

(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2014-504147

(P2014-504147A)

(43) 公表日 平成26年2月20日(2014.2.20)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 B O 2 4
C 07 K 16/46 (2006.01)	C 07 K 16/46	4 B O 6 3
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B O 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-535444 (P2013-535444)	(71) 出願人	500033483 ピエール、ファーブル、メディカマン フランス国ブローニュ、ビヤンクール、プ ラス、アベル、ガンス、45
(86) (22) 出願日	平成23年10月27日 (2011.10.27)	(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(85) 翻訳文提出日	平成25年6月24日 (2013.6.24)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 國際出願番号	PCT/EP2011/068905	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修幸
(87) 國際公開番号	W02012/055980	(74) 代理人	100176083 弁理士 松山 苜子
(87) 國際公開日	平成24年5月3日 (2012.5.3)	(72) 発明者	クリスティーヌ、クリングル-アムール フランス国グロワジー、レ、ゴターユ、ル ウト、ド、シェ、ディオサ、73 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	12/913,300		
(32) 優先日	平成22年10月27日 (2010.10.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 H I V の治療用抗体

(57) 【要約】

本発明は、C X C R 4 に結合することができるだけでなく、C X C R 4 ホモ二量体のコンホメーション変化を誘発することができ、P B M C におけるH I V - 1 一次単離物複製を阻害することができる単離抗体、またはその誘導体または抗原結合フラグメントに関する。更に詳細には、本発明は、C X C R 4 タンパク質に特異的な 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 モノクローナル抗体、ならびに H I V 感染症の治療のためのそれらの使用に関する。このような抗体を含んでなる医薬組成物およびこのような抗体を選択する方法も、包含される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

IMGTナンバリングシステムによって定義される配列番号1～6および30～33のアミノ酸配列を含んでなるCDRから選択される少なくとも一つの相補性決定領域CDRを含んでなる、単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。

【請求項 2】

配列番号1、2および3のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなるCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖と、配列番号4、5および6のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖とを含んでなる、請求項1に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。
10

【請求項 3】

配列番号7のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖と、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる重鎖とを含んでなる、請求項2に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。

【請求項 4】

キメラ抗体であり、かつ配列番号56、57または58からなる群から選択される配列の重鎖と、配列番号59の配列の軽鎖とを含んでなる、請求項2に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。
20

【請求項 5】

ヒト化抗体であり、かつ配列番号64からなる配列の重鎖可変領域と、配列番号65、66、82または83からなる群から選択される配列の軽鎖可変領域とを含んでなる、請求項2に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。

【請求項 6】

ヒト化抗体であり、かつ配列番号67、68または69からなる群から選択される配列の重鎖と、配列番号70、71、84または85からなる群から選択される配列の軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを含んでなる、請求項2に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。
30

【請求項 7】

機能的フラグメントが、フラグメントFv、scFv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc、ダイアボディ、または半減期が化学修飾によって延長された任意のフラグメントからなる、請求項2に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。

【請求項 8】

配列番号54のアミノ酸配列を含んでなるscFvである、請求項7に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントまたは誘導体の一つ。

【請求項 9】

配列番号1、2および30のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなるCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含んでなる軽鎖と、配列番号31、32および33のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含んでなる重鎖とを含んでなる、請求項1に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。
40

【請求項 10】

配列番号34のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖と、配列番号35のアミノ酸配列を含んでなる重鎖とを含んでなる請求項9に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ。

【請求項 11】

以下の核酸から選択された、単離核酸：

a) 請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもし
50

くは誘導体の一つをコードする核酸、DNA、またはRNA、

b) 配列番号14～19および41～45からなるCDR配列群から選択されるDNA配列を含んでなる核酸、

c) 配列番号20、21、46、47、72、73、74、86、および87からなる重および軽可変ドメイン配列群から選択されるDNA配列を含んでなる核酸、

d) 配列番号60～63、75～79、88、および89からなる重鎖および軽鎖配列群から選択されるDNA配列を含んでなる核酸、

e) 配列番号55からなるDNA配列を含んでなる核酸、

f) b)、c)、d)またはe)に定義される核酸の対応するRNA核酸、

g) a)、b)、c)、d)およびe)に定義される核酸の相補的核酸、および

10

h) 高ストリンジエンシー条件下で配列番号14～19および41～45の配列のCDRの少なくとも一つとハイブリダイズすることができる少なくとも18個のヌクレオチドの核酸。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸を含んでなる、ベクター。

【請求項13】

請求項12に記載のベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項14】

請求項12に記載のベクターによって形質転換された少なくとも一つの細胞を含んでなる、ヒト以外のトランスジェニック動物。

20

【請求項15】

請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つを生産する方法であって、a) 請求項13に記載の細胞の培地および適当な培養条件での培養工程、および

b) このようにして該培養培地または該培養細胞から生産された、該抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つの回収工程、

を含んでなる、方法。

【請求項16】

請求項15に記載の方法によって得ることができる、または得られた抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つ。

30

【請求項17】

薬剤としての、請求項1～10および16のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項18】

PBMCにおけるHIV-1 KON一次単離物の複製を、少なくとも5μg/ml、好ましくは少なくとも10μg/mlのIC₅₀で阻害する、請求項1～10または16～17のいずれか一項に記載の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つ。

【請求項19】

請求項1～10および16～18のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つからなる化合物を活性成分として含んでなる、組成物。

40

【請求項20】

薬剤としての、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

HIV感染の予防または治療のための、請求項19または20に記載の組成物。

【請求項22】

前記HIV感染がX4指向性HIV感染である、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

前記HIV感染がX4/R5指向性HIV感染である、請求項21に記載の組成物。

【請求項24】

HIVの侵入および/または複製を特異的に阻害することができる化合物の中から選択

50

される少なくとも一つの第二の抗HIV化合物を含んでなる、請求項19～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

少なくとも第二の抗HIV化合物が、HIVプロテアーゼ阻害剤(P1)、ヌクレオシド/ヌクレオチドHIV逆転写酵素阻害剤(NRTI/NtRTI)、非ヌクレオシドHIV逆転写酵素阻害剤(NNRTI)、HIV侵入阻害剤、HIVインテグラーゼ阻害剤のような抗レトロウイルス薬からなる群から選択される、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

少なくとも第二の抗HIV化合物が抗CCR5化合物である、請求項24または25に記載の組成物。

10

【請求項27】

抗CCR5化合物がマラビロクである、請求項26に記載の組成物。

【請求項28】

CXCR4アンタゴニスト抗ウイルス剤としての分子をスクリーニングおよび/または同定する方法であって、

- a) CXCR4を発現する細胞を選択する工程、
- b) 前記細胞を、請求項1～10または16～18のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つとともにインキュベートする工程、
- c) 抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つと、CXCR4との間の結合の潜在的な阻害のための供試分子を評価する工程、および
- d) 前記阻害が可能な分子を選択する工程

を含んでなる、方法。

20

【請求項29】

HIV複製を阻害するための薬剤を調製するための、請求項1～10および16のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ、および/または請求項19～27のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項30】

HIV疾患の予防または治療のための薬剤を調製するための、請求項1～10および16のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体の一つ、および/または請求項19～27のいずれか一項に記載の組成物の使用。

30

【請求項31】

HIVの予防または治療の方法であって、請求項1～10および16のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメントまたは誘導体の一つ、および/または請求項19～27のいずれか一項に記載の組成物を、それを必要とする患者に投与することからなる工程を含んでなる、前記方法。

【請求項32】

抗CCR5化合物を前記患者に投与することからなる工程をさらに含んでなる、請求項31に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

40

【0001】

本発明は、ケモカイン受容体(CXCR)と特異的に結合することができる新規な抗体、特に、ネズミモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体、ならびにこのような抗体をコードするアミノ酸配列および核酸配列に関する。一つの態様から、本発明は、CXCR4と特異的に結合することができ、かつ、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染に対して強い活性を有する新規な抗体、機能的フラグメントまたは誘導体に関する。本発明はまた、このような抗体、機能的フラグメントまたは誘導体の、HIV感染の予防的処置および/または治療的処置のための薬剤としての使用も含んでなる。

【0002】

ケモカインは、特に免疫反応中に、ケモカイン勾配として知られるリガンドの化学的勾

50

配によって白血球の移動を制御する小型の分泌型ペプチドである(Zlotnick A. et al., 2000)。ケモカインは、それらのNH₂末端システイン残基の位置に基づいてCCおよびCX₃Cという二つの主要なサブファミリーに分かれ、Gタンパク質共役型受容体と結合し、その受容体の二つの主要なサブファミリーはCCR3およびCCR5と呼ばれている。これまでに50を超えるヒトケモカインと18のケモカイン受容体が見出されている。

【0003】

ケモカイン受容体ファミリーのいくつかのメンバーは、主要受容体CD4とともに共受容体として働き、種々の1型HIV株を細胞へ侵入させるが、この主要な共受容体はCCR5およびCXCR4である。T細胞指向性(T-cell tropic)X4 HIV-1は細胞への侵入にCD4とCXCR4を用いるが、マクロファージ指向性(macrophage-tropic)R5 HIV-1はCD4とCCR5を用いる。二重指向性株は、CXCR4とCCR5の両者を共受容体として使用することができる。他のケモカイン受容体の中でも、CCR3、CCR2、CCR8、CXCR6、CXCR7、CX3CR1は、HIV株のより限られたサブセットにより、共受容体として機能することができる。

10

【0004】

CXCR4の天然リガンドであるSDF-1、ならびにCCR5の天然リガンドであるCCL3、CCL4、CCL4-L1およびCCL5リガンドは、種々のHIV-1株による細胞融合および感染を阻害することができる。これらの知見は、ケモカイン受容体を標的とする抗HIV治療薬の開発を促し、CCR5指向性HIV-1に感染した患者において、CCR5の小分子アンタゴニストであるマラビロク(maraviroc)(CELSENTRI(商標))と、他の抗HIV-1薬との組合せの認可に至らせた。しかしながらやはり、二重指向性HIV-1に感染した患者にも、CXCR4指向性HIV-1に感染した患者にもマラビロクは使用されない(VIDAL 2009)。従って、X4指向性HIV複製を阻害することができるCXCR4アンタゴニストを同定することにより、X4指向性感染患者および二重指向性HIV感染患者の両者にこの種の療法を拡張するという明確な医学的必要がある。

20

【0005】

ケモカイン受容体4(フーシン、CD184、LESTR、またはHUMSTRとしても知られる)は、352または360個のアミノ酸を含んでなる二つのイソ型として存在する。残基Asn11はグリコシル化され、残基Ter21は硫酸基の付加によって修飾され、Cys109および186は、受容体の細胞外部分でジスルフィド架橋によって結合されている(Juarez J.ら、2004)。

30

【0006】

この受容体は、様々な種の正常組織、ナイーブ、非メモリーT細胞、調節T細胞、B細胞、好中球、内皮細胞、一次単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、CD34+造血幹細胞、また、低レベルではあるが、心臓、結腸、肝臓、腎臓、および脳で発現される。CXCR4は、白血球輸送、B細胞のリンパ球生成、および骨髄造血に重要な役割を果たす。

30

【0007】

これまでに記載されているCXCR4受容体の独特なリガンドは、ストロマ細胞由来因子-1(SDF-1)またはCXCL12である。SDF-1は、リンパ節、骨髄、肝臓、肺において多量に、また、程度は少ないが、腎臓、脳、および皮膚によって分泌される。CXCR4はまた、III型ヒトヘルペスウイルスによってコードされているウイルスマクロファージ炎症性タンパク質II(vMIP-II)であるアンタゴニストケモカインによっても認識される。

40

【0008】

従前に記載されているように、CXCR4受容体は、T細胞指向性HIV-1単離物(X4ウイルス)に対する主要な共受容体である。この受容体に干渉すれば、極めて効率的にX4ウイルスの複製を阻害できるはずである。

【発明の概要】

【0009】

50

本発明の発明面の一つは、HIV複製を阻害するマウスモノクローナル抗体(Mab)を作製することである。本発明は、CXCR4ホモ二量体と結合することができ、かつ、HIV感染に対して強い活性を有するCXCR4 Mab 515H7(またはそのフラグメント)を包含する。本発明はまた、CXCR4 ホモ二量体と結合することができ、かつ、HIV感染に対して強い活性を有するCXCR4 Mab 301aE5(またはそのフラグメント)を包含する。

【0010】

驚くべきことに、本発明者らは、CXCR4と結合することができるだけでなく、CXCR4 ホモ二量体のコンフォメーション変化を誘導することができ、かつ、PBM CにおけるX4-HIV-1一次単離物の複製を阻害することができるモノクローナル抗体の作製に成功した。より詳細には、本発明の抗体は、PBM CにおけるX4/R5-HIV-1一次単離物の複製を阻害することもできる。

10

【0011】

好ましくは、CXCR4 化合物は、

Genbank受託番号NP_003458配列番号27：

MEGISIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGVGNGLVILVMGYQKKLRSMTDKYRLHL
SVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVITYVNLYSSVLIAFISLDRLAIVHATNSQRPRKLLAEKVYVGV
WIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIIIISKLHSKGHQKRKALKT
TVILILAFFACWLPPYYIGISIDSFILLEIIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSQAQHALTSV
SRGSSLKILSKGKRGHHSSVSTESESSSFHSS,

20

として表される配列を有するケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体4イソ型b[ホモ・サピエンス]、

Genbank受託番号NP_001008540配列番号28：

MSIPLPLLQIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGVGNGLVILVMGYQKKLRSMTDKY
RLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVITYVNLYSSVLIAFISLDRLAIVHATNSQRPRKLLAEKV
YVGWI PALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIIIISKLHSKGHQKRK
ALKTTVILILAFFACWLPPYYIGISIDSFILLEIIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSQAQHA
LTSVRGSSLKILSKGKRGHHSSVSTESESSSFHSS,

30

として表される配列を有するケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体4イソ型a[ホモ・サピエンス]、

配列番号27または28を有するこれらのbまたはaイソ型の一つと少なくとも95%の同一性を有する選択的転写スプライス変異体またはその天然変異体、およびその天然リガンドであるストロマ細胞由来因子-1(SDF-1)によって特異的に認識されることができ、かつ好ましくは、少なくとも100、150、および200のアミノ酸長を有するそのフラグメント

からなる群から選択される、二種のヒトCXCR4イソ型のうちの一つである。

【0012】

CXCR2は、

Genbank受託番号NP_001548配列番号29：

MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLLSLGNLVMVILYSRVGR
SVTDVYLLNLALADLLFALTLP IWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHATRTLTQKRY
LVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIMLFCYGFTLRTLFK
AHMGQKRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQK
FRHGLLKILAIHGLISKDSLKPDSRPSFGSSSGHTSTTL,

40

として表される配列を有するインターロイキン8受容体[ホモ・サピエンス]、

配列番号29を有するこのインターロイキン8受容体と少なくとも95%の同一性を有する、選択的転写スプライス変異体またはその天然変異体、および

IL-8によって特異的に認識ことができ、かつ、好ましくは、少なくとも100、150、および200のアミノ酸長を有するそのフラグメント

からなる群から選択される。

50

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、抗HIV活性を有するか、またはHIV感染の治療のための組成物の製造のために使用することができる化合物を選択する方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする方法も含む：

【 0 0 1 4 】

第1の側面において、本発明の主題は、本発明による抗体を作製および選択する方法である。

【 0 0 1 5 】

より詳細には、本発明は、HIV複製を阻害することができる抗CXCR4抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つを選択する方法であって、

10

i) 作製された抗体をスクリーニングし、CXCR4と特異的に結合することができる抗体を選択する工程、

i i) 工程i) の選択抗体を検定し、末梢血単核細胞（PBM C）と結合できる抗体を選択する工程、

i i i) 工程i i) の選択抗体を検定し、CXCR4ホモ二量体と結合することができる抗体を選択する工程、および次いで

i v) 工程i i i) の選択抗体を検定し、PBM CにおけるX4指向性HIV-1一次単離物の複製を阻害することができる抗体を選択する工程

を含んでなる方法に関する。

20

【 0 0 1 6 】

別の実施態様では、本発明は、HIV複製を阻害することができる抗CXCR4抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つを選択する方法であって、

i) 作製された抗体をスクリーニングし、CXCR4と特異的に結合することができる抗体を選択する工程、

i i) 工程i) の選択抗体を検定し、末梢血単核細胞（PBM C）と結合できる抗体を選択する工程、

i i i) 工程i i) の選択抗体を検定し、CXCR4ホモ二量体と結合することができる抗体を選択する工程、および次いで

i v) 工程i i i) の選択抗体を検定し、PBM CにおけるX4指向性HIV-1一次単離物の複製を阻害することができ、および/またはPBM CにおいてX4/R5指向性H

30

I V - 1一次単離物の複製を阻害することができる抗体を選択する工程

を含んでなる方法に関する。

【 0 0 1 7 】

抗体の作製は、例えば、骨髄腫細胞と免疫マウスまたは選択された骨髄腫細胞と適合する他の種に由来する脾臓細胞との融合などの、当業者に公知の方法 [Kohler & Milstein, 1975, ネイチャー (Nature), 256:495-497] によって実現することができる。この免疫動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有し、その後、直接ヒト抗体を產生するトランスジェニックマウスを含み得る。もう一つの可能性のある実施態様は、ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレー技術の使用からなるものであり得る。

40

【 0 0 1 8 】

スクリーニング工程i) およびi i) は、当業者に公知のいずれの方法または工程によっても実現可能である。限定されない例として、ELISA、BIAcore、免疫組織化学、CXCR4発現細胞膜抽出物または精製CXCR4を用いたウエスタンプロット解析、FACS分析、および機能的スクリーニングが挙げられる。好ましい方法は、產生された抗体が、標的細胞表面において本来のCXCR4受容体のコンフォメーションも認識できることを確認するための、CXCR4形質転換体（工程1）および少なくともPBM C（工程2）に対するFACS分析によるスクリーニングからなる。この方法を以下の例にさらに厳密に記載する。

【 0 0 1 9 】

スクリーニング工程i i i) は、当業者に公知のいずれの方法または工程によっても実

50

現可能である。限定されるものではないが、好ましい例として、CXCR4トランスフェクト細胞またはPBM C由来の膜抽出物に対して目的の抗体を用いるウエスタンプロット法および／または免疫沈降法が挙げられる。

【0020】

スクリーニング工程iv)は、当業者に公知のいずれの方法または工程によっても実現可能である。限定されるものではないが、好ましい例として、Hollらによって記載されているプロトコール (J. Immunol. 2004, 173, 6274-83)を用いることにより、PBM CにおけるX4一次 HIV-1単離物および／またはX4/R5一次 HIV-1単離物の複製を阻害することができるか否かに関し、抗体をスクリーニングすることからなる方法が挙げられる。

10

【0021】

本発明の方法の選択の工程iii)の好ましい実施態様では、この工程iii)は、CXCR4-RLuc/CXCR4-YFPを発現する細胞に対するBRET分析によって抗体を評価すること、およびBRETシグナルの少なくとも40%、好ましくは45%、50%、55%、最も好ましくは60%を阻害することができる抗体を選択することからなる。

【0022】

BRET法は、タンパク質二量体形成の代表例として知られている技術である[Angers et al., (PNAS), 2000, 97:3684-89]。

20

【0023】

本方法の工程iii)に用いられるBRET法は当業者によく知られており、以下の例に詳細に記載する。より詳細には、BRET(生物発光共鳴エネルギー移動)は、生物発光ドナー(ウミシイタケ・ルシフェラーゼ(RLuc))と、蛍光受容体であるGFP(緑色蛍光タンパク質)またはYFP(黄色蛍光タンパク質)の突然変異体との間で起こる非放射性のエネルギー移動である。本ケースでは、EYFP(増強黄色蛍光タンパク質)を用いた。移動の有効性は、ドナーと受容体の配向および距離に依存する。そして、エネルギー移動は、この二つの分子が近接している(1~10nm)場合にのみ起こり得る。この特性を用いて、タンパク質-タンパク質相互作用アッセイを作り出す。実際に、二つのパートナー間の相互作用を検討するために、第一のものをウミシイタケ・ルシフェラーゼと、そして、第二のものをGFPの黄色突然変異体と遺伝子融合する。融合タンパク質は、必須ではないが一般に、哺乳類細胞で発現される。その膜透過基質(セレンテラジン)の存在下で、RLucは青色の光を放出する。GFP突然変異体がRLucから10nmより近ければエネルギー移動が起こり、さらに黄色シグナルが検出できる。BRETシグナルは、受容体によって放出された光とドナーによって放出された光の間の比として測定される。従って、BRETシグナルは二つの融合タンパク質が近接するほど、またはコンフォメーション変化がRLucと、GFP突然変異体とを近接させるほど増大する。

30

【0024】

BRET分析が好ましい実施態様からなる場合、CXCR4二量体のコンフォメーション変化を測定するために、当業者に公知のいずれの方法も使用可能である。限定されるものではないが、以下の技術が挙げられる：FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)、HTRF(均一時間分解蛍光)、FLIM(蛍光寿命画像測定法)またはSW-FCCS(単波長蛍光相関分光法)。

40

【0025】

共免疫沈降法、アルファースクリーン、化学架橋、二重ハイブリッド、アフィニティクロマトグラフィー、ELISA、またはファーウエスタンプロットなどの他の従来法も使用可能である。

【0026】

本発明による方法の特定の面では、工程iii)は、CXCR4-RLuc/CXCR4-YFPの両者を発現する細胞に対するBRET分析によって抗体を評価すること、およびBRETシグナルの少なくとも40%を阻害することができる抗体を選択することか

50

らなる。

【0027】

第2の面において、本発明の主題は、該方法によって得られる単離された抗体、またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体の一つである。該抗体またはそれらのフラグメントもしくは誘導体の一つは、ヒトCXC R4と特異的に結合することができ、該抗体はまた、CXCR4ホモ二量体のコンフォメーション変化を誘導することもできる。

【0028】

例えばクローンA120のようなCXCR4 MabがHIV-1実験株(X4 HIV-1NL4-3)のPBM Cへの侵入を阻害することができる文献から知られている(Tanaka R. et al, J. Virol. 2001, 75, 11534-11543)。さらに、CXCR4 Mabが、HIV-1 X4一次単離物の、CXCR4を発現する細胞系統への侵入を阻害することができることも知られている。これに対し、このようなウイルスをそれらの天然環境において、すなわち、実験的ウイルスまたは細胞系統に対してだけでなく、阻害することができる抗体は開示されていない。しかしながらやはり、CXCR4 MabがPBM CへのHIV-1 X4一次単離物の侵入を阻害することができるということは新規であり、本発明の自明の面ではない。

【0029】

「機能的フラグメントおよび誘導体」および「抗原結合フラグメントおよび誘導体」という表現は、同様であり、本明細書の後段で詳細に定義される。

【0030】

ここで、本発明は天然型の抗体に関するものではなく、すなわち、それらはそれらの天然環境になく、天然源から精製によって単離しもしくは得ることができたものであるか、またはさらには遺伝子組換えもしくは化学合成によって得られたものであり、また、それらは、さらに記載されるように、非天然アミノ酸を含むことができることを理解しなければならない。

【0031】

より詳細には、本発明の別の面によれば、単離された抗体、またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体の一つが記載され、該抗体は、IMGTナンバリングシステムによって定義される配列番号1～6および30～33のアミノ酸配列を含んでなるCDRから選択される少なくとも一つの相補性決定領域(complementary determining region)CDRを含んでなることを特徴とする。

【0032】

第一の面によれば、本発明は、IMGTナンバリングシステムに従って定義される配列番号1～6の配列のCDRの中から選択される少なくとも一つのCDR、または配列が最適なアライメントの後に配列番号1～6の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、および98%の同一性を有する少なくとも一つのCDRを含んでなる、単離された抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体に関する。

【0033】

第二の面によれば、本発明は、IMGTナンバリングシステムに従って定義される配列番号1、2および30～33の配列のCDRの中から選択される少なくとも一つのCDR、または配列が最適なアライメントの後に配列番号1、2、および30～33の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、および98%の同一性を有する少なくとも一つのCDRを含んでなる、単離された抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体に関する。

【0034】

抗体の「機能的フラグメント」または「抗原結合フラグメント」とは、特に、フラグメントFv、scFv(s c =一本鎖)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fcもしくはダイアボディ(diabody)などの抗体フラグメント、または半減期が延長された任意のフラグメントを意味する。このような機能的フラグメントは本明細書の後段で詳細に記載される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

抗体の「誘導化合物」または「誘導体」とは、特に、ペプチド骨格(peptide scaffold)と、C X C R 4 を認識する能力を保持するための原抗体の少なくとも一つの C D R とから構成される結合タンパク質を意味する。当業者に周知のこののような誘導化合物は、本明細書の後段でさらに詳細に記載される。

【 0 0 3 6 】

より好ましくは、本発明は、本発明による抗体、それらの誘導化合物またはそれらの機能的フラグメント、特に、キメラまたはヒト化抗体、遺伝子組換え、または化学合成によって得られる抗体を含んでなる。

【 0 0 3 7 】

好みの実施形態によれば、本発明による抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、モノクローナル抗体からなることを特徴とする。

【 0 0 3 8 】

「モノクローナル抗体」とは、ほぼ均質な抗体集団から生じる抗体を意味すると理解される。より詳細には、集団の個々の抗体は、最小の割合で見られる少数の潜在的に自然に生じる突然変異以外は同一である。言い換えれば、モノクローナル抗体は、単細胞クローン(例えば、ハイブリドーマ、その均質な抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた真核生物宿主細胞、その均質な抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた原核生物宿主細胞など)の増殖から生じる均質な抗体からなり、一般に、一つおよびただ一つのクラスおよびサブクラスの重鎖と、一種類のみの軽鎖を特徴とする。モノクローナル抗体は特異性が高く、单一の抗原に対するものである。加えて、種々の決定基またはエピトープに対する種々の抗体を一般に含むポリクローナル抗体の作製とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の单一のエピトープに対するものである。

10

20

【 0 0 3 9 】

より詳細には、本発明の第一の好みの実施形態によれば、抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、C D R - L 1、C D R - L 2、およびC D R - L 3 から選択される少なくとも一つのC D R を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とし、ここで、

C D R - L 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列を含んでなり、

C D R - L 2 は配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなり、

C D R - L 3 は配列番号 3 のアミノ酸配列を含んでなる。

30

【 0 0 4 0 】

別の実施態様によれば、本発明の抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、配列番号 1、2、もしくは 3 の配列の三つの C D R のうち少なくとも一つ、または最適なアライメントの後に配列番号 1、2、または 3 の配列と少なくとも 80%、好みの 85%、90%、95%、および 98% の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 4 1 】

本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つはまた、C D R - L 1、C D R - L 2、およびC D R - L 3 を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とし、ここで、C D R - L 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列を含んでなり、C D R - L 2 は配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなり、C D R - L 3 は配列番号 3 のアミノ酸配列を含んでなる。

40

【 0 0 4 2 】

別の実施態様では、本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、配列番号 7 のアミノ酸配列、または最適なアライメントの後に配列番号 7 の配列と少なくとも 80%、好みの 85%、90%、95%、および 98% の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる配列の軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 4 3 】

本発明の第二の好みの実施態様によれば、抗体、またはその誘導化合物もしくは機能

50

的フラグメントは、 C D R - L 1、 C D R - L 2、 および C D R - L 3 から選択される少なくとも一つの C D R を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とし、 ここで、

C D R - L 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列を含んでなり、

C D R - L 2 は配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなり、

C D R - L 3 は配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 4 4 】

別の実施態様によれば、 本発明の抗体、 またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、 配列番号 1、 2、 もしくは 3 0 の配列の三つの C D R のうち少なくとも一つ、 または最適なアライメントの後に配列番号 1、 2、 もしくは 3 0 の配列と少なくとも 8 0 %、 好ましくは 8 5 %、 9 0 %、 9 5 % および 9 8 % の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。 10

【 0 0 4 5 】

本発明の抗体、 またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、 C D R - L 1、 C D R - L 2、 および C D R - L 3 を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とし、 ここで、 C D R - L 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列を含んでなり、 C D R - L 2 は配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなり、 C D R - L 3 は配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 4 6 】

別の実施態様では、 本発明の抗体、 またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、 配列番号 3 4 のアミノ酸配列、 または最適なアライメントの後に配列番号 3 4 の配列と少なくとも 8 0 %、 好ましくは 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 および 9 8 % の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる配列の軽鎖を含んでなることを特徴とする。 20

【 0 0 4 7 】

より詳細には、 本発明の抗体、 またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、 C D R - H 1、 C D R - H 2、 および C D R - H 3 から選択される少なくとも一つの C D R を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とし、 ここで、

C D R - H 1 は配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでなり、

C D R - H 2 は配列番号 5 のアミノ酸配列を含んでなり、

C D R - H 3 は配列番号 6 のアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 4 8 】

別の実施態様によれば、 本発明の抗体、 またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、 配列番号 4、 5 もしくは 6 の配列の三つの C D R のうち少なくとも一つ、 または最適なアライメントの後に配列番号 4、 5 もしくは 6 の配列と少なくとも 8 0 %、 好ましくは 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 および 9 8 % の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。 30

【 0 0 4 9 】

別の特定の実施態様によれば、 抗体、 またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、 C D R - H 1、 C D R - H 2、 および C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とし、 ここで、 C D R - H 1 は配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでなり、 C D R - H 2 は配列番号 5 のアミノ酸配列を含んでなり、 C D R - H 3 は配列番号 6 のアミノ酸配列を含んでなる。 40

【 0 0 5 0 】

別の実施態様では、 本発明の抗体、 またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、 配列番号 8 のアミノ酸配列、 または最適なアライメントの後に配列番号 8 の配列と少なくとも 8 0 %、 好ましくは 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 および 9 8 % の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる配列の重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 5 1 】

より詳細には、 本発明の抗体、 またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、 C D R - H 1、 C D R - H 2、 および C D R - H 3 から選択される少なくとも一つの C D R を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とし、 ここで、 50

C D R - H 1 は配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含んでなり、
 C D R - H 2 は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含んでなり、
 C D R - H 3 は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 5 2 】

別の実施態様によれば、本発明の抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、配列番号 3 1、3 2、もしくは 3 3 の配列の三つの C D R のうち少なくとも一つ、または最適なアライメントの後に配列番号 3 1、3 2、もしくは 3 3 の配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 %、および 9 8 % の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 5 3 】

別の特定の実施態様によれば、抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの一つは、C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とし、ここで、C D R - H 1 は配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含んでなり、C D R - H 2 は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含んでなり、C D R - H 3 は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 5 4 】

別の実施態様では、本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、配列番号 3 5 のアミノ酸配列、または最適なアライメントの後に配列番号 3 5 の配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 %、および 9 8 % の同一性を有する少なくとも一つの配列を含んでなる配列の重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 5 5 】

本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、配列番号 1、2、および 3 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなる C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 を含んでなる軽鎖と、配列番号 4、5、および 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなる C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 5 6 】

最後に、本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つはまた、配列番号 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖と、配列番号 8 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とし得る。

【 0 0 5 7 】

本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、配列番号 1、2、および 3 0 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなる C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 を含んでなる軽鎖と、配列番号 3 1、3 2、および 3 3 のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなる C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 5 8 】

最後に、本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つはまた、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖と、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖とを含んでなることを特徴とし得る。

【 0 0 5 9 】

本明細書において「ポリペプチド」、「ポリペプチド配列」、「ペプチド」、および「抗体化合物またはそれらの配列と結合しているタンパク質」は互換的である。

【 0 0 6 0 】

本発明は天然型の抗体に関するものではなく、すなわち、それらはそれらの天然環境から採取されたものではなく、天然源から精製によって単離されまたは得られたものであるか、または遺伝子組換えもしくは化学合成によって得られたものであり、従って、それらは、以下に記載されるように、非天然アミノ酸を含むことができることを理解しなければならない。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

第一の実施態様において、相補性決定領域または C D R は、Kabat ら (Kabat et al., 「免疫学的に興味深いタンパク質の配列 (Sequences of proteins of immunological interest)」, 第 5 版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991 および後続版) によって定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を意味する。三つの重鎖 C D R と、三つの軽鎖 C D R とが存在する。ここで、「 C D R 」とは、場合にもよるが、抗体が認識する抗原またはエピトープに対する抗体の結合親和性を担うアミノ酸残基の大部分を含む領域のうち 1 以上、またはさらには総てを示すのに用いられる。

【 0 0 6 2 】

第二の実施態様において、 C D R 領域または C D R は、 I M G T によって定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を示すものとする。

10

【 0 0 6 3 】

I M G T ユニークナンバリングは、どんな抗原受容体、鎖の種類、または種であれ、可変ドメインを比較するために定義されたものである [Lefranc M. -P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M .-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]。I M G T ユニークナンバリングでは、例えば、システイン 2 3 (1 s t - C Y S) 、トリプトファン 4 1 (C O N S E R V E D - T R P) 、疎水性アミノ酸 8 9 、システイン 1 0 4 (2 n d - C Y S) 、フェニルアラニン、またはトリプトファン 1 1 8 (J - P H E または J - T R P) など、保存されているアミノ酸は常に同じ位置を持つ。I M G T ユニークナンバリングでは、フレームワーク領域 (F R 1 - I M G T : 1 ~ 2 6 番、 F R 2 - I M G T : 3 9 ~ 5 5 番、 F R 3 - I M G T : 6 6 ~ 1 0 4 番および F R 4 - I M G T : 1 1 8 ~ 1 2 8 番) および相補性決定領域 : C D R 1 - I M G T : 2 7 ~ 3 8 番、 C D R 2 - I M G T : 5 6 ~ 6 5 番および C D R 3 - I M G T : 1 0 5 ~ 1 1 7 番の標準化された画定が得られる。ギャップは占有されていない位置を表すので、 C D R - I M G T 長 (例えば、 [8 . 8 . 1 3] などと括弧の中に点で区切って示される) は重要な情報となる。I M G T ユニークナンバリングは、IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] として表される 2 D グラフ、および IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., 「 T 細胞受容体および M H C 構造データー 」 . Nucl. Acid s. Res., 32, D208-D210 (2004)] に用いられる。

20

30

30

【 0 0 6 4 】

三つの重鎖 C D R と、三つの軽鎖 C D R とが存在する。ここで、 C D R は、場合によって、抗体が認識する抗原またはエピトープに対する抗体の親和性による結合を担うアミノ酸残基の大部分を含む、これらの領域の一つまたはいくつか、またはさらにはこれらの領域の全部を示すために用いられる。

40

【 0 0 6 5 】

より明瞭にするために、以下の説明およびより詳細には表 2 および 3 では、 C D R は I M G T ナンバリングシステムおよび Kabat ナンバリングシステムによって定義されていることを理解しなければならない。

【 0 0 6 6 】

I M G T ナンバリングシステムは、上記で定義された I M G T システムに従って C D R を定義し、Kabat ナンバリングシステムは、上記で定義された Kabat システムに従って C D R を定義する。

【 0 0 6 7 】

より詳細には、 5 1 5 H 7 と呼ばれる抗体に関しては、 C D R - L 1 は I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 1 からなり、 Kabat ナンバリングシステムでは配列番号 9 からなる。 C D R - L 2 に関しては、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 2 からなり、 Kabat ナンバリングシステムでは配列番号 1 0 からなる。 C D R - L 3 は、この二つのナンバリングシステムのそれぞれで配列番号 3 からなる。重鎖について、 C D

50

R - H 1 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 4 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 1 1 からなる。 C D R - H 2 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 5 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 1 2 からなる。最後に、 C D R - H 3 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 6 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 1 3 からなる。

【 0 0 6 8 】

そして、 3 0 1 a E 5 と呼ばれる抗体に関しては、 C D R - L 1 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 1 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 9 からなる。 C D R - L 2 に関しては、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 2 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 3 6 からなる。 C D R - L 3 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 3 0 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 3 7 からなる。重鎖について、 C D R - H 1 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 3 1 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 3 8 からなる。 C D R - H 2 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 3 2 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 3 9 からなる。最後に、 C D R - H 3 は、 I M G T ナンバリングシステムでは配列番号 3 3 からなり、 K a b a t ナンバリングシステムでは配列番号 4 0 からなる。

【 0 0 6 9 】

本発明の意味において、二つの核酸配列またはアミノ酸配列間の「同一性割合」とは、最適なアライメントの後に得られる、比較する二つの配列間での同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を意味し、この割合は純粋に統計学的なものであり、その 2 配列間の違いはそれらの長さに沿ってランダムに分布している。二つの核酸配列またはアミノ酸配列の比較は、従来から、それらを最適にアライメントした後に配列を比較することによって行われ、この比較はセグメントによって、または「アライメントウインドウ」の使用によって行うことができる。比較のための配列の最適なアライメントは、手による比較の他、 Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482] のローカル・ホモロジー・アルゴリズム、 Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443] のローカル・ホモロジー・アルゴリズム、 Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] の相似性探索法、またはこれらのアルゴリズムを用いたコンピューターソフトウェア (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI の G A P 、 B E S T F I T 、 F A S T A および T F A S T A 、または匹敵するソフトウェア B L A S T N R もしくは B L A S T P による) によって行うことができる。

【 0 0 7 0 】

二つの核酸配列またはアミノ酸配列間の同一性割合は、二つの最適にアライメントされた配列を比較することにより決定され、ここで、比較する核酸配列またはアミノ酸配列はその二つの配列間の最適なアライメントのために参照配列に対して付加または欠失を持ちうる。同一性割合は、アミノ酸ヌクレオチドまたは残基がその二つの配列間、好ましくは二つの全配列間で同一である位置の数を求め、その同一の位置の数をアライメントウインドウの位置の総数で割り、その商に 1 0 0 をかけて、その二つの配列間の同一性割合を得ることによって計算される。

【 0 0 7 1 】

例えば、 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> のサイトで利用可能な B L A S T プログラム、「 B L A S T 2 s e q u e n c e s 」(Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250) をデフォルトパラメーター（特に、パラメーターとして、「オープンギャップペナルティー」： 5 、および「エクステンションギャップペナルティー」： 2 、選択マトリックスは、例えば、このプログラムによって提案される「 B L O S U M 6 2 」である）とともに使用することができ、この 2 配列間の同一性割合は、このプログラムによって直接計算される。

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

50

参照アミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 85%、90%、95%、および 98% の同一性を示すアミノ酸配列として、好ましい例には、参照配列、ある特定の修飾、特に、少なくとも一つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または延長を含むものが含まれる。1 以上の連続的または非連続的アミノ酸の置換の場合、置換されるアミノ酸が「等価な」アミノ酸に置き換わる置換が好ましい。ここで、「等価なアミノ酸」とは、対応する抗体および以下に定義される具体例の生物活性にいかなる修飾も与えずに構造アミノ酸の一つの取って代わり得るアミノ酸を示すものとする。

【0073】

等価なアミノ酸は、置換されるアミノ酸との構造的相同性または生成され得る種々の抗体間の生物活性の比較試験の結果に基づいて決定される。

10

【0074】

限定されない例として、下表 1 に、対応する修飾抗体の生物活性の有意な修飾をもたらさずに行い得る置換をまとめる。なお、逆の置換も同じ条件下で本来可能である。

【0075】

【表1】

表1

原残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

10

20

30

40

【0076】

特定の実施態様において、本発明は、ネズミ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0077】

上記に見られるように、本発明はまた、本明細書に記載される抗体に由来する化合物に関する。

【0078】

より詳細には、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、

50

該誘導化合物が、最初の抗体のパラトープ認識特性の総てまたは一部を保存するように、少なくとも一つの C D R がグラフトされているペプチド骨格を含んでなる結合タンパク質からなることを特徴とする。

【 0 0 7 9 】

また、本発明に記載される C D R 配列のうち 1 以上の配列が種々の免疫グロブリンタンパク質骨格(scaffolding)に存在してもよい。この場合、このタンパク質配列によって、グラフトされた C D R の折りたたみに有利なペプチド骨格を再び作り出して、それらのパラトープ抗原認識特性を保存可能とすることができます。

【 0 0 8 0 】

一般に、当業者は、元の抗体に由来する C D R の少なくとも一つをグラフトするためのタンパク質骨格(scaffolding)の種類をどのように決めればよいかを知っている。より詳細には、選択されたこのような骨格は次のような基準の最大数を満たさなければならないことが知られている(Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187) :

- 系統発生的保存が良好であること、
- 三次元構造が既知であること(例えば、結晶学、N M R 分光法または当業者に公知の他のいずれかの方法による)、
- 小型であること、
- 転写後修飾が少ないか、または全く無いこと、および / または
- 產生、発現、および精製が容易なこと。

【 0 0 8 1 】

このようなタンパク質骨格の起源は、限定されるものではないが、フィプロネクチンおよび優先的にはフィプロネクチン I I I 型ドメイン 1 0 、リポカリン、アンチカリン(Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のタンパク質 A のドメイン B に由来するタンパク質 Z 、チオレドキシン A または「アンキリンリピート」(Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質の中から選択される構造物であり得る。

【 0 0 8 2 】

例えば、サソリ、昆虫、植物、軟体動物などの毒素、およびニューロン N O シンターゼ(P I N)のタンパク質阻害剤といった毒素に由来する骨格も挙げておくべきであろう。

【 0 0 8 3 】

限定されるものではないが、このようなハイブリッド構築物の例として、P I N のループの一つにおける抗 C D 4 抗体、すなわち 1 3 B 8 . 2 の C D R - H 1 (重鎖)挿入があり、このようにして得られた新たな結合タンパク質は元の抗体と同じ結合特性を保存している(Bes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344)。単に例示であるが、ネオカルチノスタチンのループの一つに抗リゾチーム V H H 抗体の C D R - H 3 (重鎖)をグラフトすることも挙げられる。

【 0 0 8 4 】

最後に、前記のように、このようなペプチド骨格は、元の抗体に由来する C D R の少なくとも一つを含んでなり得る。必ずしも必要というわけではないが、好ましくは、当業者は重鎖由来の少なくとも一つの C D R を選択することができ、これは抗体の特異性を主として担うことが知られている。1 以上の適切な C D R を選択することは当業者には自明であり、当業者ならば、次に好適な既知技術を選択することができる(Bes et al., FEBS Letters 508, 2001, 67-74)。

【 0 0 8 5 】

本発明の特定の面は、本発明による抗体に由来する化合物を選択する方法に関し、該誘導化合物は *in vitro* および / または *in vivo* において H I V の細胞侵入を阻害することができ、該誘導化合物は、少なくとも一つの抗体 C D R がグラフトされているペプチド骨格を含んでなり、該方法は、

a) 少なくとも一つの抗体 C D R がグラフトされているペプチド骨格から構成される化合

10

20

30

40

50

物を、HIV-1型とPBM Cを含有する生体サンプルとin vitroで接触させる工程、および

b) 該化合物がHIV-1複製を阻害することができる場合、その化合物を選択する工程を含んでなり、

少なくとも一つのグラフトされるCDRが、配列番号1～6および30～33の配列、または最適なアライメントの後に配列番号1～6および30～33の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、および98%の同一性を有する配列のCDRの中から選択されることを特徴とする。

【0086】

好ましい様式によれば、該方法は、工程a)において、少なくとも二つまたは三つの抗体CDRがグラフトされているペプチド骨格を含んでなる化合物をin vitroで接触させることを含み得る。 10

【0087】

この方法のさらに好ましい様式によれば、ペプチド骨格は、構造が上記された骨格または結合タンパク質の中から選択される。

【0088】

明らかに、これらの例は何ら限定されず、当業者に既知または自明の他のいずれの構造も、本特許出願によって付与される保護に包含されるものと考えるべきである。 20

【0089】

よって、本発明は、ペプチド骨格が、a) 系統発生的によく保存されているタンパク質、b) 丈夫な(robust)構造のタンパク質、c) 周知の3D分子構成を有するタンパク質、d) 小型のタンパク質、および/またはe) 安定性を変化させずに欠失および/または挿入によって修飾することができる領域を含んでなるタンパク質の中から選択されることを特徴とする抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。 20

【0090】

好ましい実施態様によれば、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、該ペプチド骨格が、i) フィプロネクチンに由来する骨格、優先的にはフィプロネクチン3型ドメイン10、リポカリン、アンチカリン、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のタンパク質AのドメインBに由来するタンパク質Z、チオレドキシンAまたは「アンキリンリピート」(Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質、またはii) ニューロンN0シルバーゼ(PIN)タンパク質阻害剤の中から選択されることを特徴とする。 30

【0091】

本発明の別の面は、前記抗体の機能的フラグメントに関する。

【0092】

より詳細には、本発明は、該機能的フラグメントがフラグメントFv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc、およびダイアボディ、またはPEG化フラグメントなどの半減期が延長された任意のフラグメントの中から選択されることを特徴とする抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを対象とする。 40

【0093】

本発明による抗体のこのような機能的フラグメントは、例えば、フラグメントFv、scFv(sc=一本鎖)、Fab、Fab'、(Fab')₂、scFv-Fcまたはダイアボディ、またはポリエチレンギリコール(PEG化)などのポリアルキレンギリコールの付加といった化学修飾によって(PEG化フラグメントは、Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、Fab'-PEG、Fab'-(ab')₂-PEGおよびFab'-PEGと呼ばれる)、またはリポソーム、ミクロスフェア、またはPLGAに組み込むことによって半減期が延長された任意のフラグメントからなり、該フラグメントは、特に、それが由来する抗体の全般的活性、さらには部分的活性であっても示し得る、本発明の特徴的なCDRの少なくとも一つを有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

好ましくは、該機能的フラグメントは、それらが由来する抗体の可変重鎖または軽鎖の部分的配列を含んでなるかまたは含み、該部分的配列は、それが由来する抗体と同様の結合特異性および十分な親和性、好ましくはそれが由来する抗体の親和性の少なくとも 1 / 1 0 0 、より好ましくは少なくとも 1 / 1 0 の親和性を保持するのに十分なものである。

【 0 0 9 5 】

このような機能的フラグメントは、それが由来する抗体の配列の少なくとも 5 つのアミノ酸、好ましくは、 6 、 7 、 8 、 1 0 、 1 5 、 2 5 、 5 0 、または 1 0 0 個の連続するアミノ酸を含みうる。

10

【 0 0 9 6 】

好ましくは、これらの機能的フラグメントは、それらが由来する抗体と一般に同様の結合特異性を有する、 F v 、 s c F v 、 F a b 、 F (a b ') 2 、 F (a b ') 、 s c F v - F c 、またはダイアボディタイプのものでありうる。本発明によれば、本発明の抗体のフラグメントは、前記の抗体からペプシンもしくはパパインを含む酵素消化、および / または化学的還元によるジスルフィド結合の切断などの方法によって得ることができる。該抗体フラグメントはまた、これもまた当業者に公知の組換え遺伝子技術によって、または例えば、 Applied BioSystems などによって販売されているような自動ペプチド合成装置によるペプチド合成によって得ることができる。

20

【 0 0 9 7 】

さらに明確にするために、下表 2 に、本発明の抗体に相当する種々のアミノ酸配列をまとめた。

【 0 0 9 8 】

【表2】

表2 (表中、Mu. = ネズミ)

抗体	CDRナンバーリング	重鎖	軽鎖	配列番号
515H7	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		13
301aE5	IMGT		Mu. 可変ドメイン	7
			Mu. 可変ドメイン	8
			CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	30
		CDR-H1		31
	Kabat	CDR-H2		32
		CDR-H3		33
			CDR-L1	9
			CDR-L2	36
			CDR-L3	37
		CDR-H1		38
40	Kabat	CDR-H2		39
		CDR-H3		40
			Mu. 可変ドメイン	34
		Mu. 可変ドメイン		35

【0099】

本発明の抗体対象の特に重要な付加的面は、それらが抗体依存性細胞傷害性（A D C C）および／または補体依存性細胞傷害性（C D C）などのエフェクター機能を示さないことである。

【0100】

より詳細には、一つの例として、本発明の抗体、またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、F c R（I、II、もしくはIII）に対して、またはC 1 qに対して、またはその両者に対して親和性を持たない。

【0101】

10

20

30

40

50

構造的に、これは、当業者にとって、本発明の抗体、またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体の一つが、Fc部分を欠いていること、またはそれらのFc部分がエフェクター機能を付与し得る適切なグリコシル化を示さないことを意味する。

【0102】

この結果が、本発明の抗体は好ましくはIgG4またはIgG2イソ型、最も好ましくはIgG4イソ型から選択されるということである。

【0103】

同様に、好ましいフラグメントは、Fv、scFv (scは一本鎖)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fcフラグメントもしくはダイアボディ、またはポリ(エチレン)グリコール(「PEG化」)(ペグ化フラグメントはFv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG、またはFab'-PEGと呼ばれる)(「PEG」はポリ(エチレン)グリコール)などのポリ(アルキレン)グリコールの付加のような化学的修飾によって、またはリポソームへの組み込みによって半減期が延長された任意のフラグメントといった、ADCを欠いているフラグメントである。

10

【0104】

より詳細には、抗体515H7由来の本発明の好ましい機能的フラグメントはscFvであり、以下、515H7 scFv-Ckフラグメントと呼ばれ、配列番号54のアミノ酸配列を含んでなる。

【0105】

該scFvに相当するヌクレオチド配列は、配列番号55の配列を含んでなる。

20

【0106】

本発明の別の特定の面は、抗体がマウスとは異種の、特にヒトの抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域も含んでなることを特徴とする、キメラ抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0107】

本発明のさらに別の面は、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域がそれぞれまたは領域および-2または好ましくは-4領域であることを特徴とする、ヒト化抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0108】

本発明の抗体はまた、キメラ抗体またはヒト化抗体も含んでなる。

30

【0109】

キメラ抗体は、所与の種の抗体に由来する天然可変領域(軽鎖および重鎖)を、所与の種とは異種の抗体の軽鎖および重鎖の定常領域と組み合わせて含むものである。

【0110】

抗体、またはそのキメラフラグメントは、組換え遺伝子技術を用いて調製することができる。例えば、該キメラ抗体は、プロモーターと、本発明の非ヒト、特にネズミモノクローナル抗体の可変領域をコードする配列、およびヒト抗体の定常領域をコードする配列を含む組換えDNAをクローニングすることによって作製することができる。このような組換え遺伝子の一つによってコードされる本発明によるキメラ抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラであってよく、この抗体の特異性はネズミDNAに由来する可変領域によって決定され、そのイソ型はヒトDNAに由来する定常領域によって決定される。キメラ抗体の調製方法については、Verhoevenら(BioEssays, 8:74, 1988)を参照。

40

【0111】

下表3に、本発明によるキメラ抗体515H7(c515H7またはC515H7と呼ばれる)の種々な重鎖および軽鎖のアミノ酸配列をまとめる。

【0112】

【表3】

表3(表中、c = キメラ)

抗体 c515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
完全配列(シグナルペプチドなし)	cVH (G4wt)	-	56
	cVH (G4PRO)	-	57
	cVH (G2 wt)	-	58
	-	cVL-Ck	59

【0113】

この抗体c515H7重鎖配列番号56～58および軽鎖配列番号59に相当するヌクレオチド配列はそれぞれ、配列番号60～63(重鎖)および配列番号64(軽鎖)の配列に相当する。

【0114】

好ましい実施態様では、これらの重鎖配列はそれらのC末端からリシン残基が欠失されている(LonzaからのpConPlusベクター系統原株:pConPlus4K、pConPlus4PRO-K、およびpConPlus2Kに見られる)。

【0115】

さらに、G4PRO重鎖は、半抗体の形成を避けるためにヒンジ領域に突然変異を有するヒトIgG4イソ型に相当する。この突然変異は、Lonzaからの親株pConPlus4PRO-Kに見られる[Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. 「單一アミノ酸置換は、キメラマウス/ヒト(IgG4)抗体の不均質性を解消する(A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody)」. Mol Immunol. (1993);30(1):105-108]。

【0116】

より詳細には、本発明は、種々の哺乳類種に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDRを含んでなることを特徴とするキメラ抗体重鎖に関し、ここで、該CDRは、IMGTによれば、配列番号4、5、および6の配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3からなる。

【0117】

より詳細には、本発明は、種々の哺乳類種に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDRを含んでなることを特徴とするキメラ抗体軽鎖に関し、ここで、該CDRは、IMGTによれば、配列番号1、2、および3の配列をそれぞれ含んでなるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3からなる。

【0118】

より詳細には、本発明は、種々の哺乳類種に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDRをそれぞれ有する重鎖および軽鎖を含んでなることを特徴とするキメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関し、ここで、該CDRは、IMGTによれば、配列番号4、5、および6の配列をそれぞれ含んでなる重鎖のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と、配列番号1、2、および3の配列をそれぞれ含んでなる軽鎖のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3からなる。

【0119】

別の実施態様では、本発明は、配列番号8からなる配列の重鎖可変領域と、配列番号7

10

20

30

40

50

の配列の軽鎖可変領域とを含んでなるキメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0120】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号56、57、または58からなる群から選択される配列の重鎖と、配列番号59の配列の軽鎖とを含んでなるキメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0121】

好みの実施態様では、本発明によるキメラ抗体c515H7 VH(G4wt)/VL-Ck、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号56の配列の重鎖可変領域と、配列番号59の配列の軽鎖可変領域とを含んでなる。

10

【0122】

好みの実施態様では、本発明によるキメラ抗体c515H7 VH(G4PRO)/VL-Ck、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号57の配列の重鎖可変領域と、配列番号59の配列の軽鎖可変領域とを含んでなる。

【0123】

好みの実施態様では、本発明によるキメラ抗体c515H7 VH(G2wt)/VL-Ck、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号58の配列の重鎖可変領域と、配列番号59の配列の軽鎖可変領域とを含んでなる。

【0124】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト起源の抗体に由来するCDR領域を含み、その抗体分子の他の部分が一つの（または複数の）ヒト抗体に由来する抗体を意味する。さらに、骨格セグメント残基（FRと呼ばれる）のいくつかは、結合親和性を保存するように修飾することができる（Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986、Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988、Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988）。

20

【0125】

本発明のヒト化抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術（例えば、Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992、Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992、およびBebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992の文献に記載されているもの）によって調製することができる。このようなヒト化抗体は、in vitro診断またはin vivoにおける予防的および／もしくは治療的処置などの方法での使用に好み。他のヒト化技術も当業者に公知であり、例えば、欧州特許第0451261号明細書、同第0682040号明細書、同第0939127号明細書、同第0566647号明細書、または米国特許第5,530,101号明細書、同第6,180,370号明細書、同第5,585,089号明細書、および同第5,693,761号明細書においてPDLが記載している「CDRグラフト」法がある。米国特許第5,639,641号明細書または同第5,639,641号明細書または6,054,297号明細書、同第5,886,152号明細書、および同第5,877,293号明細書も引用することができる。

30

【0126】

さらに、本発明はまた、前記のネズミ抗体に由来するヒト化抗体に関する。

40

【0127】

好みの様式では、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域はそれぞれ、またはおよび-2または好みは-4領域である。

【0128】

より詳細には、本発明は、i) 対応するヒト抗体重鎖のフレームワーク領域に相同なフレームワーク領域と、ii)種々の哺乳類に由来する抗体の対応するCDRに相同なCDRとを含んでなることを特徴とするヒト化抗体重鎖に関し、ここで、該CDRは、IMGTによれば、配列番号4、5、および6の配列をそれぞれ含んでなるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3からなる。

【0129】

50

別の実施態様では、本発明は、配列番号 6 4 からなる配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体重鎖に関する。

【 0 1 3 0 】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 6 7、6 8、6 9 および 9 5 からなる群から選択される完全な配列を含んでなるヒト化抗体重鎖に関する。

【 0 1 3 1 】

より詳細には、本発明は、i) ヒト抗体軽鎖の対応するフレームワーク領域に相同なフレームワーク領域と、ii) 種々の哺乳類種に由来する抗体の対応する C D R に相同な C D R とを含んでなることを特徴とするヒト化抗体軽鎖に関し、ここで、該 C D R は、IMGTによれば、配列番号 1、2、および 3 の配列をそれぞれ含んでなる C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 からなる。10

【 0 1 3 2 】

別の実施態様では、本発明は、配列番号 6 5、6 6、8 2、または 8 3 からなる群から選択される配列の可変領域を含んでなるヒト化抗体軽鎖に関する。

【 0 1 3 3 】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 7 0、7 1、8 4、または 8 5 からなる群から選択される完全な配列を含んでなるヒト化抗体軽鎖に関する。

【 0 1 3 4 】

より詳細には、本発明は、i) ヒト抗体の対応するフレームワーク領域に相同なフレームワーク領域と、ii) 種々の哺乳類種に由来する抗体の対応する C D R に相同な C D R をそれぞれ有する重鎖および軽鎖を含んでなることを特徴とするヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関し、ここで、該 C D R は、IMGTによれば、配列番号 4、5、および 6 の配列をそれぞれ含んでなる重鎖の C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 と、配列番号 1、2、および 3 の配列をそれぞれ含んでなる軽鎖の C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 からなる。20

【 0 1 3 5 】

別の実施態様では、本発明は、配列番号 6 4 からなる配列の重鎖可変領域と、配列番号 6 5、6 6、8 2、または 8 3 からなる群から選択される配列の軽鎖可変領域とを含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【 0 1 3 6 】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 6 7、6 8、6 9 または 9 5 からなる群から選択される配列の重鎖と、配列番号 7 0、7 1、8 4 または 8 5 からなる群から選択される配列の軽鎖とを含んでなるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。30

【 0 1 3 7 】

好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 w t) / V L 2 - C k、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 7 の配列の重鎖と、配列番号 7 0 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 3 8 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 P R O) / V L 2 - C k、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 8 の配列の重鎖と、配列番号 7 0 の配列の軽鎖とを含んでなる。40

【 0 1 3 9 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 2 w t) / V L 2 - C k、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 9 の配列の重鎖と、配列番号 7 0 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 4 0 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 w t) / V L 2 . 1 - C k、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 7 の配列の重鎖と、配列番号 7 1 の配列の軽鎖とを含んでなる。50

【 0 1 4 1 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 P R O) / V L 2 . 1 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 8 の配列の重鎖と、配列番号 7 1 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 4 2 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 2 w t) / V L 2 . 1 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 9 の配列の重鎖と、配列番号 7 1 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 4 3 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 w t) / V L 2 . 2 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 7 の配列の重鎖と、配列番号 8 4 の配列の軽鎖とを含んでなる。 10

【 0 1 4 4 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 P R O) / V L 2 . 2 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 8 の配列の重鎖と、配列番号 8 4 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 4 5 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 2 w t) / V L 2 . 2 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 9 の配列の重鎖と、配列番号 8 4 の配列の軽鎖とを含んでなる。 20

【 0 1 4 6 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 w t) / V L 2 . 3 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 7 の配列重鎖と、配列番号 8 5 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 4 7 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 4 P R O) / V L 2 . 3 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 8 の配列の重鎖と、配列番号 8 5 の配列の軽鎖とを含んでなる。 30

【 0 1 4 8 】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N (G 2 w t) / V L 2 . 3 - C k 、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 6 9 の配列の重鎖と、配列番号 8 5 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【 0 1 4 9 】

下表 4 に、本発明によるヒト化抗体 5 1 5 H 7 の、それぞれ種々の重鎖および軽鎖可変ドメインおよび全長（または完全）アミノ酸配列をまとめる。

【 0 1 5 0 】

【表4】

表4 (表中、Hz = ヒト化)

抗体 Hz515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
可変ドメイン	VH1 D76N	-	64
	-	VL2	65
	-	VL2. 1	66
	-	VL2. 2	82
	-	VL2. 3	83
完全配列 (シグナルペプチ ドなし)	VH1 D76N (G4wt)	-	67
	VH1 D76N (G4PRO)	-	68
	VH1 D76N (G2 wt)	-	69
	-	VL2-Ck	70
	-	VL2. 1-Ck	71
	-	VL2. 2-Ck	84
	-	VL2. 3-Ck	85

【0151】

30

好ましい実施態様では、これらの重鎖配列はそれらのC末端からリシン残基が欠失されている(LonzaからのpConPlusベクター系統原株:pConPlus 4K、pConPlus 4 PRO K、およびpConPlus 2 Kに見られる)。

【0152】

40

さらに、G4PRO重鎖は、半抗体の形成を避けるためにヒンジ領域に突然変異を有するヒトIgG4イソ型に相当する。この突然変異は、Lonzaからの親株pConPlus 4 PRO Kに見られる[Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. 「單一アミノ酸置換は、キメラマウス/ヒト(IgG4)抗体の不均質性を解消する(A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody)」. Mol Immunol., (1993);30(1):105-108]。

【0153】

40

詳細には、本発明では、ヒトIgG4イソ型の重鎖であって、配列番号95によって表される配列を有する該重鎖を含んでなるhz515H7 IgG4と呼ばれるヒト化抗体が提供される。

【0154】

50

一例として、疑念を避けるため、「VH1」は、「VH Variant 1」、「VH variant 1」、「VH Var 1」、または「VH var 1」という表現と同様である。

【0155】

上記で例示された V H / V L の組合せに限定されないと理解すべきである。当業者は、当然のことながら、過度な負担無く、また、発明性のある技術を用いずに、本明細書で開示された V H および V L を総て再配列することができるであろう。

【 0 1 5 6 】

本発明の新規な面は、以下の核酸（縮重遺伝コードを含む）：

- a) 本発明による抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つをコードする核酸、D N A、またはR N A、
- b) 配列番号 1 4 ~ 1 9 および 4 1 ~ 4 5 からなる配列群から選択される D N A 配列を含んでなる核酸、
- c) 配列番号 2 0 、 2 1 、 4 6 、 および 4 7 からなる配列群から選択される D N A 配列を含んでなる核酸、
- d) b) または c) に定義される核酸の、対応する R N A 核酸、
- e) a) 、 b) および c) に定義される核酸の相補的核酸、および
- f) 配列番号 1 4 ~ 1 9 および 4 1 ~ 4 5 の配列の C D R の少なくとも一つと高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズすることができる少なくとも 1 8 個のヌクレオチドの核酸

から選択されることを特徴とする単離された核酸に関する。

【 0 1 5 7 】

下表 5 に、本発明の抗体に関する種々のヌクレオチド配列をまとめた。

【 0 1 5 8 】

【表5】

表5(表中、Mu. = ネズミ)

抗体	CDR ナンバ リング	重鎖	軽鎖	配列番号
515H7	IMGT		CDR-L1	14
			CDR-L2	15
			CDR-L3	16
		CDR-H1		17
		CDR-H2		18
		CDR-H3		19
	Kabat		CDR-L1	22
			CDR-L2	23
			CDR-L3	16
		CDR-H1		24
		CDR-H2		25
		CDR-H3		26
301aE5	IMGT		Mu. 可変ドメイン	20
			Mu. 可変ドメイン	21
			CDR-L1	41
			CDR-L2	15
			CDR-L3	42
		CDR-H1		43
	Kabat	CDR-H2		44
		CDR-H3		45
			CDR-L1	48
			CDR-L2	49
			CDR-L3	50
		CDR-H1		51
40		CDR-H2		52
		CDR-H3		53
			Mu. 可変ドメイン	46
		Mu. 可変ドメイン		47

【0159】

本明細書において互換的に用いられる「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、および「ヌクレオチド配列」は、非天然ヌクレオチドを含むまたは含まない、また二本鎖DNA、一本鎖DNA、またはこれらのDNAの転写産物のいずれかである核酸のフラグメントまたは領域を規定する、修飾または非修飾のヌクレオチドの正確な配列を意味する。

【0160】

ここでまた、本発明はそれらの天然の染色体環境の、すなわち天然状態の、ヌクレオチド配列には関しないということを含めておくべきである。本発明の配列は単離および/または精製されており、すなわち、それらは直接、または例えばコピーによって間接的にサ

10

20

30

40

50

ンプリングされており、それらの環境は少なくとも部分的に修飾されている。例えば宿主細胞による組換え遺伝子技術によって得られた、または化学合成によって得られた単離された核酸もここに挙げておくべきであろう。

【0161】

「最適なアライメントの後に好ましい配列と少なくとも 80%、好ましくは 85%、90%、95%、および 98% の同一性割合を示す核配列」とは、参照核配列に比べて、特に、欠失、末端切断、延長、キメラ融合、および / または置換、特に規則的なものなどの、ある種の修飾を示す核配列を意味する。好ましくは、これらは参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列であり、これは遺伝コードの縮重、または好ましくは高ストリンジエント条件、特に以下に定義される条件下で、参照配列と特異的にハイブリダイズし得る相補的配列に関連づけられる。

10

【0162】

高ストリンジエント条件下でのハイブリダイゼーションとは、温度およびイオン強度に関する条件が、二つの相補的 DNA フラグメントの間でハイブリダイゼーションの維持を可能となるように選択される。単に例として、前記のポリヌクレオチドフラグメントを定義する目的でのハイブリダイゼーション工程の高ストリンジエント条件は有利には次の通りである。

【0163】

DNA - DNA または DNA - RNA ハイブリダイゼーションは、(1) 5 × SSC (1 × SSC は、0.15M NaCl + 0.015M クエン酸ナトリウムの溶液に相当する)、50% ホルムアミド、7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、10 × デンハート溶液、5% デキストラン硫酸、および 1% サケ精子 DNA を含むリン酸バッファー (20 mM、pH 7.5) 中、42° で 3 時間のプレハイブリダイゼーション、(2) プローブの長さに応じた温度 (すなわち、プローブ > 100 ヌクレオチド長では 42°) で 20 時間の主ハイブリダイゼーションと、その後の 2 × SSC + 2% SDS 中 20° での 20 分の洗浄 2 回、0.1 × SSC + 0.1% SDS 中 20° での 20 分の洗浄 1 回という 2 段階で行う。最後の洗浄は、プローブ > 100 ヌクレオチド長では 60° で、0.1 × SSC + 0.1% SDS 中 30 分間行う。大きさの定義されたポリヌクレオチドに対する前記の高ストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、それより長いまたは短いオリゴヌクレオチドに関しては、Sambrook ら (「分子クローニング：実験室便覧 (Molecular cloning: a laboratory manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory、第3版、2001) に記載されている手順に従い、当業者によって適合させることができる。

20

【0164】

本発明はまた、以下の核酸：

- a) 本発明によるヒト化抗体重鎖、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントをコードする核酸、DNA、または RNA、
- b) 本発明によるヒト化抗体軽鎖、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントをコードする核酸、DNA、または RNA、
- c) 本発明によるヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメンをコードする核酸、DNA、または RNA、

30

d) a)、b)、または c) に定義される核酸と相補的な核酸、

e) 高ストリンジエント条件下で配列番号 72 または 75 ~ 77 の核酸配列を含んでなる少なくとも重鎖とハイブリダイズすることができる少なくとも 18 個のヌクレオチドの核酸、

40

f) 高ストリンジエント条件下で配列番号 73、74、86、87、または 78、79、88、89 の核酸配列を含んでなる少なくとも軽鎖と、ハイブリダイズすることができる少なくとも 18 個のヌクレオチドの核酸、

の中から選択されることを特徴とする、単離された核酸分子を包含する。

【0165】

下表 6 に、本発明によるヒト化抗体 515H7 のそれぞれ種々の重鎖および軽鎖可変ド

50

メインおよび全長（または完全）のヌクレオチド配列をまとめる。

【0166】

【表6】

表6 (表中、Hz = ヒト化)

抗体 Hz515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
可変ドメイン	VH1 D76N	-	72
	-	VL2	73
	-	VL2. 1	74
	-	VL2. 2	86
	-	VL2. 3	87
完全配列 (シグナルペプチ ドなし)	VH1 D76N (G4wt)	-	75
	VH1 D76N (G4PRO)	-	76
	VH1 D76N (G2 wt)	-	77
	-	VL2-Ck	78
	-	VL2. 1-Ck	79
	-	VL2. 2-Ck	88
	-	VL2. 3-Ck	89

10

20

30

【0167】

下表7に、本発明によるキメラ抗体515H7の種々の重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列をまとめる。

【0168】

【表7】

表7 (表中、c = キメラ)

抗体 c515H7	重鎖	軽鎖	配列番号
完全配列 (シグナ ルペプチドなし)	cVH (G4wt)	-	60
	cVH (G4PRO)	-	61
	cVH (G2 wt)	-	62
	-	cVL-Ck	63

40

【0169】

言い換えれば、本発明は、以下の核酸：

a) 本発明による抗体、またはその一つの機能的フラグメントもしくは誘導体をコードす

50

る核酸、DNA、またはRNA、

b) 配列番号14～19および41～45からなるCDR配列群から選択されるDNA配列を含んでなる核酸、

c) 配列番号20、21、46、47、72、73、74、86、および87からなる重鎖および軽鎖可変ドメイン配列群から選択されるDNA配列を含んでなる核酸、

d) 配列番号60～63、75～79、88、89および94からなる重鎖および軽鎖配列群から選択されるDNA配列を含んでなる核酸、

e) 配列番号55からなるDNA配列を含んでなる核酸、

f) b)、c)、d)、またはe)に定義される核酸の対応するRNA核酸、

g) a)、b)、c)、d)、およびe)に定義される核酸の相補的核酸、および

h) 高ストリンジエンシー条件下で配列番号14～19および41～45の配列のCDRの少なくとも一つとハイブリダイズすることができる少なくとも18個のヌクレオチドの核酸

から選択されることを特徴とする、単離された核酸を取り扱う。

【0170】

本発明はまた、本明細書に記載される核酸を含んでなるベクターに関する。

【0171】

本発明は特に、このようなヌクレオチド配列を含むクローニングおよび/または発現ベクターを対象とする。

【0172】

本発明のベクターは、好ましくは、所与の宿主細胞においてヌクレオチド配列の発現および/または分泌を可能とするエレメントを含む。よって、このベクターは、プロモーター、翻訳開始および終結シグナル、ならびに好適な転写調節領域を含まなければならない。ベクターは宿主細胞において安定な様式で維持可能でなければならず、必要に応じて、翻訳されたタンパク質の分泌を条件として指定する特異的シグナルを有してもよい。これらの種々のエレメントは、使用する宿主細胞に応じて、当業者により選択され、至適化される。この目的で、これらのヌクレオチド配列は、選択された宿主内で自己複製するベクターに挿入することもできるし、または選択された宿主の組込型ベクターであってよい。

【0173】

このようなベクターは、当業者により一般に用いられる方法によって調製され、得られたクローンは、リポフェクション、エレクトロポレーション、熱ショック、また化学的方法などの標準的な方法によって好適な宿主に導入することができる。

【0174】

これらのベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス起源のベクターである。それらを用いて、本発明のヌクレオチド配列をクローニングする、または発現させるために宿主細胞を形質転換することができる。

【0175】

本発明はまた、本発明に記載されているベクターにより形質転換された、または本発明に記載されているベクターを含んでなる宿主細胞も含んでなる。

【0176】

宿主細胞は、例えば、細菌細胞だけでなく、酵母細胞または動物細胞、特に哺乳類細胞などの原核細胞または真核細胞系から選択することができる。昆虫または植物細胞を、用いることができる。

【0177】

本発明はまた、本発明による形質転換細胞を有するヒト以外の動物に関する。

【0178】

本発明の別の面は、本発明による抗体、またはその一つの機能的フラグメントの生産方法であって、以下の工程を含んでなることを特徴とする方法に関する：

a) 本発明による宿主細胞の培地および好適な培養条件での培養工程、および

10

20

30

40

50

b) このようにして該培養培地または該培養細胞から生産された、該抗体、またはその一つの機能的フラグメントの回収工程。

【0179】

本発明による形質転換細胞は、本発明による組換えポリペプチドの調製方法に用いられる。また、本発明によるベクターおよび／またはベクターによって形質転換された細胞を使用することを特徴とする、本発明によるポリペプチドの組換え型での調製方法も本発明に含まれる。好ましくは、本発明によるベクターによって形質転換された細胞は、前記のポリペプチドの発現および該組換えペプチドの回収を可能とする条件下で培養される。

【0180】

すでに述べたように、宿主細胞は原核生物系または真核生物系の中から選択することができる。特に、このような原核生物系または真核生物系において分泌を助ける本発明のヌクレオチド配列を同定することが可能である。よって、このような配列を有する本発明によるベクターは、分泌させる組換えタンパク質の生産のために有利に使用することができる。実際、これらの着目する組換えタンパク質の精製は、宿主細胞内ではなく細胞培養の上清に存在するということによって容易となる。

【0181】

本発明のポリペプチドはまた、化学合成によっても調製することができる。このような調製方法の一つも本発明の目的である。当業者は、フラグメントの縮合または溶液中での従来の合成による固相技術（特に、Steward et al., 1984, 「固相ペプチド合成(Solid phase peptides synthesis)」, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 第2版参照）または部分固相技術などの化学合成法を知っている。化学合成によって得られ、対応する非天然アミノ酸を含み得るポリペプチドもまた、本発明に含まれる。

【0182】

本発明の方法によって得られる可能性のある抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントも本発明に含まれる。

【0183】

さらに別の面によれば、本発明は、ヒトケモカインファミリー受容体と特異的に結合することができ、および／またはX4指向性HIV複製を特異的に阻害することができることをさらに特徴とする、前記のような抗体に関する。

【0184】

さらに別の面によれば、本発明は、ヒトケモカインファミリー受容体と特異的に結合することができ、および／またはX4/R5指向性HIV複製を特異的に阻害することができることを特徴とする、前記のような抗体に関する。

【0185】

新規な実施態様によれば、本発明は、例えば、CCR5、CD4、CXCR4（本発明の抗体以外の、すなわち、別のエピトープを標的とする）またはCCR3、CCR2、CCR8、CXCR6、CXCR7、CX3CR1などのHIVの細胞侵入に関する受容体と相互作用することができる第二のモチーフを含んでなるという意味で二重特異性である抗体からなる抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0186】

二重特異性または二官能性抗体は、二つの異なる可変領域が同じ分子において組み合わされている第二世代のモノクローナル抗体を構成する(Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419)。それらの有用性は、細胞表面のいくつかの分子を標的とするそれらの能力に関して診断用ドメインおよび治療用ドメインの両者で実証されており、このような抗体は化学的方法(Glennie MJ et al., 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375、Repp R. et al., 1995, J. Hemat., 377-382)または体細胞法(Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457、Suresh M.R. et al., 1986, Method Enzymol., 121:210-228)によるだけでなく、優先的には、求める抗体にヘテロ二量体形成を課し、従ってその抗体の精製を容易にすることを可能とする遺伝子操作技術(Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681)によって得ることができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

これらの二重特異性抗体は、完全な Ig G、二重特異性 Fab' 2、Fab' PEG、ダイアボディ、または二重特異性 scFv として構築できるだけではなく、標的とされる各抗原に対して二つの結合部位が存在する四価二重特異性抗体(Park et al, 2000, Mol Immunol., 37(18):1123-30)または前記のようなそのフラグメントとしても構築できる。

【 0 1 8 8 】

一つの二重特異性抗体の製造および投与が、二つの特異的抗体の製造よりも安くつくことを考えた場合の経済的利点に加え、このような二重特異性抗体の使用は処置の毒性を軽減するという利点も持つ。実際、二重特異性抗体を使用すると、循環する抗体の総量を減らすことができ、結果として毒性が軽減される。

10

【 0 1 8 9 】

本発明の好ましい実施態様においては、二重特異性抗体は二価または四価抗体である。

【 0 1 9 0 】

最後に、本発明は、薬剤としての前記の抗体、またはそれらの機能的フラグメントもしくは誘導体の一つに関する。

【 0 1 9 1 】

本発明はまた、本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つからなる化合物を有効成分として含んでなる医薬組成物に関する。好ましくは、該抗体は賦形剤および/または薬学上許容可能な担体を追加する。

【 0 1 9 2 】

20

本発明はまた、薬剤としての前記のような組成物に関する。

【 0 1 9 3 】

本発明の特定の面では、抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つは、PBMC における HIV - 1 KON 一次単離物の複製を、少なくとも 5 μg / ml、好ましくは少なくとも 10 μg / ml の IC₅₀ で阻害する。

【 0 1 9 4 】

本発明はまた、HIV 感染の予防または治療のための薬物および/または薬剤の製造のための本発明による抗体または組成物の使用を含んでなる。

【 0 1 9 5 】

より詳細には、限定されるものではないが、該 HIV 感染は X4 指向性 HIV 感染である。

30

【 0 1 9 6 】

別の実施態様では、限定されるものではないが、該 HIV 感染は X4 / R5 指向性 HIV 感染である。

【 0 1 9 7 】

本発明はまた、HIV 複製を阻害するための薬物の製造のための、本発明による抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体、好ましくは、ヒト化されたもの、および/または組成物の使用に関する。一般に、本発明は、HIV 疾患の予防または治療のための薬物の製造のための、抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体、好ましくは、ヒト化されたもの、および/または組成物の使用に関する。

40

【 0 1 9 8 】

本明細書において、「医薬ビヒクル」とは、二次反応を引き起こさず、かつ、例えば、有効化合物の投与を容易にするか、生物内でのその寿命を延長し、および/または有効性を高めるか、溶液中でのその溶解度を高めるか、またはその貯蔵性を高める化合物、または化合物の組合せ（医薬組成物を含む）を意味する。このような医薬担体は周知であり、当業者により、選択される有効化合物の性質および投与経路に応じて適合される。

【 0 1 9 9 】

好ましくは、このような化合物は、全身経路、特に、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、腹腔内経路、皮下経路、腔内経路、または経口経路によって投与される。より好ましくは、本発明による抗体から構成される組成物は、一定時間あけた数回の投与で投与され

50

る。

【0200】

それらの投与経路、投与計画および最適な剤形は、例えば、患者の年齢または体重、患者の健康状態の重篤度、患者の処置に対する耐性および受ける副作用など、患者に適合する処置を確立する際に一般に考慮される基準に従って決定することができる。

【0201】

本発明はまた、同時、個別または延長様式で用いるための組合せ物として、CXCR4に対する抗体以外の抗HIV抗体または抗HIV細胞侵入抗体または抗HIV複製抗体をさらに含んでなる組成物に関する。

【0202】

さらに別の実施態様によれば、本発明はまた、本発明に記載されているもの以外の抗CCR5、抗CD4化合物、および抗CXCR4化合物などの、HIVの侵入および/または複製を特異的に阻害することができる化合物、または当業者に知られている他のいずれかの抗HIV化合物の中から選択される少なくとも一つの第二の抗HIV化合物を含んでなる前記のような医薬組成物に関する。

【0203】

本発明の補足的な別の実施態様は、同時、個別、または延長使用のための組合せまたは複合物として、抗HIV化合物をさらに含んでなる前記のような組成物からなる。

【0204】

「同時使用」とは、単一の投与形に含まれる組成物に含まれる両化合物を投与することを意味する。

【0205】

「個別使用」とは、異なる投与形に含まれる組成物の両化合物を同時に投与することを意味する。

【0206】

「延長使用」とは、異なる投与形にそれぞれ含まれる組成物の両化合物の連続的投与を意味する。

【0207】

一般に、本発明による組成物は、HIV処置の有効性を著しく高める。言い換えれば、本発明の抗体の治療効果は、抗HIV剤の投与によって予期されないほど増強される。本発明の組成物によってもたらされる別の大きな二次的利点は、有効成分のより低量の有効用量を使用できる可能性に関し、従って、特に抗HIV剤の作用である副作用の出現の危険を回避または軽減することが可能となる。さらに、この組成物は、予想される治療効果をより迅速に達成することを可能とする。

【0208】

「治療用抗HIV剤」とは、患者に投与した際に、患者におけるHIVの複製を治療または予防する物質を意味する。このような薬剤の限定されない例としては、HIVプロテアーゼ阻害剤(PI)、ヌクレオシド/ヌクレオチドHIV逆転写酵素阻害剤(NRTI/NtRTI)、非ヌクレオシドHIV逆転写酵素阻害剤(NNRTI)、HIV侵入阻害剤、HIVインテグラーゼ阻害剤などの「抗レトロウイルス剤」が挙げられる。

【0209】

このような薬剤は、例えば、VIDALの「抗HIV化合物」に関する化合物に向けられた頁に挙げられており、この文献の参照文献によって挙げられている抗HIV化合物は、本明細書において、限定的されない好ましい抗HIV剤として挙げられる。

【0210】

HIVプロテアーゼ阻害剤は、HIVプロテアーゼ活性を阻害することができるいずれの物質も表す。このようなHIVプロテアーゼ阻害剤の例としては、限定されるものではないが、サキナビルメシレートまたはSQV(Invirase(商標))、インジナビルまたはIDV(Crixivan(商標))、リトナビルまたはRTV(Norvir(商標))、ネルフィナビルまたはNFV(Viracept(商標))、アンプレナビル(Agenerase(商標))、Prozei

10

20

30

40

50

(商標))、ロピナビル / リトナビルまたは L P V / r (Kaletra (商標) 、Aluvia (商標))、アタザナビルまたは A T V (Reyataz (商標) 、Zrivada (商標))、ホスアンプレナビルまたは F P V (Lexiva (商標) 、Telzir (商標))、チプラナビルまたは T P V (Aptivus (商標))、ダルナビルまたは D R V (Prezista (商標))が挙げられる。

【0211】

H I V ヌクレオシドまたはヌクレオチド逆転写酵素阻害剤 (N R T I)は、H I V RNA の逆転写を遮断するヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体である物質を表す。N R T I の例としては、限定されるものではないが、ジドブジンまたは A Z T 、Z D V (Retrovir/combivir/trixivir (商標))、ジダノシンまたは d d i (Videx (商標))、ザルシタビン (Hivid (商標))、スタブジンまたは d 4 T (Zerit (商標))、ラミブジンまたは 3 T C (Epivir/combivir/epzicom/trixivir (商標))、アバカビルまたは A B C (Ziagen/trixivir/epzicom (商標))、フマル酸テノホビルジソプロキシリルまたは T D F (Viread/atripla/truvada (商標))、エムトリシタビンまたは F T C (Emtriva/atripla/truvada (商標))が挙げられる。

【0212】

非ヌクレオシド H I V 逆転写酵素阻害剤 (N N R T I)は、H I V RNA の逆転写を遮断するヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体ではない物質を表す。N N R T I の例としては、限定されるものではないが、ネビラピンまたは N V P (Viramune (商標))、エファビレンツまたは E F V (Sustiva/atripla (商標) 、Stocrin (商標))、デラビルジンまたは D L V (Rescriptor (商標))、およびエトラビリンまたは E T R (Intelence (商標))が挙げられる。

【0213】

H I V 侵入阻害剤は、H I V の細胞侵入を遮断する物質を表す。H I V 侵入阻害剤の例としては、限定されるものではないが、エンフビルチドまたは T 2 0 (Fuzeon (商標))、マラビロクまたは M V C (Celsentri (商標) 、Celzentry (商標))が挙げられる。

【0214】

H I V インテグラーゼ阻害剤は、H I V インテグラーゼ活性を阻害する物質を表す。インテグラーゼ阻害剤の例としては、限定されるものではないが、ラルテグラビルまたは R A L (Isentress (商標))が挙げられる。

【0215】

このような剤はまた、例えば、限定されるものではないが、ビクリビロク、P R O 1 4 0 、T N X - 3 5 5 、A M D 0 7 0 、ラシビル、アプリシタビン、エルブシタビン、フロサルブジン (Flosalvudine) 、リルピビリン、エルビテグラビルなど、現在臨床試験中の、V I D A L に記載されている同種の薬物に属する化合物である。

【0216】

このような剤はまた、例えば、限定されるものではないが、成熟阻害剤 (ベビリマット) 、-ガラクトシリル-セラミドのグリコシド類似体、炭水化物結合剤、R N アーゼ H 阻害剤、H I V 遺伝子発現阻害剤、潜伏型 T 細胞からの H I V 放出の刺激剤 (バルプロ酸など) など、他の可能性のある種の薬物に属する化合物である。

【0217】

特に好ましい実施態様においては、組合せ物としての本発明の組成物は、前記抗 H I V 剤が同時使用のための前記抗体に化学的に結合されていることを特徴とする。

【0218】

前記抗 H I V 剤と本発明による抗体の間の結合を容易にするために、結合する二つの化合物の間にポリ (アルキレン) グリコール、ポリエチレングリコール、またはアミノ酸などのスペーサー分子を導入することができ、あるいは、別の実施態様においては、前記抗体と反応することができる官能基が導入されている前記抗 H I V 剤の活性誘導体を使用することもできる。これらの結合技術は当業者によく知られており、本明細書ではこれ以上詳細には述べない。

【0219】

10

20

30

40

50

また、好ましくは、前記の複合体を形成する本発明の抗体は、その機能的フラグメント、特に、それらのF c成分を欠失したフラグメント、例えばscF vフラグメントの中から選択される。

【0220】

本発明はまた、薬物として用いられる、本発明による、組合せ物としての組成物、または抗CXCR4 Mab / 抗HIV薬物複合体に関する。

【0221】

好ましくは、組合せ物としての前記組成物または前記複合体には、賦形剤および/または医薬ビヒクリルが添加されうる。

【0222】

よって、本発明は、HIV複製に対して生物的に活性な化合物の特異的標的化のための薬物の製造のための、抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つの使用に関する。

【0223】

別の実施態様では、本発明はまた、HIV予防または治療の方法であって、予防または治療を必要とする患者に本発明による抗体、またはその抗原結合フラグメントまたは誘導体の一つおよび/または組成物を投与することからなる工程を含んでなる、方法に関する。

【0224】

より詳細には、本発明による方法はまた、前記患者にマラビロクのような抗CCR5化合物を投与することからなる工程を含んでなる。

【0225】

従前に示したように、CXCR4 Mab 515H7および301aE5は、PBM CにおけるHIV-1複製に対して強い活性を有し、従って、このような抗体は、HIV-1感染を処置するためのCXCR4アンタゴニスト抗ウイルス剤の同定のためのスクリーニングアッセイに使用することができる。これらのアッセイの第一の工程では、CXCR4を発現する細胞をMab 515H7および/または301aE5とともにインキュベートし、その後、Mab 515H7および/または301aE5との結合を阻害するための可能性について分子を評価することができる。この種のアッセイで用いられる細胞は、CHO-CXCR4、NIH3T3-CXCR4またはCXCR4トランスフェクトヒト細胞系統（例えば、U373-MAGI-CXCR4）などのトランスフェクト細胞系統、NALM6などのCXCR4を発現するヒト細胞系統またはPBM Cなどの初代細胞であり得る。CXCR4発現細胞に対するMab 515H7および/または301aE5の結合を阻害するCXCR4のアンタゴニストをスクリーニングするために使用される方法は、Zhao Q.ら(AIDS Research And Human Retroviruses, 2003, 19, pp947-955)によって記載されている細胞に基づく競合的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)またはJuarez J.ら(Leukemia 2003, 17, pp1294-1300)によって記載されている蛍光活性化細胞選別法(FACS)を用いるプロトコールであり得る。

【0226】

よって、本発明の特定の面では、CXCR4アンタゴニスト抗ウイルス剤としての分子をスクリーニングおよび/または同定する方法であって、以下の工程を含んでなる方法が考えられる：

- a) CXCR4を発現する細胞を選択する工程、
- b) 該細胞を、本発明の抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つとともにインキュベートする工程、
- c) 抗体、またはその機能的フラグメントもしくは誘導体の一つと、CXCR4との間の結合の潜在的な阻害のための供試分子を評価する工程、および
- d) 該阻害が可能な分子を選択する工程。

【0227】

別の特定の実施態様では、以下のe)工程を追加することができる：

10

20

30

40

50

e) これらの分子を H I V - 1 複製アッセイで試験する工程。

【 0 2 2 8 】

本発明の他の特徴および利点は、実施例および図面（凡例は下記に示される）とともに説明を読めばさらに明らかになる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 2 9 】

【 図 1 】 図 1 A および 1 B は、単球およびリンパ球における CXCR4 発現のゲーティング戦略を示す図である。 図 1 A : CD3 - PE 抗体による T 細胞の染色 図 1 B : CD14 - PE 抗体による単球の染色

【 図 2 】 図 2 A および 2 B は、単球および T リンパ球における抗 CXCR4 Mab 515H7 および 301aE5 の結合を示す図である。 10

【 図 3 】 図 3 A および 3 B は、HEK293 細胞における生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) アプローチによる、それぞれ SDF-1 ならびに抗 CXCR4 Mab 515H7 および 301aE5 による CXCR4 受容体二量体の調節を示す図である。

【 図 4 】 図 4 A および 4 B および図 5 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 および 301aE5 の、ヒト P B M C における H I V - 1 单離物 K O N (X 4 ウイルス) の複製を阻害する能力を示す図である。 20

【 図 5 】 図 4 A および 4 B および図 5 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 の、ヒト P B M C における H I V - 1 单離物 K O N (X 4 ウイルス) の複製を阻害する能力を示す図である。

【 図 6 】 図 6 A 、 6 B および 6 C は、CHO - CXCR4 細胞における SDF - 1 により誘発されたカルシウム放出の、Mab 515H7 (図 6 A) 、 301aE5 (図 6 B) および c515H7 (図 6 C) による阻害を示す図である。

【 図 7 】 図 7 および図 8 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 の、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルス一次单離物 MN (図 7) および 92UG024 (図 8) の複製を阻害する能力を示す図である。 30

【 図 8 】 図 7 および図 8 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 の、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルス一次单離物 MN (国 7) および 92UG024 (国 8) の複製を阻害する能力を示す図である。

【 国 9 】 国 9 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 の、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルス一次单離物 K O N 、 MN 、および 92UG024 の複製を阻害する能力を示す図である。 30

【 国 10 】 国 10 および国 11 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 の、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 / R 5 二重ウイルス一次单離物 89.6 の複製を阻害する能力を示す図である。

【 国 11 】 国 10 および国 11 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 の、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 / R 5 二重ウイルス一次单離物 89.6 の複製を阻害する能力を示す図である。

【 国 12 】 国 12 は、Mab c515H7 とマラビロクの組合せの、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 89.6 (X 4 / R 5 二重ウイルス) の複製を阻害する有益な効果を示す図である。 40

【 国 13 】 国 13 は、Mab c515H7 とマラビロクの組合せの、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 UG93067 (X 4 / R 5 二重ウイルス) の複製を阻害する有益な効果を示す図である。

【 国 14 】 国 14 は、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 の、P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルス一次单離物 K O N の複製を阻害する能力を示す図である。

【 国 15 】 国 15 は、FACS 分析による c515H7 Mab の結合特異性を示す図である。

【 国 16 】 国 16 は、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) アプローチによる、CX

20

30

40

50

C R 4 ホモ二量体に対する c 5 1 5 H 7 M a b の効果を示す図である。

【図 17】図 17 は、5 1 5 H 7 重鎖可変ドメインとヒト生殖細胞系 I G H V 3 - 4 9 * 0 4 および I G H J 4 * 0 1とのアミノ酸配列アライメント。5 1 5 H 7 V H アミノ酸配列は、選択されたヒト受容体フレームワーク配列とアライメントされている。V H V a r 1 (V H 1) 配列は、5 1 5 H 7 V H ドメインのヒト化変異体に相当する。7 6 番の位置の単一の逆突然変異が太字で示されている。

【図 18】図 18 は、5 1 5 H 7 軽鎖と、ヒト生殖細胞系 I G K V 4 - 1 * 0 1 および I G K J 1 * 0 1とのアミノ酸配列アライメント。5 1 5 H 7 V L アミノ酸配列が、選択されたヒト受容体フレームワーク配列とアライメントされている。V L V a r 2 . 1 、 V a r 2 . 2 、および V a r 2 . 3 配列は、ヒト化 5 1 5 H 7 V L V a r 2 の実行されたヒト化変異体に相当する(変異残基を太字で示す)。V a r 2 . 1 および V a r 2 . 2 はさらに四つのヒト化残基を持ち、V a r 2 . 3 はさらに五つのヒト残基を含む。

【図 19】図 19 は、キメラ 5 1 5 H 7 およびヒト化 5 1 5 H 7 の種々の変異体による、ビオチン化ネズミ抗体 5 1 5 H 7 の交差遮断。5 1 5 H 7 のヒト化変異体(h z 5 1 5 H 7)の、親ネズミ抗体 5 1 5 H 7 を交差遮断する活性を、C X C R 4 トランスフェクト N I H 3 T 3 細胞を用いたフローサイトメトリーによって評価した。ヒト化変異体の活性をキメラ 5 1 5 H 7 と比較した。キメラ V L (c V L)と組み合わせた変異体 V H 1 の交差遮断活性は、キメラ(A)の場合と極めてよく似ていた。V L の変異体 2 と組合せた場合(B)には、V H 変異体 1 (V H 1 、逆突然変異の無い変異体)の活性の低下は見られなかつた。

【図 20】図 20 は、キメラ 5 1 5 H 7 およびヒト化 5 1 5 H 7 の種々の変異体による、ビオチン化 S D F - 1 結合の阻害。5 1 5 H 7 のヒト化変異体(h z 5 1 5 H 7)の、S D F - 1 結合を阻害する能力を、細胞系統 R A M O S を用いたフローサイトメトリーによって評価した。ヒト化変異体の阻害能をキメラ 5 1 5 H 7 と比較した。ヒト化変異体 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 は、キメラ抗体と同等の S D F - 1 結合阻害能を有する。ヒト化抗体フラグメント h z 5 1 5 V H 1 V L 2 は、R A M O S 細胞に対する S D F - 1 の結合阻害に完全な活性を示した。

【図 21】図 21 は、N I H 3 T 3 - C X C R 4 において C X C R 4 と特異的に結合するヒト化 5 1 5 H 7 M a b (h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 1 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 2 、および h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 3)を示す図である。

【図 22】図 22 は、生物発光共鳴エネルギー移動(B R E T)アプローチによる、C X C R 4 ホモ二量体に対するヒト化 5 1 5 H 7 M a b (h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 1 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 2 および h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 3)の効果を示す図である。

【図 23】図 23 は、抗 C X C R 4 M a b h z 5 1 5 H 7 の、M T - 4 細胞において X 4 H I V - 1 I I I B によって誘導される細胞病原性を阻害する能力を示す図である。

【図 24】図 24 は、抗 C X C R 4 M a b h z 5 1 5 H 7 の、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルス一次单離物 K O N の複製を阻害する能力を示す図である。

【図 25】図 25 は、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 8 9 . 6 (二重ウイルス X 4 / R 5)の複製を阻害するための M a b h z 5 1 5 H 7 とマラビロクの組合せの有利な効果を示す図である。

【図 26】図 26 は、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 U G 9 3 0 6 7 (二重ウイルス X 4 / R 5)の複製を阻害するための M a b h z 5 1 5 H 7 とマラビロクの組合せの有利な効果を示す図である。

【図 27】図 27 は、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルスの一次单離物 K O N の複製を阻害するための抗 C X C R 4 M a b h z 5 1 5 H 7 I g G 4 の能力を示す図である。

【図 28】図 28 は、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 8 9 . 6 (二重ウイル

10

20

30

40

50

ス X 4 / R 5) の複製を阻害するための M a b h z 5 1 5 H 7 I g G 4 とマラビロクの組合せの有利な効果を示す図である。

【実施例】

【0230】

実施例 1 : ヒト C X C R 4 に対するモノクローナル抗体 (M a b) の作製

C X C R 4 に対するモノクローナル抗体を作製するため、 B a l b / c マウスに組換え N I H 3 T 3 - C X C R 4 細胞および / または C X C R 4 細胞外 N 末端およびループに相当するペプチドを感作させた。 6 ~ 1 6 週齢のマウスに、完全フロイントアジュバントにて抗原を 1 回、皮下 (s . c .) 感作させた後、フロイントの不完全アジュバントにて抗原を 2 ~ 6 回 s . c . 感作させた。免疫応答を眼窩後方採血によって測定した。血清を E L I S A によりスクリーニングし (下記の通り) 、抗 C X C R 4 抗体力価が高いマウスを融合に用いた。屠殺および脾臓摘出の 2 日前にマウスの静脈内に抗原を追加投与した。

10

【0231】

E L I S A

抗 C X C R 4 抗体を産生するマウスを選択するため、免疫マウスからの血清を E L I S A によって調べた。要するに、マイクロタイタープレートを、 B S A と結合された精製 [1 - 4 1] N 末端ペプチドで 5 μ g 相当量のペプチド / m L 、 1 0 0 μ L / ウェルにてコーティングし、 4 °C での一晩インキュベートした後、 P B S 中 0 . 5 % ゼラチン 2 5 0 μ L / ウェルでブロックした。 C X C R 4 免疫マウスからの血漿希釈液を各ウェルに加え、 3 7 °C で 2 時間インキュベートした。これらのプレートを P B S で洗浄した後、 H R P (Jackson Laboratories) と結合されたヤギ抗マウス I g G 抗体とともに 3 7 °C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、プレートを T M B 基質で現像し、 5 分後に 1 0 0 μ L / ウェルの 1 M H₂SO₄ を加えることによって反応を停止させた。最高力価の抗 C X C R 4 抗体を生じたマウスを抗体作製に用いた。

20

【0232】

C X C R 4 に対する M a b を産生するハイブリドーマの作製

最高力価の抗 C X C R 4 抗体を生じた B a l b / c マウスから単離したマウス脾細胞を、 P E G を用いてマウス骨髄腫細胞系統 S p 2 / O と融合させた。細胞をマイクロタイタープレートによよそ 1 × 1 0⁵ / ウェルで播種した後、ウルトラカルチャー培地 + 2 m M L - グルタミン + 1 m M ピルビン酸ナトリウム + 1 × H A T を含有する選択培地で 2 週間インキュベートした。次に、ウェルを E L I S A によって、抗 C X C R 4 モノクローナル I g G 抗体に関してスクリーニングした。その後、抗体を分泌するハイブリドーマを制限希釈により少なくとも 2 回サブクローニングし、 in vitro で培養し、さらなる分析のための抗体を作製した。

30

【0233】

実施例 2 : F A C S 分析による抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 結合特異性 (N I H 3 T 3 - C X C R 4 形質転換体) の特性決定

この実験では、抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 のヒト C X C R 4 (h C X C R 4) への特異的結合を F A C S 分析によって調べた。 N I H 3 T 3 および N I H 3 T 3 - h C X C R 4 トランスフェクト細胞を、 1 0 μ g / m L のモノクローナル抗体 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 とともにインキュベートした。その後、これらの細胞を 1 % B S A / P B S / 0 . 0 1 % N a N₃ で洗浄した。次に、 A l e x a 標識された二次抗体をこれらの細胞に加え、 4 °C で 2 0 分間インキュベートした。その後、細胞を再び 2 回洗浄した。 2 回目の洗浄後、 F A C S 分析を行った。これらの結合試験の結果を、 [F A C S によって得られた平均蛍光強度 (M F I)] を示す下表 8 に示す。抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 はヒト C X C R 4 - N I H 3 T 3 トランスフェクト細胞系と特異的に結合するが、親 N I H 3 T 3 細胞に対する認識は見られなかった。

40

【0234】

【表8】

表8

	NIH3T3 (MFI)	NIH3T3-CXCR4 (MFI)
クローン 515H7 (10 μg/ml)	16	2752
クローン 301aE5 (10 μg/ml)	21	1367

10

【0235】

実施例3：FACS分析による末梢血単核細胞（PBMC）に対する抗CXCR4 Ma
b 515H7および301aE5の結合の特性決定

健康なドナーから血液をバフィーコートとして採取した。100 μlの全血を、示された濃度の抗ヒトCXCR4抗体（クローン515H7および301aE5）とともに4で20分間インキュベートした。血液をPBS-BSA 1% - NaN₃ 0.01% 中で3回洗浄し、1:500希釈のヤギ抗ヒトAlexa 488 IgG (Invitrogen)とともに4で20分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、CD14 - PE (Caltag)またはCD3 - PE (Caltag)とともに4で10分間インキュベートし、3回洗浄した。赤血球をHigh-Yield溶解液(Caltag)で室温にて10分間溶解させた。すぐにFacscalibur (Becton-Dickinson)を用いて細胞を分析した。単球でのCXCR4発現はCD14陽性細胞で行い、T細胞でのCXCR4発現はCD3陽性細胞で行った（図1）。結果は抗原結合能（ABC）で表す。

20

【0236】

図2Aおよび2Bに示されるように、抗ヒトCXCR4クローン515H7および301aE5はTリンパ球（図2A）および単球（図2B）の両者を染色したが、このことは、515H7および301aE5 Ma bが単球およびTリンパ球の細胞表面で発現された天然型のCXCR4を認識可能であることを示している。

30

【0237】

実施例4：生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）アプローチによるCXCR4ホモ二量体に対する515H7および301aE5 Ma bの効果

この機能的アッセイは、SDF-1および/または515H7 Ma bがCXCR4受容体に結合した際に誘発されるコンフォメーション変化をCXCR4ホモ二量体のレベルで評価することができる。

40

【0238】

検討する相互作用相手の発現ベクターを、従来の分子生物学的技術を適用することにより、対応する色素（ウミシイタケ(Renilla reniformis)ルシフェラーゼRlucおよび黄色蛍光タンパク質YFP）との融合タンパク質として構築した。BRET試験を行う2日前に、HEK293細胞を、対応するBRET相手：[CXCR4 / Rluc + CXCR4 / YFP]をコードする発現ベクターで一時的にトランスフェクトし、CXCR4ホモ二量体形成を調べた。翌日、細胞を、ポリリシンをプレコーティングした白色96 MWプレートの完全培養培地[10% FBSを添加したDMEM]に分注した。まず、細胞をプレートに接着させるために、CO₂ 5%、37°で培養した。その後、200 μl DME M / ウェルで一晩、細胞を飢餓状態にした。BRET試験の直前に、DMEMを除去し、細胞を手早くPBSで洗浄した。その後、細胞をPBS中、抗体の存在下または非存在下、37°にて10分間インキュベートした後、最終量50 μl中、SDF-1 300 nMとともに、または伴わずにコエレンテラジンH 5 μMを添加した。37°でさらに10分間インキュベートした後、Mithras LB940マルチラベルリーダー(Bert hold) (1 s / 波長 / ウェル、室温で15反復) を用い、485 nmおよび530 nmで

50

の発光獲得を誘導した。

【0239】

BRET比の計算は従前に記載されているように行った(Angersら、2000)：[(発光_{530 nm}) - (発光_{485 nm}) × C_f] / (発光_{485 nm})、式中、C_f = 同じ試験条件下で R1uc 融合タンパク質単独を発現する細胞の (発光_{530 nm}) / (発光_{485 nm})。この式を簡単にすると、BRET比が、二つのBRET相手が存在する場合に得られる 530 / 485 nm 比を、同じ試験条件下で、R1uc と融合された相手だけがアッセイ中に存在する場合に得られる 530 / 485 nm 比により補正したものに相当することが示される。読み取りやすいように、結果はミリBRET単位 (mBU) で表すが、mBU は BRET 比に 1000 を掛けたものである。10

【0240】

SDF1 (300 nM) は、CXCR4 受容体と融合されたアダプタータンパク質とアクセプタータンパク質が空間的に近接していることから生じる BRET シグナルを約 20 % 増強したが、それはおそらく CXCR4 / CXCR4 ホモ二量体形成または既存の二量体のコンフォメーション変化を示唆する(図 3A および B)。515H7 および 301aE5 Mab は、CXCR4 ホモ二量体に関して SDF-1 により誘発されるコンフォメーション変化を調節することができた(515H7 および 301aE5 に関して、SDF-1 により誘発される BRET 増強の 69 % 阻害、図 3A および B)。515H7 および 301aE5 Mab はまた、それ自体、CXCR4 / CXCR4 の空間的近接を調節することもできたが、このことは CXCR4 / CXCR4 ホモ二量体コンフォメーションに対する 515H7 および 301aE5 Mab の影響を示唆する(図 3A および 3B)。20

【0241】

実施例 5：抗 CXCR4 Mab 515H7 および 301aE5 による、ヒト PBM C における HIV-1 一次单離物 KON (X4ウイルス) 複製の阻害

HIV-1 に対して血清反応陰性の健康なドナーからの PBM C をバフィーコートから、またはフィコール・ハイパーク勾配遠心分離による血球成分分離法(cytapheresis)から単離した。PBM C を、25 mM HEPES、5 ml ベニシリン (10000 U / ml) - ストレプトマイシン (10000 µg / ml) 2 mM L-グルタミンを含有し、10 % 熱不活性化 FCS を添加した RPMI 1640 細胞培養培地中、PHA の存在下で活性化し、1 サイクルの中和アッセイで細胞標的として用いた。一次ヒト PBM C における HIV-1 複製は、ウイルス p24 抗原の細胞内染色を FACS 分析によって分析することにより行った。要するに、25 µl / ウェルの、種々の希釈率の Mab 515H7 、301aE5 および 12G5 (R&D Systems) または対照として培養培地 (RPMI 1640 、10 % FCS 、0.1 % IL-2) を、25 µl / ウェルの HIV-1 KON X4 一次单離物希釈液とともに 37 °C で 1 時間、二回復でインキュベートした。PHA 活性化ヒト PBM C (25 µl / ウェル) を 96 ウェルプレート (U 底、Costar 3599) 中の Mab / ウイルス混合物に 20×10^6 細胞 / ml で加え、RPMI 1640 、10 % FCS および 0.1 % IL-2 中、37 °C で 24 ~ 36 時間培養した。Mab を含まない培地中、非感染 PBM C からなる対照を導入した。HIV 感染 PBM C を検出するために、ウイルス p24 抗原の細胞内染色を行い、フローサイトメトリーによって分析した。細胞を固定し、Cytofix / Cytoperm キット (Becton Dickinson) を製造者のプロトコールに従って用いて透過処理を施し、1 / 160 希釈で用いる暗所にて 4 °C で 10 分間インキュベートされる蛍光抗 p24 Mab (クローン KC57 - Coulter Beckman) で染色した。PBS - 3 % FCS 培地で洗浄した後、フローサイトメトリー分析前に PBM C を PBS で希釈した。種々のサンプルにおける p24 陽性細胞の割合を、生細胞集団に対する 20,000 事象をゲートすることにより決定した。この生細胞のサブセットの p24 発現を、非感染細胞のバックグラウンド染色と比べて分析した。p24 抗原陽性値は、mock 感染細胞におけるバックグラウンド事象を差し引いた後に得た。中和の割合は、Mab を含まない対照感染ウェルと比べての p24 陽性細胞の減少と定義した。中和力値は、感染細胞の割合を 90 % 低下させる Mab の希釈率と定義した。抗 C30

10

20

30

40

50

X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 を、 H I V 適用の参照の抗 C X C R 4 M a b として知られる 1 2 G 5 M a b と比較した。図 4 A および B および 5 に示されるように、抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 は、それぞれ I C₅₀ 1 0 μg / m l (6 6 n M) および 1 5 0 μg / m l (1 μM) で、 P B M C における H I V - 1 K O N 一次単離物の複製を阻害することができるが、 1 2 G 5 M a b は P B M C における H I V - 1 K O N 一次単離物の複製を阻害することができなかった（図 4 A ）。

【 0 2 4 2 】

実施例 6 : C X C R 4 受容体により媒介される細胞内カルシウム貯蔵の動員

この機能的アッセイは、小胞体の細胞内貯蔵からのカルシウム遊離を誘導するホスホリパーゼ C 経路の刺激を介した C X C R 4 受容体シグナル伝達を測定するように設計された。

【 0 2 4 3 】

ヒト C X C R 4 受容体を安定的かつ構成的に発現する C H O - K 1 細胞は、ナイーブ C H O - K 1 細胞 (ATCC C C L - 6 1) を、ヒト C X C R 4 受容体の全コード配列 (Ref Seq NM_003467) を含む哺乳類発現ベクターでトランスフェクトした際に得られたものである。細胞を完全培養培地 [5 % ウシ胎仔血清 (F C S) および 5 0 0 μg / m l のゲネチシンを添加した D M E M - ハム F 1 2 培地] で増殖させた。細胞を黒色 9 6 M W プレートに適当な培養培地中 1 0 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で播種した。試験前に細胞を一晩飢餓状態にした。細胞にローディングバッファー [H B S S 1 × 、 H E P E S 2 0 mM 、プロベニシド酸 (Probenicid acid) 2 5 mM] 中、蛍光カルシウム色素 (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) を、 3 7 ℃ で 3 0 分間、その後、 2 5 ℃ で 3 0 分間負荷した。 S D F - 1 による刺激は、各ウェルに直接注入することにより行った。拮抗作用試験では、 1 0 μl の M a b 溶液を S D F - 1 の少なくとも 1 0 分前にローディングバッファーに直接添加する。動的蛍光測定は、マルチモード蛍光マイクロプレートリーダー M i t h r a s L B 9 4 0 (Berthold) にて、以下の設定で行う： 4 8 5 n m での励起、 5 3 5 n m での発光、 1 0 0 0 0 任意単位での励起エネルギー。各ウェルの蛍光を S D F - 1 注入前 (基底シグナル) に毎秒 0 . 1 秒、 2 0 秒間記録する。その後、 2 0 μl の S D F - 1 を注入し、データ記録を 2 分間続ける。各試験条件を 2 反復で行う。各ウェルの値をまず、基底蛍光と細胞を含まない対照ウェルによって発せられた蛍光を差し引くことによって補正する。相対的データを S D F - 1 (1 0 0 n M) によって得られた最大刺激の割合として表す。

【 0 2 4 4 】

S D F 1 (1 0 0 n M) は、組換え C H O / C X C R 4 において細胞内カルシウムの迅速かつ強い放出を誘導したが、ナイーブ C H O - K 1 細胞では蛍光シグナルは検出されなかつた。最大強度は基底蛍光の 1 4 0 % 超に達し、 S D F - 1 による刺激時に約 4 0 秒で見られた（図 6 A 、 6 B 、および 6 C ）。 M a b 5 1 5 H 7 (1 3 3 n M) （図 6 A ）および c 5 1 5 H 7 (1 3 3 n M) （図 6 C ）は、 S D F - 1 (1 0 0 n M) により誘発されたカルシウムシグナルの強い阻害をもたらした。 M a b 3 0 1 a E 5 (1 3 3 n M) （図 6 B ）は、 S D F - 1 (1 0 0 n M) により誘発されたカルシウムシグナルの部分的阻害をもたらした。

【 0 2 4 5 】

実施例 7 : 抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 、 c 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 による、ヒト P B M C における H I V - 1 一次単離物 K O N 、 M N 、および 9 2 U G 0 2 4 (X 4 ウイルス) の複製の阻害

1 サイクル中和アッセイ

このアッセイは、感染 2 日後に 2 % の感染 C D 4 T リンパ球の検出を可能とするよう相応に濃縮および希釈した一次単離物 K O N 、 M N 、および 9 2 U G 0 2 4 を用いて 3 6 時間行う。

【 0 2 4 6 】

10

20

30

40

50

種々の希釈率の M a b 5 1 5 H 7、 c 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 2 5 μ l を、 2 5 μ l のウイルスとともに 3 7 で 1 時間インキュベートした。 2 0 \times 1 0 6 細胞 / m l のヒト P B M C (2 5 μ l) を 9 6 ウェルプレート (U 底、 C o s t a r 3 5 9 9) 中の M a b / ウイルス混合物に加え、 R P M I 1 6 4 0 1 0 % F C S および 2 0 U / m l I L - 2 (R & D Systems, Minneapolis, MN) 中で 3 6 時間培養した。

【 0 2 4 7 】

2 日間の培養後、 H I V 感染リンパ球を、 ウィルス p 2 4 A g の細胞内染色により検出した。細胞を固定し、 製造者に従い C y t o f i x / C y t o p e r m および P e r m / W a s h キット (BD Biosciences) の両者を用いて透過処理を施し、 P e r m / W a s h 溶液中 1 / 1 6 0 希釈で用いる 4 で 1 5 分間加える蛍光抗 p 2 4 M a b (F I T C - または P E - 抗 p 2 4 、 クローン K C 5 7 、 Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) で染色した。 3 % F B S を含む P B S で洗浄した後、 P B M C を 3 0 0 μ l の P B S に希釈した後、 D I V A ソフトウェア (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー分析 (LSRII 、 BD Biosciences) を行った。種々のサンプル中の p 2 4 陽性細胞の割合を、 前方および側方散乱パラメーターによって同定された生細胞集団に対する 2 0 , 0 0 0 事象をゲートすることにより決定した。これらの生細胞のサブセットは、 live/dead solution kit (Invitrogen) を用いて分析した。 p 2 4 A g 陽性値は、 m o c k 感染細胞におけるバックグラウンド事象を差し引いた後に得た。

【 0 2 4 8 】

中和パーセントは、 M a b を含まない対照感染ウェルと比べての p 2 4 陽性細胞の減少と定義した。中和力価は、 感染細胞の割合を 9 0 % 低下させる抗体の濃度 (3 反復で行った連続希釈率の間に挿入) と定義した。

【 0 2 4 9 】

図 7 、 8 および 9 に示されるように、 抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 、 c 5 1 5 H 7 、 および 3 0 1 a E 5 は、 P B M C における H I V - 1 X 4 M N 、 K O N 、 および 9 2 U G 0 2 4 一次単離物の複製を阻害することができる。 I C (μ g / m l において) の結果を表 9 にまとめる。

【 0 2 5 0 】

【 表 9 】

表 9

	K O N			M N			9 2 U G 0 2 4		
	感染細胞の阻害%			感染細胞の阻害%			感染細胞の阻害%		
	90	80	50	90	80	50	90	80	50
301aE5	>150	>150	150	>150	150	1	>150	150	50
515H7	15	8	1	10	1. 5	<1. 5	10	3	0. 5
c515H7	20	10	1. 5	15	1	<1. 5	15	3	<1. 5

【 0 2 5 1 】

実施例 8 : 抗 C X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 、 c 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 による、 ヒト P B M C における H I V - 1 一次単離物 8 9 . 6 (X 4 / R 5 二重ウイルス) の複製の阻害

1 サイクル中和アッセイ

このアッセイは、 感染 2 日後に 2 % の感染 C D 4 T リンパ球の検出を可能とするよう に相応に濃縮および希釈した一次単離物 8 9 . 6 を用いて 3 6 時間行う。

【 0 2 5 2 】

種々の希釈率の M a b 5 1 5 H 7 、 c 5 1 5 H 7 および 3 0 1 a E 5 2 5 μ l を、

10

20

30

40

50

25 μl のウイルスとともに37℃で1時間インキュベートした。20 × 10⁶ 細胞 / m¹ のヒトPBM C (25 μl) を96ウェルプレート(U底、Costar 3599)中のMab / ウィルス混合物に加え、 RPMI 1640 10% FCS および20U / m¹ IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 中で36時間培養した。

【0253】

2日間の培養後、 HIV 感染リンパ球を、ウイルス p 24 Ag の細胞内染色により検出した。細胞を固定し、製造者に従い Cytofix/Cytoperm および Perm/Wash キット(BD Biosciences)の両者を用いて透過処理を施し、 Perm/Wash 液中 1 / 160 希釈で用いる 4℃ で 15 分間加える蛍光抗体 p 24 Mab (FITC - または PE - 抗 p 24 、クローン KC 57 、 Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) で染色した。3% FBS を含む PBS で洗浄した後、 PBM C を 300 μl の PBS に希釈した後、 DIVA ソフトウェア(BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリー分析 (LSRII、 BD Biosciences)を行った。種々のサンプル中の p 24 陽性細胞の割合を、前方および側方散乱パラメーターによって同定された生細胞集団に対する 20,000 事象をゲートすることにより決定した。これらの生細胞のサブセットは、 live/dead solution kit (Invitrogen)を用いて分析した。 p 24 Ag 陽性値は、 mock 感染細胞におけるバックグラウンド事象を差し引いた後に得た。

10

【0254】

中和パーセントは、 Mab を含まない対照感染ウェルと比べての p 24 陽性細胞の減少と定義した。中和力価は、感染細胞の割合を 90% 低下させる抗体の濃度 (3 反復で行った連続希釈率の間に挿入) と定義した。

20

【0255】

図 10 および 11 に示されるように、抗 CXCR4 Mab 515H7 、 c515H7 、および 301aE5 は、 PBM C における HIV - 1 89.6 一次単離物の複製を阻害することができる。 IC (μg / ml) の結果を表 10 にまとめる。

【0256】

【表 10 】

89.6			
感染細胞の阻害%			
	90	80	50
301aE5	>150	150	20
515H7	15	1.5	<1.5
c515H7	10	1.5	<1.5

30

【0257】

実施例 9 : 抗 CXCR4 Mab c515H7 と抗CCR5 分子マラビロクの組合せによる、ヒトPBM C における HIV - 1 一次単離物 89.6 および UG93067 (X4 / R5 二重ウイルス) の複製の阻害

40

中和アッセイ、一次 PBM C における複数回の HIV 一次単離物複製の分析 :

c515H7 Mab またはマラビロクまたは両者の組合せの連続希釈液と、ウイルスの連続希釈液とを組み合わせるこのアッセイは、 PBM C (末梢血单核細胞) に対する複数回の感染を分析する。要するに、 c515H7 Mab またはマラビロクまたは両者の組合せの連続希釈液 (2倍) の 25 μl アリコート四つをそれぞれ、予め含水させた 96 ウェルフィルタープレート (孔径 1.25 μm 、 Durapor Dv 、 Millipore, Molsheim, France) にて、ウイルスの連続希釈液 25 μl とともに培養した。ウイルスの対照滴定 (希釈 c515H7 Mab またはマラビロクの代わりに 25 μl の RPMI) を、 c515H7 Mab またはマラビロクまたは両者の組合せの希釈液の存在下での滴定と同じプレートで行った。 37℃ で 1 時間後、 4 × 10⁶ 細胞 / m¹ の濃度の PHA 刺激 PBM C

50

25 μl (5人の健康なドナーからのPHA活性化PBMCのプール)を、RPMIの最終培養容量75 μl、10%ウシ胎仔血清(FCS)および20IUのインターロイキン-2(IL-2)/ml(R&D System)となるように加えた。37で24時間後、100 μlの同じ培養培地を加えた。4日目に濾過により2回の洗浄(各200 μlのRPMI)を行ってc515H7 Mabおよびマラビロクを除去し、200 μlの新鮮培養培地を加えた。7日目に、培養上清におけるp24の存在をELISAにより測定し、陰性対照(ウイルス希釈液で感染させ、10⁻⁶Mジドブジン[AZT]の存在下で維持した培養物)の場合と比べ、陽性ウェルを判定した。4反復のウェルを用い、各希釈率のc515H7 Mabまたはマラビロクまたは両者の組合せの非存在下(V₀)および存在下(V_n)でウイルス力価(50%組織培養感染量[TCID₅₀])を決定した。中和力価は、ウイルス力価の90%低下をもたらす(V_n/V₀=0.1)c515H7 Mabまたはマラビロクまたは両者の組合せの希釈率として定義した。

10

【0258】

図12に示されるように、二重指向性X4R5ウイルス89.6の複製は、c515H7 Mabにより、IC₉₀ 2 μg/mlで阻害された(図12)。マラビロク50 μg/mlでは、IC₉₀阻害活性に達しなかった(図12)。さらに、2 μg/mlのマラビロクを抗体c515H7に添加したところ、IC₉₀ 0.2 μg/mlでc515H7 Mabの阻害活性を増強した(図12)。

20

【0259】

c515H7 Mabとマラビロクの組合せの有益な効果を、種々の希釈率のこれらの2分子および別の二重指向性ウイルスUG93067を用いて評価した。図13に示されるように、Mab c515H7およびマラビロクの阻害活性は同等であった。これらの結果は、ウイルスUG93067の、CCR5受容体またはCXCR4受容体のいずれかを用いる能力が匹敵していたことを示唆する。UG93067ウイルスを用いると、より良い活性を証明することができ、これらのX4(c515H7 Mab)とR5(マラビロク)阻害剤(各10 μg/ml)の組合せだけが、ウイルス力価の90%低下を可能とした(図13)。

30

【0260】

実施例10：抗CXCR4キメラMab c515H7の生産

ネズミc515H7 Mabのキメラ形式を設計した。これは、着目するネズミ抗体の軽鎖および重鎖可変ドメインを、ヒトCおよびIgG1/IgG2/IgG4定常ドメインと遺伝的に融合したものに相当する。この組換えMabは、HEK293/EBNA系をpCEP4発現ベクター(Invitrogen, US)とともに使用することによって、一時的トランسفエクション時に作製されたものである。

30

【0261】

個々のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は本明細書に上記した。さらに、上記の表3にIgG2および4イソ型(好ましいイソ型)の配列が開示されているため、ここでも、IgG1イソ型の重鎖、すなわち、配列番号80のアミノ酸配列および配列番号81のヌクレオチド配列に相当するc515H7 VH(G1wt)の配列を挙げることができる。

40

【0262】

c515H7 Mab軽鎖および重鎖の可変ドメインに相当する全ヌクレオチド配列は、グローバル遺伝子合成(Genecust, Luxembourg)によって合成されたものである。それらを、ヒトIgG1/IgG2/IgG4免疫グロブリンの軽鎖[C]または重鎖[CH1-Hinge-CH2-CH3]のいずれかの定常ドメインの全コード配列を有するpCEP4ベクター(Invitrogen, US)にサブクローニングした。全クローニング工程は、the Laboratory manual (Sambrook and Russel, 2001)に記載されている従来の分子生物学的技術に従って、または供給者の説明書に従って行った。各遺伝子構築物を、Big Dyeターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット(Applied Biosystems, US)を用いたヌクレオチド配列決定によって完全にバリデートし、3100ジェネティック・アナラ

50

イザー(Applied Biosystems, US)を用いて分析した。

【0263】

懸濁適合HEK293EBNA細胞(Invitrogen, US)を常法により、オービタルシェーカー(回転速度110rpm)上、250mlフラスコにて、6mMグルタミンを添加した血清不含培地Excell 1293(SAFC Biosciences)50ml中で増殖させた。一時的トランスフェクションは、水中終濃度1mg/mlで調製した直鎖25kDaポリエチレンイミン(PEI)(Polysciences)、混合およびプラスミドDNA(重鎖：軽鎖プラスミド比1:1で、終濃度1.25μg/ml)を用い、 $2 \cdot 10^6$ 細胞/mlで行った。トランスフェクション4時間後に、培養物を1容量の新鮮培養培地で希釈して、最終細胞密度を 10^6 細胞/mlとした。培養工程を細胞の生存率およびMab生産に基づいて測定した。一般に、培養は4~5日間維持された。Mabは、プロテインA樹脂(GE Healthcare, US)での従来のクロマトグラフィーアプローチを用いて精製した。Mabは機能的評価に好適なレベルで生産された。生産性レベルは一般に、精製Mab 6~15mg/1の範囲である。

10

【0264】

実施例11：FACS分析による抗CXCR4キメラMab c515H7結合特異性の特性決定

この試験では、抗CXCR4キメラMab c515H7のヒトCXCR4に対する特異的結合をFACS分析によって調べた。

【0265】

NIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞を0μg/ml~10μg/mlの用量範囲のモノクローナル抗体c515H7とともにインキュベートした。その後、これらの細胞を1%BSA/PBS/0.01%NaN3で洗浄した。次に、Alexaで標識した二次抗体をこれらの細胞に加え、4℃で20分間インキュベートした。その後、これらの細胞を再び2回洗浄した。2回目の洗浄後に、FACS分析を行った。この結合試験の結果を図15に示すが、これは、抗CXCR4キメラMab C515H7がヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞系統と特異的に結合することを示す。NIH3T3wt細胞との結合は検出されなかった(データは示されていない)。

20

【0266】

実施例12：生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)アプローチによるCXCR4ホモ二量体に対するc515H7 Mabの効果

この機能的アッセイは、SDF-1および/またはc515H7 MabがCXCR4受容体に結合した際に誘発されるコンフォメーション変化をCXCR4ホモ二量体のレベルで評価することができる。

30

【0267】

検討する相互作用相手の発現ベクターを、従来の分子生物学的技術を適用することにより、対応する色素(ウミシイタケ(Renilla reniformis)ルシフェラーゼRLucおよび黄色蛍光タンパク質YFP)との融合タンパク質として構築した。BRET試験を行う2日前に、HEK293細胞を、対応するBRET相手:[CXCR4/RLuc+CXCR4/YFP]をコードする発現ベクターで一時的にトランスフェクトし、CXCR4ホモ二量体形成を調べた。翌日、細胞を、ポリリシンをブレコーティングした白色96MWプレートの完全培養培地[10%FBSを添加したDMEM]に分注した。まず、細胞をプレートに接着させるために、CO₂5%、37℃で培養した。その後、200μl DMEM/ウェルで一晩、細胞を飢餓状態にした。BRET試験の直前に、DMEMを除去し、細胞を手早くPBSで洗浄した。その後、細胞をPBS中、抗体の存在下または非存在下、37℃にて10分間インキュベートした後、最終量50μl中、SDF-1 100nMとともに、または伴わずにコエレンテラジンH 5μMを添加した。37℃でさらに10分間インキュベートした後、Mithras LB940マルチラベルリーダー(Berthold)(1s/波長/ウェル、室温で15反復)を用い、485nmおよび530nmでの発光獲得を誘導した。

40

50

【0268】

B R E T 比の計算は従前に記載されているように行った(Angersら 2000)： [(発光_{530 nm}) - (発光_{485 nm}) × C f] / (発光_{485 nm})、式中、C f = 同じ試験条件下で R l u c 融合タンパク質単独を発現する細胞の (発光_{530 nm}) / (発光_{485 nm})。この式を簡単になると、B R E T 比が、二つの B R E T 相手が存在する場合に得られる 530 / 485 nm 比を、同じ試験条件下で、R l u c と融合された相手だけがアッセイ中に存在する場合に得られる 530 / 485 nm 比により補正したものに相当することが示される。読み取りやすいように、結果はミリ B R E T 単位 (m B U) で表すが、m B U は B R E T 比に 1000 を掛けたものである。

【0269】

S D F 1 (100 nM) は、C X C R 4 受容体と融合されたドナータンパク質と、アクセプタータンパク質とが空間的に近接していることから生じる B R E T シグナルを約 10 % 増強したが、それはおそらく C X C R 4 / C X C R 4 ホモ二量体形成または既存の二量体のコンフォメーション変化を示唆する(図 16)。M a b c 515 H 7 は、C X C R 4 ホモ二量体に関して、S D F - 1 により誘発されるコンフォメーション変化を調節することができた(S D F - 1 により誘発される B R E T 増強の 96 % 阻害、図 16)。M a b c 515 H 7 はまた、それ自体、C X C R 4 / C X C R 4 の空間的近接を調節することができたが、このことは C X C R 4 / C X C R 4 ホモ二量体コンフォメーションに対するこの M a b の影響を示唆する(図 16)。

【0270】

実施例 13 : C D 4 および C X C R 4 または C C R 5 を発現する G F P 形質導入ヒト骨肉腫 (G H O S T) 細胞を用いた M a b 515 H 7 抗 H I V - 1 活性の in vitro 評価

C X C R 4 515 H 7 M a b の特異性を判定するために、本発明者らは、C D 4 および C X C R 4 または C C R 5 を発現する G H O S T 細胞を用い、この M a b の抗 H I V - 1 活性を評価した。

【0271】

このアッセイは、X 4 H I V - 1 L A I ウイルス(C X C R 4 を発現する G h o s t 細胞を持つ)または R 5 H I V - 1 B a L ウイルス(C C R 5 を発現する G h o s t 細胞を持つ)のいずれかを用いて 48 時間行う。500 μl の G h o s t 細胞を、10 % F C S を添加したダルベッコの培養培地で 24 時間平板培養した(2.5 × 10⁵ 細胞 / ml)。種々の希釈率の M a b 515 H 7 を 37 ℥ で 1 時間インキュベートした後、これらの細胞に希釈した H I V - 1 L A I ウイルス(1/10)および H I V - 1 B a L ウイルス(1/7)を 48 時間加えた。細胞をトリプシン処理し、P B S で 1 回洗浄した。細胞を固定し、また、ウイルスを不活性化するために、この細胞ペレットに 300 μL の 1.5 % パラホルムアルデヒドを暗所、+4 ℃ で 2 時間加えた。G F P 陽性細胞をフローサイトメトリーにより分析し、H I V - 1 感染の阻害を算出した。

【0272】

感染細胞の阻害パーセントは、M a b を含まない対照感染ウェルと比較して定義した。I C s (μg / ml) の結果を表 11 にまとめる。抗 C X C R 4 M a b 515 H 7 は、G h o s t 細胞を発現する C X C R 4 において H I V - 1 X 4 L a i ウイルスの感染を阻害することができたが、G h o s t 細胞を発現する C C R 5 において H I V - 1 R 5 B a L ウイルスの感染阻害には全く不活性であった。

【0273】

10

20

30

40

【表11】

GHOST CXCR4ウイルス			GHOST CCR5/BaLウイルス		
感染細胞の阻害%			感染細胞の阻害%		
90	80	50	90	80	50
515H7	0.5	0.1	0.05	>75	>75

【0274】

10

実施例14：515H7抗CXCR4ネズミ抗体のヒト化および該h515H7のフラグメントの作製

一般手順

515H7抗CXCR4抗体のヒト化は、CDRグラフト法のグローバルルールを適用することで行った。免疫原性分析ならびにCDRおよびフレームワーク(FR)領域の定義は、IMGTユニークナンバリングスキームならびにIMGTライブラリーおよびツール(Lefranc, 1997 - www.imgt.org)を適用することで行った。

【0275】

20

515H7のヒト化変異体の結合は、ヒトCXCR4で安定的にトランスフェクトされたNIH3T3細胞系にて判定した。結合活性は、ビオチン化マウス抗体を用いた競合アッセイによって評価した。第二の試みにおいて、ヒト化抗体を、ビオチン化SDF-1のRAMOS細胞との結合を阻害する能力に関して評価した。RAMOS細胞は、CXCR4の発現が高く、CXCR7およびSDF-1の発現が低いために選択された。

【0276】

これらのアッセイを用いて、抗CXCR4抗体の組換えヒト化型を特性決定した。可変ドメインをヒトIgG1/k定常ドメインでフォーマットし、哺乳類発現ベクターpCEPにクローニングした。組換えIgG1/由来抗体をHEK293細胞で一時的に発現させた。発現培養上清を濾過し、プロテインAセファロースを用いて抗体を精製した。精製抗体に再びPBSバッファーを加え、抗体濃度をELISAにより測定した。

【0277】

30

組換え抗体フラグメントを、ヒト化抗体の可変ドメインに特異的なオリゴヌクレオチドを用いたPCRによって作製し、これらを大腸菌系にサブクローニングした。抗体フラグメントの精製は、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィー(IMAC)によって行った。

【0278】

515H7可変ドメインのヒト化

重鎖および軽鎖可変ドメインの種々の配列アライメントを図17および18に示す。

【0279】

40

最初の一連の試験では、三つの第一のヒト化変異体の抗CXCR4結合活性を分析した。VH変異体1(VH1)をネズミVLと組合せ、これらの構築物の、ビオチン化ネズミ515H7親抗体の結合を阻害する能力を評価した。VH1の可変ドメインのアミノ酸配列は配列番号90を含んでおり、ヌクレオチド配列は配列番号91を含んでなる。全長VH1のアミノ酸配列は配列番号92を含んでおり、ヌクレオチド配列は配列番号93を含んでなる。この構築物は、キメラ抗体と同等の、ネズミ抗体との競合能を示した(図19A)。このことは、ほとんどのヒトVH変異体がキメラと同等の結合能を有することを示唆する。よって、VH1をVLの変異体2と組み合わせた(図19B)。

【0280】

さらなる試験では、抗体515H7のヒト化変異体がSDF-1のCXCR4発現細胞への結合を阻害するか否かを判定した(図20)。このh515H7のヒト化変異体の阻害能は、フローサイトメトリーにおいてビオチン化SDF-1を検出することによって

50

評価した。ヒト化抗体 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 は、キメラ c 5 1 5 H 7 と同等の S D F - 1 結合阻害能を有する。

【 0 2 8 1 】

また、ヒト化変異体 h z 5 1 5 H 7 V H 1 V L 2 の抗体フラグメントも試験したところ、この抗体フラグメントが S D F - 1 の結合を完全に阻害することができる事が分かった（図 2 0）。

【 0 2 8 2 】

実施例 1 5 : F A C S 分析による抗 C X C R 4 ヒト化 M a b 5 1 5 H 7 結合特異性の特性決定

この試験では、抗 C X C R 4 ヒト化 M a b 5 1 5 H 7 の、ヒト C X C R 4 に対する特異的結合を F A C S 分析により調べた。

10

【 0 2 8 3 】

N I H 3 T 3 、N I H 3 T 3 - h C X C R 4 トランスフェクト体を、1 0 0 μ l の F a c s バッファー中、暗所、4 °C にて 2 0 分間、0 ~ 1 0 μ g / m L のヒト化 M a b 5 1 5 H 7 (h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 1 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 2 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 3) とともにインキュベートした。F a c s バッファー中で 3 回洗浄した後、細胞を、暗所、4 °C にて 2 0 分間、二次抗体であるヤギ抗ヒト A l e x a 4 8 8 (1 / 5 0 0 希釀) とともにインキュベートした。F a c s バッファー中で 3 回洗浄した後、各ウェルにヨウ化プロピジウムを加え、生存細胞のみを F a c s により分析した。少なくとも 5 0 0 0 の生存細胞を評価し、各条件について蛍光強度の平均値を見積もった。

20

【 0 2 8 4 】

これらの結合試験の結果を、[F A C S] によって得られた平均蛍光強度 (M F I)] を示す図 2 1 に示す。抗 C X C R 4 ヒト化 M a b h z 5 1 5 H 7 は、ヒト C X C R 4 - N I H 3 T 3 トランスフェクト細胞系統と特異的に結合した (N I H 3 T 3 親細胞では M F I = 2 . 2) 。

【 0 2 8 5 】

実施例 1 6 : 生物発光共鳴エネルギー移動 (B R E T) アプローチによる C X C R 4 ホモ二量体に対する h z 5 1 5 H 7 M a b の効果

この機能的アッセイは、S D F - 1 および / または h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 1 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 2 、 h z 5 1 5 H 7 V H 1 D 7 6 N V L 2 . 3 が C X C R 4 受容体に結合した際に誘発されるコンフォメーション変化を C X C R 4 ホモ二量体のレベルで評価することができる。

30

【 0 2 8 6 】

検討する相互作用相手の発現ベクターを、従来の分子生物学的技術を適用することにより、対応する色素（ウミシイタケ(Renilla reniformis)ルシフェラーゼ R l u c および黄色蛍光タンパク質 Y F P ）との融合タンパク質として構築した。B R E T 試験を行う 2 日前に、H E K 2 9 3 細胞を、対応する B R E T 相手 : [C X C R 4 / R l u c + C X C R 4 / Y F P] をコードする発現ベクターで一時的にトランスフェクトし、C X C R 4 ホモ二量体形成を調べた。翌日、細胞を、ポリリシンをプレコーティングした白色 9 6 M W プレートの完全培養培地 [1 0 % F B S を添加した D M E M] に分注した。まず、細胞をプレートに接着させるために、C O₂ 5 %、3 7 °C で培養した。その後、2 0 0 μ l D M E M / ウェルで一晩、細胞を飢餓状態にした。B R E T 試験の直前に、D M E M を除去し、細胞を手早く P B S で洗浄した。その後、細胞を P B S 中、抗体の存在下または非存在下、3 7 °C にて 1 0 分間インキュベートした後、最終量 5 0 μ l 中、S D F - 1 1 0 0 n M とともに、または併わざにコエレンテラジン H 5 μ M を添加した。3 7 °C でさらに 1 0 分間インキュベートした後、M i t h r a s L B 9 4 0 マルチラベルリーダー(Bert hold) (1 s / 波長 / ウェル、室温で 1 5 反復) を用い、4 8 5 n m および 5 3 0 n m での発光獲得を誘導した。

40

50

【0287】

B R E T 比の計算は従前に記載されているように行った(Angersら、2000)：[(発光_{530 nm}) - (発光_{485 nm}) × C f] / (発光_{485 nm})、式中、C f = 同じ試験条件下で R l u c 融合タンパク質単独を発現する細胞の (発光_{530 nm}) / (発光_{485 nm})。この式を簡単になると、B R E T 比が、二つの B R E T 相手が存在する場合に得られる 530 / 485 nm 比を、同じ試験条件下で、R l u c と融合された相手だけがアッセイ中に存在する場合に得られる 530 / 485 nm 比により補正したものに相当することが示される。読み取りやすいように、結果はミリ B R E T 単位 (m B U) で表すが、m B U は B R E T 比に 1000 を掛けたものである。

【0288】

S D F 1 (100 nM) は、C X C R 4 受容体と融合されたドナータンパク質と、アクセプタータンパク質とが、空間的に近接していることから生じる B R E T シグナルを約 12 % 増強したが、それはおそらく C X C R 4 / C X C R 4 ホモ二量体形成または既存の二量体のコンフォメーション変化を示唆する(図 22)。

10

【0289】

515H7ヒト化 M a b は、C X C R 4 ホモ二量体に関して S D F - 1 により誘発されるコンフォメーション変化を調節することができ、S D F - 1 により誘発される B R E T 増強の阻害割合は、h z 515H7 V H 1 D 7 6 N - V L 2 M a b で約 88 %、h z 515H7 V H 1 D 7 6 N - V L 2 . 1 M a b で 65 %、h z 515H7 V H 1 D 7 6 N - V L 2 . 2 M a b で 33 % および h z 515H7 V H 1 D 7 6 N - V L 2 . 3 M a b で 21 % であった(図 22)。

20

【0290】

実施例 17 : 抗 C X C R 4 M a b h z 515H7 による M T - 4 細胞中の H I V - 1_{I I I B} (X 4 ウィルス) の複製の阻害

このアッセイでは、H I V - 1_{I I I B} に対する h z 515H7 M a b の活性は、M T - 4 細胞におけるウィルスによって誘導される細胞病原性の阻害に基づいている。5日以内に生存細胞の数を 90 % 減少させるウイルス量の 50 % 組織培養感染量 (T C I D₅₀) の 5 倍の H I V - 1_{I I I B} 单離物を細胞に感染させた。37にて 30 分間吸着させた後、感染細胞を、20 % 熱不活性化したウシ胎仔血清 (F C S)、100 I U / m l のペニシリン、100 μg / m l のストレプトマイシン、2 mM のグルタミンを添加した R P M I 1640 培地中 2 × 10⁵ 細胞 / m l に調整し、種々の濃度の h z 515H7 M a b 100 μl を有する 96 ウェルの平底組織培養プレート (C O S T A R 3596) (100 μl / ウェル) に播種した。5日目に、細胞の生存能を比色反応 M T T によって測定した。h z 515H7 M a b で処置した感染細胞の保護の割合を、下記の式によって計算した：

30

【数 1】

保護% =

$$\frac{[\text{h z } 515H7 \text{ M a b で処置した感染細胞の OD}_{540}] - [\text{対照感染細胞の OD}_{540}]}{[\text{対照未感染細胞の OD}_{540}] - [\text{対照感染細胞の OD}_{540}]} \times 100$$

40

$$= \frac{[\text{h z } 515H7 \text{ M a b で処置した感染細胞の OD}_{540}] - [\text{対照感染細胞の OD}_{540}]}{[\text{対照未感染細胞の OD}_{540}] - [\text{対照感染細胞の OD}_{540}]} \times 100$$

【0291】

図 23 に示されるように、h z 515H7 M a b は、M T - 4 細胞において H I V - 1_{I I I B} によって誘導される細胞病原性を阻害することができるので、顕著な抗 H I V - 1 活性を示す。

【0292】

実施例 18 : 抗 C X C R 4 M a b h z 515H7 による、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 K O N (X 4 ウィルス) 複製の阻害

1 サイクル中和アッセイ

50

このアッセイは、感染2日後に2%の感染CD4 Tリンパ球の検出を可能とするよう相応に濃縮および希釈した一次単離物KONを用いて36時間行った。

【0293】

種々の希釈率のMab 515H7 25μlを、25μlのウイルスとともに37で1時間培養した。20×10⁶細胞/mlのヒトPBM C(25μl)を96ウェルプレート(U底、Costar 3599)中のMab/ウイルス混合物に加え、RPMI 1640、10%FCSおよび20U/ml IL-2(R&D Systems, Minneapolis, MN)中で36時間培養した。

【0294】

2日間の培養後、HIV感染リンパ球を、ウイルスp24 Agの細胞内染色により検出した。細胞を固定し、製造者に従いCytofix/CytopermおよびPerm/Washキット(BD Biosciences)の両者を用いて透過処理を施し、Perm/Wash溶液中1/160希釈で用いる4で15分間加える蛍光抗p24 Mab(FITC-またはPE-抗p24、クローンKC57、Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL)で染色した。3%FBSを含むPBSで洗浄した後、PBM Cを300μlのPBSに希釈した後、DIVAソフトウェア(BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリー分析(LSR II、BD Biosciences)を行った。種々のサンプル中のp24陽性細胞の割合を、前方および側方散乱パラメーターによって同定された生細胞集団に対する20,000事象をゲートすることにより決定した。これらの生細胞のサブセットは、live/dead solution kit (Invitrogen)を用いて分析した。p24 Ag陽性値は、mock感染細胞におけるバックグラウンド事象を差し引いた後に得た。

【0295】

中和パーセントは、Mabを含まない対照感染ウェルと比べてのp24陽性細胞の減少と定義した。中和力価は、感染細胞の割合を低下させる抗体の濃度(3反復で行った連続希釈率の間に挿入)と定義した。

【0296】

図24に示されるように、抗CXCR4 Mab 515H7は、PBM CにおけるHIV-1 X4 KON一次単離物の複製を阻害することができる。

【0297】

実施例19：抗CXCR4 Mab hz515H7と抗CCR5分子マラビロクの組合せによる、ヒトPBM CにおけるHIV-1一次単離物89.6およびUG93067(X4/R5二重ウイルス)の複製の阻害

中和アッセイ、一次PBM Cにおける複数回のHIV一次単離物複製の分析：

hz515H7 Mabまたはマラビロクまたは両者の組合せの連続希釈液と、ウイルスの連続希釈液とを組み合わせるこのアッセイは、PBM C(末梢血単核細胞)に対する複数回の感染を分析する。要するに、hz515H7 Mabまたはマラビロクまたは両者の組合せの連続希釈液(2倍)の25μlアリコート四つをそれぞれ、予め含水させた96ウェルフィルタープレート(孔径1.25μm、Durapor Dv、Millipore, Molsheim, France)にて、ウイルスの連続希釈液25μlとともに培養した。ウイルスの対照滴定(希釈hz515H7 Mabまたはマラビロクの代わりに25μlのRPMI)を、hz515H7 Mabまたはマラビロクまたは両者の組合せの希釈液の存在下での滴定と同じプレートで行った。37で1時間後、4×10⁶細胞/mlの濃度のPHA刺激PBM C 25μl(5人の健康なドナーからのPHA活性化PBM Cのプール)を、RPMIの最終培養容量75μl、10%ウシ胎仔血清(FCS)および20IUのインターロイキン-2(IL-2)/ml(R&D System)となるように加えた。37で24時間後、100μlの同じ培養培地を加えた。4日目に濾過により2回の洗浄(各200μlのRPMI)を行ってhz515H7 Mabおよびマラビロクを除去し、200μlの新鮮培養培地を加えた。7日目に、培養上清におけるp24の存在をELISAにより測定し、陰性対照(ウイルス希釈液で感染させ、10⁻⁶Mジドブジン[AZT]の存在下で維持した培養物)の場合と比べ、陽性ウェルを判定した。4反復のウェルを用い、各希釈

10

20

30

30

40

50

率の 5 1 5 H 7 M a b またはマラビロクまたは両者の組合せの非存在下 (V_0) および存在下 (V_n) でウイルス力価 (50% 組織培養感染量 [T C I D₅₀]) を決定した。中和力価は、ウイルス力価の 90% 低下をもたらす ($V_n / V_0 = 0.1$) 5 1 5 H 7 M a b またはマラビロクまたは両者の組合せの希釈率として定義した。

【0298】

h z 5 1 5 H 7 M a b とマラビロクの間の相乗効果の可能性を、種々の希釈率のこれらの 2 分子の組合せを用い、二重指向性ウイルス 89.6 および U G 9 3 0 6 7 を用いて評価した。図 25 および 26 に示されるように、M a b h z 5 1 5 H 7 およびマラビロクの阻害活性は同等であった。これらの X 4 (h z 5 1 5 H 7 M a b) および R 5 (マラビロク) 阻害剤の組合せが、P B M C における 89.6 と U G 9 3 0 6 7 の二重ウイルス X 4 / R 5 ウイルス力価の 90% 低下を可能とした (それぞれ、図 25 および 26)。
10

【0299】

実施例 20 : 抗 C X C R 4 M a b h z 5 1 5 H 7 I g G 4 による、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 K O N (X 4 ウィルス) の複製の阻害

1サイクル中和アッセイ

このアッセイは、感染 2 日後に 2% の感染 C D 4 T リンパ球の検出を可能とするよう に相応に濃縮および希釈した一次单離物 K O N を用いて 36 時間行う。

【0300】

種々の希釈率の M a b h z 5 1 5 H 7 I g G 4 25 μl を、25 μl のウイルス 20 とともに 37 度で 1 時間培養した。20 × 10⁶ 細胞 / m l のヒト P B M C (25 μl) を 96 ウェルプレート (U 底、C o s t a r 3599) 中の M a b / ウィルス混合物に 加え、R P M I 1 6 4 0 1 0 % F C S および 20 U / m l I L - 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 中で 36 時間培養した。

【0301】

2 日間の培養後、H I V 感染リンパ球を、ウイルス p 2 4 A g の細胞内染色により検出した。細胞を固定し、製造者に従い C y t o f i x / C y t o p e r m および P e r m / W a s h キット (BD Biosciences) の両者を用いて透過処理を施し、P e r m / W a s h 溶液中 1 / 1 6 0 希釈で用いる 4 度 15 分間加える蛍光抗 p 2 4 M a b (F I T C - 30 または P E - 抗 p 2 4 、クローン K C 5 7 、Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) で染色した。3% F B S を含む P B S で洗浄した後、P B M C を 3 0 0 μl の P B S に 希釈した後、D I V A ソフトウェア (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー分析 (LSRII、BD Biosciences) を行った。種々のサンプル中の p 2 4 陽性細胞の割合を、前方 および 側方散乱パラメーターによって同定された生細胞集団に対する 20,000 事象を ゲートすることにより決定した。これらの生細胞のサブセットは、l i v e / d e a d s o l u t i o n k i t (Invitrogen) を用いて分析した。p 2 4 A g 陽性値は、m o c k 感染細胞におけるバ ックグラウンド事象を差し引いた後に得た。

【0302】

中和パーセントは、M a b を含まない対照感染ウェルと比べての p 2 4 陽性細胞の減少 40 と定義した。中和力価は、感染細胞の割合を低下させる抗体の濃度 (3 反復で行った連続 希釈率の間に挿入) と定義した。

【0303】

図 27 に示されるように、抗 C X C R 4 M a b h z 5 1 5 H 7 I g G 4 は、P B M C における H I V - 1 X 4 K O N 一次单離物の複製を阻害することができる。

【0304】

実施例 21 : 抗 C X C R 4 M a b h z 5 1 5 H 7 I g G 4 と抗 C C R 5 分子マラビロクの組合せによる、ヒト P B M C における H I V - 1 一次单離物 89.6 (X 4 / R 5 二重ウイルス) の複製の阻害

中和アッセイ、一次 P B M C における複数回の H I V 一次单離物複製の分析 :

h z 5 1 5 H 7 I g G 4 M a b またはマラビロクまたは両者の組合せの連続希釈液と、ウイルスの連続希釈液とを組み合わせるこのアッセイは、P B M C (末梢血単核細胞)
50

に対する複数回の感染を分析する。要するに、*h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b* またはマラビロクまたは両者の組合せの連続希釈液（2倍）の $25 \mu l$ アリコート四つをそれぞれ、予め含水させた 96 ウェルフィルタープレート（孔径 $1.25 \mu m$ 、Durapor Dv、Milipore, Molsheim, France）にて、ウイルスの連続希釈液 $25 \mu l$ とともにインキュベートした。ウイルスの対照滴定（希釈 *h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b* またはマラビロクの代わりに $25 \mu l$ の RPMI）を、*h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b* またはマラビロクまたは両者の組合せの希釈液の存在下での滴定と同じプレートで行った。37で1時間後、 4×10^6 細胞 / $m l$ の濃度の PHA 刺激 PBMC $25 \mu l$ （5人の健康なドナーからの PHA 活性化 PBMC のプール）を、RPMI の最終培養容量 $75 \mu l$ 、10%ウシ胎仔血清（FCS）および 20 IU のインターロイキン-2（IL-2）/ $m l$ (R&D System)となるように加えた。37で24時間後、 $100 \mu l$ の同じ培養培地を加えた。4日目に濾過により2回の洗浄（各 $200 \mu l$ の RPMI）を行って *h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b* およびマラビロクを除去し、 $200 \mu l$ の新鮮培養培地を加えた。7日目に、培養上清における p24 の存在を ELISA により測定し、陰性対照（ウイルス希釈液で感染させ、 $10^{-6} M$ ジドブジン [AZT] の存在下で維持した培養物）の場合と比べ、陽性ウェルを判定した。4反復のウェルを用い、各希釈率の *h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b* またはマラビロクまたは両者の組合せの非存在下 (V_0) および存在下 (V_n) でウイルス力価（50%組織培養感染量 [TCID₅₀]）を決定した。中和力価は、ウイルス力価の 90% 低下をもたらす ($V_n / V_0 = 0.1$) *h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b* またはマラビロクまたは両者の組合せの希釈率として定義した。
10
20

【0305】

h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b とマラビロクの間の相乗効果の可能性を、これらの2分子の種々の希釈率の組合せを用い、二重指向性ウイルス 89.6 を用いて評価した。図 28 に示されるように、これらの X4 (*h z 5 1 5 H 7 Ig G 4 M a b*) および R5 (マラビロク) 阻害剤の組合せが、PBMC における 89.6 の二重ウイルス X4 / R5 のウイルス力価の 90% 低下を可能とした（図 28）。

【図17】

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
515H7 VH	1C	2C	3C	4C
IgHV3-49*04	ENLVVSESSG.GLVQPGKGKLMSCNS GIFTF... TONY	MSWVQCPFGKALEHDF	INNNNGYTT	
EVQLVESSG.GLVQPGKGKLMSCNS GIFTF... GOTA	MSWVQCPFGKALEHDF	INNNNGYTT		
VH1 D76N	EVQLVESSG.GLVQPGKGKLMSCNS GIFTF... TONY	MSWVQCPFGKALEHDF	INNNNGYTT	
	EVQLVESSG.GLVQPGKGKLMSCNS GIFTF... TONY	MSWVQCPFGKALEHDF	INNNNGYTT	
	FR3-IMGT (66-124)	CDR3-IMGT (125-151)	FR4-IMGT (152-155)	CDR2-IMGT (116-125)
515H7 VH
IgHV3-49*04	DYAAAVVK.GRFTISQNSLTKEDTAVYYC ARDVGSNYFYDW QQQTLIVTVSS	YFDTW QQPLIVTVSS		
IgHV4*01	EVAAAVVK.GRFTISQNSLTKEDTAVYYC ARDVGSNYFYDW QQQTLIVTVSS			
VH1 D76N	EVAAAVVK.GRFTISQNSLTKEDTAVYYC ARDVGSNYFYDW QQQTLIVTVSS			

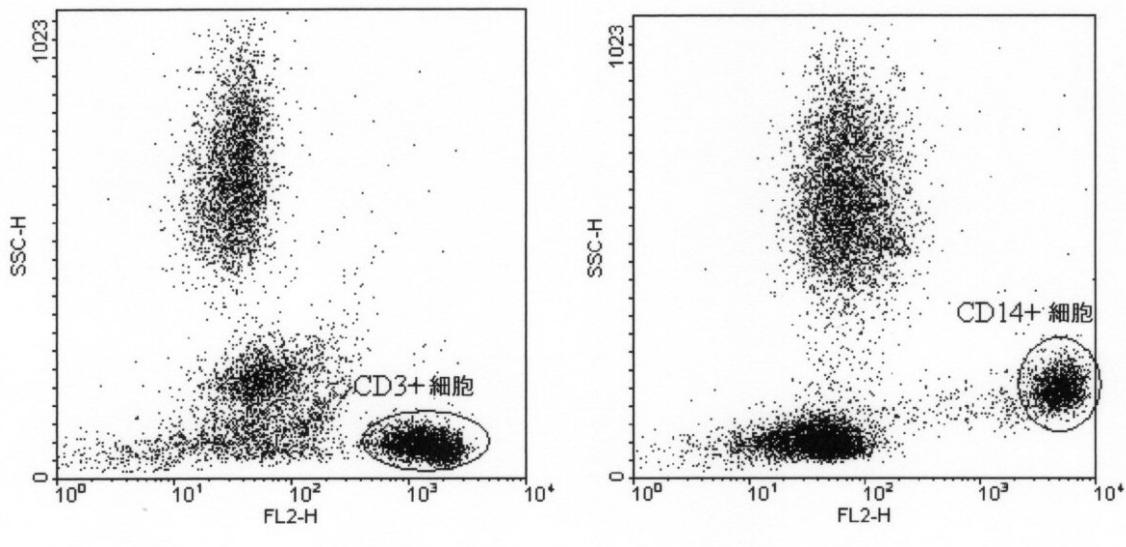
Figure 17

【図18】

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
515H7 VL	1	10	2C	3C
IgKV4-1*01	DIVYVQSQPSFLAVSLGEARATMCKS QSELINSRKMYN	LAWYQCPGPQGPMLLLIV	WA.....S	
VL Var2	DIVYVQSQPSFLAVSLGEARATMCKS QSELINSRKMYN	LAWYQCPGPQGPMLLLIV	WA.....S	
VL Var2.1	DIVYVQSQPSFLAVSLGEARATMCKS QSELINSRKMYN	LAWYQCPGPQGPMLLLIV	WA.....S	
VL Var2.2	DIVYVQSQPSFLAVSLGEARATMCKS QSELINSRKMYN	LAWYQCPGPQGPMLLLIV	WA.....S	
VL Var2.3	DIVYVQSQPSFLAVSLGEARATMCKS QSELINSRKMYN	LAWYQCPGPQGPMLLLIV	WA.....S	
	FR3-IMGT (66-124)	CDR3-IMGT (125-151)	FR4-IMGT (152-155)	CDR2-IMGT (116-125)
515H7 VL
IgKV4-1*01	ASSSVAV.ARTFSGG...SETTYFLTISRQQAEGLAVYYC MQ8FNLR...	MQ8FNLR...	FQGQ7KVEIK	
VL Var2	ASSSVAV.ARTFSGG...SETTYFLTISRQQAEGLAVYYC MQ8FNLR...	MQ8FNLR...	FQGQ7KVEIK	
VL Var2.1	ASSSVAV.DRFTGSG...SETTYFLTISRQQAEGLAVYYC MQ8FNLR...	MQ8FNLR...	FQGQ7KVEIK	
VL Var2.2	ASSSVAV.DRFTGSG...SETTYFLTISRQQAEGLAVYYC MQ8FNLR...	MQ8FNLR...	FQGQ7KVEIK	
VL Var2.3	ASSSVAV.DRFTGSG...SETTYFLTISRQQAEGLAVYYC MQ8FNLR...	MQ8FNLR...	FQGQ7KVEIK	

Figure 18

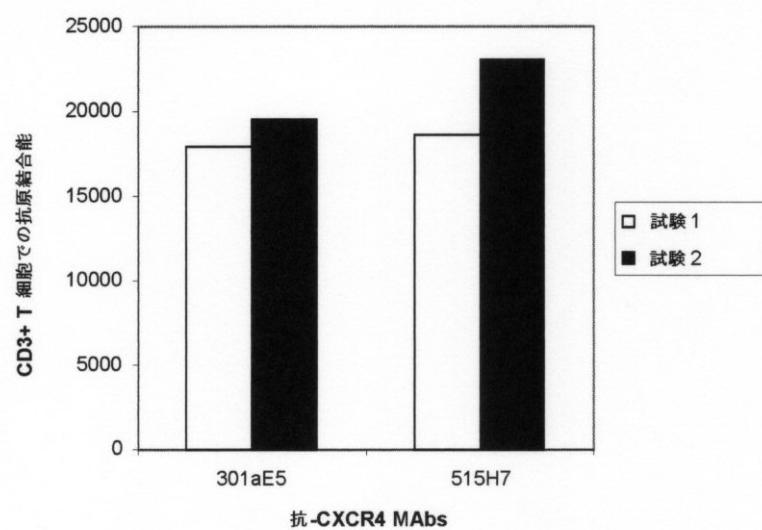
【図1】



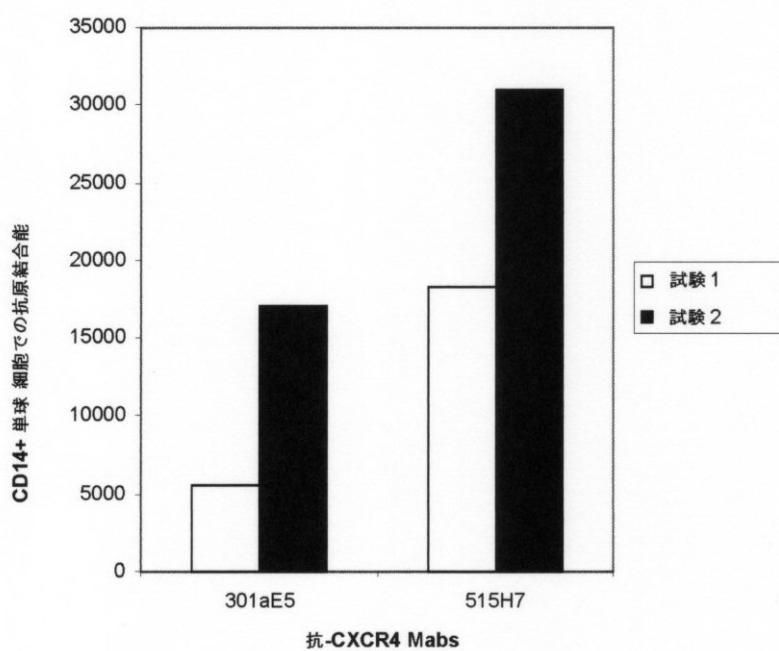
A

B

【図2】

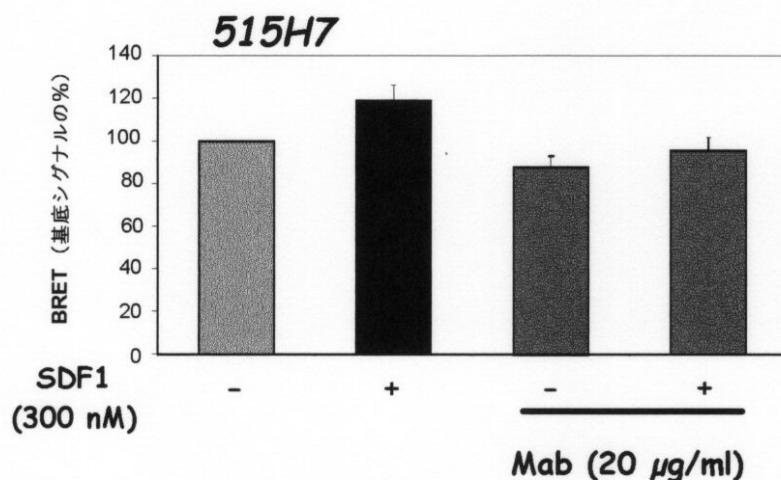
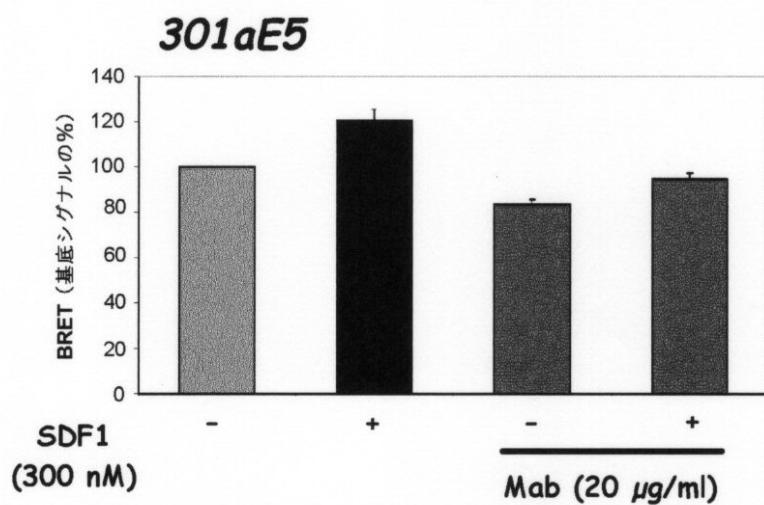


A

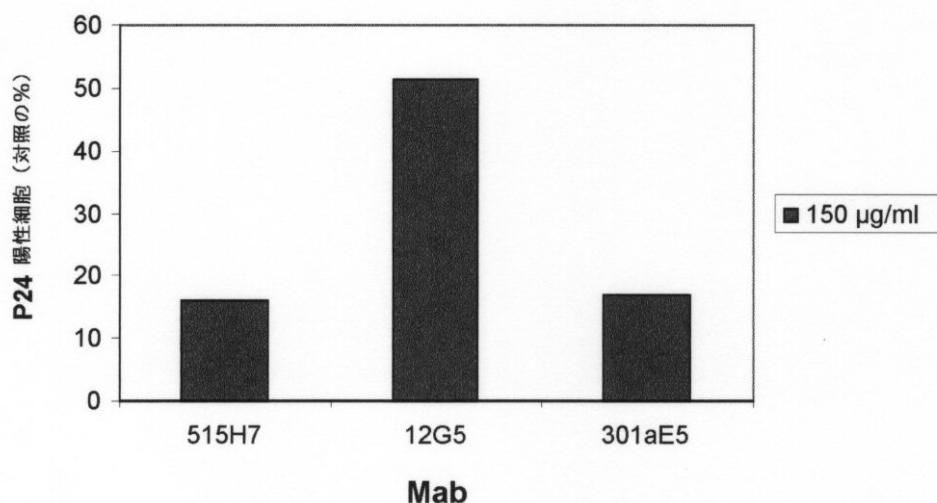


B

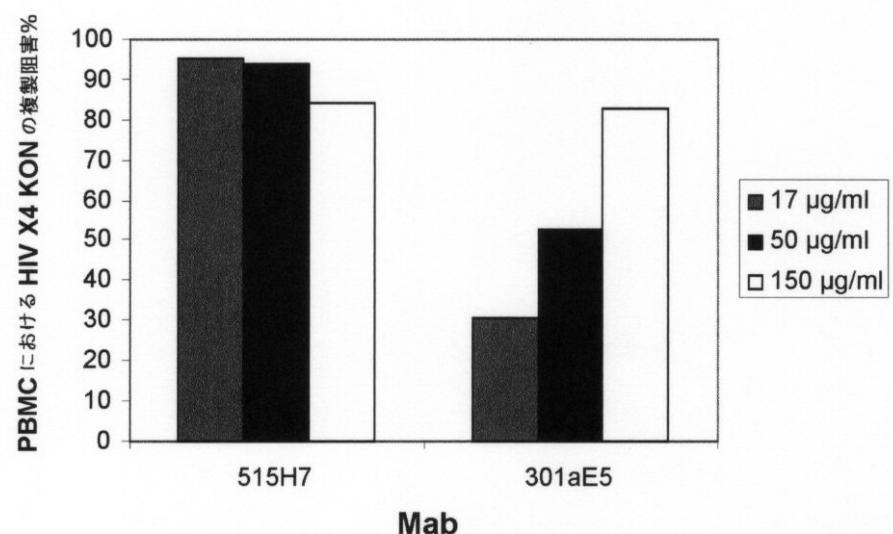
【図3】

**A****B**

【図4】

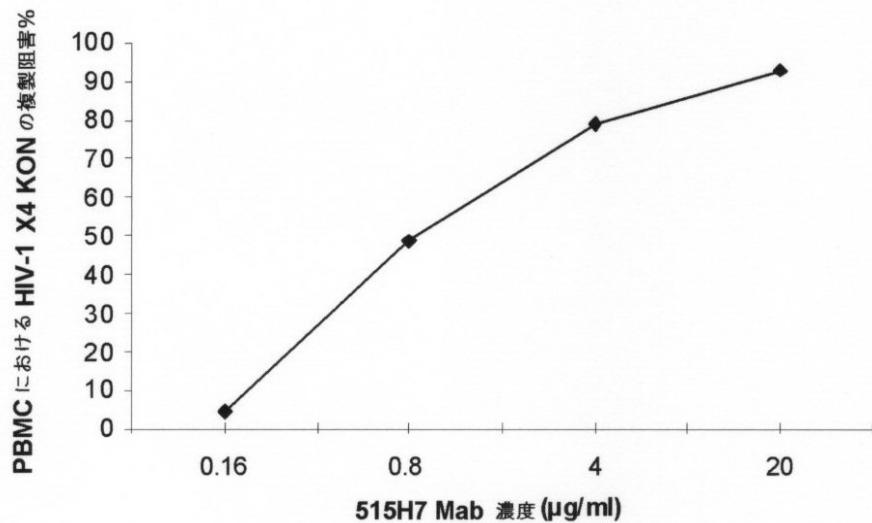


A

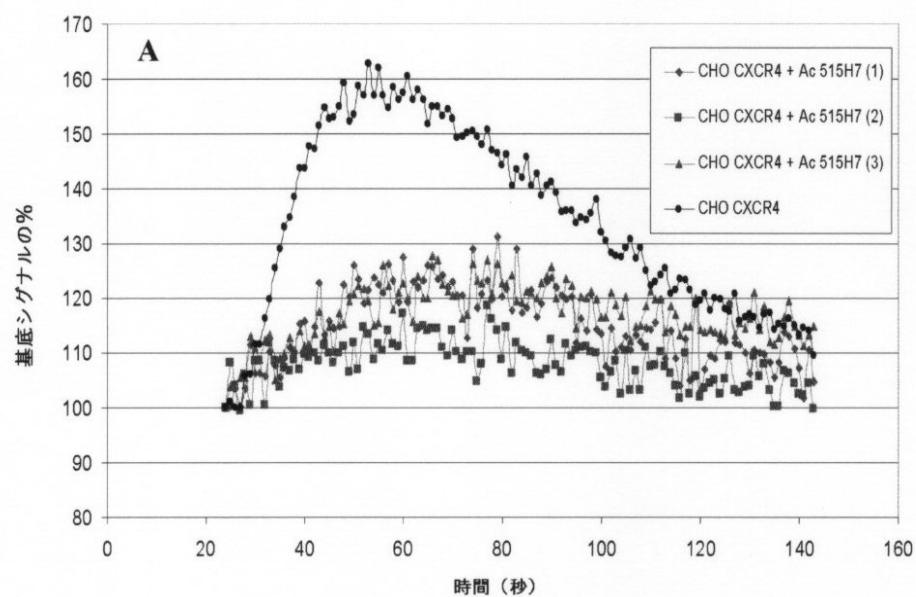


B

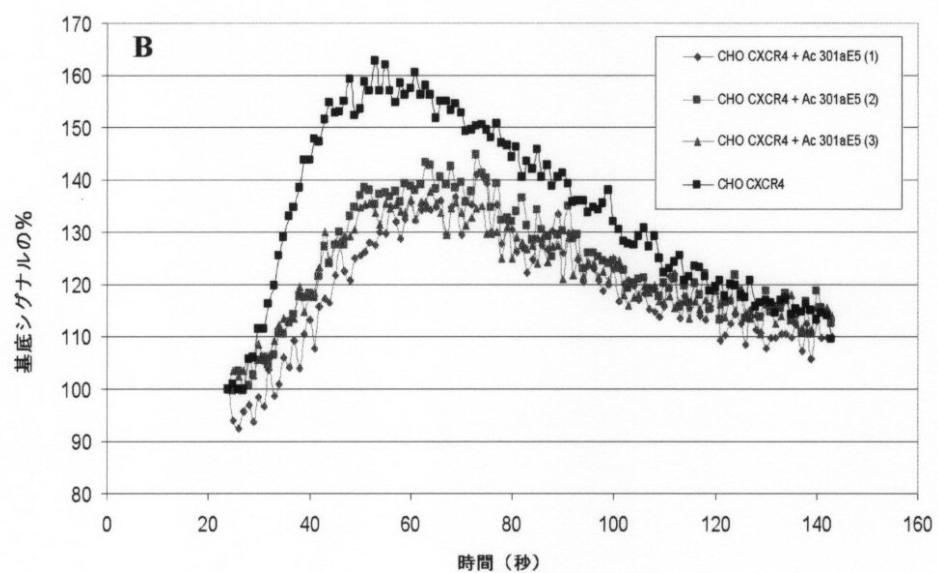
【図5】



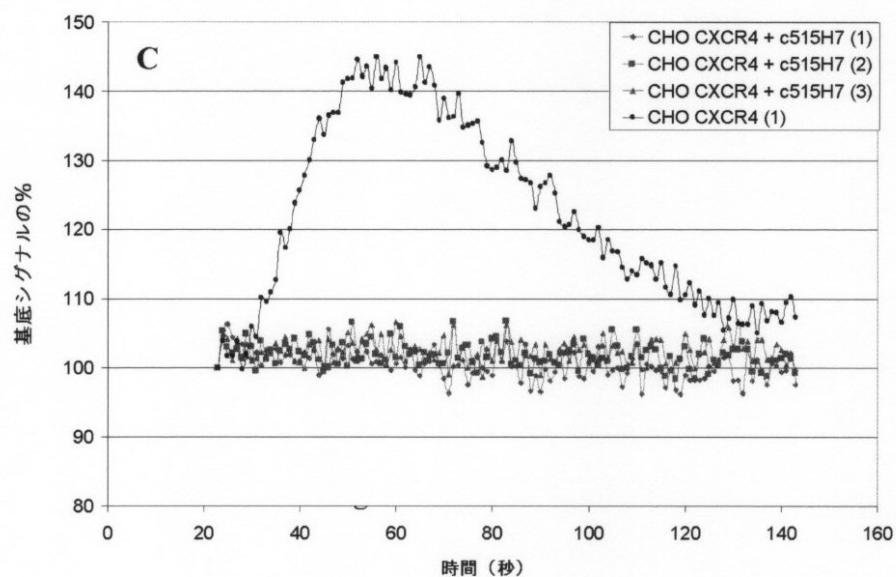
【図6 A】



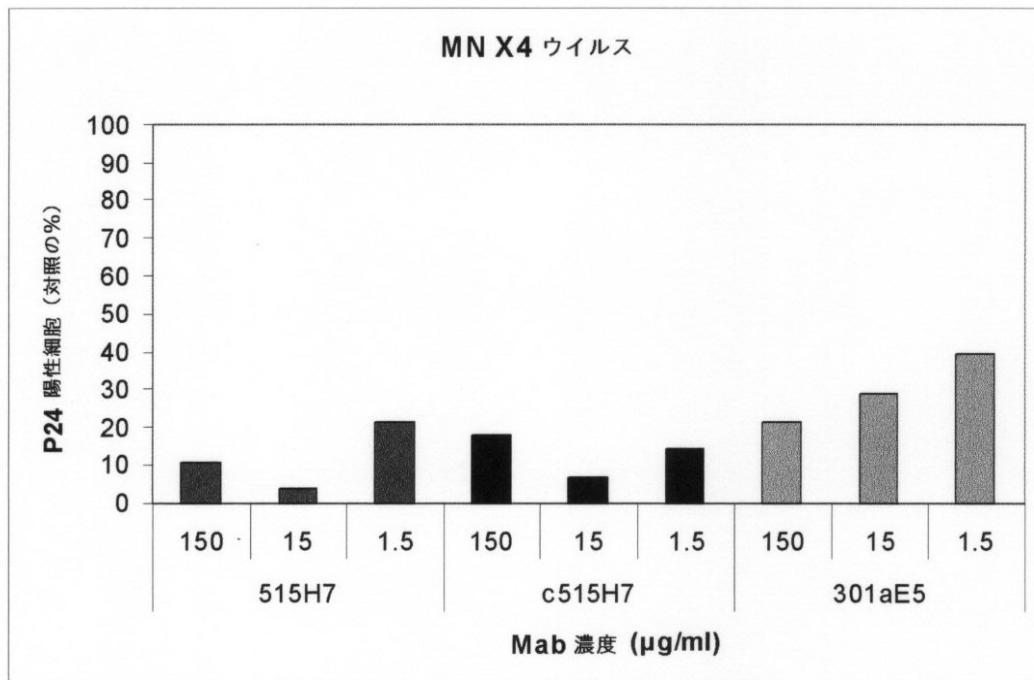
【図 6 B】



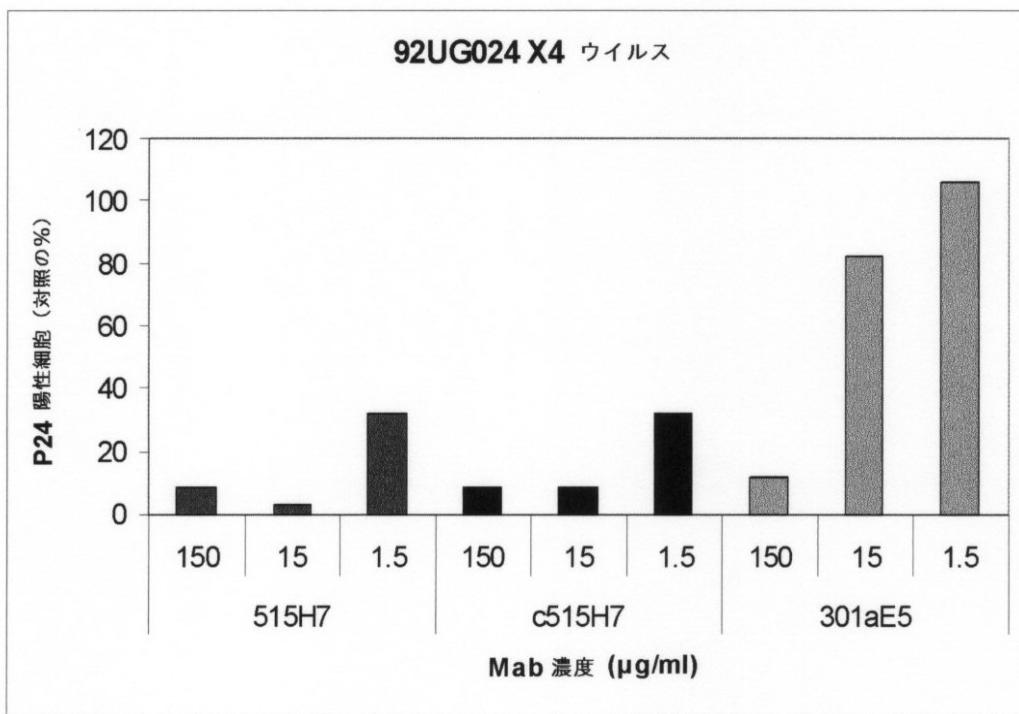
【図 6 C】



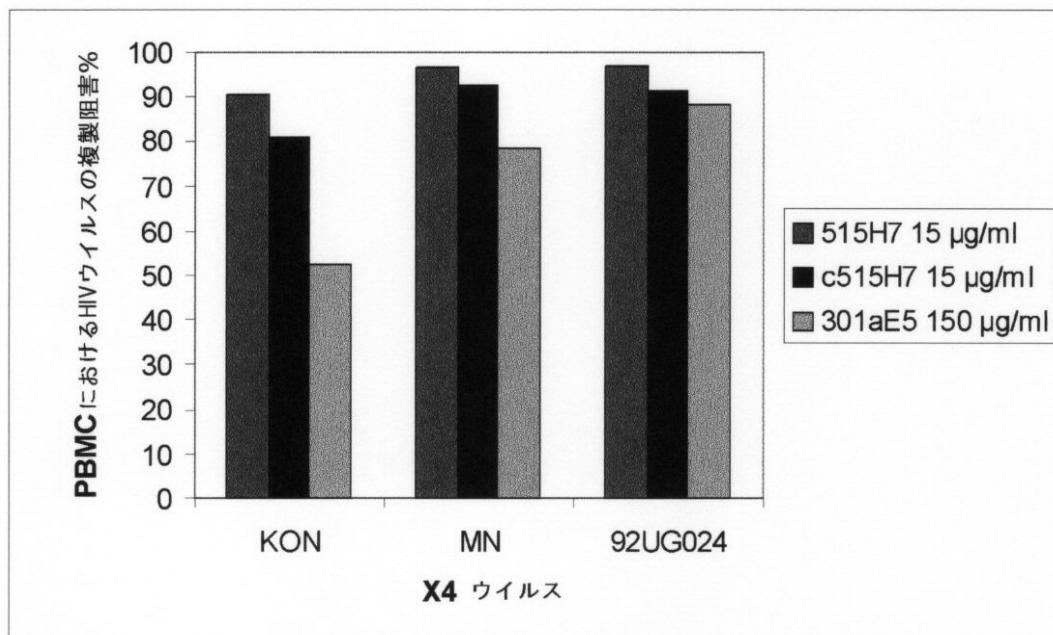
【図7】



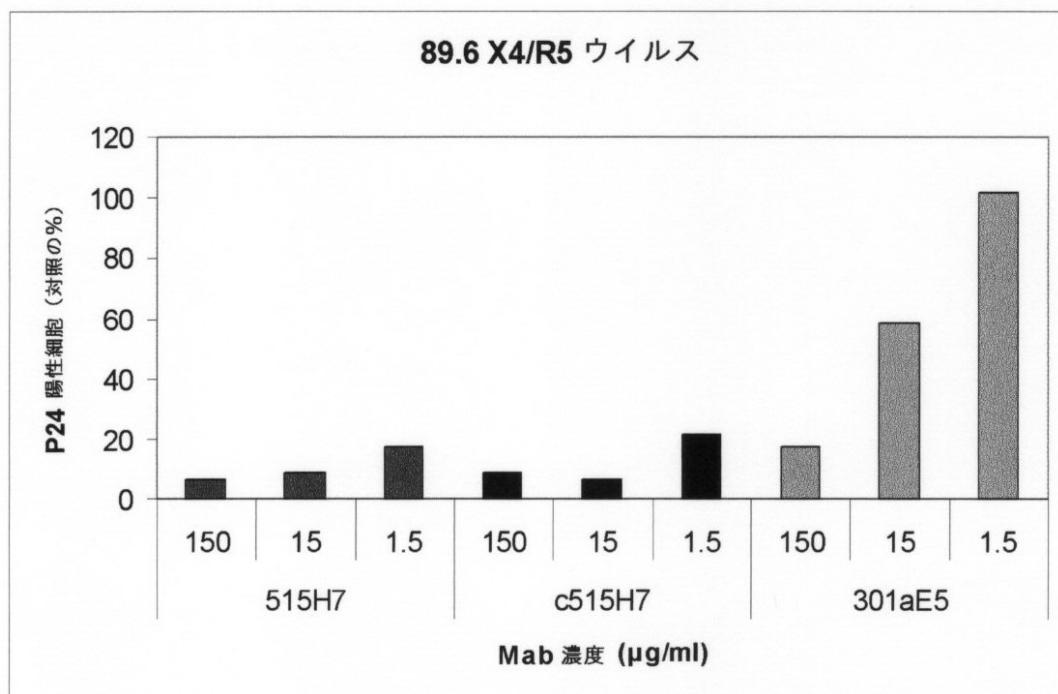
【図8】



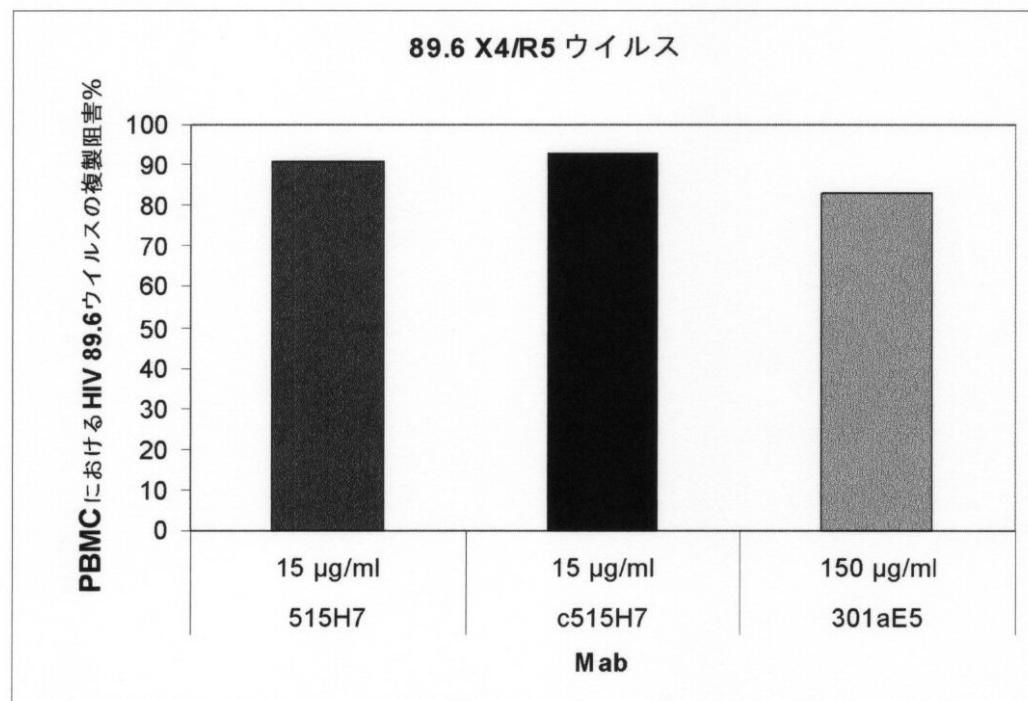
【図9】



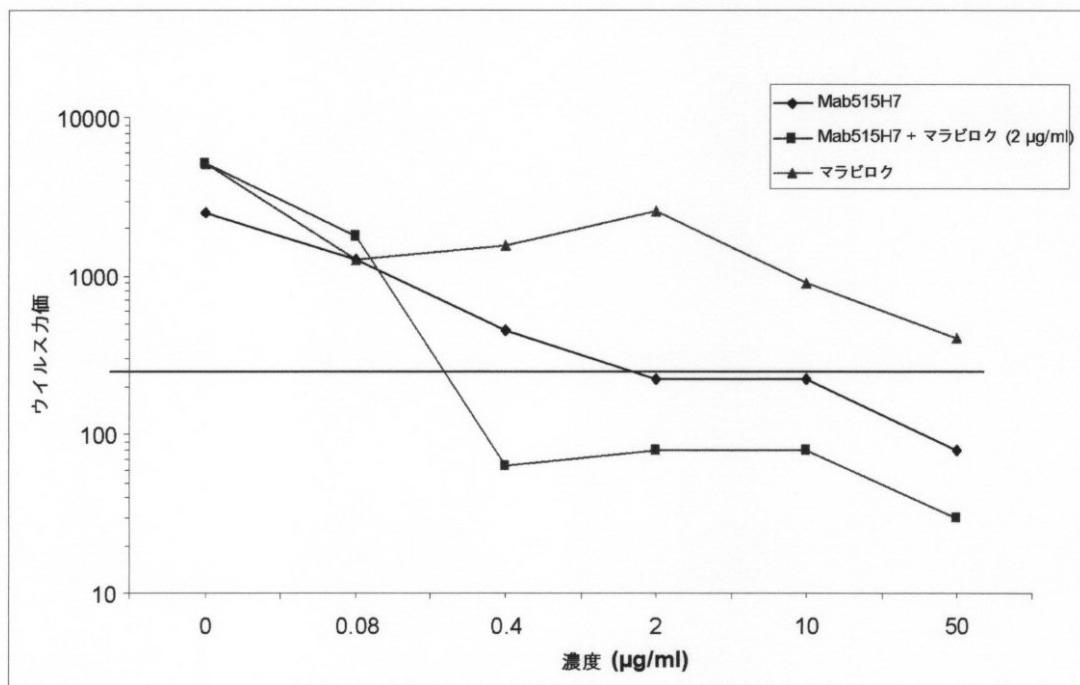
【図10】



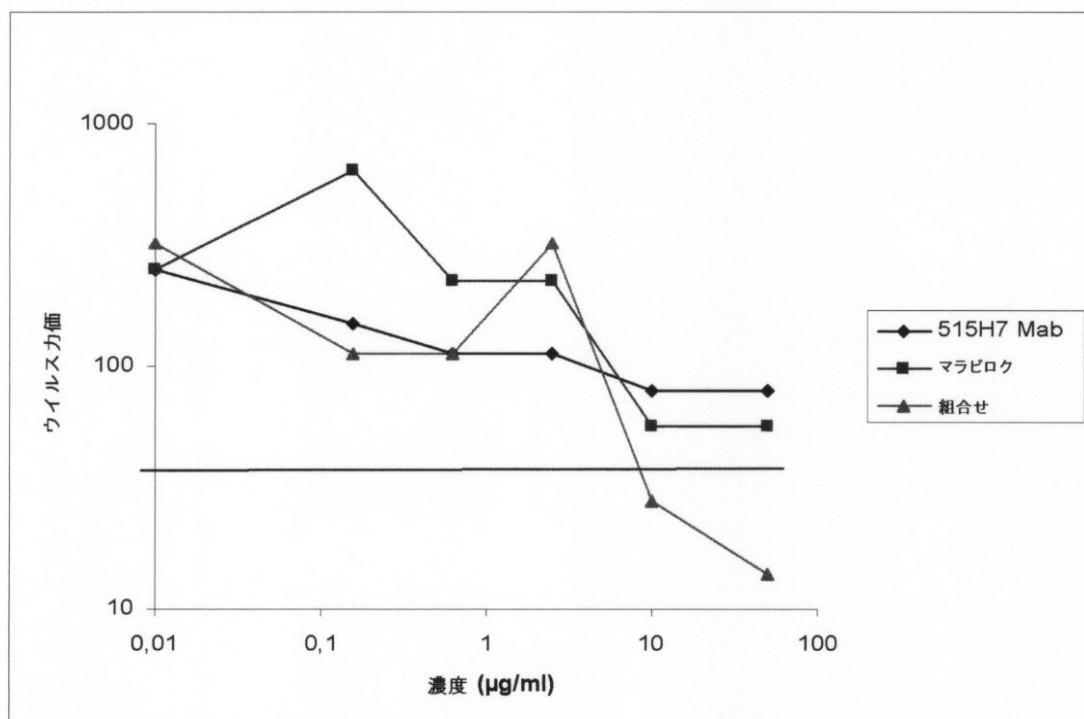
【図 1 1】



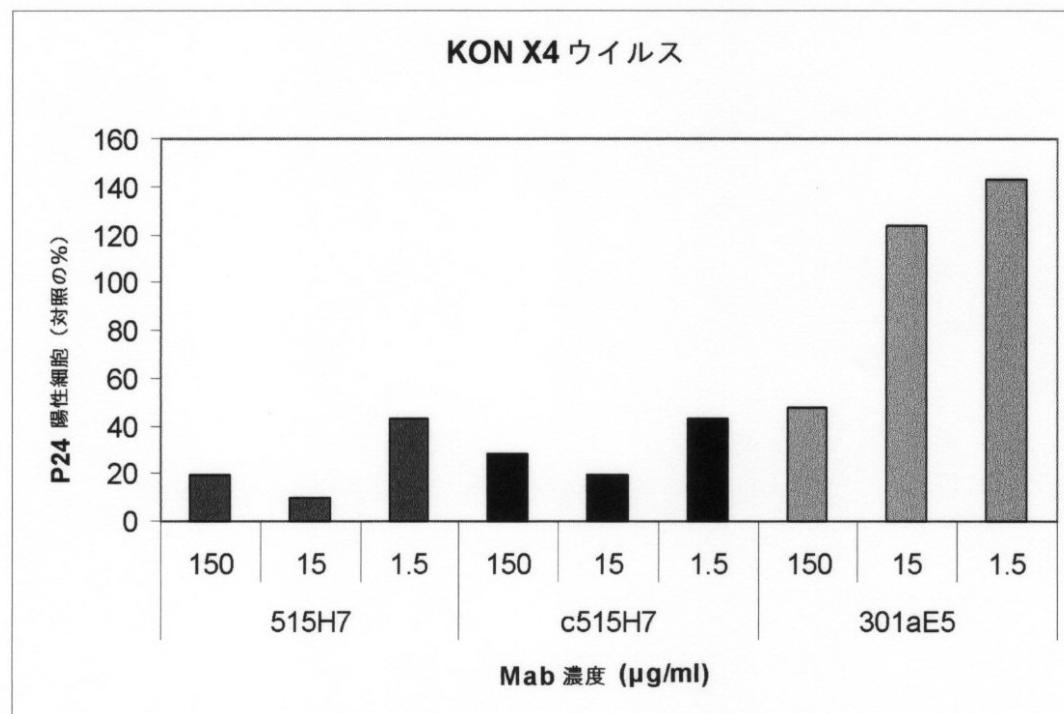
【図 1 2】



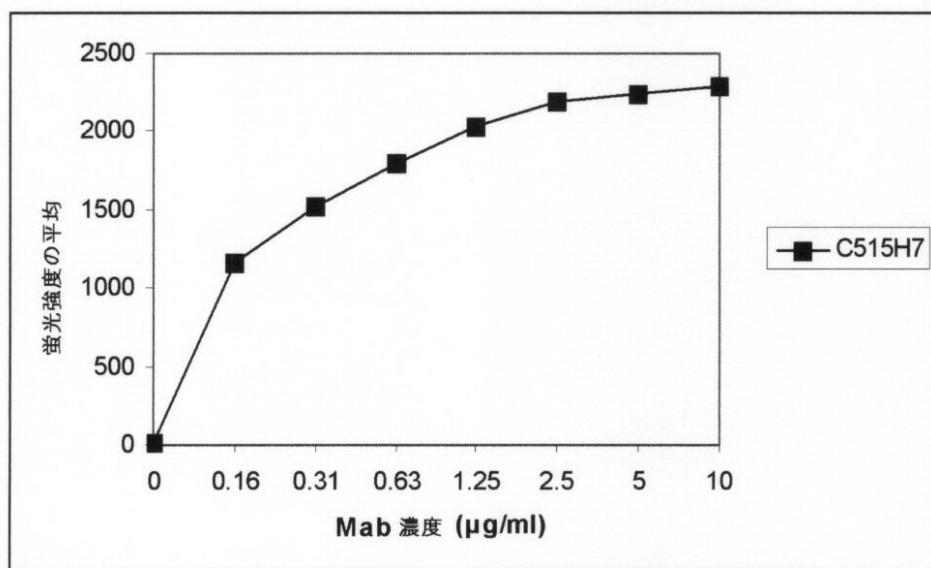
【図 1 3】



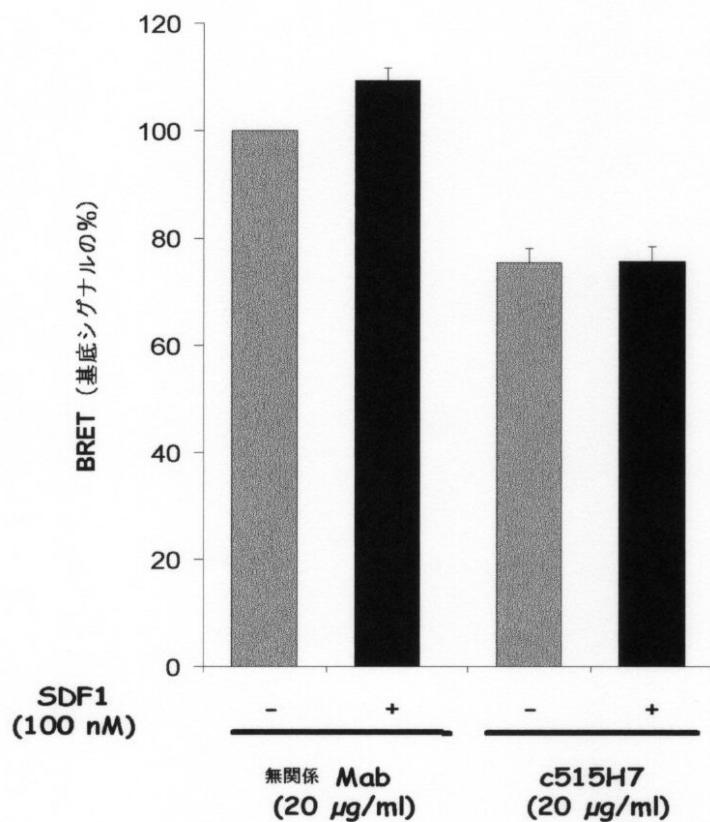
【図 1 4】



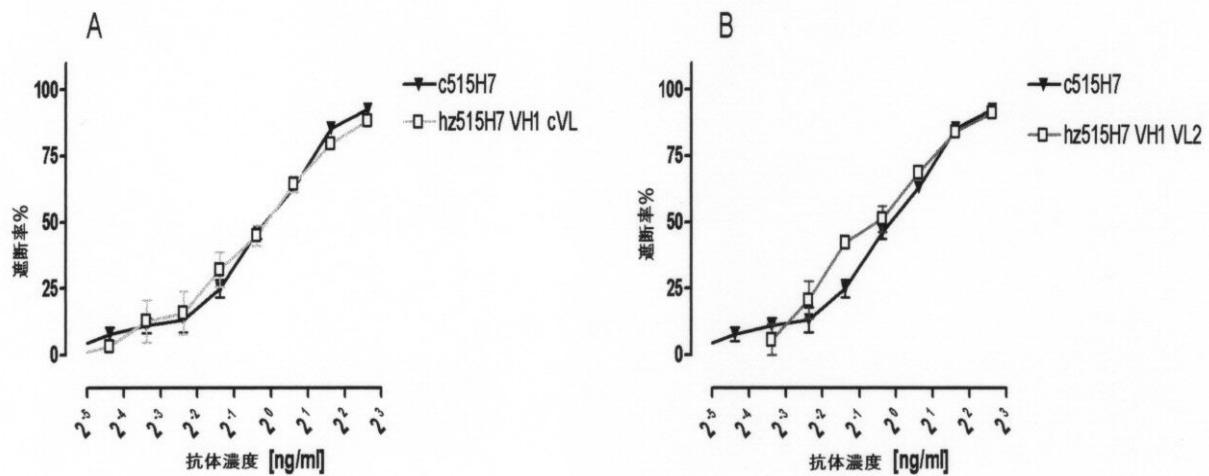
【図 1 5】



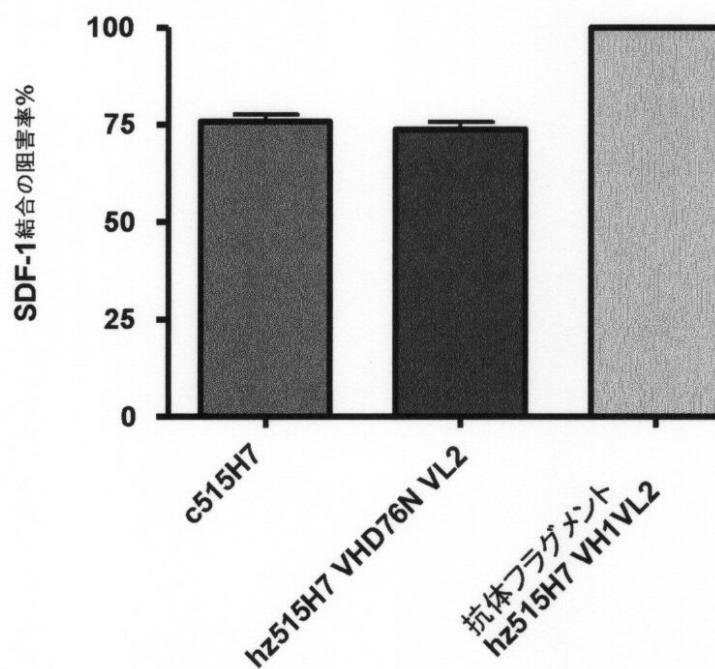
【図 1 6】



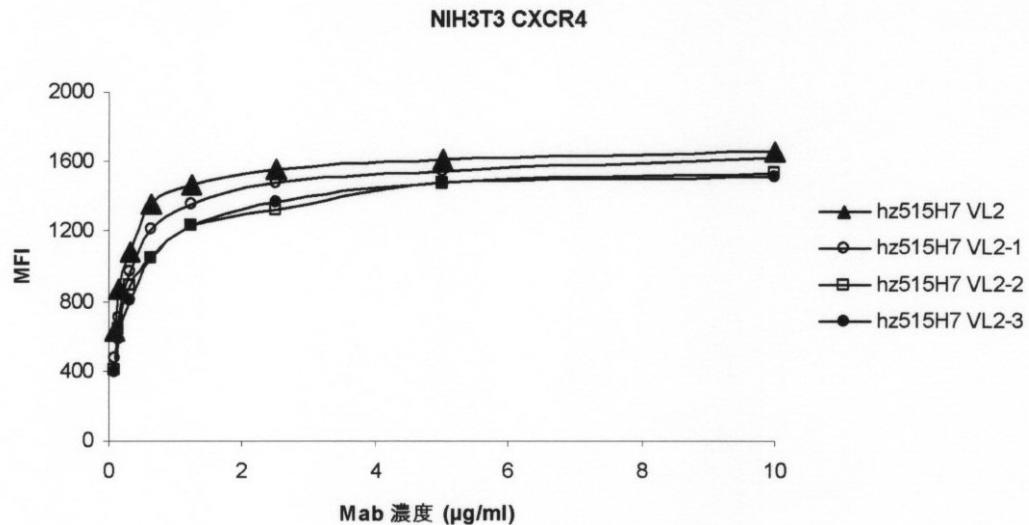
【図 19】



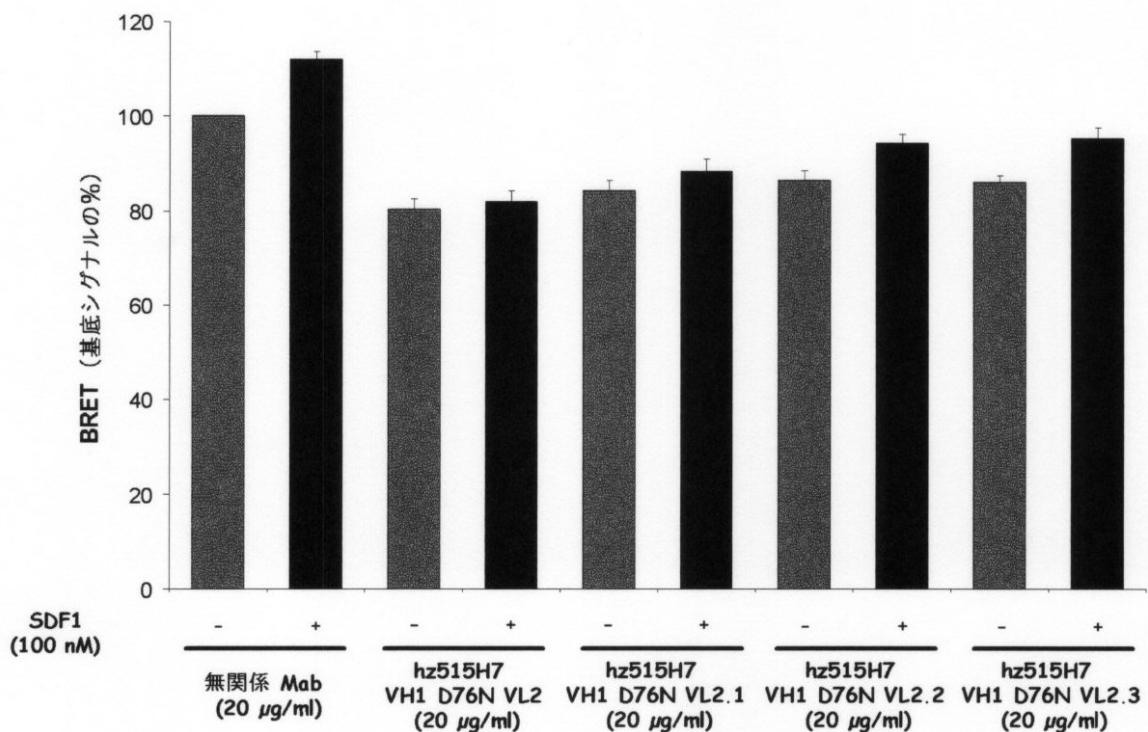
【図 20】



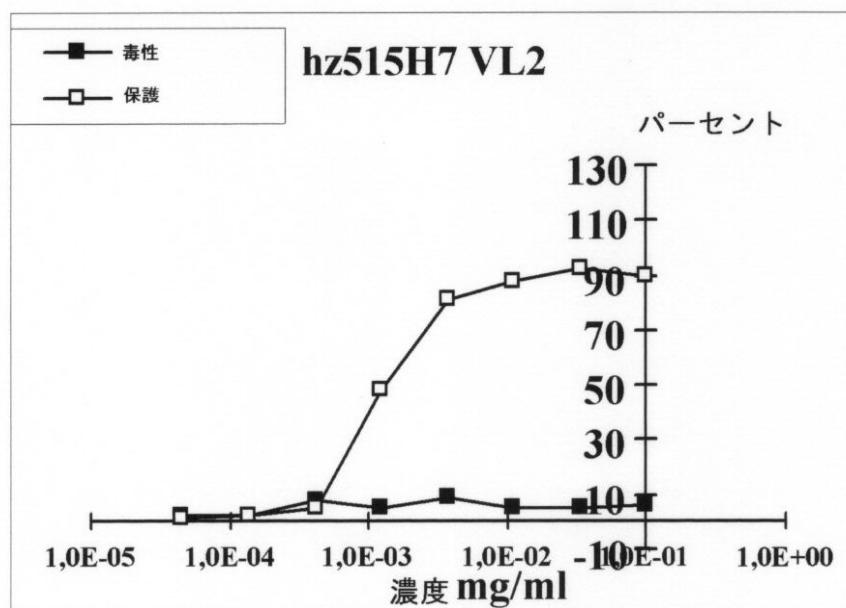
【図 2 1】



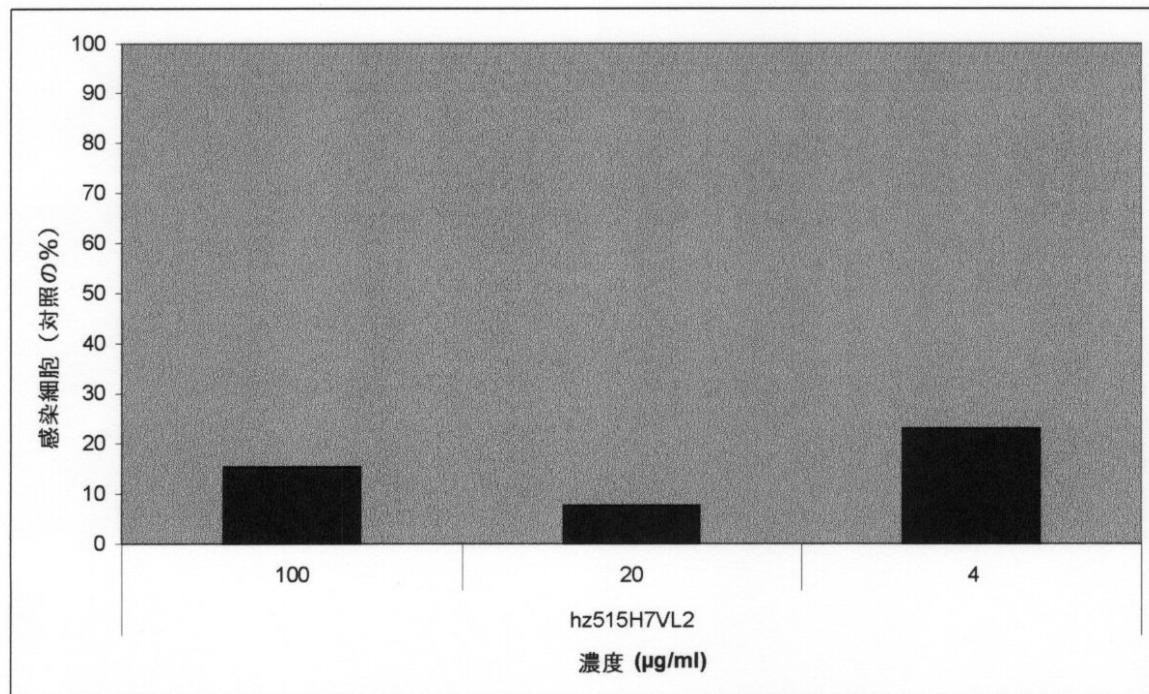
【図 2 2】



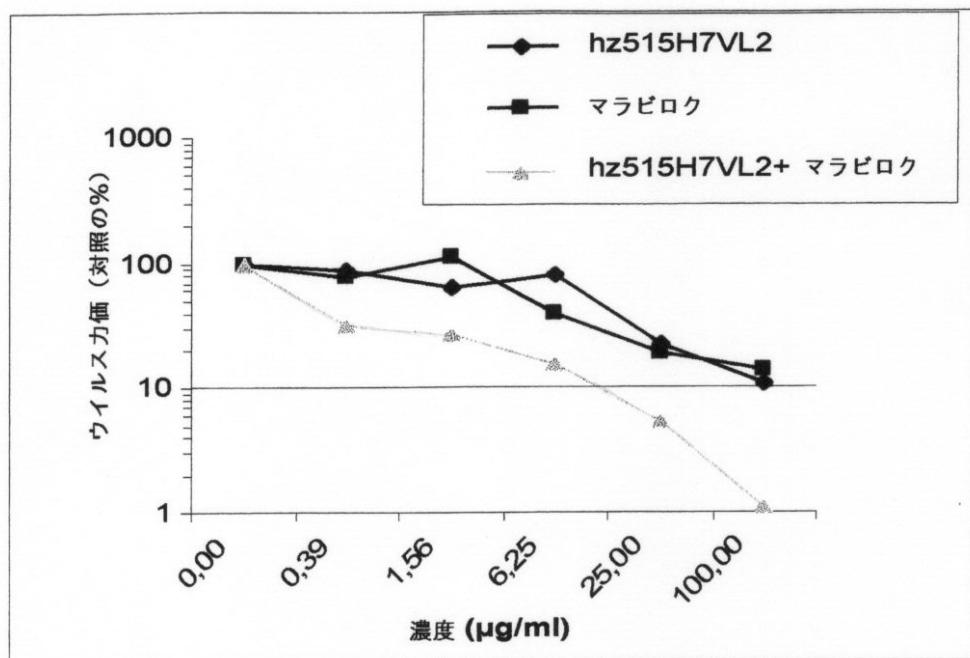
【図23】



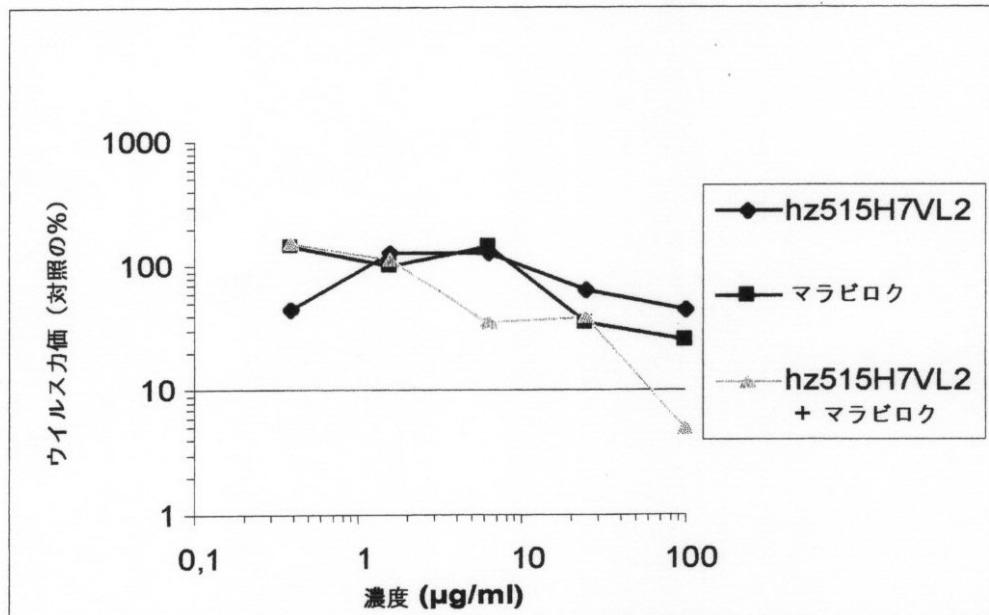
【図24】



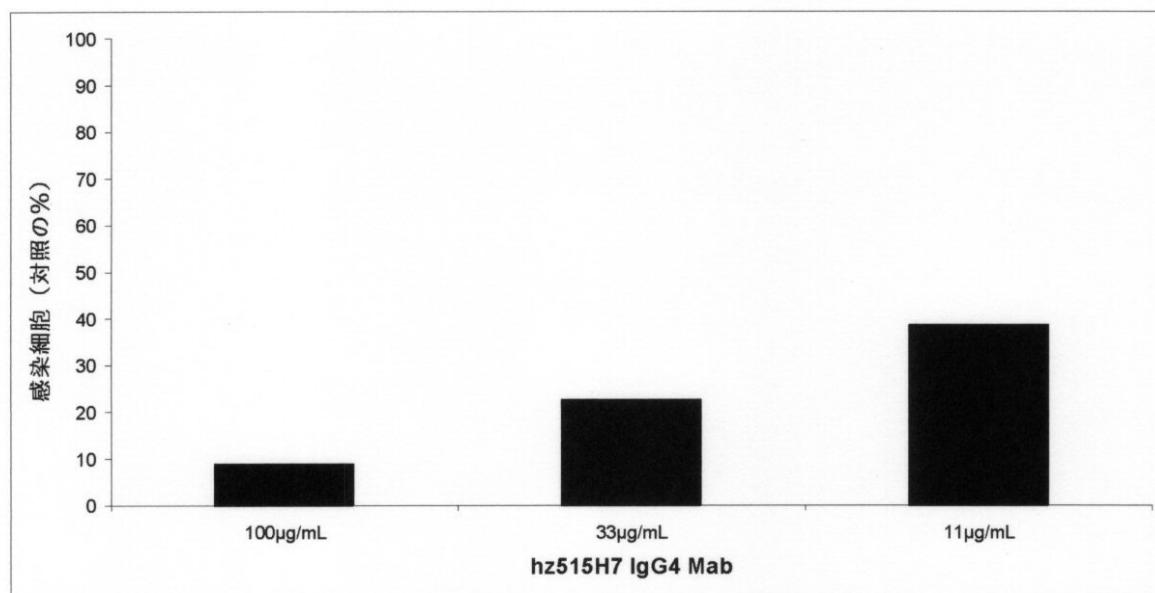
【図 2 5】



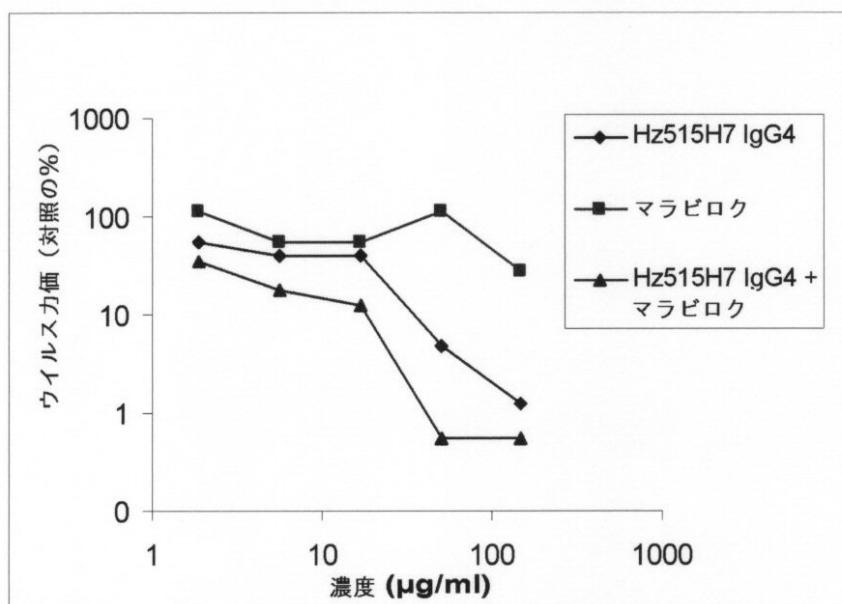
【図 2 6】



【図27】



【図28】



【配列表】

2014504147000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/068905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P31/18
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

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 172 485 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 7 April 2010 (2010-04-07) the whole document -----	1-26, 28-32
X, P	EP 2 246 364 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 3 November 2010 (2010-11-03) the whole document -----	1-32
L	EP 2 371 863 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 5 October 2011 (2011-10-05) the whole document -----	1,2,5,7, 11-20
X, P		-/-
L		

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

21 February 2012

09/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marinoni J-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/068905

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REEVES J D ET AL: "The second extracellular loop of CXCR4 is involved in CD4-independent entry of human immunodeficiency virus type 2", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 79, no. 7, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 1793-1799, XP002290004, ISSN: 0022-1317 -----	1-32
A	CARNEC XAVIER ET AL: "Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 79, no. 3, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 1930-1933, XP002518542, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.3.1930-1933.2005 -----	1-32
A	BARIBAUD FREDERIC ET AL: "Antigenically distinct conformations of CXCR4", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 19, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 8957-8967, XP002234668, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.19.8957-8967.2001 -----	1-32
A	TANAKA R ET AL: "Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 23, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 11534-11543, XP002548956, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.23.11534-11543.2001 cited in the application ----- -/-	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/068905

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STRIZKI J M ET AL: "A monoclonal antibody (12G5) directed against CXCR-4 inhibits infection with the dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate HIV-1(89.6) but not the T-tropic isolate HIV-1(HxB)", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, [Online] vol. 71, no. 7, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 5678-5683, XP002548957, ISSN: 0022-538X</p> <p>Retrieved from the Internet: URL:http://jvi.asm.org/cgi/reprint/71/7/5678.pdf</p> <p>-----</p> <p>REY-CUIILLE M A ET AL: "Conserved CXCR4 usage and enhanced replicative capacity of HIV-2/287, an isolate highly pathogenic in Macaca nemestrina", AIDS, LONDON, GB, vol. 15, no. 18, 7 December 2001 (2001-12-07), pages 2349-2357, XP002548958, ISSN: 0269-9370, DOI: 10.1097/00002030-200112070-00002</p> <p>-----</p> <p>WO 2004/059285 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; ZLOTNIK ALBERT [US]; LAW DEBBIE [US]; MU) 15 July 2004 (2004-07-15)</p> <p>-----</p> <p>MURGA JOSE D ET AL: "Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 50, no. 10, October 2006 (2006-10), pages 3289-3296, XP002670018, ISSN: 0066-4804</p> <p>-----</p>	1-32
A		1-32
A		1-32
A		1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/068905

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 2172485	A1 07-04-2010	AR 073748 A1		01-12-2010
		AU 2009299787 A1		08-04-2010
		CA 2738782 A1		08-04-2010
		CN 102209730 A		05-10-2011
		EP 2172485 A1		07-04-2010
		EP 2342233 A1		13-07-2011
		KR 20110081229 A		13-07-2011
		TW 201018483 A		16-05-2010
		US 2011020218 A1		27-01-2011
		US 2011287451 A1		24-11-2011
		US 2011294156 A1		01-12-2011
		WO 2010037831 A1		08-04-2010
<hr/>				
EP 2246364	A1 03-11-2010	AU 2010243526 A1		22-12-2011
		CA 2759989 A1		04-11-2010
		EP 2246364 A1		03-11-2010
		EP 2424897 A1		07-03-2012
		SG 175353 A1		28-11-2011
		US 2011088104 A1		14-04-2011
		WO 2010125162 A1		04-11-2010
<hr/>				
EP 2371863	A1 05-10-2011	EP 2371863 A1		05-10-2011
		WO 2011121040 A1		06-10-2011
<hr/>				
WO 2004059285	A2 15-07-2004	AU 2003299747 A1		22-07-2004
		US 2005002939 A1		06-01-2005
		WO 2004059285 A2		15-07-2004
<hr/>				

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 S	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/46 (2006.01)	A 6 1 K 31/46	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

F ターム(参考) 2G045 AA24 FB03

4B024 AA01	AA11	BA44	BA53	CA07	DA02	EA04	GA03
4B063 QA18	QQ98	QR48	QR77	QS33	QX01		
4B064 AG27	CA10	CA19	CA20	CC24	DA01	DA13	
4B065 AA91X	AA91Y	AB01	AC14	BA02	CA25	CA44	CA46
4C084 AA19	MA02	MA52	MA56	MA66	NA05	NA14	ZB33 ZC75
4C085 AA14	CC02	DD62	DD63	EE01	EE03	GG02	GG03 GG04 GG05
						GG06	GG08
4C086 AA01	AA02	CB15	MA02	MA04	MA52	MA56	MA66 NA05 NA14
						ZB33	ZC75
4H045 AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	DA76	EA29	FA74