結合を示したことを示す。同様に、図７は、ＶＨ５／ＶＬ１抗体が、Ａｂ Ｈｕｎｔｅｒ抗ＣＣＲ６バイオアッセイに対して他の候補と同様またはそれらよりもよい阻害機能を示すことを示す。さらに、ＶＨ５（配列番号３７）は、ヒトフレームワークＩＧＨＶ３－２３*０４（配列番号８０）と８９．５％の配列同一性の最高の同一性を有し、より低い免疫原性リスクをもたらした。

【０２４４】

示差走査熱量分析による、選択されたヒト化抗ＣＣＲ６抗体の耐熱性

ヒト化抗体の耐熱性を、示差走査熱量分析（ＤＳＣ）を用いて測定した。モノクローナル抗体融解プロファイルは、それらのアイソタイプの特徴である（Ｇａｒｂｅｒ ＥおよびＤｅｍａｒｅｓｔ ＳＪ（２００７）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．３５５：７５１～７）が、ＦＡＢ断片の中間融解温度は、全長ＩｇＧの関係においてさえ容易に同定できる。ＦＡＢ部分のこのような中間融解温度を用いて、ヒト化候補のモノクローナル安定性をモニタリングした。

【０２４５】

熱量測定を、ＶＰ－ＤＳＣ示差走査微小熱量計（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ）で行った。セル容量は０．１２８ｍｌであり、加熱速度は２００℃／ｈであり、過圧は６５ｐ．ｓ．ｉに維持した。全ての抗体を、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中で１ｍｇ／ｍｌの濃度にて用いた。抗体のモル熱容量は、抗体を除いた同一の緩衝液を含有する２重の試料との比較により見積もった。部分モル熱容量および融解曲線を、標準的な手順を用いて分析した。サーモグラムをベースライン補正し、濃度を標準化した後に、ソフトウェアＯｒｉｇｉｎ　ｖ７．０において非２状態モデル〔Non-Two State model〕を用いてさらに分析した。

【０２４６】

ヒト化バリアントＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢ断片は、密に折りたたまれたＦＡＢ断片について通常観察される協同的アンフォールディングと一致する形状および振幅を備えた、７９．４℃の単一の転移を示し、これは工学改変プロセスがＦＡＢ安定性をうまく保持したことを指し示している。全体的に、ヒト化バリアントは、良好な熱安定性を示した。

【０２４７】

【表５】

表 5:ヒト化抗ヒト CCR6 抗体

抗体バリアント (IGHG1)	配列番号	逆変異 VH/VL	EC50	DSC (℃)
キメラ	**175/176**	**-**	**1.89**	**76.1**
H1/L1	**173/30**	**-/-**	**1.27**	**78.7**
H1/L2	**173, 186**	**-/Y36F**	**1.42**	**77.2**
H1/L3	**173, 187**	**-/Y36F-R46L**	**ND**	**76.9**
H2/L1	**183, 30**	**T24A/-**	**0.3195**	**79.6**
H2/L2	**183, 186**	**T24A/Y36F**	**1.93**	**77.9**
H2/L3	**183, 187**	**T24A/Y36F-R46L**	**ND**	**76.5**
H3/L1	**184, 30**	**A49S/-**	**0.84**	**77.2**
H3/L2	**184, 186**	**A49S/Y36F**	**1.04**	**76**
H3/L3	**184, 187**	**A49S/Y36F-R46L**	**ND**	**76**
H5/L1	**37, 30**	**T24A-A49S-T62S/-**	**0.95**	**79.4**

【０２４８】

上記の表に記載するＨ５／Ｌ１抗体は、ＩｇＧ１フォーマットとしてフォーマットし、ヒンジ安定化ヒトＩｇＧ４としてもフォーマットして、非細胞傷害性抗ＣＣＲ６ヒト化抗体を創出した。

【０２４９】

［実施例７］

ヒトおよびカニクイザルの両方の種からのＣＣＲ６の可溶性Ｎ末端領域に対する４Ｈ１１ヒト化候補の結合活性の試験

キメラ４Ｈ１１のエピトープはＣＣＲ６のＮ末端領域に局在しているので、このＮ末端断片に対応する可溶性ペプチドを作製して、ヒトおよびカニクイザルの両方の種における４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳ候補の親和性を評価するために用いた。可溶性Ｎ末端ペプチド領域は、以下のようにして作製した。

【０２５０】

ヒトおよびカニクイザルＣＣＲ６のＮ末端とＩｇＧ１アイソタイプのヒトＦｃとの可溶性融合構築物の発現

ヒトＣＣＲ６のＮ末端の可溶性融合構築物のクローニング：

ヒトＣＣＲ６のＮ末端の可溶性融合構築物をコードするＤＮＡは、ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＧｅｎｅＡｒｔ（登録商標）；Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）に注文した。アミノ酸構築物は、まず、シグナルペプチドをヒトＣＣＲ６の細胞外Ｎ末端（ｓｗｉｓｓｐｒｏｔ受入番号Ｐ５１６８４におけるアミノ酸１～４７）と融合することにより設計した。この構築物を、配列番号［正しい番号についてヒトＣＣＲ６－Ｆｃを参照されたい］に示すように、ヒトＩｇＧ１アイソタイプのＦｃ部分（ｓｗｉｓｓｐｒｏｔ受入番号Ｐ０１８５７におけるアミノ酸１０４～３３０）と、改変グリシンリンカー（ＧＧＧＧＴ）を介して連結した。ＧｅｎｅＡｒｔは、このアミノ酸をＤＮＡ配列に逆翻訳し、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームの５’にＮｈｅＩ制限部位およびＫｏｚａｋ配列を、そして３’にＸｈｏＩ制限部位を付加した。この構築物を、プラスミド１３ＡＢＲＣ６Ｐにクローニングし、Ｇｌｅｎｍａｒｋに届けた。

【０２５１】

プラスミド１３ＡＢＲＣ６Ｐを、ＮｈｅＩ／ＸｈｏＩを用いて切断し、挿入断片を、同じ酵素を用いてＭＣＳで切断し、かつ再閉環を防ぐためにＣＩＰ処理したｐＧＬＥＸ１８（ヒトＣＭＶプロモーターおよびｏｒｉＰエレメントの制御下の発現カセットを有する、Ｇｌｅｎｍａｒｋが所有権を持つベクター）の主鎖にクローニングした。得られた構築物をｐＧＬＥＸ１８－ｈｓＣＣＲ６－Ｎｔｅｒ－Ｆｃと命名し、配列決定（Ｆａｓｔｅｒｉｓ、Ｇｅｎｅｖａ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により確認した。

【０２５２】

カニクイザル融合構築物のクローニングのための手順は、同様であった。ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓに注文した融合構築物は、カニクイザルＣＣＲ６の細胞外Ｎ末端（ｓｗｉｓｓｐｒｏｔ受入番号Ｇ７ＭＲ７２におけるアミノ酸６～５２）のみが異なっており、プラスミドＧｅｎｅＡｒｔ配列＃３１に送達およびクローニングされた。最終構築物をｐＧＬＥＸ１８－ｃｙｎｏＣＣＲ６－Ｎｔｅｒ－Ｆｃと命名し、配列決定（Ｆａｓｔｅｒｉｓ、Ｇｅｎｅｖａ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により確認した。

【０２５３】

発現：

懸濁ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞に発現ベクターを、１５０ｍｌの培地を用いて１ＬのＳｃｈｏｔｔ瓶でポリエチレンイミン（ＪｅｔＰＥＩ（登録商標）、Ｐｏｌｙｐｌｕｓ－ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ、Ｉｌｌｋｉｒｃｈ、Ｆｒａｎｃｅ）を用いてトランスフェクトした。この目的のために、指数的に成長している細胞を、７５ｍＬのＯｐｔｉＭＥＭ培地（＃３１９８５－０４７、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に８Ｅ６細胞／ｍＬの密度にて播種した。ＪｅｔＰＥＩ（登録商標）：ＤＮＡ複合体を、３（μｇ／μｇ）の重量比にて細胞に加えた。細胞懸濁液中の最終ＤＮＡ濃度は、２．５μｇ／ｍＬであった。３７℃にて振とう（２００ｒｐｍ）しながら５時間のインキュベーションの後に、７５ｍＬの新鮮培養培地を細胞懸濁液に加えた。次いで、細胞を、３７℃、５％CO_2および湿度８０％にて５日間、振とうプラットフォーム上で採集までインキュベートした。細胞の上清を０．２μｍフィルタを用いて清澄にし、プロテインＡを用いてタンパク質を精製した。

配列番号１８８［ヒトＣＣＲ６－Ｆｃ］

METDTLLLWVLLLWVPGSTGMSGESMNFSDVFDSSEDYFVSVNTSYYSVD
SEMLLCSLQEVRQFSRLGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号１８９［カニクイザルＣＣＲ６－Ｆｃ］
METDTLLLWVLLLWVPGSTGMSGESMNFSDVFDSSEDYFASVNTSYYTVD
SEMLLCTLHEVRQFSRLGGGGTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２５４】

ＥＬＩＳＡ：

結合ＥＬＩＳＡを行って、ヒトおよびカニクイザル種からのＣＣＲ６のＮ末端領域からなるペプチドに対する、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１および４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳ抗体の反応性を試験した。簡単に述べると、９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｃｏｓｔａｒ　ＵＳＡ、流通業者ＶＷＲ　ＡＧ、Ｎｙｏｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を、ＰＢＳ中２μｇ／ｍｌにて１００μｌの組換えヒトおよびカニクイザルＮ末端ペプチド－Ｆｃで被覆した。プレートを４℃にて一晩インキュベートし、次いで、ＰＢＳ　２％ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン、ＰＡＡ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）で室温（ＲＴ）にて１時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、様々な濃度の４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１および４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳを加えた。プレートをＲＴにて１時間インキュベートし、次いで、ＰＢＳ０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＧｍｂＨ、Ｂｕｃｈｓ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）およびヤギ抗ヒトＩｇ　Ｆ（ａｂ’）２断片特異的－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｅｕｒｏｐｅ　Ｌｔｄ、Ｎｅｗｍａｒｋｅｔ、ＵＫ）で６回洗浄した。洗浄の後に、プレートをＴＭＢ基質（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　ＡＧ、Ｒｅｉｎａｃｈ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）とインキュベートして、抗体結合を明らかにした。２Ｍ　H_2SO_4を加えることにより反応を停止し、光学密度を４５０ｎＭ（ＯＤ４５０ｎＭ）にてＳｙｎｅｒｇｙ　ＨＴ２分光光度計（Ｂｉｏｔｅｋ、ＵＳＡ；流通業者：ＷＩＴＴＥＣ　ＡＧ、Ｌｉｔｔａｕ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で読み取った。図８は、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１および４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳ抗体が、ヒト（図８Ａ）およびカニクイザル（図８Ｂ）の両方の種からのＣＣＲ６のＮ末端領域に対応するＮ末端ペプチドを同様に認識することを示す。

【０２５５】

表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）による動的結合親和性定数：

動的結合親和性定数（ＫＤ）を、Ｆｃ－融合ｈｕＣＣＲ６Ｎ末端およびｃｙｎｏＣＣＲ６　Ｎ末端ペプチド上で、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ｈｓ抗体を分析物として用いて測定した。比較のために、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１抗体およびキメラ４Ｈ１１抗体を用いて同様の測定を行った。測定は、ＢＩＡｃｏｒｅ　２０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ－ＢＩＡｃｏｒｅ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｇｌａｔｔｂｒｕｇｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で室温にて行い、２価分析物動的親和性モデルを用いるＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア（ＢＩＡｃｏｒｅ；ｖ４．１、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ）を用いて分析した。

【０２５６】

ＣＭ５研究グレードセンサチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ；参照番号ＢＲ－１０００－１４）を、３５μｌの１：１　Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（ＮＨＳ）／１－エチル－３－［３－ジメチルアミノプロピル］カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）溶液（ｖ／ｖ；５μｌ／分の流速；流路１および２にて）を注入す

ることにより活性化した。Ｆｃ－融合ヒトまたはカニクイザルＣＣＲ６　Ｎ末端ペプチドを、酢酸緩衝液ｐＨ４．５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、ＢＲ－１００３－５０；ｐＩより１ｐＨ単位低い）中で２５ｎＭの最終濃度まで希釈し、その後、予め活性化したＣＭ５センサチップ上に、２０μｌを両方の流路１および２に注入することにより（５μｌ／分）（これは、およそ３００応答単位（ＲＵ）に相当する）固定化した。ＣＭ５センサチップと結合したヒトまたはカニクイザルＣＣＲ６　Ｎ末端ペプチドを、次いで、３５μｌのエタノールアミン溶液を注入することにより（５μｌ／分）不活性化した。最後に、３Ｍ　$MgCl_2$溶液（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、参照番号ＢＲ１００８３９）を２回注入して、架橋されていないＦｃ－融合ペプチドを遊離させた。

【０２５７】

親和性測定のために、１×ＰＢＳ緩衝液中で貯蔵した組換え４Ｈ１１抗体を、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ、参照番号ＢＲ－１００１－８８；０．０１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ＥＤＴＡ　３ｍＭ、０．００５％サーファクタントＰ２０、ｐＨ７．４）中で希釈し、異なる濃度（３．８ｎＭ～１μＭ）にて流路１および２（流路１は参照として用いる）に３０μｌ／分の流速で４分間注入した後に、ランニングバッファー中で１０分間の解離期間を設けた。それぞれの結合事象の後に、表面を、３Ｍ　$MgCl_2$で１０秒間（３０μｌ／分の流速）再生した。

【０２５８】

測定（センサーグラム：ｆｃ２～ｆｃ１）は、２価分析物モデルと最もよくフィットした。測定は、参照のためのゼロ濃度試料を含んだ。このモデルは、２つの平衡解離定数のセット、そして２つのＫＤ値であるＫＤ１およびＫＤ２の決定を導く、２つの一連の反応に結合データをフィットさせる。ｉｎ　ｖｉｖｏで生じるＩｇＧとその膜結合標的との間の相互作用を模倣する、動的データを決定するために用いたフォーマットにより、見かけの親和性を増加するアビディティーが可能になる。

【０２５９】

カイ２値は、各点での実験データと参照データとの間の差の２乗和を表すが、残差のプロットは、フィットにおけるそれぞれの点の実験データと参照データとの間の差を示す。カイ２および残差の両方の値を用いて、実験データと個別の結合モデルとの間のフィットの質を評価した。

【０２６０】

図９は、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ｈｓ抗体が、Ｆｃ－融合ヒトおよびカニクイザルＮ末端ペプチドを、それぞれ１．５６ｎＭおよび４．６７ｎＭのＫＤ値で認識することを示す。

【０２６１】

キメラヒト－マウスＣＣＲ６構築物をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞のＣＣＬ２０誘導遊走の阻害：

図８および図９に示すように、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳは、ＣＣＲ６受容体のＮ末端部分を特異的に認識する。ＣＣＲ６のＮ末端領域の生物学的機能をさらに探索するために、ヒトＮ末端領域を含有するハイブリッドマウスＣＣＲ６またはマウスＮ末端領域を含有するヒトＣＣＲ６のいずれかでトランスフェクトしたＢＡＦ細胞を、阻止する抗マウスＣＣＲ６または４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳの存在下で用いた。遊走アッセイは、実施例３に記載したプロトコールに従って評価した。図１０からの結果は、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳが、トランスフェクトしたＢＡＦ細胞のヒトＣＣＬ２０媒介性遊走を中和できたが、マウスＮ末端領域を含有するヒトＣＣＲ６受容体をＢＡＦ細胞のマウスＣＣＬ２０媒介性遊走は中和しなかったことを示す。よって、この抗体は、ＣＣＲ６のＮ末端領域が媒介する生物学的機能を特異的に阻止した。対照として、阻止するラット抗マウスＣＣＲ６抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、クローン１４０７０６）を１０μｇ／ｍｌの最終濃度にて用いた。

【０２６２】
ＣＣＬ２０－ＣＣＲ６相互作用の阻害：
４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳがＣＣＬ２０－ＣＣＲ６相互作用の直接の阻害によりＣＣＲ６媒介性生物学的機能を中和するかを決定するために、フローサイトメトリーアプローチを用いるアッセイをセットアップした。簡単に述べると、ＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞を計数し、０．１％のアジ化物を含有するＦＡＣＳ緩衝液で１＊１０^{6}細胞／ｍｌに希釈した。１００μｌのこれらの細胞を、次いで、ＦＡＣＳ緩衝液０．１％アジ化物で希釈した様々な濃度の４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳと４℃にて２０分間インキュベートした。インキュベーションの後に、細胞を遠心分離し、２回洗浄し、０．１％のアジ化物を含有するＦＡＣＳ緩衝液で希釈した固定濃度（０．５μｇ／ｍｌ）の組換えＣＣＬ２０（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）と２０分間インキュベートした。次いで、ＣＣＬ２０を、ＦＡＣＳ緩衝液＋０．１％アジ化物でそれぞれ１μｇ／ｍｌおよび１／１００に希釈したビオチン化抗ヒトＣＣＬ２０（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、クローンＢＡＦ３６０）、続いてアロフィコシアニン（ＡＰＣ）標識ストレプトアビジンを用いて検出した。細胞を、ＦＡＣＳ緩衝液、０．１％アジ化物で２回洗浄し、試料をフローサイトメトリーにより分析した。ＣＣＲ６へのＣＣＬ２０の結合の相対パーセンテージを、キメラＩｇＧ１アイソタイプ対照を用いる条件での蛍光シグナルを１００％の蛍光活性とみなして算出した。図１１は、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳが、ＣＣＲ６受容体へのＣＣＬ２０の結合シグナル伝達を、アイソタイプ一致対照と比較して、用量依存的な様式で著しく低減することを示す。さらに、４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ４ＨＳは、低濃度（０．５μｇ／ｍｌ未満）にてまだ活性である。
【０２６３】
［実施例８］
２価および１価４Ｈ１１　ＶＨ５／ＶＬ１の結合および中和能力の評価
結合アッセイにおける２価および１価ＶＨ５／ＶＬ１　ｍＡｂの試験
２価ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１（配列番号１０および３０）および１価ＢＥＡＴ（登録商標）ＶＨ５／ＶＬ１抗体（配列番号２１８、２１９および２２０）の結合活性を、ヒトＣＣＲ６全長タンパク質をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞を用いて、実施例３に記載したプロトコールに従って、フローサイトメトリーにより評価した。アッセイでは、トランスフェクトした細胞を、様々な濃度の両方の抗体（３～０．０１μｇ／ｍｌの範囲）とインキュベートした。１／２００に希釈した抗ヒトＨ＋Ｌ－フィコエリトリン－ＰＥ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を２次抗体として用いて、２価ＩｇＧ１および１価ＢＥＡＴ（登録商標）抗体分子両方を検出した。図１２は、ＩｇＧ１およびＢＥＡＴ（登録商標）ＶＨ５／ＶＬ１抗体がともに、細胞表面上のＣＣＲ６を用量依存的な様式で認識したことを示す。しかし、２価ＶＨ５／ＶＬ１抗体は、１価断片と比較してよりよい結合プロファイルを示し、前者は、後者よりも高い最大結合活性を示した。
【０２６４】
ＣＣＬ２０媒介性遊走バイオアッセイにおける２価および１価ＶＨ５／ＶＬ１　ｍＡｂの試験
１価ＢＥＡＴ（登録商標）ＶＨ５／ＶＬ１および２価ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１抗体の中和効率を評価および比較するために、両方の分子を異なる濃度（５０～０．４μｇ／ｍｌの範囲）にて、実施例３に詳細に説明したプロトコールに従って走化性アッセイにおいて試験した。図１３に示すように、１価ＶＨ５／ＶＬ１抗体は２価フォーマットと比較して活性の低減を示したが、試験した抗体はともに、アイソタイプ対照と比較して細胞遊走の低減を示した。
【０２６５】
まとめると、図１２および１３からの結果は、２価分子と比較して結合および機能的効果が低減しているにもかかわらず、１価抗体であるＶＨ５／ＶＬ１がまだ活性であることを示す。これらの観察結果は、２重特異性抗体のような１つより多い抗原と結合できる抗

体の成分としてのＶＨ５／ＶＬ１の使用を支持する。
【０２６６】
［実施例９］
ヒト化ＶＨ５／ＶＬ１抗体の工学改変
親和性成熟
ヒトＣＣＲ６のＮ末端領域についてのＶＨ５／ＶＬ１親和性を、ファージディスプレイによりさらに工学改変した。ファージディスプレイを用いる親和性成熟抗体への技術は知られている（Ｂｅｎｈａｒ Ｉ（２００７）Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．、７（５）：７６３～７９）。ＶＨ５／ＶＬ１抗体遺伝子配列をｓｃＦｖ断片としてディスプレイのためにフォーマットし、多様性を部位特異的変異導入により導入した。
【０２６７】
２つの異なるファージライブラリーを構築した。第１ファージライブラリーは、ＣＤＲ－Ｈ２（Ｋａｂａｔ残基５２、５３、５６および５８においてＮＮＫコドンを用いる）において多様化し、他のＣＤＲは変更しなかった。第２ファージライブラリーは、ＣＤＲ－Ｌ３（Ｋａｂａｔ残基９２、９３および９４においてＮＮＫコドン、Ｋａｂａｔ残基９６は、５つの異なるオリゴヌクレオチドのミックスによりＬｅｕ、Ｐｈｅ、Ｉｌｅ、ＴｙｒおよびＴｒｐに多様化した）において多様化し、他のＣＤＲは変更しなかった。得られた親和性成熟ライブラリーは、＞２×１０ｅ７の多様性を有し、ビオチン化抗原（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片と融合したヒトＣＣＲ６のＮ末端領域）およびストレプトアビジン捕捉を用いる３回の選択を行った。抗原濃度は３回の間に低下させ（１回目：５０ｎＭ、２回目：５ｎＭおよび３回目：０．５ｎＭ）、非ビオチン化抗原を用いる競合ステップを加えて、高親和性バリアントを選択した（２回目および３回目において１μＭ）。親和性成熟ｓｃＦｖ候補は、融合タンパク質上の結合オフレートの改善について表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）により評価した（図１４）。ＣＤＲ－Ｈ２ライブラリーからのバリアントは、オフレート改善が全くないかまたは穏やかなだけであったが、ＣＤＲ－Ｌ３ライブラリーからのバリアントは、穏やかから著しいオフレート改善を示した。
【０２６８】
１つの好ましいＣＤＲ－Ｈ２バリアントは、ＶＨ５／ＶＬ１－Ｈ２－Ｂ３　ｓｃＦｖクローン（図１４Ａ）であり、これは、置換Ｎ５３ＴおよびＩ５６Ｒ（Ｋａｂａｔ番号付け）を有した。このバリアントは、親の対照と比較して穏やかなオフレート改善を有し、Ｋａｂａｔ５３および５４位にて親のＣＤＲ－Ｈ２配列で見出される推定脱アミド化部位の除去というさらなる利点を有した。
【０２６９】
２つの好ましいＣＤＲ－Ｌ３バリアント、すなわちＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｃ９およびＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｇ８バリアントを、親の対照に対するそれらのオフレート改善について同定した（図１４Ｂ）。ＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｃ９は、以下のＣＤＲ－Ｌ３置換：Ｓ９２Ｔ、Ｈ９３ＹおよびＶ９４Ｙ（Ｋａｂａｔ番号付け）を有し、ＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｇ８配列は、ＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｃ９から９４位だけが異なっており、以下のように置換されていた：Ｓ９２Ｔ、Ｈ９３ＹおよびＶ９４Ｌ（Ｋａｂａｔ番号付け）。
【０２７０】
これらの改善されたクローンから同定されたＣＤＲ－Ｈ２およびＣＤＲ－Ｌ３中の全ての好ましいアミノ酸変化を用いて、以下に記載する新しいＦＡＢ断片および抗体をフォーマットした。
【０２７１】
ＣＤＲ－Ｌ１での推定脱アミド化モチーフの除去
ＶＨ５／ＶＬ１のＣＤＲ－Ｌ１は、Ｋａｂａｔ２８および２９位に脱アミド化モチーフを有する。そのコンセンサス配列を抑止するために、いくつかの置換を行った。ＣＤＲ－Ｌ１においてＮ２８Ｔ、Ｎ２８Ｓ、Ｎ２８Ｑ、Ｎ２８ＥおよびＧ２９Ａ位にて置換したＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢ断片を生成した。ＣＤＲ－Ｌ１　２８位での全ての置換は、ヒトまたはカニクイザル融合タンパク質上でＳＰＲにより判断されるように結合を損なった（図

１５）。Ｇ２９Ａだけが、ヒトＣＣＲ６についてのＶＨ５／ＶＬ１親和性またはそのＦＡＢ安定性に影響しなかった（図１６）。

【０２７２】

フォーマッティング

ファージディスプレイスクリーニングから同定されたＣＤＲ－Ｌ３およびＣＤＲ－Ｈ２置換を用いて、上記のＧ２９Ａ改変も含むことにより、ＣＤＲ　Ｌ１にある脱アミド化部位も除去した、工学改変ＶＨ５／ＶＬ１抗体およびその断片を生成した。フォーマットは、図１７に記載するように、ヒトＦＡＢ断片、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒト１価ＢＥＡＴ（登録商標）抗体（ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０１２／１３１５５５およびＷＯ２０１４／０４９００３）およびヒンジ安定化ＩｇＧ４抗体を含んだ。ＦＡＢ構築物を、センサチップ上に結合したヒトまたはカニクイザルＣＣＲ６融合タンパク質を用いるＳＰＲによるＫＤ決定のために用いた。

【０２７３】

工学改変ＦＡＢの第１ペアを、ＣＤＲ－Ｌ１　Ｇ２９Ａ改変が付加された好ましいＣＤＲ－Ｌ３ライブラリーｓｃＦｖクローンＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｃ９およびＶＨ５／ＶＬ１－Ｌ３－Ｇ８の可変ドメインを用いて生成した。本明細書においてＶＨ５／ＶＬ１－Ｃ９－Ｇ２９ＡおよびＶＨ５／ＶＬ１－Ｇ８－Ｇ２９Ａと称する両方のＦＡＢは、同じ実験のセットにおいて対照として用いた親のＦＡＢと比較してＫＤ値が約２０倍改善されていた（図１８）。なお、親のＦＡＢは、以前（実施例７）に測定された４８ｎＭに反して、約２０ｎＭのＫＤ値を有しており、この差は、用いた融合タンパク質の質、抗原の質の変動がこの実験のセットにおいてより大きかったことにより説明される。

【０２７４】

好ましいＣＤＲ－Ｈ２置換（Ｎ５３ＴおよびＩ５６Ｒ）およびＣＤＲ－Ｌ１　Ｇ２９Ａ改変と組み合わせた、好ましいＣＤＲ－Ｌ３置換（Ｓ９２Ｔ、Ｈ９３ＹおよびＶ９４ＹまたはＳ９２Ｔ、Ｈ９３ＹおよびＶ９４Ｌ）を包含する、工学改変ＦＡＢの第２ペアも生成した。本明細書においてＶＨ５／ＶＬ１－Ｂ３Ｃ９－Ｇ２９ＡおよびＶＨ５／ＶＬ１－Ｂ３Ｇ８－Ｇ２９ＡというＦＡＢは、ＦＡＢ構築物の第１ペアからＣＤＲ－Ｈ２だけが異なり、ＫＤ値がさらに２倍改善されていた。両方のＶＨ５／ＶＬ１－Ｂ３Ｃ９－Ｇ２９ＡおよびＶＨ５／ＶＬ１－Ｂ３Ｇ８－Ｇ２９Ａは、ヒトＣＣＲ６のＮ末端領域について約０．５ｎＭ、およびカニクイザルＣＣＲ６のＮ末端領域について約１ｎＭのＫＤ値を有し、親のＶＨ５／ＶＬ１　ＦＡＢと比較して、ヒトＣＣＲ６についての親和性の約４０倍の改善、およびカニクイザルＣＣＲ６についての親和性の約３０倍の改善を表した。

【０２７５】

［実施例１０］

親和性成熟ＶＨ５／ＶＬ１バリアントの改善された阻止能力

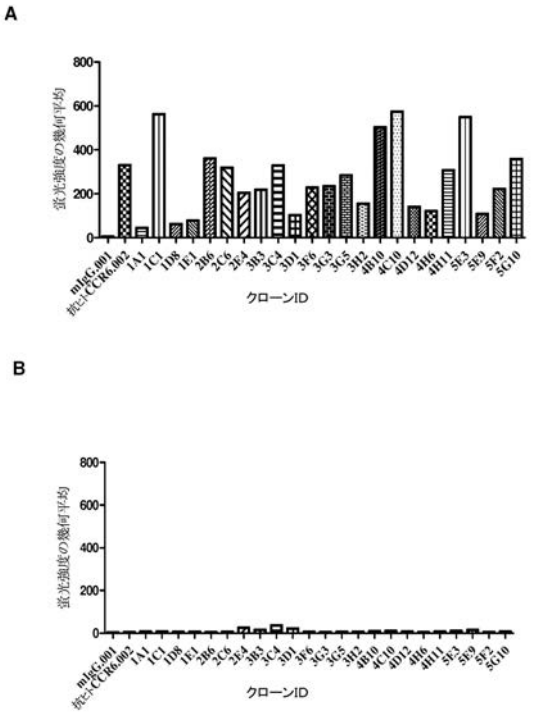
ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１の親和性成熟が走化性活性に与える影響を評価するために、２価ＩｇＧ１または１価ＢＥＡＴ（登録商標）フォーマットのいずれかでのＶＨ５／ＶＬ１の４つの工学改変バリアントを、様々な濃度（２０～０．７５μｇ／ｍｌの範囲）にて、全長ヒトＣＣＲ６をトランスフェクトしたＢＡＦ細胞を用いる遊走アッセイにおいて試験した。簡単に述べると、１００００００の細胞を、親和性成熟バリアントの存在下でＨＴＳ　Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（登録商標）－９６プレート［Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｃｈｅｍｉｅ　Ｂｒｕｎｓｃｈｗｉｇ　ＡＧ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ］の上部チャンバに加えた。Ｔｒａｎｓｗｅｌｌの下部チャンバは、２３５μｌのＢＡＦ培地（１０％のＦＣＳ（Ａｍｉｍｅｄ、Ｂｉｏｃｏｎｃｅｐｔ、Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄにより流通）を含有するＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｅ　ＧｍｂＨ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ））中１０ｎｇ／ｍｌに希釈した組換えヒトＣＣＬ２０（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を含有した。３７℃、５％ＣＯ２にて４時間のインキュベーションの後に、下部および上部チャンバからの細胞を採集し、Ｇｕａｖａ　Ｅａｓｙｃｙｔｅ　ＨＴ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＡＧ、Ｚｕｇ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて計数した。陰性対照として、ヒトＩｇＧ１の無関係の抗体を２０μｇ／ｍｌにて用

いた。非親和性成熟２価ＶＨ５／ＶＬ１　ＩｇＧ１および１価ＶＨ５／ＶＬ１　ＢＥＡＴ（登録商標）分子を、バイオアッセイにおいて参照として用いた。全ての試験した分子について、遊走比は、下部チャンバ中の細胞の数を、上部および下部チャンバ中の細胞の総数で除することにより算出した。遊走の阻害のパーセンテージは、アイソタイプ対照について観察されたもののパーセンテージとして算出した。図１９は、ヒトＣＣＲ６－Ｎ末端ペプチドに対して親和性が増加したＶＨ５／ＶＬ１バリアント（図１８に示すＢ３Ｇ８　Ｇ２９ＡおよびＢ３Ｃ９　Ｇ２９Ａ）が、ＣＣＲ６発現ＢＡＦ細胞の遊走をより効果的に阻害したことを証明する。４つの工学改変バリアントは、低濃度（例えば０．７５μｇ／ｍｌ）でさえ高い阻止能力を示した。興味深いことに、親和性成熟バリアントの１価バージョンは、親和性成熟前の１価ＶＨ５／ＶＬ１抗体と比較して中和能力の増加も示した。特に、低濃度にて、Ｂ３Ｇ８　Ｇ２９ＡおよびＢ３Ｃ９　Ｇ２９Ａ変異体は、２０μｇ／ｍｌの非工学改変１価ＶＨ５／ＶＬ１　ＢＥＡＴ（登録商標）（およそ２０％）よりも高い阻害プロファイル（およそ３５％）を示した。

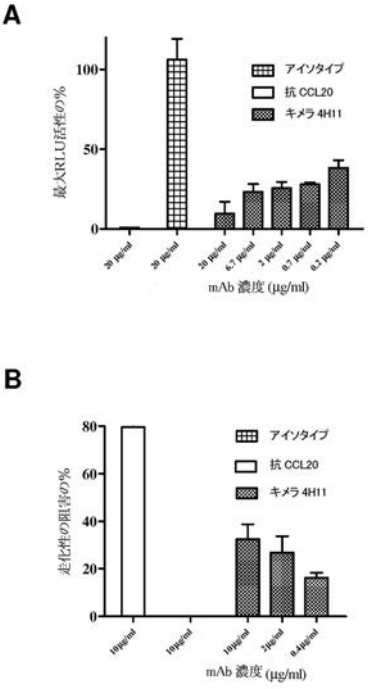
【０２７６】

まとめると、図１９からのデータは、４つの異なる工学改変ＶＨ５／ＶＬ１バリアントの親和性の増加と遊走アッセイにおけるそれらの阻止能力の増加との間の直接的な関係を証明する。

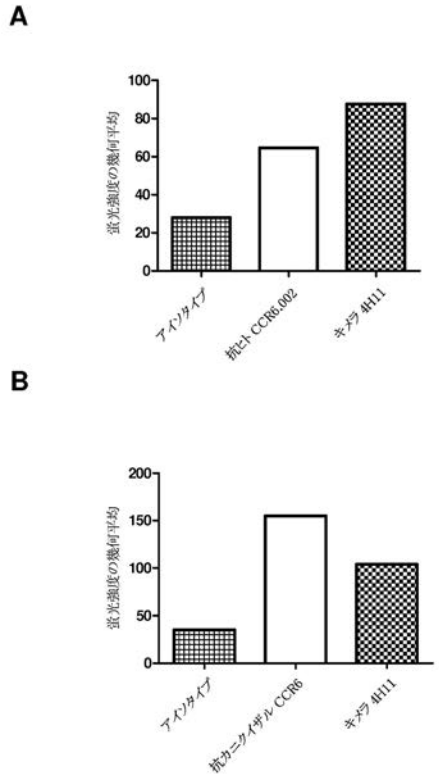
【図１】



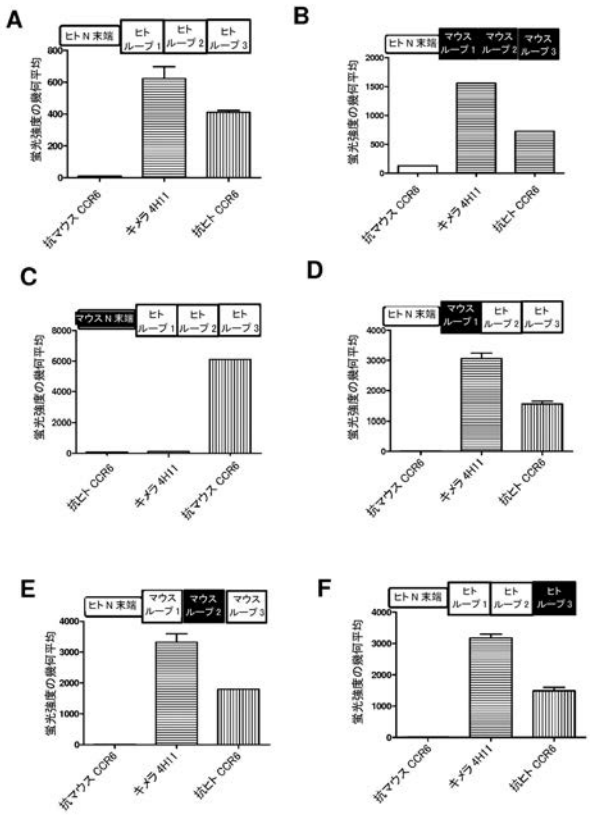
【図２】



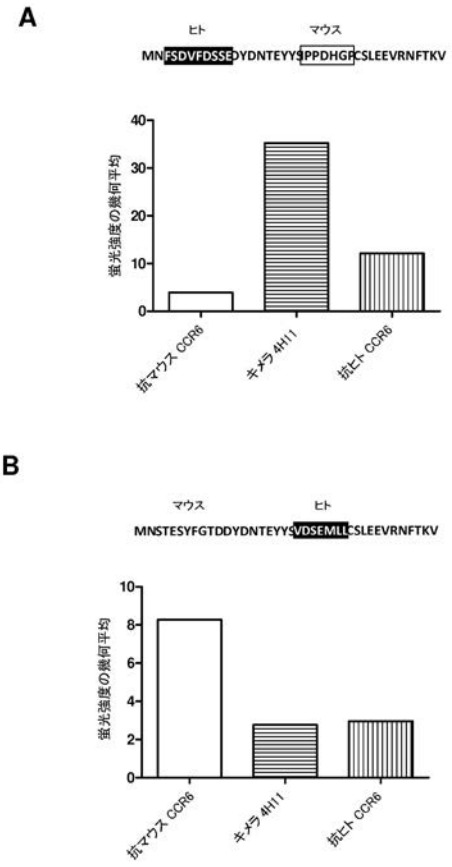
【図３】


A
蛍光強度の幾何平均
アイソタイプ
抗ヒト CCR6.002
キメラ 4H11
B
蛍光強度の幾何平均
アイソタイプ
抗カニクイザル CCR6
キメラ 4H11

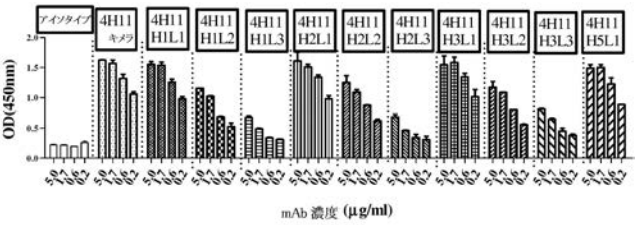
【図４】


A
ヒト N 末端
ヒト ループ 1
ヒト ループ 2
ヒト ループ 3
蛍光強度の幾何平均
抗マウス CCR6
キメラ 4H11
抗ヒト CCR6
B
ヒト N 末端
マウス ループ 1
マウス ループ 2
マウス ループ 3
C
マウス N 末端
D
E
F

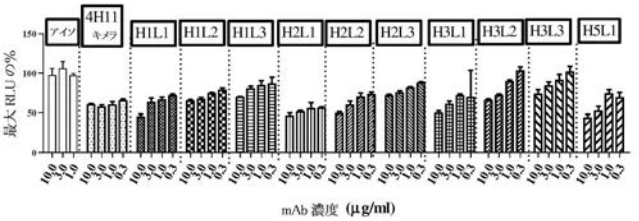
【図５】


A
ヒト
マウス
MNFSDVFDSSEDYDNTEYYSPPDHGRCSLEEVRNFTKV
蛍光強度の幾何平均
抗マウス CCR6
キメラ 4H11
抗ヒト CCR6
B
マウス
ヒト
MNSTESYFGTDDYDNTEYYSVDSEMLLCSLEEVRNFTKV

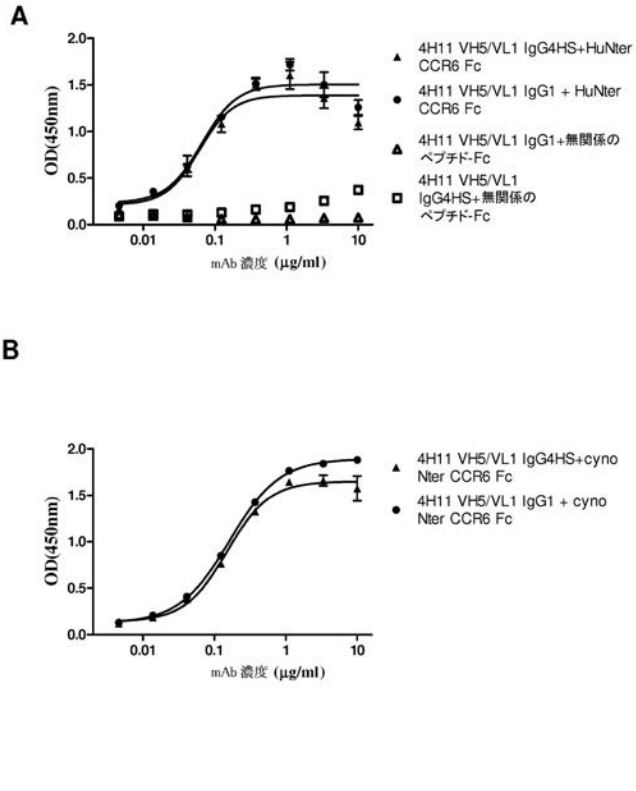
【図６】


アイソタイプ
4H11 キメラ
4H11 H1L1
4H11 H1L2
4H11 H1L3
4H11 H2L1
4H11 H2L2
4H11 H2L3
4H11 H3L1
4H11 H3L2
4H11 H3L3
4H11 H5L1
OD(450nm)
mAb 濃度 (μg/ml)

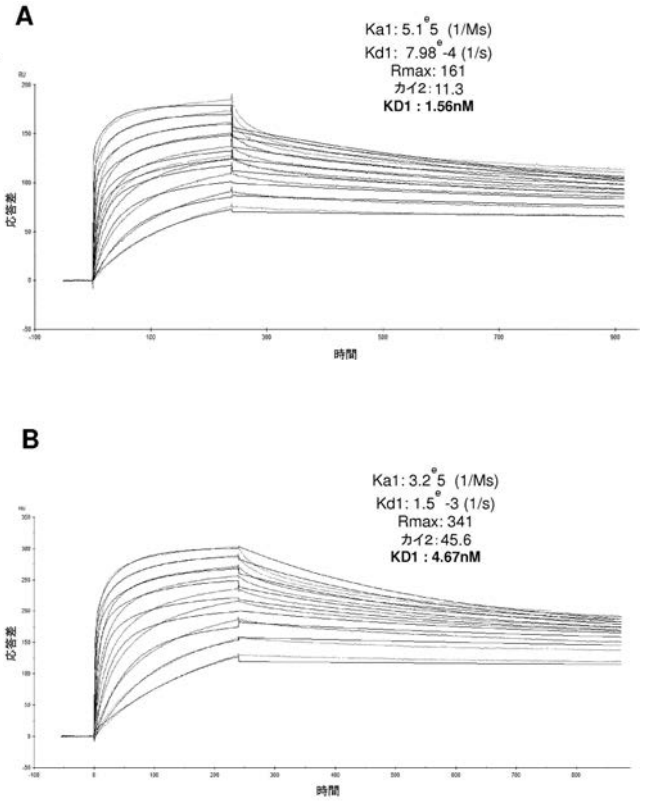
【図７】


アイソ
4H11 キメラ
H1L1
H1L2
H1L3
H2L1
H2L2
H2L3
H3L1
H3L2
H3L3
H5L1
最大 RLU の%
mAb 濃度 (μg/ml)

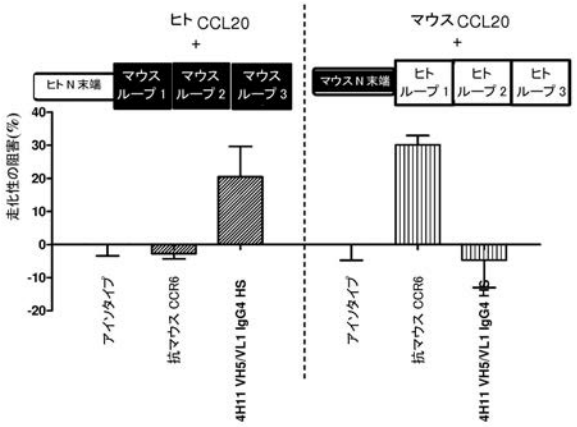
【図８】



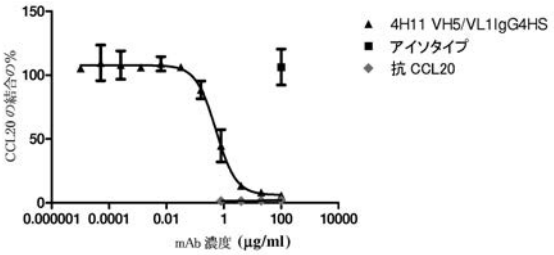
【図９】



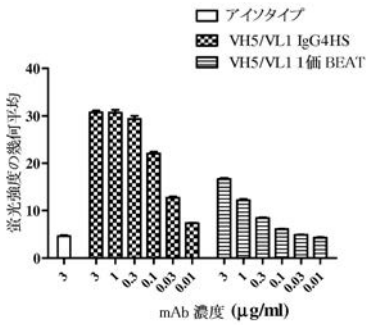
【図１０】



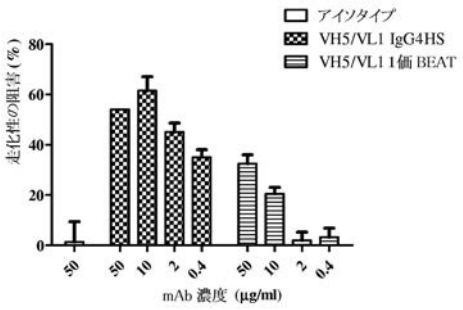
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【図１４Ａ】

	Kabat:	H52	H52a	H53	H54	H55	H56	H57	H58	Biacore 結合
H2:		T	-	N	G	G	I	T	Y	
多様化:		X	-	X	G	G	X	T	X	
scFv クローン:										
VH5/VL1-H2-H1		S					K			=
VH5/VL1-H2-D1				S			K			-
VH5/VL1-H2-B1				M			K			-
VH5/VL1-H2-C3				R			K			-
VH5/VL1-H2-A3							K			=/+
VH5/VL1-H2-C1				T			D			-
VH5/VL1-H21-C2		N		T			G			=
VH5/VL1-H2-G2				T			T			=
VH5/VL1-H2-B3				**T**			**R**			=/+
VH5/VL1-H2-E1				T			S			-
VH5/VL1-H2-G1				K			K		F	-
VH5/VL1-H2-E3		N		A			S		L	0

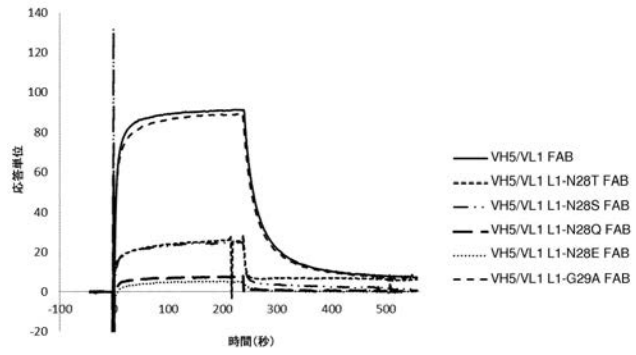
略語表
(−) より弱いオフレート
(=) H5/L1 親 scFv と同様のオフレート
(+) よりよいオフレート
(++) 著しくよりよいオフレート
(0) 結合なし
(ND) 未測定
(X) 多様性:NNK−20全てのアミノ酸

【図１４Ｂ】

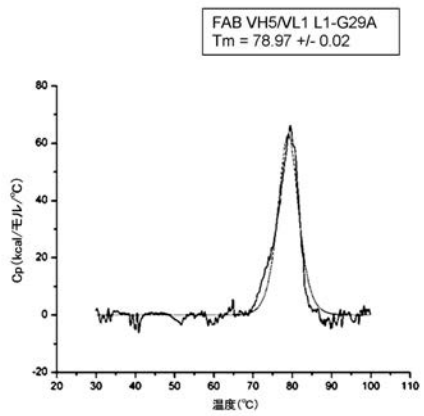
	Kabat:	L92	L93	L94	L95	L96	Biacore 結合
L3:		S	H	V	P	L	
多様化:		X	X	X	P	x	
scFv クローン:							
VH5/VL1-L3-H7			L	L			++
VH5/VL1-L3-F9		T	Y	M			++
VH5/VL1-L3-B8		T	Y	N			++
VH5/VL1-L3-G8		**T**	**Y**	**L**			++
VH5/VL1-L3-D8		T	K	L			+
VH5/VL1-L3-E8			Y	L			+
VH5/VL1-L3-A9			L	M		I	ND
VH5/VL1-L3-B9			Y	I			ND
VH5/VL1-L3-C9		**T**	**Y**	**Y**			++
VH5/VL1-L3-G7		T	F	L			++
VH5/VL1-L3-F8			Y	S			0
VH5/VL1-L3-C8		T	Y	L		I	++
VH5/VL1-L3-B10			K	L			+
VH5/VL1-L3-D9		S	X	M		L	++

略語表
(−) より弱いオフレート
(=) H5/L1 親 scFv と同様のオフレート
(+) よりよいオフレート
(++) 著しくよりよいオフレート
(0) 結合なし
(ND) 未測定

【図１５】



【図１６】



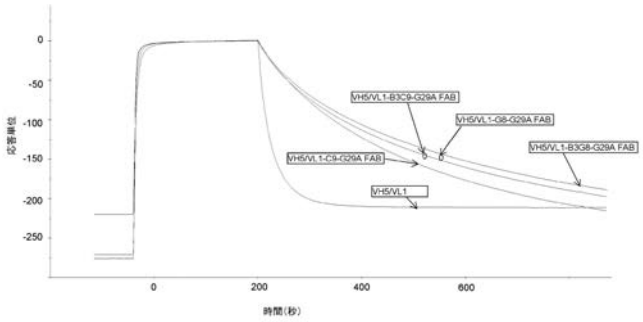
【図１７】

	ヒト FAB HC/LC 配列番号	ヒト IgG1 HC/LC 配列番号	ヒト 1価 BEAT（登録商標） HC1/HC2/LC 配列番号	ヒト IgG4 HC/LC 配列番号
VH5/VL1-B3G8-G29A	**206/207**	**198/199**	**227/228/229**	**214/215**
VH5/VL1-B3C9-G29A	**208/209**	**200/201**	**230/231/232**	**216/217**
VH5/VL1-G8-G29A	**202/203**	**194/195**	**221/222/223**	**210/211**
VH5/VL1-C9-G29A	**204/205**	**196/197**	**224/225/226**	**212/213**
VH5/VL1	**233/234**	**10/30**	**218/219/220**	**235/236**

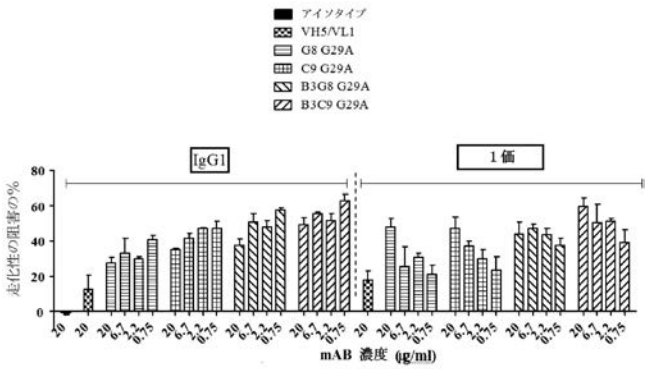
【図１８Ａ】

FAB	Ka ヒト CCR6	Kd ヒト CCR6	KD ヒト CCR6	Ka カニクイザル CCR6	Kd カニクイザル CCR6	KD カニクイザル CCR6
VH5/VL1-B3G8-G29A	**6.46e6**	**3.39e-3**	**526 pM**	**1.72e6**	**2.02e-3**	**1.17 nM**
VH5/VL1-B3C9-G29A	**6.96e6**	**3.79e-3**	**544 pM**	**1.83e6**	**2.25e-3**	**1.23 nM**
VH5/VL1-G8-G29A	**2.65e6**	**2.66e-3**	**1.0 nM**	**8.97e5**	**1.96e-3**	**2.19 nM**
VH5/VL1-C9-G29A	**2.66e6**	**3.41e-3**	**1.28 nM**	**8.75e5**	**2.44e-3**	**2.79 nM**
VH5/VL1	**1.58e6**	**3.11e-2**	**19.6 nM**	**7.44e5**	**2.50e-2**	**33.6 nM**

【図１８Ｂ】



【図１９】



【配列表】

2017536101000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/074178

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/074178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/00
ADD.

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 A61K

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/005649 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD [JP]; ISODA YUYA; KOYAMA MAMI; KANDA YUTAKA;) 10 January 2013 (2013-01-10) abstract figures 17, 20, 25 -----	1-15
X	WO 2013/184218 A1 (KIM ELDAR [US]; VASILYEVA VIKTORIIA [US]; ABBASOVA SVETLANA [RU]; IVAN) 12 December 2013 (2013-12-12) cited in the application the whole document * see in particular example 7, Figures 34-36 * ----- -/--	1-15

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
11 January 2016	27/01/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sirim, Pinar

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/074178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/197329 A1 (NAKAYAMA YASUNORI [JP] ET AL) 7 October 2004 (2004-10-07) the whole document * see in particular abstract; columns 4-5; Examples 5, 8, 11, 14; Figures 5, 8, 11, 14, claims 1-13 * -----	1-15
X	KEIJI HIROTA ET AL: "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritisand its animal model", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE,, vol. 204, no. 12, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 2803-2812, XP003027713, DOI: 10.1084//JEM.20071397 the whole document * see in particular abstract, pages 2808-2810, Figures 3E, 4 * -& Keiji Hirota ET AL: "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 19 November 2007 (2007-11-19), page Figure S5, XP055182657, Retrieved from the Internet: URL:http://jem.rupress.org/content/suppl/2007/11/19/jem.20071397.DC1/5.html [retrieved on 2015-04-13] the whole document -& Keiji Hirota ET AL: "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 19 November 2007 (2007-11-19), page Figure S6, XP055182660, Retrieved from the Internet: URL:http://jem.rupress.org/content/suppl/2007/11/19/jem.20071397.DC1/6.html [retrieved on 2015-04-13] the whole document ----- -/--	1-15

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/074178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. A. VONGSA ET AL: "CCR6 Regulation of the Actin Cytoskeleton Orchestrates Human Beta Defensin-2- and CCL20-mediated Restitution of Colonic Epithelial Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 15, 20 February 2009 (2009-02-20), pages 10034-10045, XP055113707, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M805289200 the whole document * see in particular abstract, pages 10035, 10037-39; Figures 3C, 3D * -----	1-15

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/074178

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013005649 A1	10-01-2013	NONE	
WO 2013184218 A1	12-12-2013	US 2015337037 A1	26-11-2015
		WO 2013184218 A1	12-12-2013
US 2004197329 A1	07-10-2004	CA 2405906 A1	25-04-2002
		US 2004197329 A1	07-10-2004
		US 2005287142 A1	29-12-2005
		WO 0232456 A1	25-04-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10		4H045
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P	21/08		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	29/00	101	
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P 17/06	*(2006.01)*	A61P	17/06		
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P	37/06		
A61P 27/02	*(2006.01)*	A61P	27/02		
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61P	11/00		
A61P 17/00	*(2006.01)*	A61P	17/00		
A61P 13/12	*(2006.01)*	A61P	13/12		
A61P 1/16	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61P 31/06	*(2006.01)*	A61P	31/06		
A61P 9/00	*(2006.01)*	A61P	9/00		
A61P 3/00	*(2006.01)*	A61P	3/00		
A61P 7/00	*(2006.01)*	A61P	7/00		
A61P 19/02	*(2006.01)*	A61P	19/02		
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P 9/10	*(2006.01)*	A61P	9/10		
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P	35/02		
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61K 47/68	*(2017.01)*	A61K	47/68		

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

(74)代理人 100173185
弁理士 森田 裕
(74)代理人 100162503
弁理士 今野 智介
(74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
(72)発明者 リッシラ, ラミ
スイス国 ツェーハー－２３００ ラ ショー－ド－フォン, シュマン ド ラ コンベタ ５, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ. アー. 内
(72)発明者 ヴァルムスレイ, アドリアン
スイス国 ツェーハー－２３００ ラ ショー－ド－フォン, シュマン ド ラ コンベタ ５, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ. アー. 内
(72)発明者 ブライン, スタニスラス
スイス国 ツェーハー－２３００ ラ ショー－ド－フォン, シュマン ド ラ コンベタ ５, グレンマーク ファーマシューティカルズ, エセ. アー. 内

(72)発明者　オリエール，ロマイン
スイス国　ツェーハー‐２３００　ラ　ショー‐ド‐フォン，シュマン　ド　ラ　コンベタ　５，
グレンマーク　ファーマシューティカルズ，エセ．アー．内
(72)発明者　ホウ，サミュエル
スイス国　ツェーハー‐２３００　ラ　ショー‐ド‐フォン，シュマン　ド　ラ　コンベタ　５
(72)発明者　ロヤウ，ジェレミー
スイス国　ツェーハー‐２３００　ラ　ショー‐ド‐フォン，シュマン　ド　ラ　コンベタ　５，
グレンマーク　ファーマシューティカルズ，エセ．アー．内

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24
4B065 AA90X AC14 CA25 CA44
4C076 AA95 CC01 CC03 CC07 CC11 CC16 CC17 CC21 CC27 EE41
EE59
4C084 AA17 MA02 MA66 NA05 NA13 ZA012 ZA332 ZA362 ZA452 ZA592
ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962 ZB082 ZB152 ZB262 ZB272 ZB352
ZC212
4C085 AA14 AA15 AA16 CC23 EE01 EE03
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA22 FA74