

(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 I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28	4 B O 2 4
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 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
(86) (22) 出願日	平成23年10月27日 (2011. 10. 27)		ビエール、ファール、メディカマン
(85) 翻訳文提出日	平成25年6月24日 (2013. 6. 24)		フランス国ブローニュ、ビヤンクール、ブ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/068905		ラス、アベル、ガンス、4 5
(87) 国際公開番号	W02012/055980	(74) 代理人	100117787
(87) 国際公開日	平成24年5月3日 (2012. 5. 3)		弁理士 勝沼 宏仁
(31) 優先権主張番号	12/913, 300	(74) 代理人	100091487
(32) 優先日	平成22年10月27日 (2010. 10. 27)		弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
		(74) 代理人	100176083
			弁理士 松山 祐子
		(72) 発明者	クリスティーヌ、クリンゲル-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、7 3
			最終頁に続く

(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】

I M G T 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 3 0 ~ 3 3 のアミノ酸配列を含んでなる C D R から選択される少なくとも一つの相補性決定領域 C D R 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 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 5 6、5 7 または 5 8 からなる群から選択される配列の重鎖と、配列番号 5 9 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 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、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 6 7、6 8 または 6 9 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 7】

機能的フラグメントが、フラグメント F v、s c F v、F a b、F (a b ')₂、F a b '、s c F v - F c、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。

30

【請求項 8】

配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含んでなる s c F v 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 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 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 ~ 1 0 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

h) 高ストリンジェ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。

【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。

【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5 μg/ml、好ましくは少なくとも10 μg/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。

【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

10

20

30

40

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(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。

【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。

【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。

【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】

【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

10

20

30

40

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CX₂C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CCRおよびCX₂CR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CX₂CR4である。T細胞指向性(T-cell tropic)X₄HIV-1は細胞への侵入にCD4とCX₂CR4を用いるが、マクロファージ指向性(macrophage-tropic)R5HIV-1はCD4とCCR5を用いる。二重指向性株は、CX₂CR4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、CX₂CR6、CX₂CR7、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。

【0004】

CX₂CR4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)(CELESENTRI(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、CX₂CR4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CX₂CR4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。

【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Tyr21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)。

【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。CX₂CR4は、白血球輸送、B細胞のリンパ球生成、および骨髓造血に重要な役割を果たす。

【0007】

これまでに記載されているCX₂CR4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、骨髓、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。CX₂CR4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。

【0008】

従前に記載されているように、CX₂CR4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】

10

20

30

40

50

本発明の発明面の一つは、H I V複製を阻害するマウスモノクローナル抗体 (M a b) を作製することである。本発明は、C X C R 4 ホモ二量体と結合することができ、かつ、H I V 感染に対して強い活性を有するC X C R 4 M a b 5 1 5 H 7 (またはそのフラグメント) を包含する。本発明はまた、C X C R 4 ホモ二量体と結合することができ、かつ、H I V 感染に対して強い活性を有するC X C R 4 M a b 3 0 1 a E 5 (またはそのフラグメント) を包含する。

【 0 0 1 0 】

驚くべきことに、本発明者らは、C X C R 4 と結合することができるだけでなく、C X C R 4 ホモ二量体のコンフォメーション変化を誘導することができ、かつ、P B M C におけるX 4 - H I V - 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、P B M C におけるX 4 / R 5 - H I V - 1 一次単離物の複製を阻害することもできる。

【 0 0 1 1 】

好ましくは、C X C R 4 化合物は、

G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 3 4 5 8 配列番号 2 7 :

MEG I S I Y T S D N Y T E E M G S G D Y D S M K E P C F R E E N A N F N K I F L P T I Y S I I F L T G I V G N G L V I L V M G Y Q K K L R S M T D K Y R L H L S V A D L L F V I T L P F W A V D A V A N W Y F G N F L C K A V H V I Y T V N L Y S S V L I L A F I S L D R Y L A I V H A T N S Q R P R K L L A E K V V Y V G V W I P A L L L T I P D F I F A N V S E A D D R Y I C D R F Y P N D L W V V F Q F Q H I M V G L I L P G I V I L S C Y C I I I S K L S H S K G H Q K R K A L K T T V I L I L A F F A C W L P Y Y I G I S I D S F I L L E I I K Q G C E F E N T V H K W I S I T E A L A F F H C C L N P I L Y A F L G A K F K T S A Q H A L T S V S R G S S L K I L S K G K R G G H S S V S T E S E S S S F H S S、

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]、

G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 1 0 0 8 5 4 0 配列番号 2 8 :

M S I P L P L L Q I Y T S D N Y T E E M G S G D Y D S M K E P C F R E E N A N F N K I F L P T I Y S I I F L T G I V G N G L V I L V M G Y Q K K L R S M T D K Y R L H L S V A D L L F V I T L P F W A V D A V A N W Y F G N F L C K A V H V I Y T V N L Y S S V L I L A F I S L D R Y L A I V H A T N S Q R P R K L L A E K V V Y V G V W I P A L L L T I P D F I F A N V S E A D D R Y I C D R F Y P N D L W V V F Q F Q H I M V G L I L P G I V I L S C Y C I I I S K L S H S K G H Q K R K A L K T T V I L I L A F F A C W L P Y Y I G I S I D S F I L L E I I K Q G C E F E N T V H K W I S I T E A L A F F H C C L N P I L Y A F L G A K F K T S A Q H A L T S V S R G S S L K I L S K G K R G G H S S V S T E S E S S S F H S S、

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 2 7 または 2 8 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 9 5 % 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 (S D F - 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 1 0 0、1 5 0、および 2 0 0 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 C X C R 4 イソ型のうちの一つである。

【 0 0 1 2 】

C X C R 2 は、

G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 1 5 4 8 配列番号 2 9 :

M E D F N M E S D S F E D F W K G E D L S N Y S Y S S T L P P F L L D A A P C E P E S L E I N K Y F V V I I Y A L V F L L S L L G N S L V M L V I L Y S R V G R S V T D V Y L L N L A L A D L L F A L T L P I W A A S K V N G W I F G T F L C K V V S L L K E V N F Y S G I L L L A C I S V D R Y L A I V H A T R T L T Q K R Y L V K F I C L S I W G L S L L L A L P V L L F R R T V Y S S N V S P A C Y E D M G N N T A N W R M L L R I L P Q S F G F I V P L L I M L F C Y G F T L R T L F K A H M G Q K H R A M R V I F A V V L I F L L C W L P Y N L V L L A D T L M R T Q V I Q E T C E R R N H I D R A L D A T E I L G I L H S C L N P L I Y A F I G Q K F R H G L L K I L A I H G L I S K D S L P K D S R P S F V G S S S G H T S T T L、

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 2 9 を有するこのインターロイキン 8 受容体 と少なくとも 9 5 % 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

I L - 8 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 1 0 0、1 5 0、および 2 0 0 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。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、抗H I V活性を有するか、またはH I V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、H I V複製を阻害することができる抗C X C R 4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、C X C R 4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(P B M 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、C X C R 4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、P B M CにおけるX 4指向性H 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 6 】

別の実施態様では、本発明は、H I V複製を阻害することができる抗C X C R 4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、C X C R 4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(P B M 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、C X C R 4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、P B M CにおけるX 4指向性H I V - 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P B M CにおいてX 4 / R 5指向性H 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、骨髓腫細胞と免疫マウスまたは選択された骨髓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、直接ヒト抗体を産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イ技術の使用からなるものであり得る。

【 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、E L I S A、B I A c o r e、免疫組織化学、C X C R 4発現細胞膜抽出物または精製C X C R 4を用いたウエスタンブロット解析、F A C S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、産生された抗体が、標的細胞表面において本来のC X C R 4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、C X C R 4形質転換体(工程1)および少なくともP B M C(工程2)に対するF A C S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

10

20

30

40

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、C X C R 4 トランスフェクト細胞または P B M 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ブロット法および / または免疫沈降法が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

スクリーニング工程 i v) 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ル (J. Immunol. 2004, 173, 6274-83) を用いることにより、P B M C に おける X 4 一次 H I V - 1 単離物および / または X 4 / R 5 一次 H I V - 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

【 0 0 2 1 】

本発明の方法の選択の工程 i i i) の好ましい実施態様では、この工程 i i i) は、C X C R 4 - R L u c / C X C R 4 - Y F P を発現する細胞に対する B R E T 分析によって抗体を評価すること、および B R E T シグナルの少なくとも 4 0 %、好ましくは 4 5 %、5 0 %、5 5 %、最も好ましくは 6 0 % を阻害することができる抗体を選択することからなる。

【 0 0 2 2 】

B R E T 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]。

【 0 0 2 3 】

本方法の工程 i i i) に用いられる B R E T 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、B R E T (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 (R l u c)) と、蛍光受容体である G F P (緑色蛍光タンパク質) または Y F P (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的エネルギー移動である。本ケースでは、E Y F P (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 ~ 1 0 n m) 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 G F P 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、R l u c は青色の光を放出する。G F P 突然変異体が R l u c から 1 0 n m 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。B R E T 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、B R E T 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 R l u c と、G F P 突然変異体とを近接させるほど増大する。

20

30

【 0 0 2 4 】

B R E T 分析が好ましい実施態様からなる場合、C X C R 4 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: F R E T (蛍光共鳴エネルギー移動)、H T R F (均一時間分解蛍光)、F L I M (蛍光寿命画像測定法) または S W - F C C S (単波長蛍光相関分光法)。

40

【 0 0 2 5 】

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、アフィニティークロマトグラフィー、E L I S A、またはファーウエスタンブロットなどの他の従来法も使用可能である。

【 0 0 2 6 】

本発明による方法の特定の面では、工程 i i i) は、C X C R 4 - R L u c / C X C R 4 - Y F P の両者を発現する細胞に対する B R E T 分析によって抗体を評価すること、および B R E T シグナルの少なくとも 4 0 % 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CXCR4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(X4HIV-1_{NL4-3})のPBMCへの侵入を阻害することができることが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PBMC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。

10

【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】

20

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。

30

【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。

40

【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(sc=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。

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 】

好ましい実施形態によれば、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、単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単一のエピトープに対するものである。

【 0 0 3 9 】

より詳細には、本発明の第一の好ましい実施形態によれば、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。

【 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。

【 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 】

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

10

20

30

40

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30のアミノ酸配列を含んでなる。

【0044】

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30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30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

【0045】

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30のアミノ酸配列を含んでなる。

【0046】

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34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34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

【0047】

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。

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

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。

【0051】

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 】

10

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。

20

【 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。

30

【 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。

40

【 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 】

50

第一の実施態様において、相補性決定領域またはCDR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CDRと、三つの軽鎖CDRとが存在する。ここで、「CDR」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。

【0062】

第二の実施態様において、CDR領域またはCDRは、IMGT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

【0063】

IMGT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)]。IMGTユニークナンバリングでは、例えば、システイン23(1st-CYS)、トリプトファン41(CONSERVED-TRP)、疎水性アミノ酸89、システイン104(2nd-CYS)、フェニルアラニン、またはトリプトファン118(J-PHEまたはJ-TRP)など、保存されているアミノ酸は常に同じ位置を持つ。IMGTユニークナンバリングでは、フレームワーク領域(FR1-IMGT: 1~26番、FR2-IMGT: 39~55番、FR3-IMGT: 66~104番およびFR4-IMGT: 118~128番)および相補性決定領域: CDR1-IMGT: 27~38番、CDR2-IMGT: 56~65番およびCDR3-IMGT: 105~117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、CDR-IMGT長(例えば、[8.8.13]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。IMGT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2D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MHC構造データ」. Nucl. Acid s. Res., 32, D208-D210 (2004)]に用いられる。

20

30

【0064】

三つの重鎖CDRと、三つの軽鎖CDRとが存在する。ここで、CDR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。

【0065】

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、CDRはIMGT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。

40

【0066】

IMGTナンバリングシステムは、上記で定義されたIMGTシステムに従ってCDR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CDRを定義する。

【0067】

より詳細には、515H7と呼ばれる抗体に関しては、CDR-L1はIMGT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。CDR-L2に関しては、IMGT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10からなる。CDR-L3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、CD

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、この割合は純粹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、Neddleman 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, 1999, 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 】

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CDR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。

【0079】

また、本発明に記載されるCDR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CDR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る。

【0080】

一般に、当業者は、元の抗体に由来するCDR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、NMR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
- 産生、発現、および精製が容易なこと。

【0081】

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、フィブロネクチンおよび優先的にはフィブロネクチンIII型ドメイン10、リボカリン、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。

【0082】

例えば、サソリ、昆虫、植物、軟体動物などの毒素、およびニューロンノシンターゼ(PIN)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。

【0083】

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、PINのループの一つにおける抗CD4抗体、すなわち13B8.2のCDR-H1(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VHH抗体のCDR-H3(重鎖)をグラフトすることも挙げられる。

【0084】

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CDR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CDR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CDR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)。

【0085】

本発明の特定的面は、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HIV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CDR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CDR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

物を、H I V 1 型とP B M 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H I V - 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C D R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C D R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化合物をin vitroで接触させることを含み得る。

【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。

【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) 安定性を变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。

【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) フィブロネクチンに由来する骨格、優先的にはフィブロネクチン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i i i) ニューロンN Oシンターゼ(P I N)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。

【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F v、F a b、(F a b')₂、F a b'、s c F v、s c F v - F c、およびダイアボディ、またはP E G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。

【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F v、s c F v (s c = 一本鎖)、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、またはポリエチレングリコール(P E G化)などのポリアルキレングリコールの付加といった化学修飾によって(P E G化フラグメントは、F v - P E G、s c F v - P E G、F a b - P E G、F (a b')₂ - P E GおよびF a b' - P E Gと呼ばれる)、またはリポソーム、ミクロスフェア、またはP L G A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C D Rの少なくとも一つを有する。

10

20

30

40

50

【0094】

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1/100、より好ましくは少なくとも1/10の親和性を保持するのに十分なものでありうる。

【0095】

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、10、15、25、50、または100個の連続するアミノ酸を含みうる。

10

【0096】

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、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc、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。

【0097】

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る。

20

【0098】

【表 2】

表 2 (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	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
			Mu. 可変ドメイン	7
		Mu. 可変ドメイン		8
301aE5	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	30
		CDR-H1		31
		CDR-H2		32
		CDR-H3		33
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	36
			CDR-L3	37
		CDR-H1		38
		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（ADCC）および／または補体依存性細胞傷害性（CDC）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、FcR（I、II、もしくはIII）に対して、またはC1q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、またはリボ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、ADCCを欠いているフラグメントである。

【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。

【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。

【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、Verhoeynら(BioEssays, 8:74, 1988)を参照。

【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】

10

20

30

40

【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

10

【0113】

この抗体 c 5 1 5 H 7 重鎖配列番号 5 6 ~ 5 8 および軽鎖配列番号 5 9 に相当するヌクレオチド配列はそれぞれ、配列番号 6 0 ~ 6 3 (重鎖) および配列番号 6 4 (軽鎖) の配列に相当する。

【0114】

20

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 4 K、pConPlus 4 PRO K、および pConPlus 2 K 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 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. 「単一アミノ酸置換は、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]。

30

【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。

40

【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

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。

【 0 1 2 0 】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 5 6、5 7、または 5 8 からなる群から選択される配列の重鎖と、配列番号 5 9 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。

【 0 1 2 1 】

好ましい実施態様では、本発明によるキメラ抗体 c 5 1 5 H 7 V H (G 4 w t) / V L - 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 5 6 の配列の重鎖可変領域と、配列番号 5 9 の配列の軽鎖可変領域とを含んでなる。

10

【 0 1 2 2 】

好ましい実施態様では、本発明によるキメラ抗体 c 5 1 5 H 7 V H (G 4 P R O) / V L - 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 5 7 の配列の重鎖可変領域と、配列番号 5 9 の配列の軽鎖可変領域とを含んでなる。

【 0 1 2 3 】

好ましい実施態様では、本発明によるキメラ抗体 c 5 1 5 H 7 V H (G 2 w t) / V L - 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 5 8 の配列の重鎖可変領域と、配列番号 5 9 の配列の軽鎖可変領域とを含んでなる。

【 0 1 2 4 】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト起源の抗体に由来する C D R 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（F R 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

【 0 1 2 5 】

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ましい。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 0 4 5 1 2 6 1 号明細書、同第 0 6 8 2 0 4 0 号明細書、同第 0 9 3 9 1 2 7 号明細書、同第 0 5 6 6 6 4 7 号明細書、または米国特許第 5, 5 3 0, 1 0 1 号明細書、同第 6, 1 8 0, 3 7 0 号明細書、同第 5, 5 8 5, 0 8 9 号明細書、および同第 5, 6 9 3, 7 6 1 号明細書において P D L が記載している「C D R グラフト」法がある。米国特許第 5, 6 3 9, 6 4 1 号明細書または同第 5, 6 3 9, 6 4 1 号明細書または 6, 0 5 4, 2 9 7 号明細書、同第 5, 8 8 6, 1 5 2 号明細書、および同第 5, 8 7 7, 2 9 3 号明細書も引用することができる。

30

【 0 1 2 6 】

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

【 0 1 2 7 】

好ましい様式では、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 または好ましくは - 4 領域である。

【 0 1 2 8 】

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重鎖に関し、ここで、該 C D R は、I M G T 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 C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 からなる。

【 0 1 2 9 】

50

別の実施態様では、本発明は、配列番号 64 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。

【0130】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 67、68、69 および 95 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。

【0131】

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 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。

10

【0132】

別の実施態様では、本発明は、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可変領域を含んでなるヒト化抗体軽鎖に関する。

【0133】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 70、71、84、または 85 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。

【0134】

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 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 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。

20

【0135】

別の実施態様では、本発明は、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。

【0136】

さらに別の実施態様では、本発明は、配列番号 67、68、69 または 95 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に関する。

30

【0137】

好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2 - 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 67 の配列の重鎖と、配列番号 70 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0138】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2 - 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 68 の配列の重鎖と、配列番号 70 の配列の軽鎖とを含んでなる。

40

【0139】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2 - 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 69 の配列の重鎖と、配列番号 70 の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0140】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.1 - 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 67 の配列の重鎖と、配列番号 71 の配列の軽鎖とを含んでなる。

50

【0141】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.1 - 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68の配列の重鎖と、配列番号71の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0142】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.1 - 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69の配列の重鎖と、配列番号71の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0143】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.2 - 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67の配列の重鎖と、配列番号84の配列の軽鎖とを含んでなる。

10

【0144】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.2 - 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68の配列の重鎖と、配列番号84の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0145】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.2 - 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69の配列の重鎖と、配列番号84の配列の軽鎖とを含んでなる。

20

【0146】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.3 - 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67の配列重鎖と、配列番号85の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0147】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.3 - 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68の配列の重鎖と、配列番号85の配列の軽鎖とを含んでなる。

【0148】

別の好ましい実施態様では、本発明によるヒト化抗体 H₂515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.3 - 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69の配列の重鎖と、配列番号85の配列の軽鎖とを含んでなる。

30

【0149】

下表4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メインおよび全長（または完全）アミノ酸配列をまとめる。

【0150】

【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】

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 4 K、pConPlus 4 PRO K、およびpConPlus 2 Kに見られる)。

【0152】

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. 「単一アミノ酸置換は、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】

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】

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VH/VL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VHおよびVLを総て再配列することができるであろう。

【0156】

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、DNA、またはRNA、
- b) 配列番号14～19および41～45からなる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、および47からなる配列群から選択されるDNA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RNA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14～19および41～45の配列のCDRの少なくとも一つと高ストリンジェ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に関する。

【0157】

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る。

【0158】

10

20

【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
			Mu. 可変ドメイン	20
		Mu. 可変ドメイン		21
301aE5	IMGT		CDR-L1	41
			CDR-L2	15
			CDR-L3	42
		CDR-H1		43
		CDR-H2		44
		CDR-H3		45
	Kabat		CDR-L1	48
			CDR-L2	49
			CDR-L3	50
		CDR-H1		51
		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

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ェント条件、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】

高ストリンジェ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ェ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(20mM、pH7.5)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ェ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

30

【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トをコードする核酸、DNA、またはRNA、
 - d) a)、b)、またはc)に定義される核酸と相補的な核酸、
 - e) 高ストリンジェ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、
 - f) 高ストリンジェ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。

40

【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。

【 0 1 6 6 】

【 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

【 0 1 6 7 】

下表 7 に、本発明によるキメラ抗体 5 1 5 H 7 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。

【 0 1 6 8 】

【 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

【 0 1 6 9 】

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) 高ストリンジェ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もよい。

【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、用いることもできる。

【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の細胞侵入に関与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

【0187】

これらの二重特異性抗体は、完全なIgG、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。

【0188】

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

【0189】

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。

【0190】

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。

【0191】

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。

【0192】

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。

20

【0193】

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。

【0194】

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。

【0195】

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

【0196】

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。

【0197】

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

【0198】

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。

【0199】

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、C X C R 4 に対する抗体以外の抗 H I V 抗体または抗 H I V 細胞侵入抗体または抗 H I V 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 C C R 5、抗 C D 4 化合物、および抗 C X C R 4 化合物などの、H I V 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 H I V 化合物の中から選択される少なくとも一つの第二の抗 H I V 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 H I V 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、H I V 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 H I V 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 H I V 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 H I V 剤」とは、患者に投与した際に、患者における H I V 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、H I V プロテアーゼ阻害剤 (P I)、ヌクレオシド / ヌクレオチド H I V 逆転写酵素阻害剤 (N R T I / N t R T I)、非ヌクレオシド H I V 逆転写酵素阻害剤 (N N R T I)、H I V 侵入阻害剤、H I V 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、V I D A L の「抗 H I V 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、この文献の参考文献によって挙げられている抗 H I V 化合物は、本明細書において、限定的されない好ましい抗 H I V 剤として挙げられる。

【0210】

H I V プロテアーゼ阻害剤は、H I V 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 H I V 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 S Q V (Invirase (商標))、インジナビルまたは I D V (Crivivan (商標))、リトナビルまたは R T V (Norvir (商標))、ネルフィナビルまたは N F V (Viracept (商標))、アンブレナビル (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))、チブラナビルまたは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 R N A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))、ザルシタピン(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ルまたはT D F (Viread/atrilpa/truvada (商標))、エムトリシタピンまたはF T C (Emtriva/atrilpa/truvada (商標))が挙げられる。

10

【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 R N A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/atrilpa (商標)、Stocrin (商標))、デラビルジンまたはD L V (Rescriptor (商標))、およびエトラピリンまたはE T R (Intelence (商標))が挙げられる。

20

【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、ピクリビロク、P R O 1 4 0、T N X - 3 5 5、A M D 0 7 0、ラシビル、アプリシタピン、エルブシタピン、フロサルブジン(Flosalvudine)、リルビピリン、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。

30

【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(ベピリマット)、-ガラクトシル-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。

40

【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】

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 s c F 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 C X C R 4 M a b / 抗 H I V 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 / または医薬ビヒクルが添加されうる。

【0222】

よって、本発明は、H I V 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、H I V 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 C C R 5 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、C X C R 4 M a b 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 複製に対して強い活性を有し、従って、このような抗体は、H I V - 1 感染を処置するための C X C R 4 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、C X C R 4 を発現する細胞を M a b 5 1 5 H 7 および / または 3 0 1 a E 5 とともにインキュベートし、その後、M a b 5 1 5 H 7 および / または 3 0 1 a E 5 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、C H O - C X C R 4、N I H 3 T 3 - C X C R 4 または C X C R 4 トランスフェクトヒト細胞系統（例えば、U 3 7 3 - M A G I - C X C R 4）などのトランスフェクト細胞系統、N A L M 6 などの C X C R 4 を発現するヒト細胞系統または P B M C などの初代細胞であり得る。C X C R 4 発現細胞に対する M a b 5 1 5 H 7 および / または 3 0 1 a E 5 の結合を阻害する C X C R 4 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 (E L I S A) 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 (F A C S) 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、C X C R 4 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) C X C R 4 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、C X C R 4 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：

e) これらの分子をHIV-1複製アッセイで試験する工程。

【0228】

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】

【0229】

【図1】図1Aおよび1B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1A：CD3-PE抗体によるT細胞の染色 図1B：CD14-PE抗体による単球の染色

【図2】図2Aおよび2B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3Aおよび3B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4Aおよび4Bおよび図5は、抗CXCR4 Mab 515H7および301aE5の、ヒトPBMCにおけるHIV-1単離物KON(X4ウイルス)の複製を阻害する能力を示す図である。

【図5】図4Aおよび4Bおよび図5は、抗CXCR4 Mab 515H7の、ヒトPBMCにおけるHIV-1単離物KON(X4ウイルス)の複製を阻害する能力を示す図である。 20

【図6】図6A、6Bおよび6C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6A)、301aE5(図6B)およびc515H7(図6C)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PBMCにおけるHIV-1 X4ウイルス一次単離物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。

【図8】図7および図8は、抗CXCR4 Mab 515H7、c515H7、および301aE5の、ヒトPBMCにおけるHIV-1 X4ウイルス一次単離物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。

【図9】図9は、抗CXCR4 Mab 515H7、c515H7、および301aE5の、ヒトPBMCにおけるHIV-1 X4ウイルス一次単離物KON、MN、および92UG024の複製を阻害する能力を示す図である。 30

【図10】図10および図11は、抗CXCR4 Mab 515H7、c515H7、および301aE5の、ヒトPBMCにおけるHIV-1 X4/R5二重ウイルス一次単離物89.6の複製を阻害する能力を示す図である。

【図11】図10および図11は、抗CXCR4 Mab 515H7、c515H7、および301aE5の、ヒトPBMCにおけるHIV-1 X4/R5二重ウイルス一次単離物89.6の複製を阻害する能力を示す図である。

【図12】図12は、Mab c515H7とマラビロクの組合せの、ヒトPBMCにおけるHIV-1一次単離物89.6(X4/R5二重ウイルス)の複製を阻害する有益な効果を示す図である。 40

【図13】図13は、Mab c515H7とマラビロクの組合せの、ヒトPBMCにおけるHIV-1一次単離物UG93067(X4/R5二重ウイルス)の複製を阻害する有益な効果を示す図である。

【図14】図14は、抗CXCR4 Mab 515H7、c515H7、および301aE5の、PBMCにおけるHIV-1 X4ウイルス一次単離物KONの複製を阻害する能力を示す図である。

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

【図16】図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 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 1 7】図 1 7 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 1 8】図 1 8 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 1 9】図 1 9 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った。

【図 2 0】図 2 0 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 2 1】図 2 1 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 2 2】図 2 2 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 2 3】図 2 3 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 2 4】図 2 4 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 ウイルス一次単離物 K O N の複製を阻害する能力を示す図である。

【図 2 5】図 2 5 は、ヒト P B M C における H I V - 1 一次単離物 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 2 6】図 2 6 は、ヒト P B M C における H I V - 1 一次単離物 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 2 7】図 2 7 は、ヒト P B M C における H I V - 1 X 4 ウイルスの一次単離物 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 2 8】図 2 8 は、ヒト P B M C における H I V - 1 一次単離物 8 9 . 6 (二重ウイルス

10

20

30

40

50

スX4/R5)の複製を阻害するためのMab hz515H7 IgG4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CXCR4に対するモノクローナル抗体(Mab)の作製

CXCR4に対するモノクローナル抗体を作製するため、Balb/cマウスに組換えNIH3T3-CXCR4細胞および/またはCXCR4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。6～16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ELISAによりスクリーニングし(下記の通り)、抗CXCR4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】

ELISA

抗CXCR4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ELISAによって調べた。要するに、マイクロタイタープレートを、BSAと結合された精製[1-41]N末端ペプチドで5μg相当量のペプチド/mL、100μL/ウェルにてコーティングし、4℃で一晩インキュベートした後、PBS中0.5%ゼラチン250μL/ウェルでブロックした。CXCR4免疫マウスからの血漿希釈液を各ウェルに加え、37℃で2時間インキュベートした。これらのプレートをPBSで洗浄した後、HRP(Jackson Laboratories)と結合されたヤギ抗マウスIgG抗体とともに37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で現像し、5分後に100μL/ウェルの1MH₂SO₄を加えることによって反応を停止させた。最高力価の抗CXCR4抗体を生じたマウスを抗体作製に用いた。

20

【0232】

CXCR4に対するMabを産生するハイブリドーマの作製

最高力価の抗CXCR4抗体を生じたBalb/cマウスから単離したマウス脾細胞を、PEGを用いてマウス骨髓腫細胞系統Sp2/Oと融合させた。細胞をマイクロタイタープレートにおよそ1×10⁵/ウェルで播種した後、ウルトラカルチャー培地+2mML-グルタミン+1mMピルビン酸ナトリウム+1×HAT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ELISAによって、抗CXCR4モノクローナルIgG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：FACS分析による抗CXCR4 Mab 515H7および301aE5結合特異性(NIH3T3-CXCR4形質転換体)の特性決定

この実験では、抗CXCR4 Mab 515H7および301aE5のヒトCXCR4(hCXCR4)への特異的結合をFACS分析によって調べた。NIH3T3およびNIH3T3-hCXCR4トランスフェクト細胞を、10μg/mLのモノクローナル抗体515H7および301aE5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標識され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、細胞を再び2回洗浄した。2回目の洗浄後、FACS分析を行った。これらの結合試験の結果を、[FACSによって得られた平均蛍光強度(MFI)]を示す下表8に示す。抗CXCR4 Mab 515H7および301aE5はヒトCXCR4-NIH3T3トランスフェクト細胞系統と特異的に結合するが、親NIH3T3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 μ g/ml)	16	2752
クローン 301aE5 (10 μ g/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 Mab 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 μ l 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 Mab 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。

【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 Mab の効果

この機能的アッセイは、SDF-1 および / または 515H7 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。

【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 μ l 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 50 μ l 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 μ M 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) (1 s / 波長 / ウェル、室温で 15 反復) を用い、485 nm および 530 nm で

40

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_{530nm}) - (発光_{485nm}) × Cf] / (発光_{485nm})、式中、Cf = 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_{530nm}) / (発光_{485nm})。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PBMCにおけるHIV-1一次単離物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PBMC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。PBMCを、25 mM HEPES、5 mM ペニシリン(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PBMC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 X4一次単離物希釈液とともに37で1時間、二反復でインキュベートした。PHA活性化ヒトPBMC(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 × 10⁶細胞/mlで加え、RPMI 1640、10%FCSおよび0.1%IL-2中、37で24~36時間培養した。Mabを含まない培地中、非感染PBMCからなる対照を導入した。HIV感染PBMC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PBMC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。中和力価は、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C

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 1×10^{-6} g / m l (6 6 n M) および 1.5×10^{-6} g / m l (1 μ M) 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 (A T C C C C L - 6 1) を、ヒト C X C R 4 受容体の全コード配列 (R e f S e q N M _ 0 0 3 4 6 7) 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 5×10^{-6} g / 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 1×10^5 , 1×10^4 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 \times 、 H E P E S 2 0 m M 、プロベネシド酸 (Probenicid acid) 2 5 m M] 中、蛍光カルシウム色素 (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) を、3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間、その後、2 5 $^{\circ}$ C 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、 1×10^{-6} l 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、 1×10^4 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、 2×10^{-6} l 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 (1×10^{-6} 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 (1×10^{-6} 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った。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 (1.33×10^{-6} M) (図 6 A) および c 5 1 5 H 7 (1.33×10^{-6} M) (図 6 C) は、S D F - 1 (1×10^{-6} 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 (1.33×10^{-6} M) (図 6 B) は、S D F - 1 (1×10^{-6} 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に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 0⁶ 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 (B D 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 (B D Biosciences) を用いてフローサイトメトリー分析 (L S R I I、B D 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 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。

10

【 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。

20

【 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

30

	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

40

【 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、

50

25 μ l のウイルスとともに37 で1時間インキュベートした。20 \times 10⁶ 細胞/ml のヒトPBMC (25 μ l) 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20 U/ml 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Cytotfix/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、PBMCを300 μ l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。

【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。

【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、PBMC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 (μ g/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

【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PBMC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PBMC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、PBMC (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、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 μ 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 μ m、Durapor Dv、Millipore, Molsheim, France) にて、ウイルスの連続希釈液25 μ l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 μ l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 \times 10⁶ 細胞/mlの濃度のPHA刺激PBMC

25 μ 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 μ l、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 μ 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 μ lのRPMI)を行ってc515H7 Mabおよびマラビロクを除去し、200 μ 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c515H7 Mab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($V_n/V_0 = 0.1$) 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、IC₅₀ 2 μ g/mlで阻害された(図12)。マラビロク50 μ g/mlでは、IC₅₀ 阻害活性に達しなかった(図12)。さらに、2 μ g/mlのマラビロクを抗体c515H7に添加したところ、IC₅₀ 0.2 μ g/mlでc515H7 Mabの阻害活性を増強した(図12)。

【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 μ g/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)。

20

【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 α 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、一時的トランスフェ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 α]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 H E K 2 9 3 E B N A 細胞 (Invitrogen, US) を常法により、オービタルシェーカー (回転速度 110 rpm) 上、250 ml フラスコにて、6 mM グルタミンを添加した血清不含培地 E x c e l l 2 9 3 (SAFC Biosciences) 50 ml 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 1 mg / ml で調製した直鎖 25 k D a ポリエチレンイミン (P E I) (Polysciences)、混合およびプラスミド D N A (重鎖：軽鎖プラスミド比 1 : 1 で、終濃度 1 . 2 5 μ g / ml) を用い、2 . 1 0⁶ 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 1 0⁶ 細胞 / ml とした。培養工程を細胞の生存率および M a b 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。M a b 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。M a b 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 M a b 6 ~ 1 5 mg / l の範囲である。

10

【0264】

実施例 11 : F A C S 分析による抗 C X C R 4 キメラ M a b c 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 キメラ M a b c 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 分析によって調べた。

【0265】

N I H 3 T 3 - h C X C R 4 トランスフェクト細胞を 0 μ g / ml ~ 1 0 μ g / ml の用量範囲のモノクローナル抗体 c 5 1 5 H 7 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 N 3 で洗浄した。次に、A l e x a で標識した二次抗体をこれらの細胞に加え、4 で 2 0 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、F A C S 分析を行った。この結合試験の結果を図 1 5 に示すが、これは、抗 C X C R 4 キメラ M a b C 5 1 5 H 7 がヒト 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することを示す。N I H 3 T 3 w t 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 (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 c 5 1 5 H 7 M a b の効果

30

この機能的アッセイは、S D F - 1 および / または c 5 1 5 H 7 M a b 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。

【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 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 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 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、または伴わずにコエレンテラジン H 5 μ M を添加した。3 7 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 の発光獲得を誘導した。

40

50

【0268】

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_{530nm}) - (発光_{485nm}) × C_f] / (発光_{485nm})、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_{530nm}) / (発光_{485nm})。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 / 485nm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 / 485nm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。

【0269】

SDF1 (100nM)は、CXCR4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BRETシグナルを約10%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16)。Mab c515H7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(SDF-1により誘発されるBRET増強の96%阻害、図16)。Mab c515H7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このMabの影響を示唆する(図16)。

【0270】

実施例13：CD4およびCXCR4またはCCR5を発現するGFP形質導入ヒト骨肉腫(GHOST)細胞を用いたMab c515H7抗HIV-1活性のin vitro評価

CXCR4 c515H7 Mabの特異性を判定するために、本発明者らは、CD4およびCXCR4またはCCR5を発現するGHOST細胞を用い、このMabの抗HIV-1活性を評価した。

【0271】

このアッセイは、X4 HIV-1 LAIウイルス(CXCR4を発現するGhost細胞を持つ)またはR5 HIV-1 BaLウイルス(CCR5を発現するGhost細胞を持つ)のいずれかを用いて48時間行う。500μlのGhost細胞を、10% FCS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Mab c515H7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HIV-1 LAIウイルス(1/10)およびHIV-1 BaLウイルス(1/7)を48時間加えた。細胞をトリプシン処理し、PBS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300μlの1.5%パラホルムアルデヒドを暗所、+4℃で2時間加えた。GFP陽性細胞をフローサイトメトリーにより分析し、HIV-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、Mabを含まない対照感染ウェルと比較して定義した。IC₅₀(μg/ml)の結果を表11にまとめる。抗CXCR4 Mab c515H7は、Ghost細胞を発現するCXCR4においてHIV-1 X4 Laiウイルスの感染を阻害することができたが、Ghost細胞を発現するCCR5においてHIV-1 R5 BaL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 1 1】

	G H O S T C X C R 4 ウイルス			G H O S T C C R 5 / B a L ウイルス		
	感染細胞の阻害%			感染細胞の阻害%		
	9 0	8 0	5 0	9 0	8 0	5 0
5 1 5 H 7	0 . 5	0 . 1	0 . 0 5	> 7 5	> 7 5	> 7 5

【 0 2 7 4 】

10

実施例 1 4 : 5 1 5 H 7 抗 C X C R 4 ネズミ抗体のヒト化および該 h 5 1 5 H 7 のフラグメントの作製

一般手順

5 1 5 H 7 抗 C X C R 4 抗体のヒト化は、C D R 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 C D R およびフレームワーク (F R) 領域の定義は、I M G T ユニークナンバリングスキームならびに I M G T 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。

【 0 2 7 5 】

5 1 5 H 7 のヒト化変異体の結合は、ヒト C X C R 4 で安定的にトランスフェクトされた N I H 3 T 3 細胞系統にて判定した。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 S D F - 1 の R A M O S 細胞との結合を阻害する能力に関して評価した。R A M O S 細胞は、C X C R 4 の発現が高く、C X C R 7 および S D F - 1 の発現が低いために選択された。

20

【 0 2 7 6 】

これらのアッセイを用いて、抗 C X C R 4 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 I g G 1 / k 定常ドメインでフォーマットし、哺乳類発現ベクター p C E P にクローニングした。組換え I g G 1 / 由来抗体を H E K 2 9 3 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 P B S バッファーを加え、抗体濃度を E L I S A により測定した。

【 0 2 7 7 】

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 P C R によって作製し、これら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ークロマトグラフィー (I M A C) によって行った。

【 0 2 7 8 】

5 1 5 H 7 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 1 7 および 1 8 に示す。

【 0 2 7 9 】

最初の一連の試験では、三つの第一のヒト化変異体の抗 C X C R 4 結合活性を分析した。V H 変異体 1 (V H 1) をネズミ V L と組合せ、これらの構築物の、ビオチン化ネズミ 5 1 5 H 7 親抗体の結合を阻害する能力を評価した。V H 1 の可変ドメインのアミノ酸配列は配列番号 9 0 を含んでなり、ヌクレオチド配列は配列番号 9 1 を含んでなる。全長 V H 1 のアミノ酸配列は配列番号 9 2 を含んでなり、ヌクレオチド配列は配列番号 9 3 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 1 9 A)。このことは、ほとんどのヒト V H 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、V H 1 を V L の変異体 2 と組み合わせた (図 1 9 B)。

40

【 0 2 8 0 】

さらなる試験では、抗体 5 1 5 H 7 のヒト化変異体が S D F - 1 の C X C R 4 発現細胞への結合を阻害するか否かを判定した (図 2 0)。この h z 5 1 5 H 7 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 S D F - 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ことが分かった (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。

【 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 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 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 希釈) 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。

【 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。

【 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 O ₂ 5 %、3 7 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 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、または伴わずにコエレンテラジン H 5 μ M を添加した。3 7 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) を使い、4 8 5 n m および 5 3 0 n m で

の発光獲得を誘導した。

10

20

30

40

50

【0287】

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_{530nm}) - (発光_{485nm}) × Cf] / (発光_{485nm})、式中、Cf = 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_{530nm}) / (発光_{485nm})。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 / 485nm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 / 485nm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。

【0288】

SDF1(100nM)は、CXCR4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BRETシグナルを約12%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22)。

【0289】

515H7ヒト化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、SDF-1により誘発されるBRET増強の阻害割合は、hz515H7 VH1D76N-VL2 Mabで約88%、hz515H7 VH1D76N-VL2.1 Mabで65%、hz515H7 VH1D76N-VL2.2 Mabで33%およびhz515H7 VH1D76N-VL2.3 Mabで21%であった(図22)。

【0290】

実施例17：抗CXCR4 Mab hz515H7によるMT-4細胞中でのHIV-1_{IIIB}(X4ウイルス)の複製の阻害

このアッセイでは、HIV-1_{IIIB}に対するhz515H7 Mabの活性は、MT-4細胞におけるウイ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(TCID₅₀)の5倍のHIV-1_{IIIB}単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(FCS)、100IU/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、2mMのグルタミンを添加したRPMI 1640培地中2×10⁵細胞/mlに調整し、種々の濃度のhz515H7 Mab 100μlを有する96ウェルの平底組織培養プレート(COSTAR 3596)(100μl/ウェル)に播種した。5日目に、細胞の生存能を比色反応MTTによって測定した。hz515H7 Mab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：

【数1】

保護% =

$$\frac{[\text{hz515H7 Mabで処置した感染細胞のOD}_{540}] - [\text{対照感染細胞のOD}_{540}]}{[\text{対照未感染細胞のOD}_{540}] - [\text{対照感染細胞のOD}_{540}]}$$

【0291】

図23に示されるように、hz515H7 Mabは、MT-4細胞においてHIV-1_{IIIB}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HIV-1活性を示す。

【0292】

実施例18：抗CXCR4 Mab hz515H7による、ヒトPBMCにおけるHIV-1一次単離物KON(X4ウイルス)複製の阻害

1 サイクル中和アッセイ

10

20

30

40

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に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 25 μ lを、25 μ lのウイルスとともに37で1時間培養した。20 \times 10⁶ 細胞/mlのヒトPBMC (25 μ l)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20 U/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Cyt of ix / Cyt oper m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、PBMCを300 μ l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、PBMC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PBMC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PBMC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、PBMC(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25 μ 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 μ m, Durapor Dv, Millipore, Molsheim, France)にて、ウイルスの連続希釈液25 μ l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25 μ l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 \times 10⁶ 細胞/mlの濃度のPHA刺激PBMC 25 μ 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 μ 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)/ml(R&D System)となるように加えた。37で24時間後、100 μ 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 μ lのRPMI)を行ってhz515H7 Mabおよびマラビロクを除去し、200 μ 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

10

20

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 [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 ($V_n / V_0 = 0.1$) 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 2 5 および 2 6 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 2 5 および 2 6)。

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 一次単離物 K O N (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に相応に濃縮および希釈した一次単離物 K O N を用いて 3 6 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 μ l を、25 μ l のウイルスとともに 37 で 1 時間培養した。20 \times 10⁶ 細胞 / ml のヒト P B M C (25 μ l) を 96 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 10% F C S および 20 U / ml I L - 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 中で 3 6 時間培養した。

20

【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 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 300 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 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 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。

30

【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。

40

【0303】

図 2 7 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 一次単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 一次単離物 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 一次単離物複製の分析:

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 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（2 倍）の 2 5 μ l アリコート四つをそれぞれ、予め含水させた 9 6 ウェルフィルタープレート（孔径 1 . 2 5 μ m、Durapor Dv、Millipore, Molsheim, France）にて、ウイルスの連続希釈液 2 5 μ 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 I g G 4 M a b またはマラビロクの代わりに 2 5 μ l の R P M I）を、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希釈液の存在下での滴定と同じプレートで行った。3 7 で 1 時間後、 4×10^6 細胞 / m l の濃度の P H A 刺激 P B M C 2 5 μ l（5 人の健康なドナーからの P H A 活性化 P B M C のプール）を、R P M I の最終培養容量 7 5 μ l、1 0 % ウシ胎仔血清（F C S）および 2 0 I U のインターロイキン - 2（I L - 2）/ m l（R&D System）となるように加えた。3 7 で 2 4 時間後、1 0 0 μ 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 2 0 0 μ l の R P M I）を行って h z 5 1 5 H 7 I g G 4 M a b およびマラビロクを除去し、2 0 0 μ l の新鮮培養培地を加えた。7 日目に、培養上清における p 2 4 の存在を E L I S A 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 [A Z T] 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 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非存在下（ V_0 ）および存在下（ V_n ）でウイルス力価（5 0 % 組織培養感染量 [T C I D ₅₀]）を決定した。中和力価は、ウイルス力価の 9 0 % 低下をもたらす（ $V_n / V_0 = 0.1$ ）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希釈率として定義した。

10

20

【 0 3 0 5 】

h z 5 1 5 H 7 I g 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 8 9 . 6 を用いて評価した。図 2 8 に示されるように、これらの X 4（h z 5 1 5 H 7 I g G 4 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 8 9 . 6 の二重ウイルス X 4 / R 5 のウイルス力価の 9 0 % 低下を可能とした（図 2 8）。

【 図 17 】

	FR1-IMGT				CDR1-IMGT				FR2-IMGT				CDR2-IMGT			
	(1-26)				(27-38)				(39-55)				(56-65)			
	1	1C	2C	3C	4C	5C	6C									
515H7 VH															
IGHV3-49*04	EYLVESGG.GLVQPGRLRLCTAS GTFE...TONY HSNVRCAPGKLEWGF INNKANGYTT															
VH1	EYLVESGG.GLVQPGRLRLCTAS GTFE...TONY HSNVRCAPGKLEWGF INNKANGYTT															
VH1 D76N	EYLVESGG.GLVQPGRLRLCTAS GTFE...TONY HSNVRCAPGKLEWGF INNKANGYTT															
	FR3-IMGT				CDR3-IMGT				FR4-IMGT							
	(66-104)				(105-135)				(116-125)							
	7C	8C	9C	10C												
515H7 VH															
IGHV3-49*04	DYASVYR.GRFTISRDSQSILYLAKNAKAEIMATYYC ARDVGNYFDYK GQSTLTIVSS															
IGHJ4*01	EYASVYR.GRFTISRDSQSILYLAKNAKAEIMATYYC TR YFDYK GQSTLTIVSS															
VH1	EYASVYR.GRFTISRDSQSILYLAKNAKAEIMATYYC ARDVGNYFDYK GQSTLTIVSS															
VH1 D76N	EYASVYR.GRFTISRDSQSILYLAKNAKAEIMATYYC ARDVGNYFDYK GQSTLTIVSS															

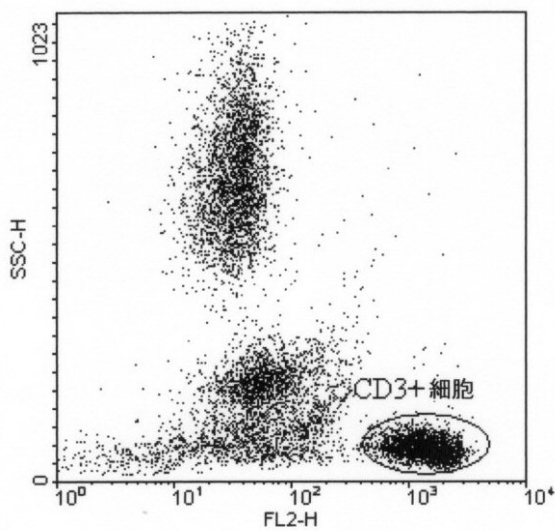
Figure 17

【 図 18 】

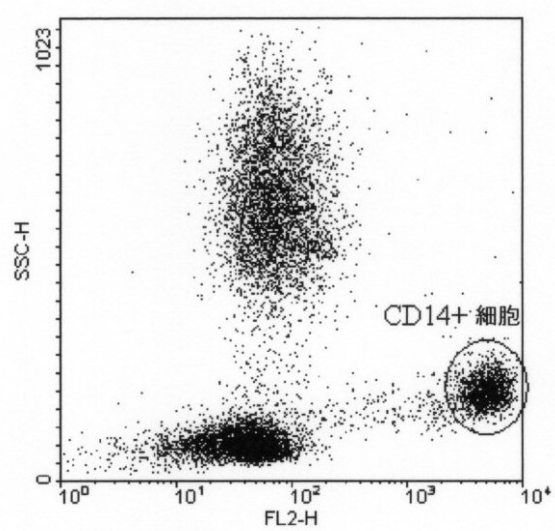
	FR1-IMGT				CDR1-IMGT				FR2-IMGT				CDR2-IMGT			
	(1-26)				(27-38)				(39-55)				(56-65)			
	1	1C	2C	3C	4C	5C	6C									
515H7 VL															
IGHV4-1*01	DIVMSQSFSSLAVALGERATMSCKSS QSLINERTRKQY LAWYQKPGQSKLLLY WA.....S															
VL Var2	DIVMSQSFSSLAVALGERATMSCKSS QSLINERTRKQY LAWYQKPGQSKLLLY WA.....S															
VL Var2.1	DIVMSQSFSSLAVALGERATMSCKSS QSLINERTRKQY LAWYQKPGQSKLLLY WA.....S															
VL Var2.2	DIVMSQSFSSLAVALGERATMSCKSS QSLINERTRKQY LAWYQKPGQSKLLLY WA.....S															
VL Var2.3	DIVMSQSFSSLAVALGERATMSCKSS QSLINERTRKQY LAWYQKPGQSKLLLY WA.....S															
	FR3-IMGT				CDR3-IMGT				FR4-IMGT							
	(66-104)				(105-135)				(114-123)							
	7C	8C	9C	10C												
515H7 VL															
IGHV4-1*01	ARDGQVF.ARPTQSG...SETYFTLTISRVAQLAVYYC MQSFLAT FQQTKEVEIK															
IGHJ1*01	TRESQVF.DRFTQSG...SOTQFTLTISRVAQLAVYYC WT FQQTKEVEIK															
VL Var2	ARDGQVF.ARPTQSG...SETYFTLTISRVAQLAVYYC MQSFLAT FQQTKEVEIK															
VL Var2.1	ARDGQVF.DRFTQSG...SETYFTLTISRVAQLAVYYC MQSFLAT FQQTKEVEIK															
VL Var2.2	ARDGQVF.DRFTQSG...SETYFTLTISRVAQLAVYYC MQSFLAT FQQTKEVEIK															
VL Var2.3	ARDGQVF.DRFTQSG...SETYFTLTISRVAQLAVYYC MQSFLAT FQQTKEVEIK															

Figure 18

【 図 1 】

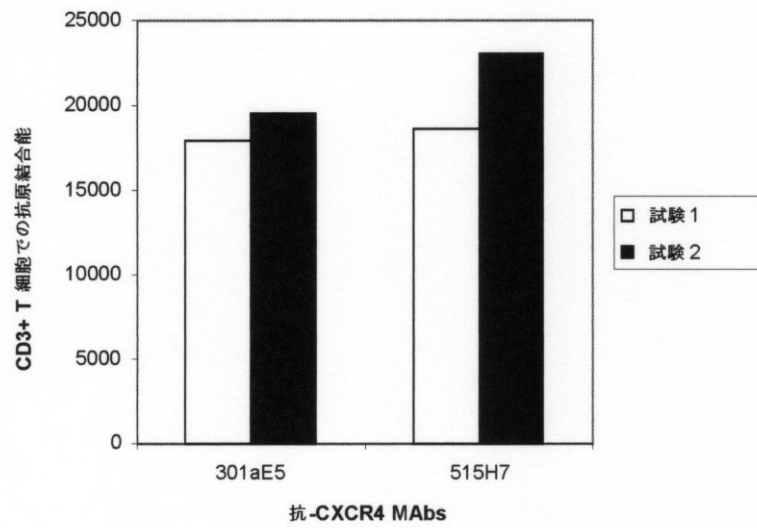
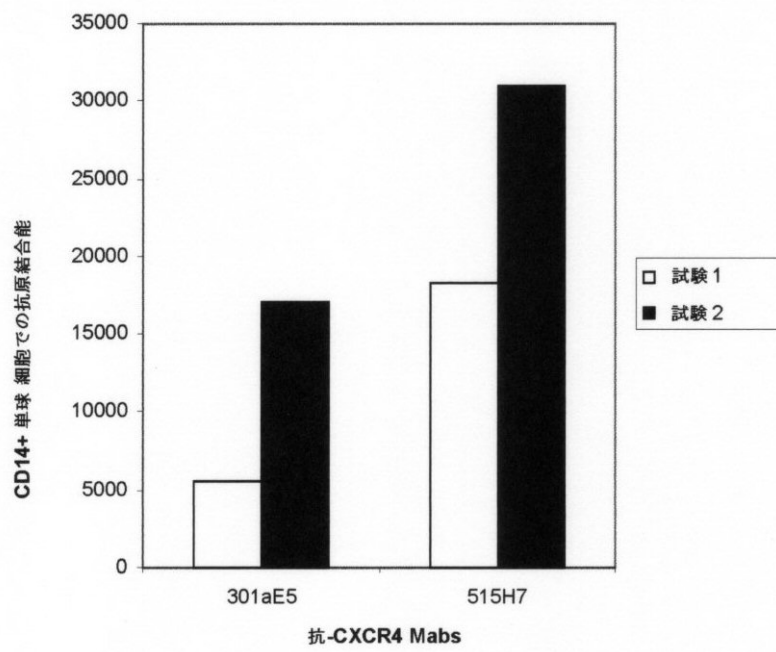


A

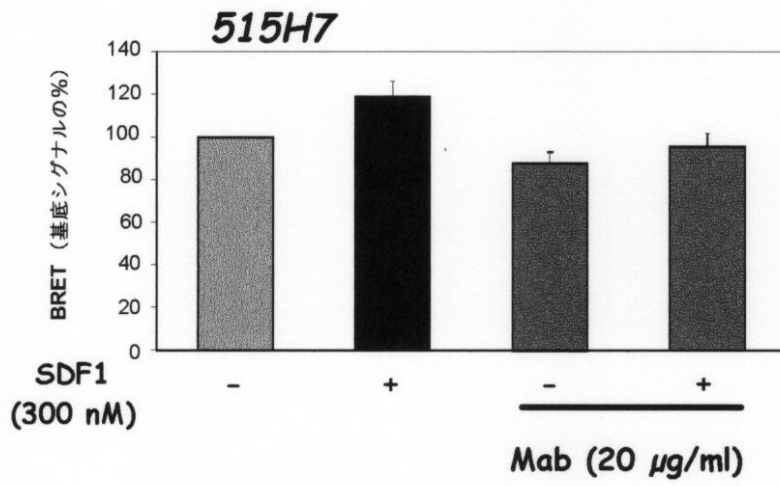


B

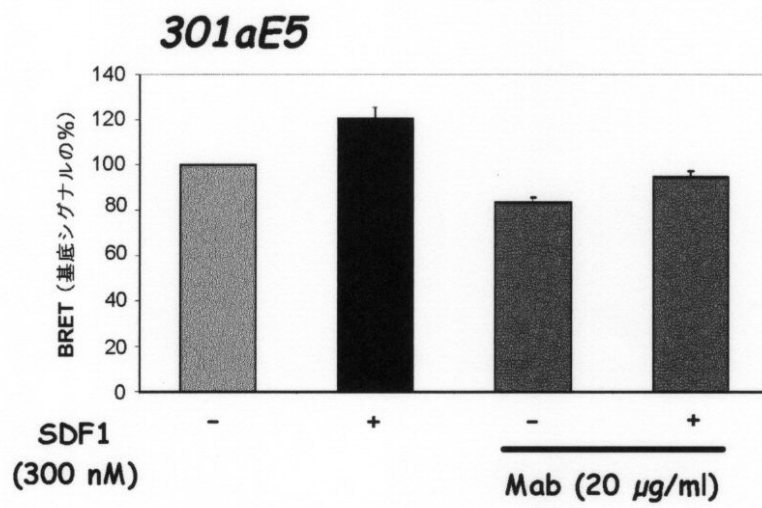
【 図 2 】

**A****B**

【 図 3 】

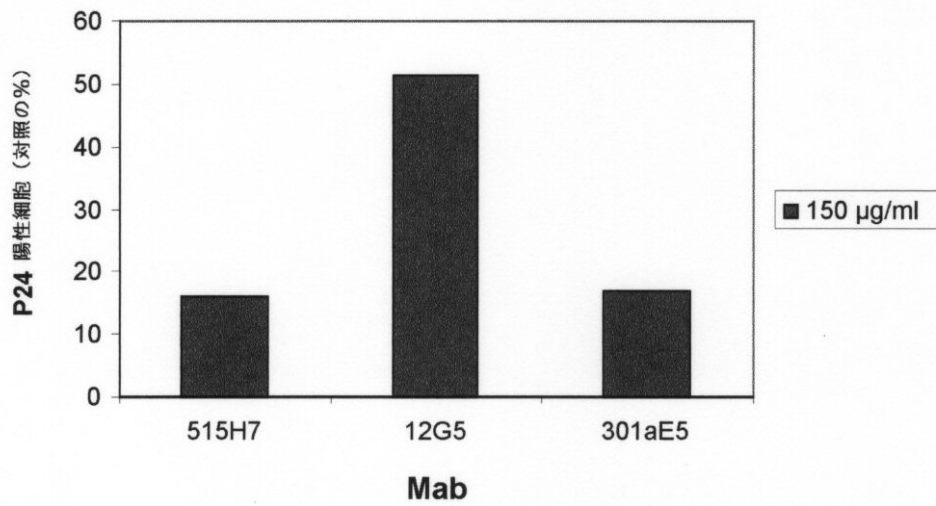


A

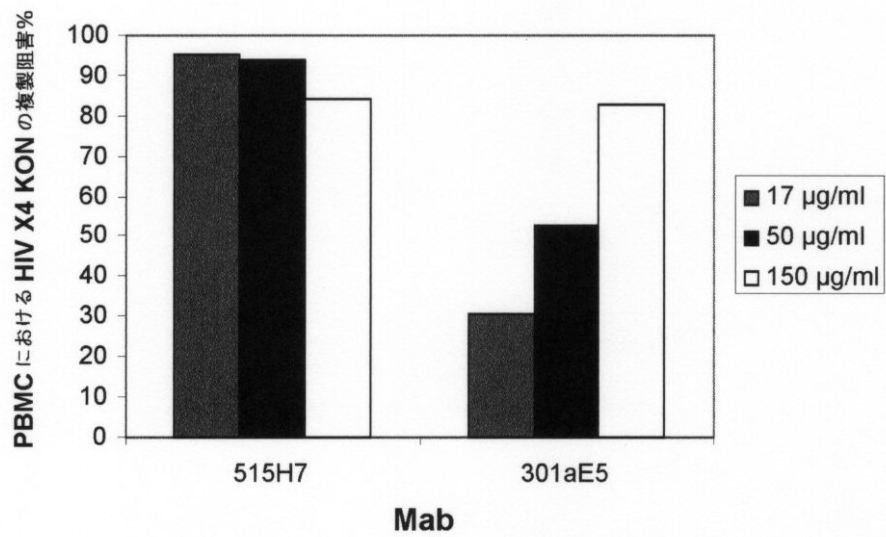


B

【 図 4 】

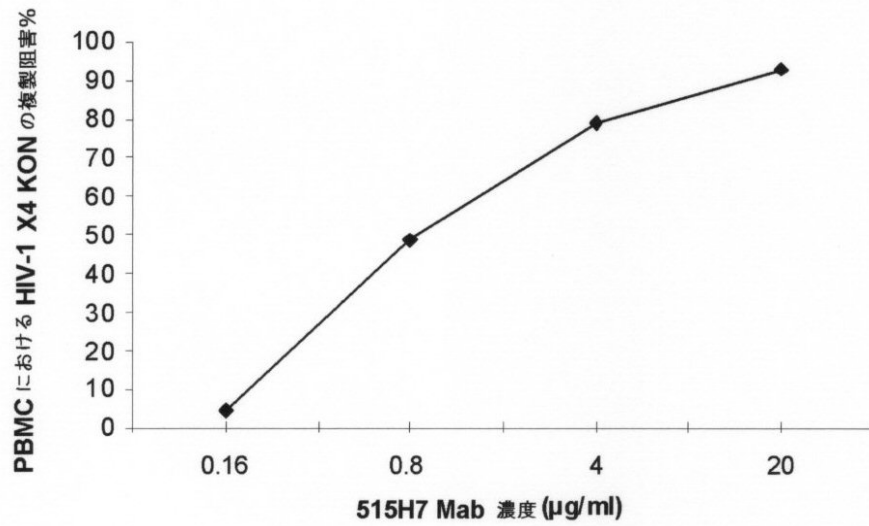


A

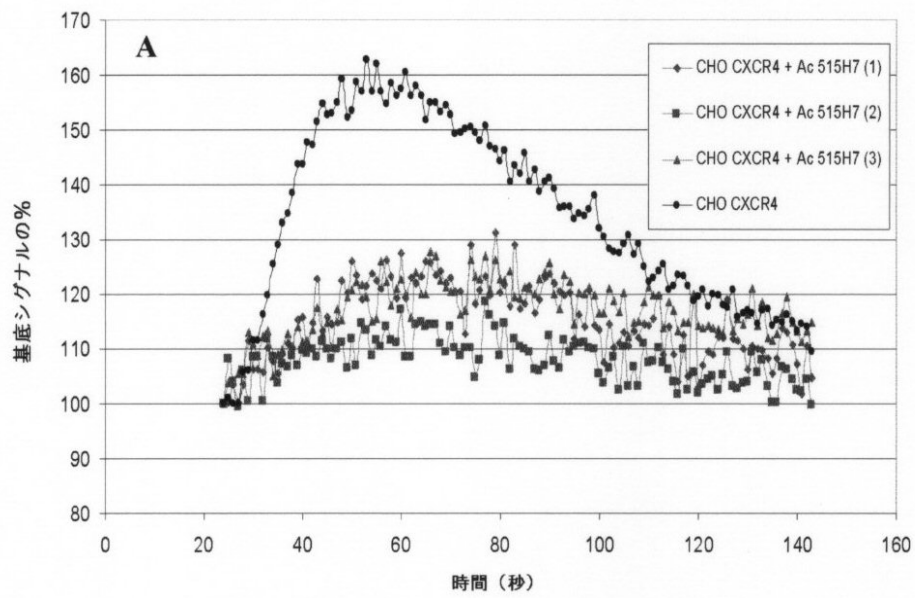


B

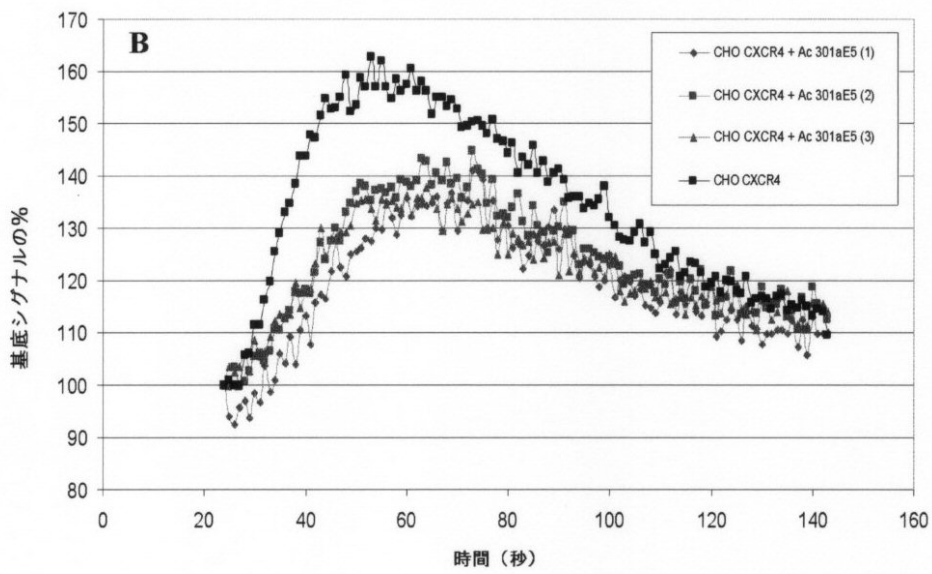
【図 5】



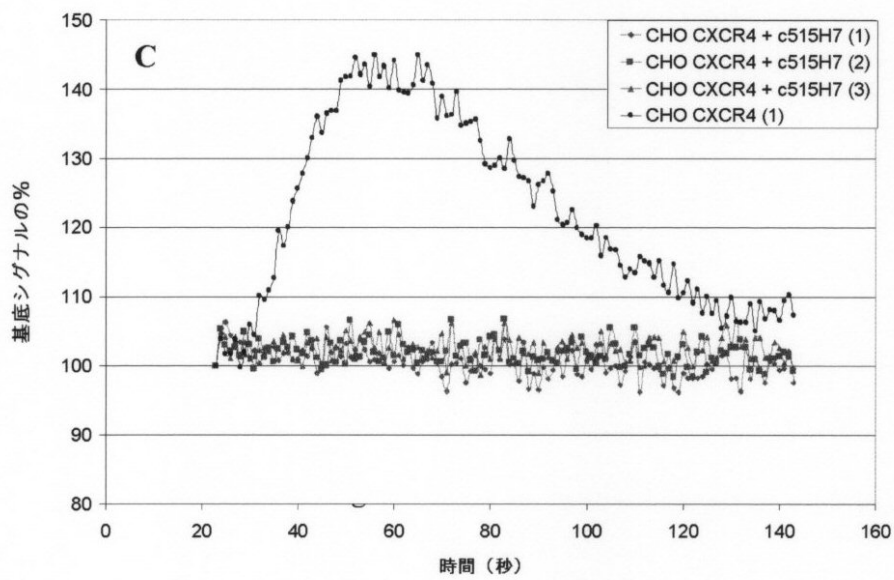
【図 6 A】



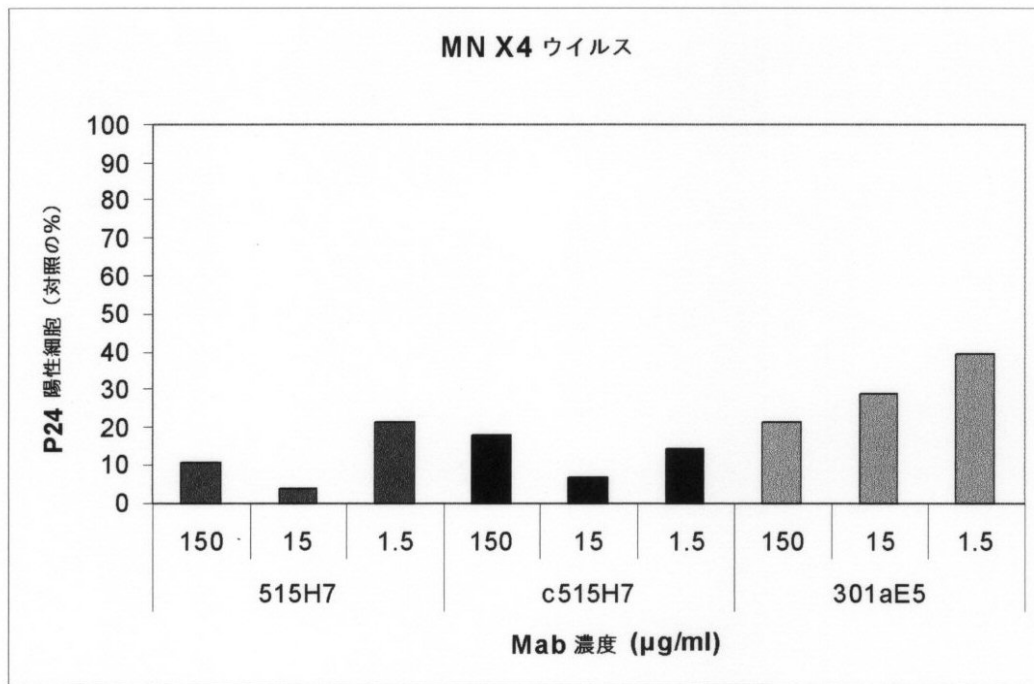
【図 6 B】



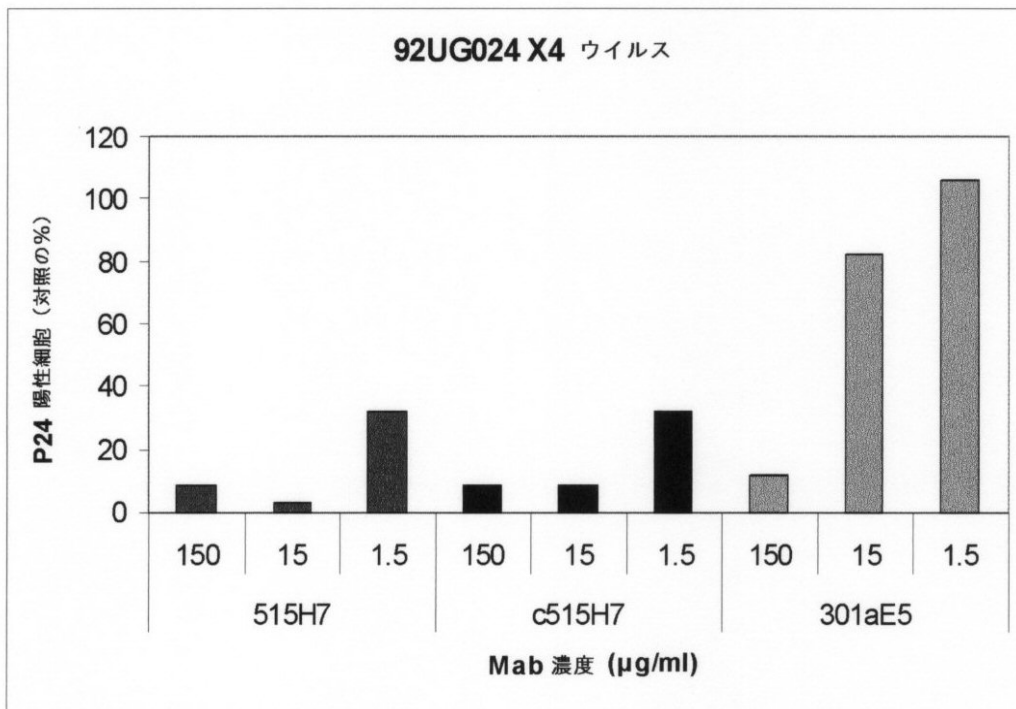
【図 6 C】



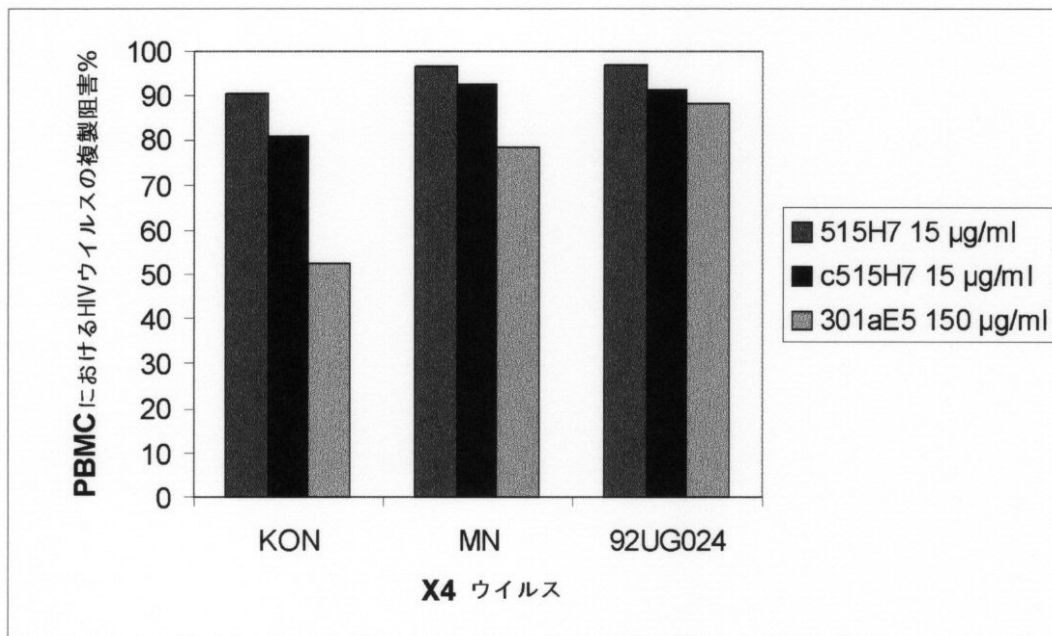
【図 7】



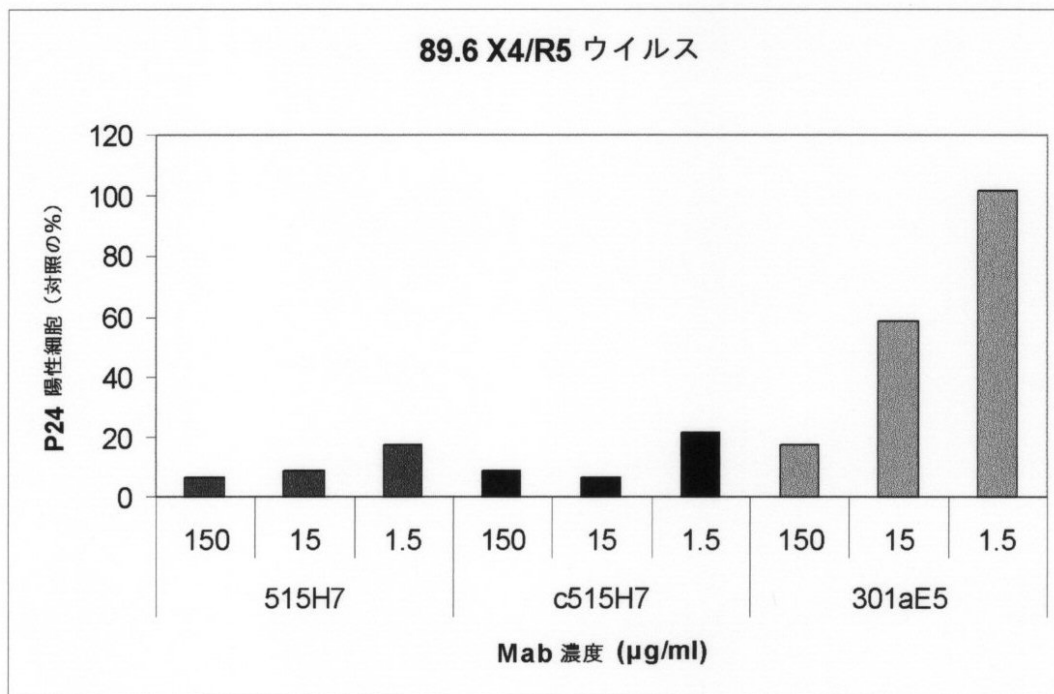
【図 8】



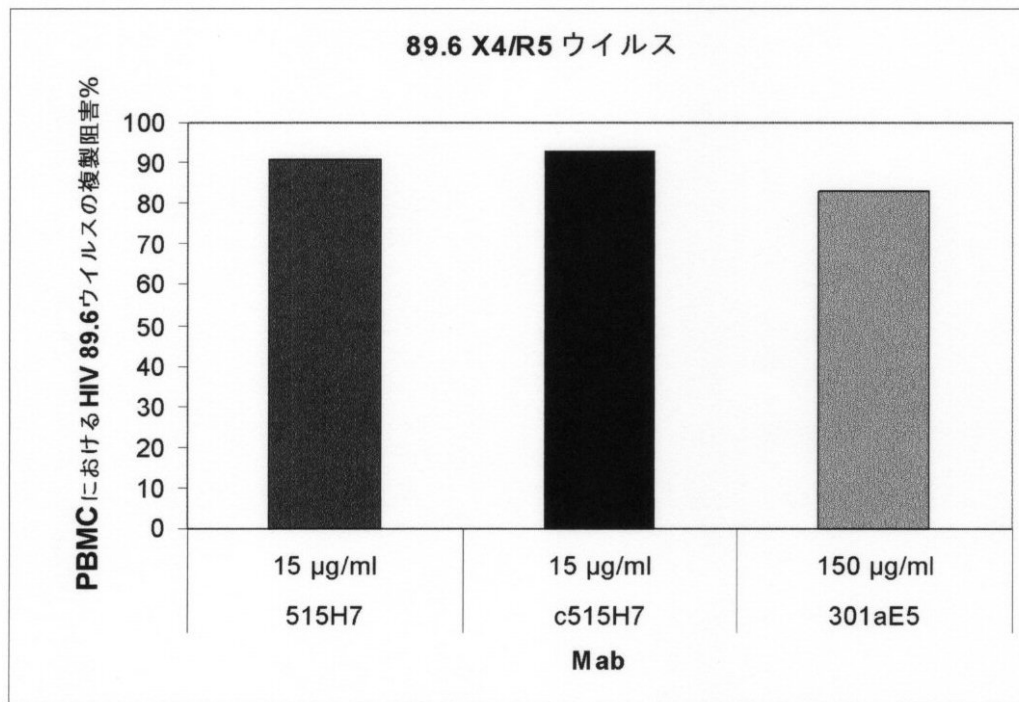
【図 9】



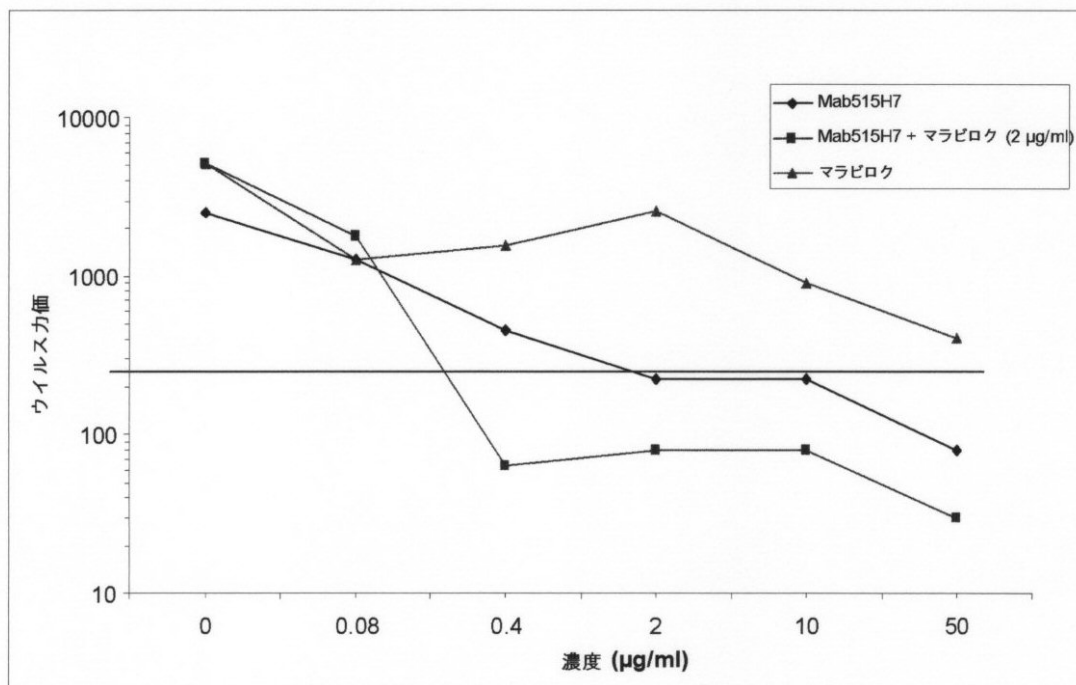
【図 10】



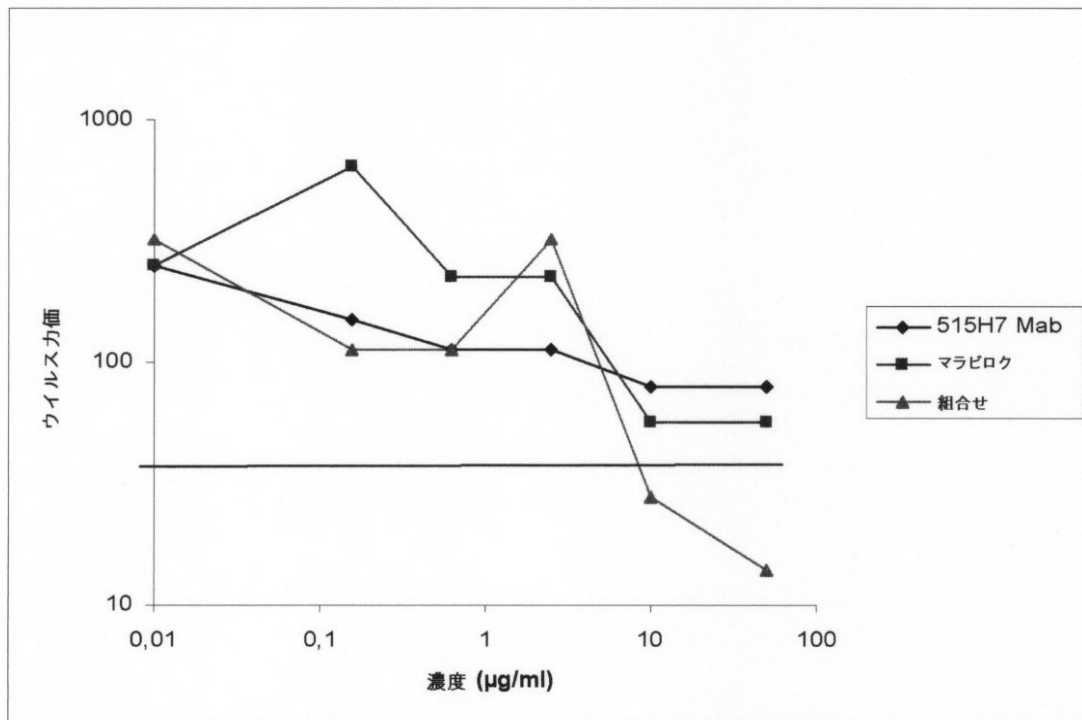
【図 1 1】



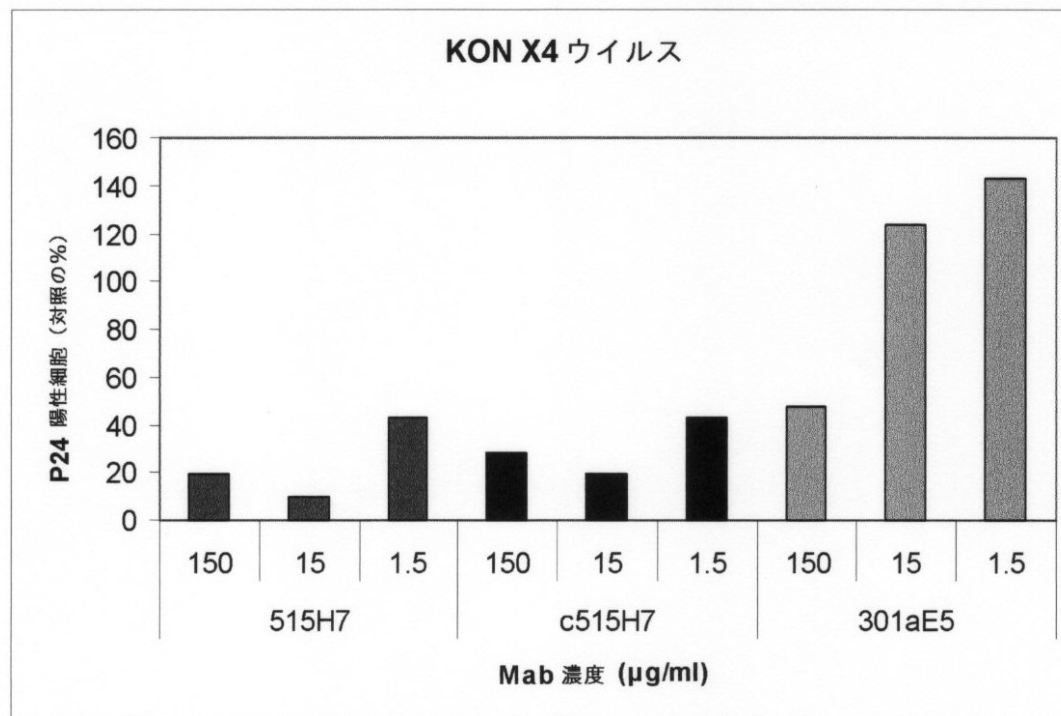
【図 1 2】



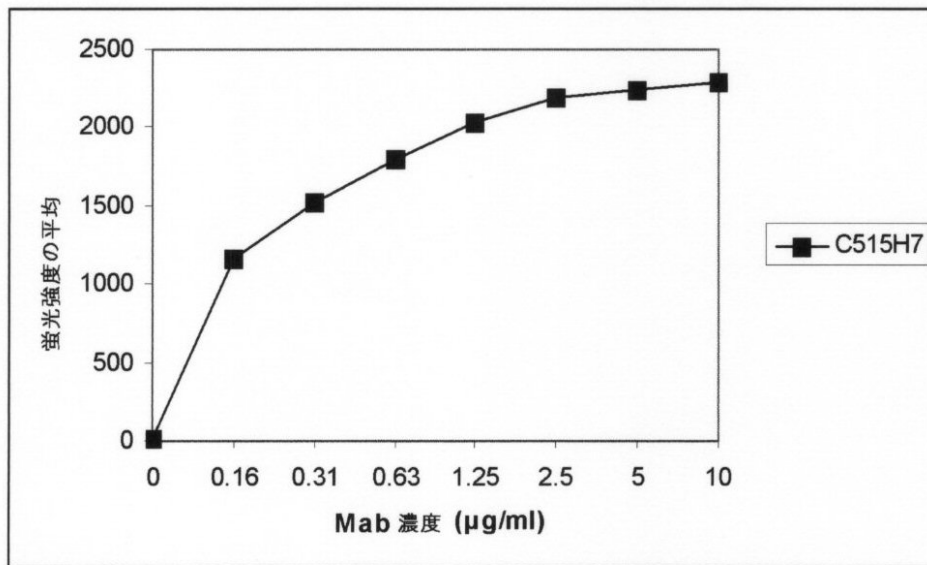
【図 1 3】



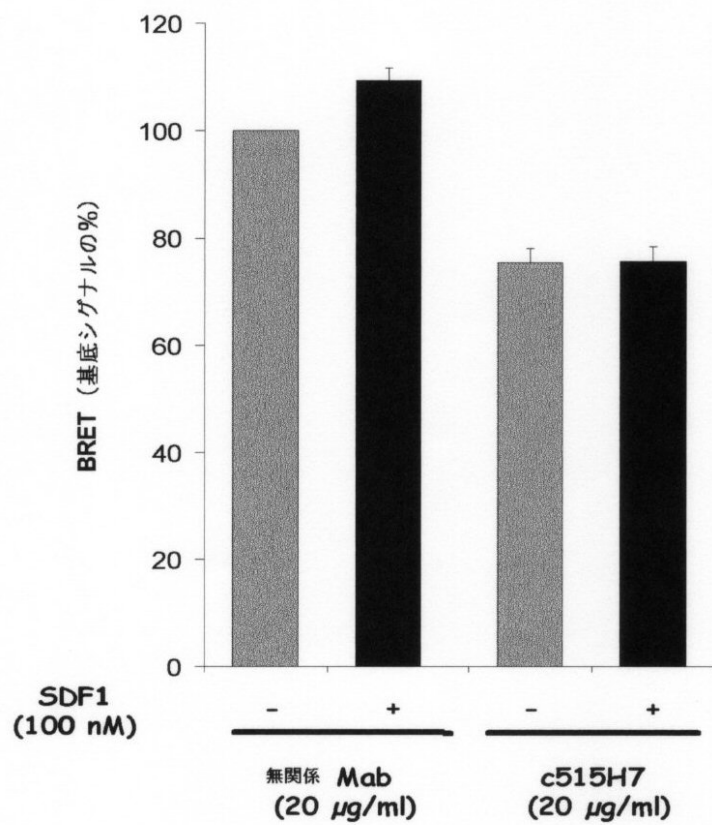
【図 1 4】



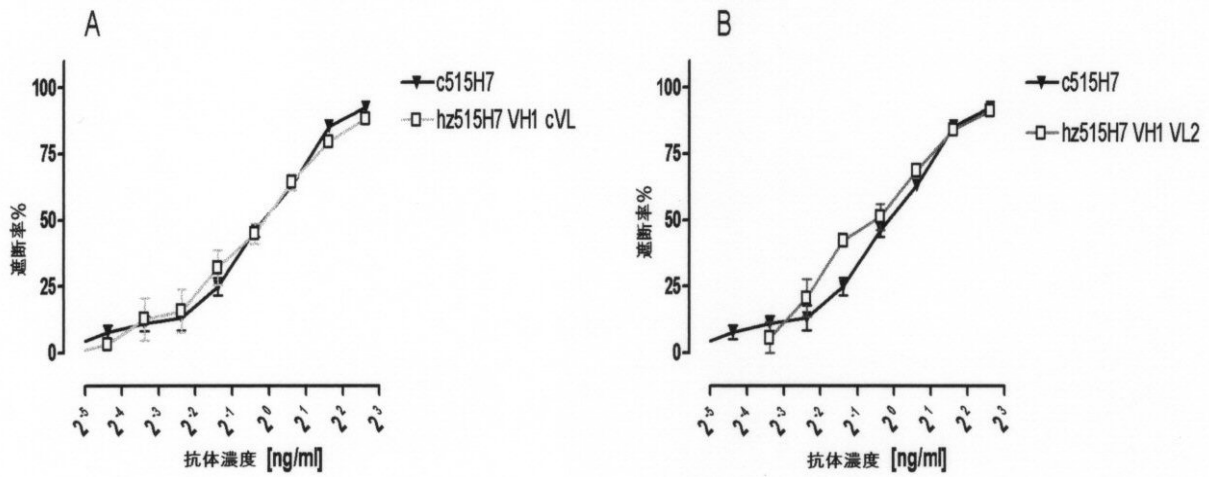
【 図 1 5 】



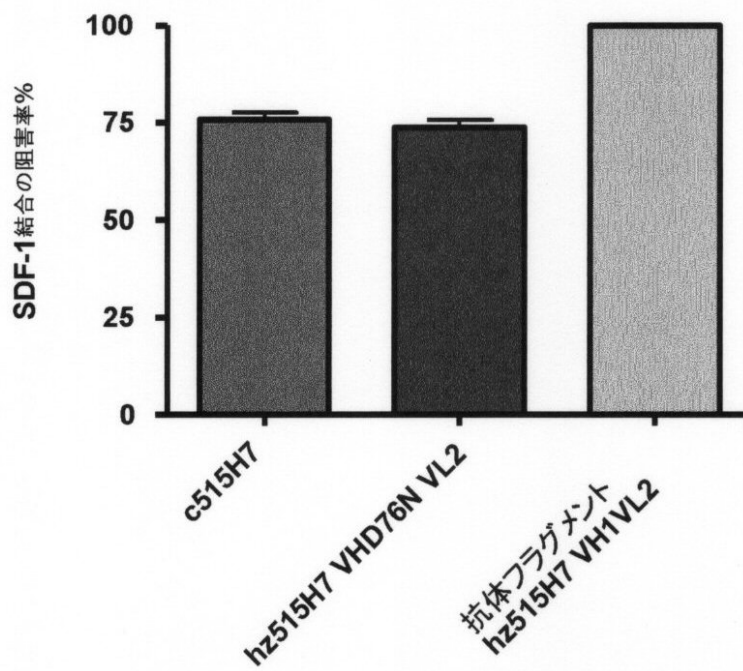
【 図 1 6 】



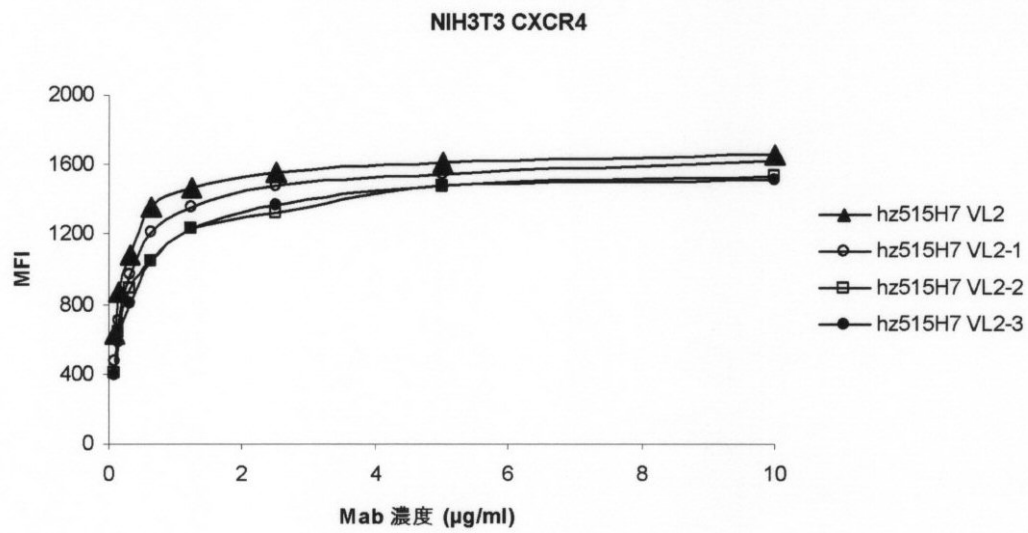
【図 19】



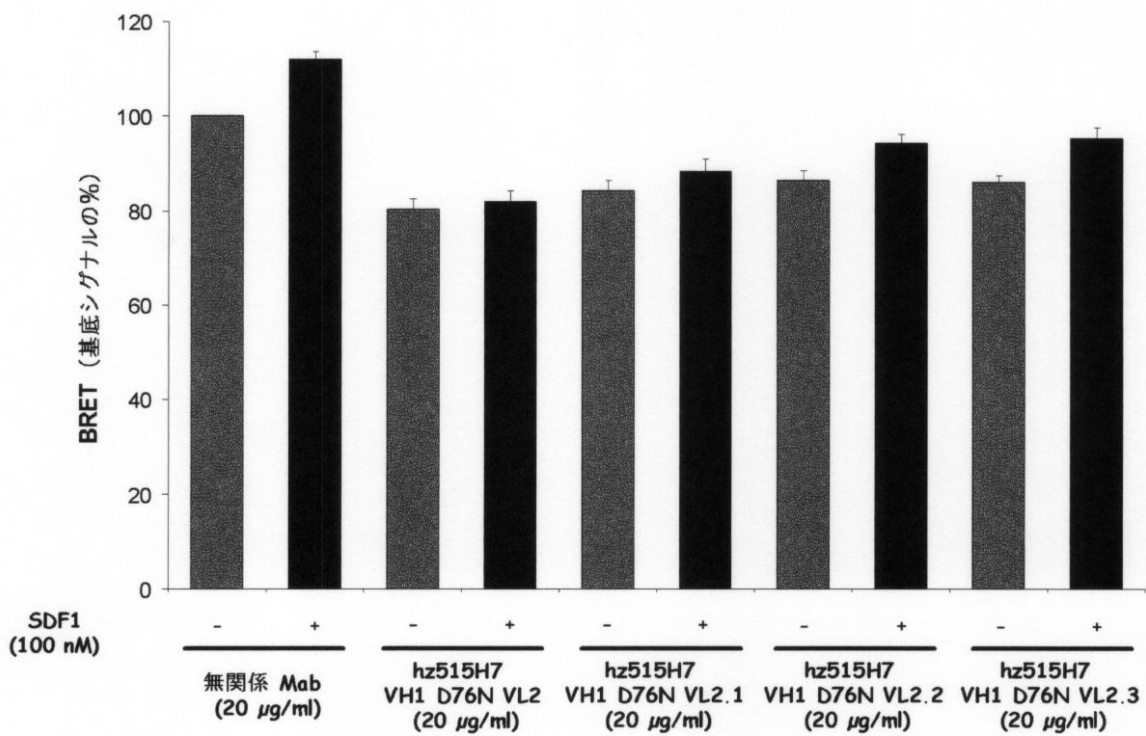
【図 20】



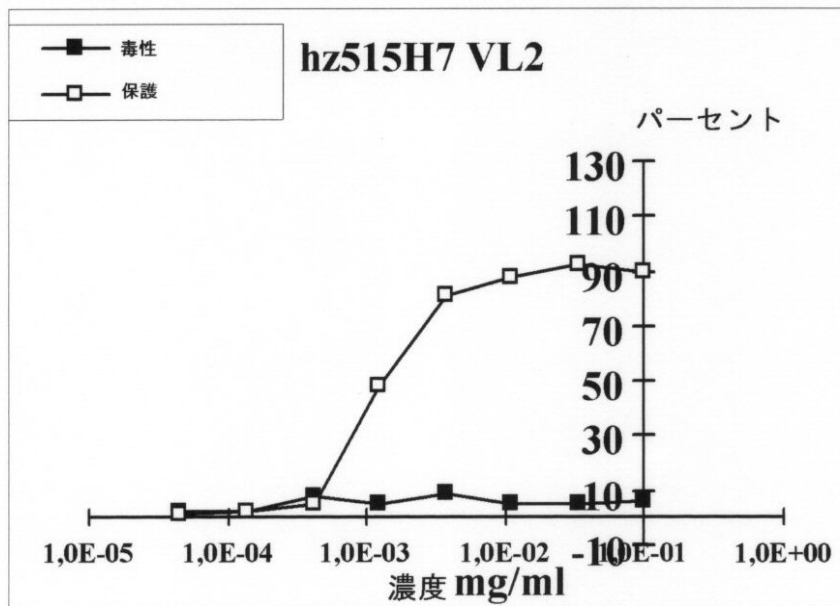
【図 2 1】



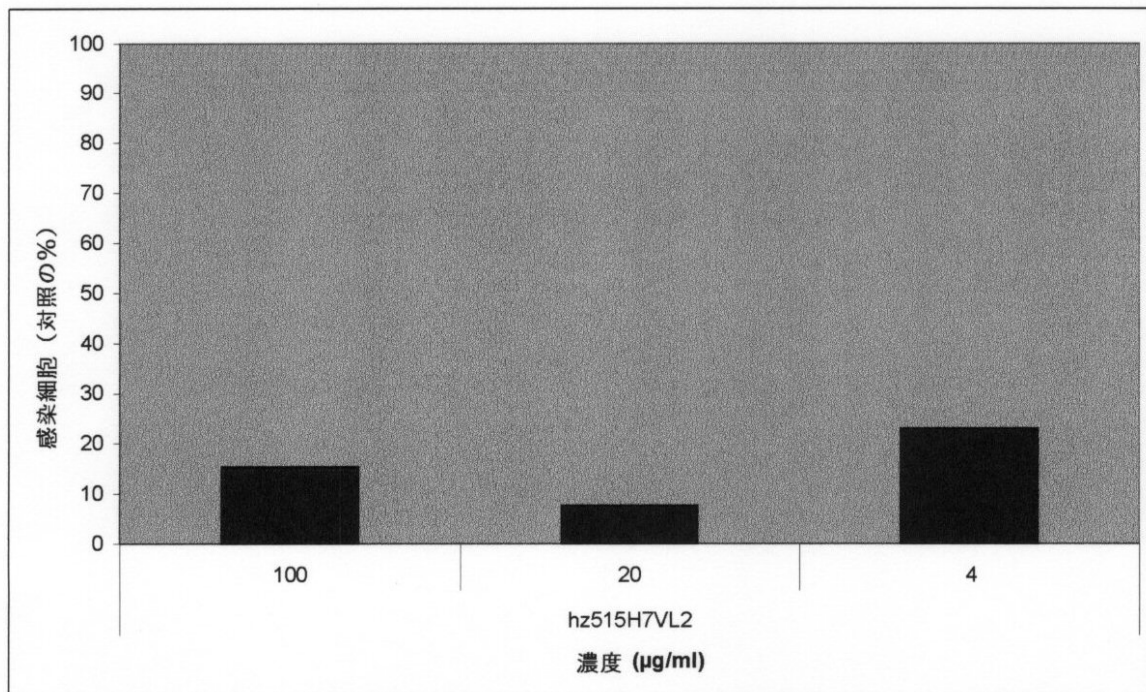
【図 2 2】



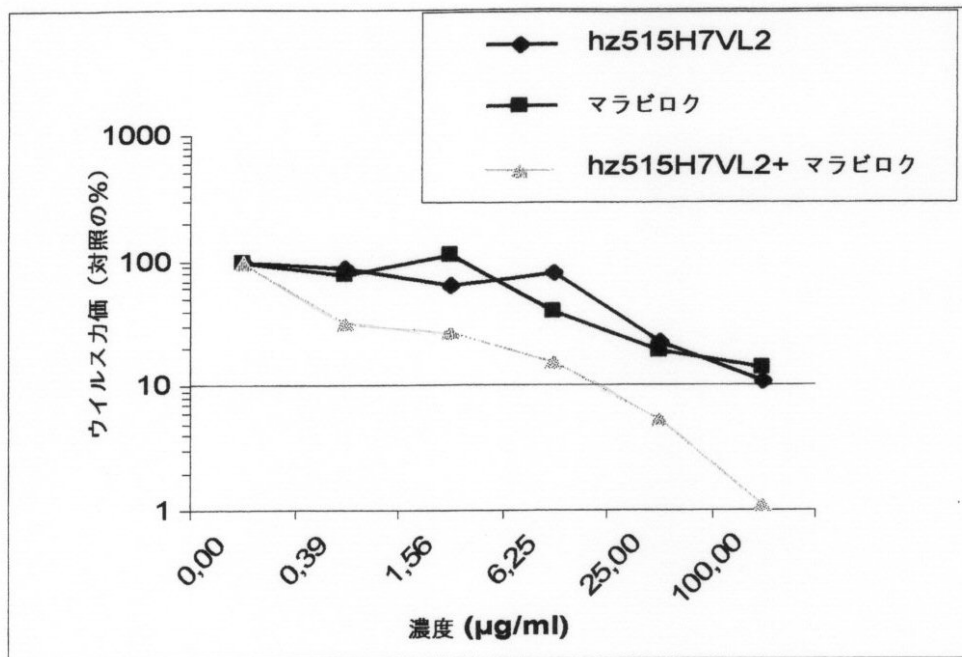
【 図 2 3 】



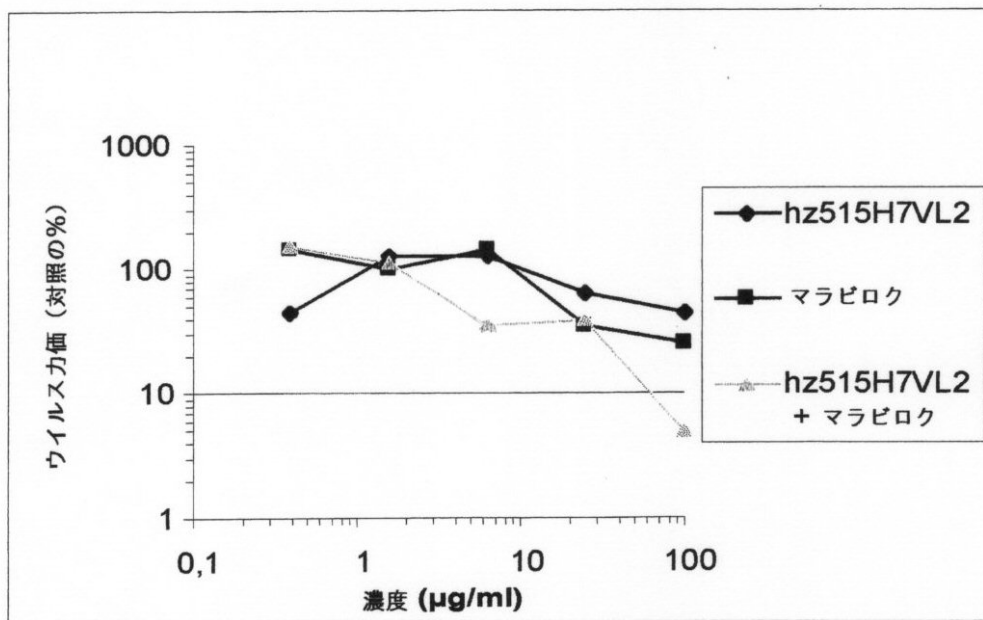
【 図 2 4 】



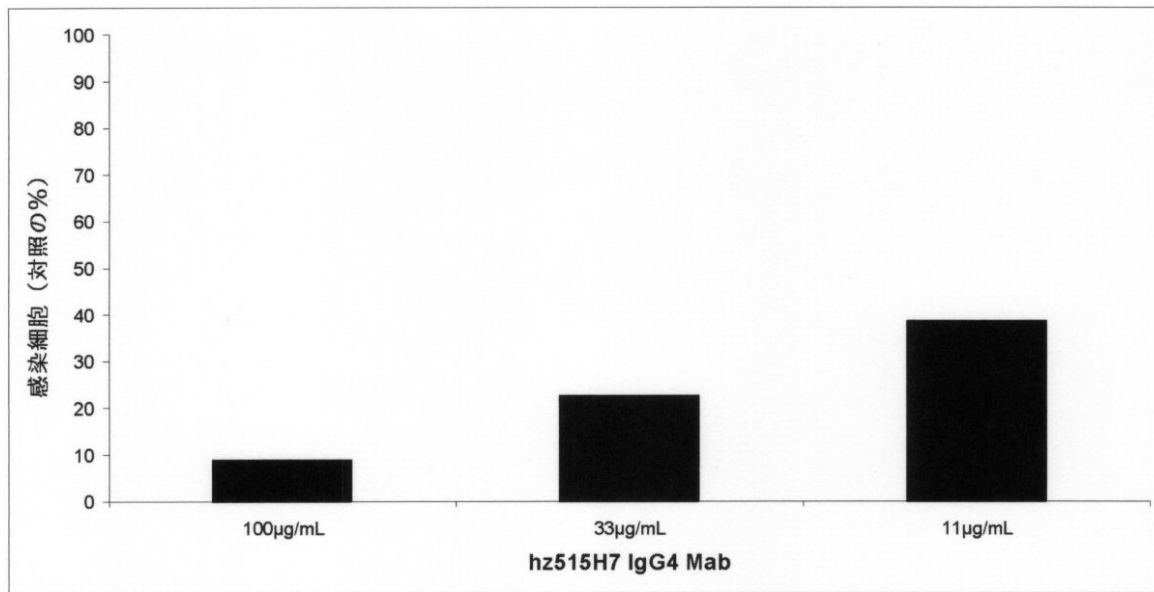
【図 25】



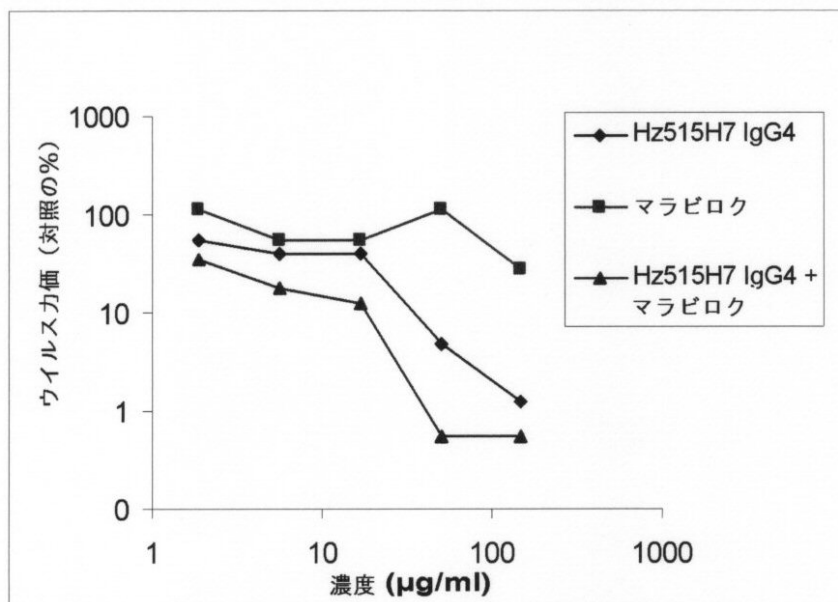
【図 26】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 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 L	----- EP 2 246 364 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 3 November 2010 (2010-11-03) the whole document	1-32
X,P L	----- EP 2 371 863 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 5 October 2011 (2011-10-05) the whole document ----- -/-	1,2,5,7, 11-20

☒ 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

21 February 2012

Date of mailing of the international search report

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	<p>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</p> <p>-----</p>	1-32
A	<p>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</p> <p>-----</p>	1-32
A	<p>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</p> <p>-----</p>	1-32
A	<p>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</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-32

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

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 Retrieved from the Internet: URL:http://jvi.asm.org/cgi/reprint/71/7/5678.pdf></p>	1-32
A	<p>REY-CUILLE 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>	1-32
A	<p>WO 2004/059285 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; ZLOTNIK ALBERT [US]; LAW DEBBIE [US]; MU) 15 July 2004 (2004-07-15)</p>	1-32
A	<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>	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

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

EP 2371863	A1	05-10-2011	EP 2371863 A1	05-10-2011
			WO 2011121040 A1	06-10-2011

WO 2004059285	A2	15-07-2004	AU 2003299747 A1	22-07-2004
			US 2005002939 A1	06-01-2005
			WO 2004059285 A2	15-07-2004

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, T J, 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, R O, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, 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