

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和4年12月13日(2022.12.13)

【特許番号】特許第7181193号(P7181193)

【登録日】令和4年11月21日(2022.11.21)

【特許公報発行日】令和4年11月30日(2022.11.30)

【年通号数】登録公報(特許)2022-218

【出願番号】特願2019-521142(P2019-521142)

【訂正要旨】特許権者の住所の誤載により、下記のとおり全文を訂正する。

【国際特許分類】

C 07 K 16/10(2006.01)

C 12 N 15/13(2006.01)

C 12 P 21/08(2006.01)

C 12 N 1/15(2006.01)

C 12 N 1/19(2006.01)

C 12 N 1/21(2006.01)

C 12 N 5/10(2006.01)

A 61 K 39/395(2006.01)

A 61 P 19/02(2006.01)

A 61 P 29/00(2006.01)

A 61 P 31/14(2006.01)

【F I】

C 07 K 16/10

C 12 N 15/13 Z N A

C 12 P 21/08

C 12 N 1/15

C 12 N 1/19

C 12 N 1/21

C 12 N 5/10

A 61 K 39/395 S

A 61 P 19/02

A 61 P 29/00

A 61 P 31/14

【記】別紙のとおり

10

20

30

40

50

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7181193号  
(P7181193)

(45)発行日 令和4年11月30日(2022.11.30)

(24)登録日 令和4年11月21日(2022.11.21)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	16/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/10
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

F I

Z N A

請求項の数 21 (全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-521142(P2019-521142)  
 (86)(22)出願日 平成29年10月19日(2017.10.19)  
 (65)公表番号 特表2019-534001(P2019-534001)  
 A)  
 (43)公表日 令和1年11月28日(2019.11.28)  
 (86)国際出願番号 PCT/EP2017/076792  
 (87)国際公開番号 WO2018/073387  
 (87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)  
 審査請求日 令和2年10月16日(2020.10.16)  
 (31)優先権主張番号 16306374.6  
 (32)優先日 平成28年10月20日(2016.10.20)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 504456798  
 サノフィ  
 S A N O F I  
 フランス国 7 5 0 1 7 パリ . アヴェニ  
 ュ・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ 4 6  
 (74)代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74)代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (72)発明者 カラ・カーター  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8  
 8 0 7 . ブリッジウォーター . メイル -  
 コード: 5 5 エ - 5 0 5 エ . コーポ  
 レートドライブ 5 5 . サノフィ・ユーワ  
 ス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗C H I K V 抗体およびその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C H I K V に結合し、3つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) および3つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) を含む単離されたヒト I g G モノクローナル抗体であって：

i . 前記 C D R H は、配列番号 5 、 6 および 7 のアミノ酸配列を有し、前記 C D R L は、配列番号 8 、 G N T および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有するか、または

i i . 前記 C D R H は、配列番号 1 1 、 1 2 および 1 3 のアミノ酸配列を有し、前記 C D R L は、配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有し；  
 前記抗体は：

i i i . 位置 4 3 4 におけるアラニン、または

i v . それぞれ位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 におけるアラニン、または

v . それぞれ位置 2 5 0 におけるグルタミンおよび位置 4 2 8 におけるロイシン、または

v i . それぞれ位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、または

v i i . それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも1つの残基を含む F c 領域をさらに含み、  
 ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる前記モノクローナル抗体。

10

20

**【請求項 2】**

以下の：

i . C H I K V p E 2 - E 1 標的に約 1 0 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D ) で結合する；

i i . ヒトの F c R n に約 2 0 0 n M 未満の K D で結合する；

i i i . ヒトの F c R I I I に約 6 0 0 n M 未満の K D で結合する

性質の 1 つまたはそれ以上を有する、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体。

**【請求項 3】**

それぞれ配列番号 5 、 6 および 7 のアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、ならびにそれぞれ配列番号 8 、 G N T および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

10

**【請求項 4】**

それぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 1 3 のアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、ならびにそれぞれ配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 5】**

前記 F c 領域が：

i . 位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、または

20

i i . それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される残基を含み、

ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 6】**

前記 F c 領域は、位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリンを含み、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

30

**【請求項 7】**

前記 F c 領域は、配列番号 5 9 、 6 0 、 6 1 、 6 2 および 6 3 からなる群から選択される配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 8】**

重鎖の可変領域は、配列番号 1 の配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる、請求項 1 から 3 または 5 から 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 9】**

軽鎖の可変領域は、配列番号 2 の配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる、請求項 1 から 3 または 5 から 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

40

**【請求項 10】**

その重鎖は、配列番号 3 1 の配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる、請求項 1 から 3 または 5 から 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 11】**

その軽鎖は、配列番号 2 0 の配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる、請求項 1 から 3 または 5 から 1 0 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 12】**

50

C H I K V に結合し、ならびに配列番号 3 1 の重鎖および配列番号 2 0 の軽鎖を含むかまたはそれからなる単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 1 3】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 4】

C H I K V と関連する関節痛の処置に使用するための、請求項 1 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 5】

C H I K V 感染の防止に使用するための、請求項 1 3 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体および少なくとも 1 種の賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法であって：

i . 前記モノクローナル抗体を産生する細胞株を培養するステップ；

i i . 該産生されたモノクローナル抗体を精製するステップ；および場合により

i i i . 前記モノクローナル抗体を医薬組成物に剤形化するステップ

20

を含む前記方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体をコードする配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 2 0】

配列番号 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 4 0 、 4 2 、および 4 4 からなる群から選択される配列を含むポリペプチドをコードする請求項 1 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の 1 種の抗体および場合によりパッケージング材料を含むキット。

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、チクングニアウイルス（CHIKV）に特異的に結合して中和する抗体および抗体の抗原結合フラグメントに関し、それは、操作されてCHIKV疾患の防止および処置のための予防的および治療的解決をもたらす。本発明はCHIKVを中和する抗体を含む医薬組成物およびCHIKV疾患の防止および処置のための抗体の使用にも関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

CHIKVは、再興性の、蚊によって運ばれる病原体である。CHIKVは、アフリカ、インドおよび東南アジアにおける地方病であるが、これらの領域を越えても、高い攻撃率で予測不能の急激な大発生を起こして、幾百万もの人々に感染する（非特許文献1）。CHIKVのエンベロープ糖タンパク質1（E1）における突然変異が、ネッタイシマカに加えてヒトスジシマカによるウイルスの伝播を可能にして、2005年にはレユニオン、インドおよびインドネシアに広がって深刻な流行を生じ、それに続いてイタリア、フランスおよび中国において旅行者で始まった急激な発生を生じた（非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6）。ヒトスジシマカの広がった地理的範囲に基づいて、該ウイルスは新しい領域に広がると予想され、ヨーロッパおよび南北アメリカは今やCHIKVの急激な発生のリスク下にある。

10

## 【0003】

CHIKVは、トガウイルス科のアルファウイルス属のエンベロープ付きのプラス鎖RNAウイルスである。それは、セムリキ森林ウイルス複合体のメンバーであり、ロスリバーウイルスおよびオニヨンニヨンウイルス（ONNV）と密接に関係しており；それは節足動物、すなわち蚊により伝播されるので、アルボウイルス（節足動物によって運ばれるウイルス）と称することもできる。

20

## 【0004】

CHIKVは、受容体に媒介される内部移行、および初期のエンドソーム中における低pHに引き起こされるタイプIIの膜融合事象により細胞に進入する。CHIKV疾患は、急性、急性後および慢性の多発性関節炎／多発性関節痛期により特徴づけられ、後者は、通常対称性であり、しばしば無能力をもたらし、数か月または数年継続し得る。発熱、発疹、筋肉痛。および／または疲労のような他の症状も、急性期中に存在する。最近の流行は、共存症を有する非常に若い患者および高齢の患者に限定されるようであるCHIKV疾患の非定型および重症の臨床的形態および一部は死とも関連していた。

30

## 【0005】

現在、CHIKV疾患のための特定の予防的または治療的処置はない。CHIKVは、通常、ベッドで休養、輸液、および発熱および疼痛の症状を緩和するために簡単な鎮痛剤および／または非ステロイド抗炎症性薬剤（NSAID）のような医薬で症状に処置されている。CHIKVに対するワクチン候補が最初に45年前に提案されたが、これまでに試験された多くのワクチン候補は、保護抗体を誘発すること、または有意の安全性の結果を示すことに成功しなかった。

40

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【文献】Powers AM, Logue CH, 2007, J. Gen. Virol. 88: 2363-2377  
 Tsetsarkin KAら 2007, PLoS Pathog. 3: e201;  
 Schuffenecker Iら 2006, PLoS Med. 3: e263;  
 Wu D, Zhang Yら 2013, Virol. J. 10: 174;  
 Rezza Gら 2007, Lancet 370: 1840-1846;  
 Burt FJ 2012, Lancet 379: 662-671

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

CHIKVを標的とする特異的モノクローナル抗体の使用を含む、CHIKVに対する向上した治療効力を示す処置に対する必要性が未だ存在する。予防的および治療的使用のために適当なCHIKVを中和する抗体の必要性が当技術分野に存在する。特に、そのような抗体は、異なる株のCHIKウイルスを高い標的結合親和性を以て適切に中和して、適当な薬物動態学的パラメーターを示し、投与されると適当な半減期を示し、大規模における効率的な製造を可能にしながら、エフェクター機能と関連するFc RIIIaに対するそれらの結合を保持する必要がある。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明で開示したように、本出願の発明者らは、特異的なCHIKV中和抗体を選択および操作し、それらの曝露と関連する薬物動態を改善し、エフェクター機能に関連するFc RIIIaに対するそれらの結合を維持して、それらを、CHIKV疾患を防止および処置するための治療学の開発と適合性にして、CHIKVに対する効果的な療法のための技術分野における必要性に対処することができた。

## 【0009】

本発明の抗体は、異なるCHIKV株に対する高い結合親和性（ナノモル濃度の範囲内）を有する。それ故、それらは、異なるCHIKV株に対して、広い、非常に強力な中和活性を示す。さらに、本発明の抗体は、ヒトFcRn受容体に対する改善された結合を有し、同時にFc RIIIaへの結合を保持してそれらを増大した半減期と適合性にして、同時にエフェクター機能と関連するFc RIIIaに対するそれらの結合を維持する。

20

## 【0010】

第1の態様において、本発明は、CHIKVに結合し、3つの重鎖相補性決定領域（CDRH）および3つの軽鎖相補性決定領域（CDRL）を含む単離されたモノクローナル抗体であって：

i. 前記CDRHは配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有し、前記CDRLは配列番号8、GNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有するか、または

ii. 前記CDRHは、配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有し、前記CDRLは配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有するか、または

iii. 前記CDRHおよびCDRLHは、1つもしくは2つのアミノ酸置換により  
i. もしくはii. の配列と異なるアミノ酸配列を有し；

および前記抗体は：

iv. 位置434におけるアラニン、または

v. それぞれ位置307、380および434におけるアラニン、または

vi. それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシン、または

vii. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または

viii. それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも1つの残基を含むFc領域をさらに含み；  
ここで、前記アミノ酸の位置は、EUインデックスにより与えられるモノクローナル抗体に関する。

## 【0011】

一実施形態において、単離されたモノクローナル抗体は、CHIKVに結合し、および3つの重鎖相補性決定領域（CDRH）および3つの軽鎖相補性決定領域（CDRL）を含み、ここで：

i. 前記CDRHは、配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有し、および前記C

40

50

D R L は、配列番号 8、 G N T および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有するか、または  
i i . 前記 C D R H は、配列番号 1 1、 1 2 および 1 3 のアミノ酸配列を有し、お  
よび前記 C D R L は、配列番号 1 4、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有するか  
、または

i i i . 前記 C D R H および C D R L H は、1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により  
i . もしくは i i . の配列と異なるアミノ酸配列を有し；  
および前記抗体は：

i v . 位置 4 3 4 におけるアラニン、または  
v . それぞれ位置 3 0 7、3 8 0 および 4 3 4 におけるアラニン、または  
v i . それぞれ位置 2 5 0 におけるグルタミンおよび位置 4 2 8 におけるロイシン  
、または

v i i . それぞれ位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、  
または

v i i i . それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニン  
および位置 2 5 6 におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも 1 つの残基を含む F c 領域をさらに含み；

ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられ；

および抗体は以下の：

i x . C H I K V p E 2 - E 1 標的と約 1 0 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D )  
で結合する；

x . ヒト F c R n と約 2 0 0 n M 未満の K D で結合する；

x i . ヒト F c R I I I と約 6 0 0 n M 未満の K D で結合する

性質の 1 つまたはそれ以上を有する。

#### 【 0 0 1 2 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、それぞれ配列番号 5、6 および 7 のア  
ミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ  
酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、前記抗体は、それぞれ配  
列番号 8、G N T および配列番号 1 0 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つまたは  
2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D  
R L ) を含む。

#### 【 0 0 1 3 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は：

- 配列番号 5 の配列からなる C D R H 1 ；
- 配列番号 6 の配列からなる C D R H 2 ；
- 配列番号 7 の配列からなる C D R H 3 ；
- 配列番号 8 の配列からなる C D R L 1 ；
- 配列 G N T からなる C D R L 2 ；
- 配列番号 1 0 の配列からなる C D R L 3

を含む。

#### 【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は、それぞれ配列番号 1 1、1 2 お  
よび 1 3 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異  
なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、前記抗体は、  
それぞれ配列番号 1 4、G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有するか、またはこれ  
らの配列と 1 つもしくは 2 つにアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの  
軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) を含む。

#### 【 0 0 1 5 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ；
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ；

10

20

30

40

50

- 配列番号 1 3 の配列からなる C D R H 3 ；
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ；
- 配列 G T S からなる C D R L 2 ；
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

を含む。

**【 0 0 1 6 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体は：

- i . 位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、または
  - i i . それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび  
位置 2 5 6 におけるグルタミン酸
- からなる群から選択される残基を含む F c 領域を含み、  
ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる。

**【 0 0 1 7 】**

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は F c 領域を含み、ここで、前記 F c 領域は、位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリンを含み、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる。

**【 0 0 1 8 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体はカッパ軽鎖またはラムダ軽鎖を含む。

**【 0 0 1 9 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 5 9 、 6 0 、 6 1 、 6 2 および 6 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる F c 領域を有する。

**【 0 0 2 0 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を有する。

**【 0 0 2 1 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 2 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を有する。

**【 0 0 2 2 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 3 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖を有する。

**【 0 0 2 3 】**

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 2 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖を有する。

**【 0 0 2 4 】**

第 2 の態様において、単離されたモノクローナル抗体は、C H I K V 、またはその抗原結合フラグメントに結合し、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、および前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) をさらに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、および / または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく ; および / または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

**【 0 0 2 5 】**

一実施形態において、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは：

配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ；

配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ；

10

20

30

40

50

配列番号 3 3 の配列からなる C D R H 3 ;  
 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;  
 G T S からなる C D R L 2  
 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

を含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、および / または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく；および / または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

【 0 0 2 6 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、それ 10  
 ぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは  
 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D  
 R H ) を含み、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 4 、 G  
 T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミ  
 ノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) をさ  
 らに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく；または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

【 0 0 2 7 】

別の実施形態において、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、それ 20  
 ぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 のアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性  
 決定領域 ( C D R H ) を含み、および前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それ  
 ぞれ配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性  
 決定領域 ( C D R L ) をさらに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく；または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

【 0 0 2 8 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、それ 30  
 ぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは  
 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D  
 R H ) を含み、および前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1  
 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つ  
 のアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L  
 ) をさらに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく；または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではなく、

ここで、抗体は以下の：

i v . C H I K V p E 2 - E 1 標的に約 1 0 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D ) で  
 結合する；

v . ヒトの F c R n に約 2 0 0 n M 未満の K D で結合する；

v i . ヒトの F c R I I I に約 6 0 0 n M 未満の K D で結合する  
 性質の 1 つまたはそれ以上を有する。

【 0 0 2 9 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、 I 、 L 、 V 、 Q および N からなる群か  
 ら選択される、配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸を含む。

【 0 0 3 0 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は：

10

20

30

40

50

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ;
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ;
- 配列番号 3 4 の配列からなる C D R H 3 ;
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;
- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

を含む。

【 0 0 3 1 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、Q、E、S、TおよびDからなる群から選択される、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸を含む。

10

【 0 0 3 2 】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ;
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ;
- 配列番号 3 5 の配列からなる C D R H 3 ;
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;
- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

を含む。

【 0 0 3 3 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、A、SおよびTからなる群から選択される、配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸を含む。

20

【 0 0 3 4 】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ;
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ;
- 配列番号 3 6 の配列からなる C D R H 3 ;
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;
- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

30

を含む。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 5 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を有する。

【 0 0 3 6 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 4 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を有する。

【 0 0 3 7 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 4 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖を有する。

40

【 0 0 3 8 】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 3 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる軽鎖を有する。

【 0 0 3 9 】

この第 2 の態様の別の態様において、モノクローナル抗体は：

- i . 位置 4 3 4 におけるアラニン、または
- i i . それぞれ位置 3 0 7、3 8 0 および 4 3 4 におけるアラニン、または
- i i i . それぞれ位置 2 5 0 におけるグルタミンおよび位置 4 2 8 におけるロイシン、または

i v . それぞれ位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、ま

50

たは

v . それぞれ位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256 におけるグルタミン酸からなる群から選択される残基を含む Fc 領域をさらに含みここで、前記アミノ酸の位置は EU インデックスにより与えられる。

【0040】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は：

i . 位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリン、または  
i i . 位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256 におけるグルタミン酸

10

からなる群から選択される残基を含む Fc 領域を有し、ここで、前記アミノ酸の位置は EU インデックスにより与えられる。

【0041】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリンを含む Fc 領域を有し、ここで、前記アミノ酸の位置は EU インデックスにより与えられる。

【0042】

本発明のこの態様の別の実施形態において、モノクローナル抗体は、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖を含む。

【0043】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 59、60、61、62 および 63 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる Fc 領域を有する。

20

【0044】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 57 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を有する。

【0045】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 4 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を有する。

【0046】

30

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 53 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる重鎖を有する。

【0047】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、配列番号 38 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる軽鎖を有する。

【0048】

第 4 の態様において、本発明は、医薬として使用するためのモノクローナル抗体に関する。

【0049】

別の実施形態において、モノクローナルは、CHIKV と関連する関節痛の処置に使用するためのものである。

40

【0050】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、CHIKV 感染の防止に使用するためのものである。

【0051】

第 5 の態様において、本発明は、モノクローナル抗体および少なくとも 1 種の賦形剤を含む医薬組成物に関する。

【0052】

第 6 の態様において、本発明は、モノクローナル抗体を產生する細胞株に関する。

【0053】

50

第7の態様において、モノクローナル抗体を產生する方法であり、前記方法は、(i)第6の態様により細胞株を培養するステップ；(ii)產生されたモノクローナル抗体を精製するステップ；および場合により(iii)前記モノクローナル抗体を医薬組成物に剤形化するステップを含む。

【0054】

第8の態様において、本発明は、本発明で特徴づけられる抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする配列を含むポリヌクレオチドに関する。一実施形態において、該ポリヌクレオチドは、配列番号18、21、22、24、26、28、30、32、39、40、42、44、46、48、50、52および54の配列の1つと少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードする。一実施形態において、該ポリヌクレオチドは、それが配列番号18、21、22、24、26、28、30、32、39、40、42、44、46、48、50、52および54の配列の1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を有することを特徴とする。

10

【0055】

第9の態様において、本発明は、本発明で特徴づけられる少なくとも1種の抗体を含むキットに関する。一実施形態において、前記キット場合によりパッケージング材料を含む。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】ヒトのIgG1の重鎖のCH1、ヒンジ、CH2およびCH3領域のアミノ酸配列；ヒンジおよびCH2およびCH3領域の部分がFc領域を構成することを示す図である。アミノ酸残基の番号づけは、Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th, Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))で説明されているEUインデックスに従う。本発明で主に扱うFc領域の置換された残基を四角で囲ってある。

20

【図2】IgG1のFc領域配列アラインメント：配列番号17；配列番号59；配列番号60；配列番号61；配列番号62および配列番号63を示す図である。

【図3】潜在的脱アミノ化および酸化モチーフを排除するために作製されたmAb2のCDRH3内における突然変異のE2-E1標的への結合に対する効果を示す図である。結果の比較を各突然変異体について2連で示す。

30

【図4-1】mAb1およびmAb2のそれぞれのFc領域における置換の、FcRnへの結合に対する効果を示す図である。pH6.0における結果の比較を、ヒトのFcRnに対するmAb1(図4A)およびmAb2(図4C)について、ならびにマウスのFcRnに対するmAb1(図4B)およびmAb2(図4D)について2連で示す。

【図4-2】図4-1の続き。

【図4-3】図4-2の続き。

【図4-4】図4-3の続き。

【図5-1】mAb1およびmAb2のそれぞれのFc領域における突然変異のE2-E1標的への結合に対する効果を示す図である。結果を、株LR2006(図5A)およびSL15649(図5B)のそれぞれから誘導されたE1-E2抗原について2連で示す。

40

【図5-2】図5-1の続き。

【図6-1】mAb1およびmAb2のそれぞれのFc領域における置換の、FcRIIaの結合に対する効果を示す図である。結合結果を、ヒトFcRIIa高親和性受容体(FcRIIaV158)に対するmAb1(図6A)およびmAb2(図6B)について、ならびにヒトFcRIIa低親和性受容体(FcRIIaF158)に対する、それぞれについて(mAb1について図6CおよびmAb2について図6D)2連で示す。

【図6-2】図6-1の続き。

【図6-3】図6-2の続き。

【図6-4】図6-3の続き。

50

【図7-1】標準的ブラーク減少アッセイを使用するmAb1およびmAb7の中和活性を示す図である。mAb1およびmAb7は、3通り全ての遺伝子型すなわち、アジア型(図7A)、東中部および南部アフリカ型(ESCA)(図7B)および西部アフリカ型(図7C)からのチクングニアウイルスを非常に強力な活性で阻害する。

【図7-2】図7-1の続き。

【図7-3】図7-2の続き。

【図8】マウスにおけるmAbによる予防の研究。CHIKV感染の前2、7または14日に250μg/マウスで与えられたmAb1およびmAb7の、DBA/1Jマウスの右後脚に接種後3日におけるウイルス力価に対する効果を示す図である。ウイルスの力価を組織の1グラム当たり50%細胞培養感染性用量(CCID<sub>50</sub>)としてプロットしてある。

10

【図9-1】マウスにおけるmAb曝露後療法を示す図である。3dipiでmAb2、7、11および14の固定された250μg用量の単回の腹腔内投与後、右後脚に接種後5日(dipi)におけるウイルス力価(図9A)。3dipiで種々の用量の単回投与後(10から250μg/マウス)(図9B)におけるmAb7およびmAb14の5dipiの右後脚におけるウイルス力価に対する用量範囲の効果。ウイルスの力価を、組織の1グラム当たりの50%細胞培養感染性用量(CCID<sub>50</sub>)としてプロットしてある。上側の横線は組織ホモジネートについての検出の平均限界である。

【図9-2】図9-1の続き。

【図10】非ヒト霊長類におけるmAbの薬物動態を示す図である。静脈内(IV)ボーラスにより、2.5mg/kgを雄カニクイザルサル(Macaca fasciculensis)に投与されたmAb1およびmAb7についての薬物動態の比較。

20

【発明を実施するための形態】

【0057】

定義

「抗体」は、2つの重鎖がジスルフィド結合により互いに連結されて、かつ各重鎖がジスルフィド結合で軽鎖に連結されている天然または通常の抗体である。哺乳動物では、抗体は、5種の主要なクラスまたはアイソタイプ、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMに分類される。それらは、それらがそれぞれ含有する重鎖、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマまたはミューによって分類される。これらは、定常ドメインの配列および数、ヒンジ構造および抗体の価数が異なる。2つのタイプの軽鎖、ラムダ(λ)およびカッパ(κ)があり、2つのうちカッパ軽鎖がより一般的である。これらはタンパク質配列が比較的異なるが、それらは同様な構造および機能を共有する。

30

【0058】

5種の主要な重鎖クラス(またはアイソタイプ)が、抗体分子:IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEの機能の活性を決定する。各鎖は、別個の配列ドメインを含有する。IgGは正常ヒト血清中で最も豊富な抗体であり、全免疫グロブリンプールの70-85%を占める。それは分子量が約150KDのモノマーであり、第二次免疫応答の主要な抗体であり、5種の免疫グロブリンクラスのうち最長の半減期を有する。IgGは各々異なる重鎖を含有する4種のヒトサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4)からなる。それらは、高度に相同意性であり、主としてヒンジ領域およびそれらが宿主の免疫システムを活性化する程度において異なる。IgG1およびIgG4は、ヒンジ領域中に2個の鎖間のジスルフィド結合を含有し、IgG2は4個を有し、IgG3は11個を有する。

40

【0059】

軽鎖は、2つのドメインまたは領域、すなわち、1つの可変ドメイン(VL)および1つの定常ドメイン(CL)を含む。重鎖は、4つのドメイン、すなわち、1つの可変ドメイン(VH)および3つの定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3、総称的にCHと称される)を含む。軽鎖(VL)および重鎖(VH)の両方の可変領域が、抗原に対する結合認識および特異性を決定する。軽鎖(CL)および重鎖(CH)の定常領域ドメイン

50

は、抗体鎖の会合、分泌、胎盤を越える移動性、補体結合、およびFc受容体(FcR)に対する結合のような重要な生物学的性質を付与する。Fvフラグメントは、免疫グロブリンのFabフラグメントのN末端部分であり、1つの軽鎖および1つの重鎖の可変部分からなる。抗体の特異性は、抗体の結合部位と抗原性決定基との間の構造相補性に存する。抗体の結合部位は、主として超可変性または相補性決定領域(CDR)による残基でできている。時たま、非超可変基またはフレームワーク領域(FR)からの残基が、ドメイン構造全体に、それ故、結合部位に影響する。「相補性決定領域またはCDR」とは、元來の免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性を一緒に定めるアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽および重鎖は、各々、CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L(軽鎖の相補性決定領域について)またはCDRL1、CDRL2、CDRL3およびCDR1-H、CDR2-H、CDR3-H(重鎖の相補性決定領域について)またはCDRH1、CDRH2、CDRH3と呼ばれる3つのCDRをそれぞれ有する。通常の抗体の抗原結合部位は、それ故、重および軽鎖のV領域の各々からのCDRセットを含む6つのCDRを含む。

#### 【0060】

「フレームワーク領域」(FR)とは、CDR間に差しはさまれたアミノ酸配列、すなわち、単一種における異なる免疫グロブリンの間で比較的保存されている、免疫グロブリンの軽および重鎖の可変領域のこれらの部分を指す。免疫グロブリンの軽および重鎖は、各々FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L、およびFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hと、呼ばれるそれぞれ4つのFRを有する。

#### 【0061】

本明細書において使用する、「ヒトのフレームワーク領域」は、天然に生じるヒト抗体のフレームワーク領域と実質的に同一の(約85%またはそれ以上、特に90%、95%、97%、99%または100%)フレームワーク領域である。

#### 【0062】

一実施形態において、免疫グロブリン軽または重鎖におけるCDR/FRの定義は、IMGT定義(Lefranc, M. Pら, 2003, Dev Comp Immunol. 27(1): 55-77; www.imgt.org)に基づいて決定されるべきである。本発明で主に扱うCDR配列はIMGTの命名法に従って与えられる。

#### 【0063】

本明細書において使用する用語「抗体」は、通常のまたは全長の抗体(すなわち、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む抗体)、単一ドメインの抗体、および通常のおよび単一ドメインの抗体のフラグメントを指す。本明細書において使用する用語「抗体」は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒトの抗体、および多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体および三重特異性抗体など)を含むが、これらに限定されない。用語「抗体」は、シグナルペプチド(または、存在すればプロペプチド)を含む抗体、および鎖(単数または複数)の分泌およびタンパク質分解プロセシングで得られる成熟形態の両方を指す。

#### 【0064】

本明細書において使用する、抗体または免疫グロブリンは、比較的最近記載された「単一ドメイン抗体」も含み、それは、その相補性決定領域が単一ドメインポリペプチドの部分である抗体である。単一ドメイン抗体の例は、重鎖抗体、元來軽鎖が欠けている抗体、通常の4鎖抗体から誘導される単一ドメイン抗体、操作された単一ドメイン抗体を含む。単一ドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギおよびウシを含むが、これらに限定されない任意の種から誘導することもできる。単一ドメイン抗体は、軽鎖を欠く重鎖抗体として知られる天然に生じる単一ドメイン抗体であることもある。特に、ラクダ科の種、例えば、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカおよびグアナコは、元來軽鎖を欠く重鎖抗体を産生する。ラクダ科の動物の重鎖抗体は、CH1ドメインも欠く。

#### 【0065】

軽鎖を欠くこれらの単一ドメイン抗体の可変重鎖は、当技術分野で「VHH」または「ナノボディ」として知られている。通常のVHドメインと同様に、VHHは、4つのFR

10

20

30

40

50

および3つのC D Rを含有する。ナノボディは、通常の抗体に優る利点を有する：すなわち、それらはI g G分子より約10倍小さく、その結果として、適当に折り畳まれた機能性ナノボディを、高収率を達成しながらインビトロにおける発現により産生することができる。さらに、ナノボディは非常に安定で、プロテアーゼの作用に対して抵抗性である。ナノボディの性質および産生は、HarmsenおよびDe Haard H Jにより総説されている( Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov; 77 (1) : 13 - 22)。

【0066】

本明細書において使用する、「単離された抗体」は、主として異なる抗原特異性を有する他の抗体を含まない抗体を指し；例えば、C H I K Vに結合する単離された抗体、またはそれらのフラグメント、またはその抗原結合フラグメントは、主としてC H I K V以外の抗原に特異的に結合する抗体を含まない。

10

【0067】

本明細書において使用する「遮断抗体」または「中和抗体」、または「C H I K V活性を中和する抗体」、または「C H I K Vに対して中和する活性を示す／発揮する抗体」、または「C H I K Vを中和する抗体」または「抗C H I K V抗体」は、そのC H I K Vに対する結合がC H I K Vの少なくとも1種の生物学的活性の阻害を生ずる抗体を指す。例えば、抗体は、細胞に対するC H I K Vの付着を遮断することによりC H I K V株を中和して、それによりC H I K Vによる前記細胞の感染を防止することができる。

20

【0068】

本明細書において使用する用語「モノクローナル抗体」または「m A b」は、特定の抗原に対する単一のアミノ酸組成物の抗体分子を指し、如何なる特定の方法による抗体の産生を要求すると解釈されるべきではない。モノクローナル抗体は、B細胞またはハイブリドーマの单一クローンにより産生されるが、組換え、すなわち、タンパク質工学により産生されることも可能である。

【0069】

用語「キメラ抗体」は、その最も広い意味で、1種の抗体からの1つまたはそれ以上の領域と1種またはそれ以上の他の抗体（単数または複数）からの1つまたはそれ以上の領域とを含有する操作され抗体を指す。特に、キメラ抗体は、別の抗体、特にヒトの抗体のC HドメインおよびC Lドメインと結合した非ヒト動物に由来する抗体のV HドメインおよびV Lドメインを含む。非ヒト動物として、任意の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等を使用することができる。キメラ抗体は、少なくとも2種の異なる抗原に対する特異性を有する多重特異性抗体を意味することもできる。一実施形態において、キメラ抗体は、マウス起源の可変ドメインとヒト起源の定常ドメインとを有する。

30

【0070】

用語「ヒト化抗体」は、ヒトにおける免疫応答を回避または最小化するために、最初は全体的にまたは部分的に非ヒト起源のものであり、あるアミノ酸、特に重鎖および軽鎖のフレームワーク領域中のアミノ酸を置き換えることにより改変された抗体を指す。ヒト化抗体の定常ドメインは、ほとんどの場合、ヒトのC HおよびC Lドメインである。一実施形態において、ヒト化抗体はヒト起源の定常ドメインを有する。

40

【0071】

(通常の)抗体の「フラグメント」は、完全抗体の部分、特に完全抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例は、F v、F a b、F ( a b ' ) 2、F a b '、d s F v、( d s F v ) 2、s c F v、s c ( F v ) 2、ダイアボディ、抗体フラグメントから形成された二重特異性抗体および多重特異性抗体を含む。通常の抗体のフラグメントは、重鎖抗体またはV H Hのような単ードメイン抗体であることもできる。

【0072】

用語「F a b」は、I g Gをパパインというプロテアーゼで処理することにより得られるフラグメントの中で、H鎖のN末端側の約半分および全L鎖がジスルフィド結合を通して結合されて一緒になった、約50,000の分子量および抗原結合活性を有する抗体フ

50

ラグメントを意味する。

【0073】

用語「F(ab')2」は、IgGをペプシンというプロテアーゼで処理することにより得られるフラグメントの中で、ヒンジ領域のジスルフィド結合を通して結合したFabより僅かに長い、約100,000の分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを意味する。

【0074】

用語「Fab'」は、F(ab')2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することにより得られる、約50,000の分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指す。

10

【0075】

「Fc領域」または「Fcドメイン」は、抗体の重鎖のカルボキシル末端部と定義されて、全ての免疫グロブリンに共通のタンパク質配列ならびに免疫グロブリンの個々の異なるクラスに固有の決定基を含有する。例として、ヒトIgG1の重鎖は、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3領域を含み；ヒンジおよびCH2およびCH3領域の部分がFc領域を構成する。図1に示したように、本発明の目的のためのFc領域のアミノ酸残基の番号づけは、Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) で説明されているEUインデックスに従う。その結果、「該/前記アミノ酸の位置がEUインデックスにより与えられている」という表現は、上のKabat et al., 1991で説明されている、図1に示したFc領域のこの番号づけを指す。

20

【0076】

このFc領域のドメインは、免疫グロブリンの生物学的機能の決定における中心であり、これらの生物学的機能は「エフェクター機能」と称される。これらのFcドメインに媒介される活性は、Bリンパ球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好塩基球、好中球およびマスト細胞、または種々の補体構成要素を含む免疫学的エフェクター細胞により媒介される。これらのエフェクター機能は、抗体のFcドメインの前記受容体（または「Fc受容体」）または補体構成要素（単数または複数）への結合による前記エフェクター細胞の表面にある受容体の活性化を含む。抗体依存性の細胞の細胞障害性（ADCC）、抗体依存性の細胞の食作用（ADCP）および補体依存性の細胞障害性（CDC）活性は、これらのエフェクター機能に属して、エフェクター細胞のFc RI (CD64)、Fc RII、Fc RIIAのようなFc受容体またはC1qのような補体構成要素に対するFcドメインの結合を含む。種々のヒト免疫グロブリンクラスの中で、ヒトIgG1およびIgG3媒介のADCCは、IgG2およびIgG4よりも効果的である。用語「Fc受容体」は、Fc RI (CD64)、Fc RIIIAおよびFc RIIIB (CD16b)、Fc 受容体 (Fc RIまたはCD89) およびFc 受容体 (Fc RIおよびFc RI (CD23) を含むが、これらに限定されない。数通りのアミノ酸置換が、文献で、異なるヒトIgGアイソタイプにおけるエフェクター機能の低下に結びつくと報告されている (Stroh et al., 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691中の表2を参照されたい)。

30

【0077】

単一鎖Fv（「scFv」）のポリペプチドは、共有結合で連結されたVH:VLヘテロダイマーであり、それは、ペプチドをコードするリソマーにより連結された、VHおよびVLをコードする遺伝子を含む遺伝子融合から通常発現される。ヒトscFvフラグメントは、特に遺伝子組換え技法を使用することにより、適当な構造に保たれるCDRを含むことができる。2価および多価抗体のフラグメントは、1価のscFvsの会合により自発的に形成されるか、または2価sc(Fv)2のようなペプチドリソマーにより1

40

50

価の  $s_c Fv$  をカップリングさせることにより生成されるかのいずれかが可能である。「 $d_s Fv$ 」は、ジスルフィド結合により安定化された  $VH$  : :  $VL$  ヘテロダイマーである。「 $(d_s Fv)_2$ 」は、ペプチドリンカーによりカップルされた 2 つの  $d_s Fv$  を表す。

【0078】

用語「二重特異性抗体」または「 $BsAb$ 」は、単一分子内に 2 種の抗体の抗原結合部位を組み合わせた抗体を表す。したがって、 $BsAb$  は、2 種の異なる抗原と同時に結合することができる。遺伝子操作は、増大した頻度で、例えば E P 2 0 5 0 7 6 4 A 1 に記載された結合の性質およびエフェクター機能の所望のセットを用いて、抗体または抗体誘導体を設計、改変、および产生するために使用される。

【0079】

用語「多重特異性抗体」は、単一分子内の 2 種またはそれ以上の抗体の抗原結合部位を組み合わせた抗体を表す。

【0080】

用語「ダイアボディ」は、2 種の抗原が結合している部位を有する小さい抗体フラグメントを指し、そのフラグメントは、同じポリペプチド鎖で軽鎖の可変ドメイン ( $VL$ ) に接続された重鎖の可変ドメイン ( $VH$ ) ( $VH - VL$ ) を含む。2 つのドメイン間を同じ鎖で対にすることを可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインは、別の鎖の相補性ドメインと対を形成することを強制されて 2 種の抗原結合部位を生じる。

【0081】

用語「ハイブリドーマ」は、非ヒト哺乳類を抗原で免疫することにより製造された B 細胞を、マウス等に由来する骨髄腫細胞と細胞融合させることにより得られる細胞を表し、それは抗原特異性を有する所望のモノクローナル抗体を产生する。

【0082】

本明細書において使用する、「特異的に結合する」または「と特異的に結合する」または「と結合する」等は、抗体またはその抗原結合フラグメントが、生理学的条件下で比較的安定な抗原との複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも、約  $1 \times 10^{-8} M$  またはそれ以下の平衡解離定数 ( $K_D$ ) により特徴づけることができる（例えば、より小さい  $K_D$  はより緊密な結合を表す）。2 種の分子が特異的に結合するかどうかを決定する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴等を含む。本明細書で記載されているように、抗体は、例えば、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E (商標) を使用して、 $CHIKV$  および / または  $CHIKV$  抗原に対するそれらの特異的結合により特徴づけられてきた。

【0083】

本明細書において使用する「 $CHIKV$  抗原」は、本明細書に記載されている抗体の特異的天然抗原、すなわち、 $CHIKV$  のタンパク質 E 2 を意味する。それは、例えば、本明細書の材料および方法で記載された抗  $CHIKV$  抗体の結合親和性をインピトロで測定するための表面プラズモン共鳴結合実験で使用され、「 $pE2 - E1$  タンパク質」または「 $pE2 - E1$  標的」または「 $p62 - E1$ 」または「 $his$  タグ付き  $CHIKV E2$ 」または「 $CHIKV$  標的  $pE2 - E1$ 」または「 $CHIKV$  の  $pE2 - E1$  抗原」と呼ばれる  $CHIKV$  のエンベロープタンパク質 E 1 および  $CHIKV$  の特異的抗原 E 2 を含む組換えタンパク質も包含する。

【0084】

本明細書において使用する「酸性環境」とは、pH 7 未満の環境を意味して；それは、例えば pH 6 で行われる結合実験は、酸性環境における結合データをもたらすと理解される。

【0085】

「参考配列と少なくとも 80 % 同一の」配列は、その全長で、参考配列の全長と 80 % 以上、特に 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の配列同一性を有する配列である。

10

20

30

40

50

## 【0086】

「配列同一性」のパーセンテージは、比較枠にわたって最適に整列された2つの配列を比較することにより決定することができて、その際、2つの配列の最適の整列について、比較枠中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、参照配列（それは付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列で出現する位置の数を決定することにより計算されて一致した位置の数を得、比較枠中における一致した位置の数を位置の全数により除して、結果を100倍することにより配列同一性のパーセンテージを得る。比較のための配列の最適の整列は、全体的なペアごとの整列により、例えば、Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) のアルゴリズムを使用して実施される。配列同一性のパーセンテージは、例えば、プログラムNeedleを、BLOSUM62マトリックス、および以下のパラメーター、ギャップ - オープン = 10、ギャップ - エクステンド = 0.5で使用して、容易に決定することができる。10

## 【0087】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、化学性質（例えば、電荷または疎水性）が同様な側鎖R基を有する別のアミノ酸残基により置換された置換である。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的性質を実質的に変化させない。化学性質が同様な側鎖を有するアミノ酸の群の例は、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；2) 脂肪族のヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；3) アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン；5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン；6) 酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸；および7) イオウ含有側鎖：システインおよびメチオニンを含む。保存的アミノ酸置換群は：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン - トリプトファン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタメート - アスパルテート、およびアスパラギングルタミンである。20

## 【0088】

抗体の「抗原結合部分」、抗体等の「抗原結合フラグメント」という本明細書において使用する用語は、抗原と特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然に生じる、酵素的に得ることができる、合成の、または遺伝子操作されたポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の「抗原結合部分」、または「抗体フラグメント」という本明細書において使用する用語は、CHIKVおよび/またはCHIKV抗原と結合する能力を保持する抗体の1つまたはそれ以上のフラグメントを指す。そのような抗原結合部分は、典型的には抗体のCDRを含む。30

## 【0089】

「抗体依存性の細胞媒介細胞障害性」または「ADCC」は、分泌されて、ある種の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合した抗体が、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が、抗原を担持する標的細胞に特異的に結合して、その後標的細胞を殺滅することを可能にする細胞障害性の形態を指す。換言すれば、ADCCは、免疫システムのエフェクター細胞、主としてナチュラルキラー細胞が、特異的抗体が結合した標的細胞を能動的に溶解する細胞媒介免疫の機構である。ADCCは、抗体が、液性免疫応答の部分として、感染を制限して封じ込めることができる機構の1つである。関心がある分子のADCC活性を推定するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されたようなインビトロのADCCアッセイも考慮した。40

## 【0090】

「1つまたは2つのアミノ酸置換（単数または複数）によりXまたはYの配列と異なるアミノ酸配列（単数または複数）」という表現は、前記配列が、最大で2つのアミノ酸置換により配列XまたはYと異なる、すなわち、1つまたは2つにすぎないアミノ酸置換に50

よって異なることを意味する。

【0091】

例えば、「アミノ酸置換Zおよび場合により1つまたは2つの追加のアミノ酸置換（単数または複数）により、配列Yと異なる配列X」という表現は、前記配列Xが：

- アミノ酸置換Zのみ、または
- アミノ酸置換Zおよびアミノ酸置換Zと異なる1つまたは2つのアミノ酸置換によって、配列Yと異なることを意味する。

【0092】

「位置Yで1つのアミノ酸が置換された配列番号X」という表現は、配列番号Xの位置Yにおける1つのアミノ酸置換により配列番号Xと異なる配列を意味する。

【0093】

本明細書において使用する「CHIKV」は、上の導入部で記載されたトガウイルス科のアルファウイルス属のエンベロープ付きのプラス鎖RNAウイルスであるチングニアウイルスを意味する。CHIKVの中に、東部/中部/南部アフリカ( E C S A )遺伝子型、例として、2006年10月24日付けのNCBI受入番号：DQ443544.2で示された配列を有するLR2006OPY1[LR]株など；西部アフリカ遺伝子型、別の例として、2010年12月28日付けのNCBI受入番号：HM045786.1で示された配列を有するNI64IBH35株など、およびアジア型遺伝子型、別の例として、2010年12月28日付けのNCBI受入番号：HM045797.1で示された配列を有するRSU1株など、および例えば、2014年9月11日付けのNCBI受入番号：KJ451624で示された配列を有する99659[2014カリブ型]株を含むが、これらに限定されない異なった代表的感染性株（「CHIKV株」）も含まれる。異なる遺伝子型に属する他の株も同定されており、例えば、S27株は、別の例として、2014年1月14日付けのNCBI受入番号AF369024.2、および2015年9月16日付けのUniProtKB/Swiss-Prot referenceでQ8JUX5で示された配列を有し：ならびに別の例としてSL15649は、2011年12月14日付けのNCBI受入番号：GU189061で示された配列を有する。参照されたCHIKV株の他の例は、ウイルス病原体データベース内で、それらのゲノムに関しては：[https://www.viprbrc.org/brc/vipr\\_genome\\_search.spg?method=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=1476362322448](https://www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?method=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=1476362322448)で、または関連するタンパク質に関しては：[https://www.viprbrc.org/brc/vipr\\_protein\\_search.spg?method=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=1476362669763](https://www.viprbrc.org/brc/vipr_protein_search.spg?method=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=1476362669763)

で利用可能である。

【0094】

他のアルファウイルスのゲノムと同様に、CHIKVゲノムは、2つのエンベロープ糖タンパク質、E2およびE1をコードして、それらは、より大きいポリタンパク質前駆体（カブシド/E3/E2/6K/E1；2012年6月27日付けのNCBI受入番号：NC\_004162.2で示される）から誘導されて、ウイルスの膜に埋め込まれる。成熟ビリオンは、3種の主要な構造タンパク質：ヌクレオカブシドタンパク質および2種の糖タンパク質、E1およびE2を含み、ここで、E2は細胞への付着において機能し、およびE1はウイルス融合に関係する。第3の糖タンパク質、E3は、幾種類かのアルファウイルスにおける成熟ビリオンに会合しているが、他のビリオンに会合しておらず、E2およびE1を放出するポリタンパク質前駆体の切断により生じる膜結合ペプチドである6Kタンパク質が、粒子中に低レベルで組み込まれる。粒子中におけるアルファウイルスの表面糖タンパク質の組織化は、冷凍電子顕微鏡(Cryo-EM)を使用して明確化されたが、CHIKVの糖タンパク質の原子構造は、最近X線結晶学により、成熟粒子および

10

20

30

40

50

未成熟前駆体ポリタンパク質の両方について解説された。3種の糖タンパク質（E3/E2/E1）の各々の240コピーが、成熟ウイルス上で一緒にになって80個のスパイクを形成し、それがウイルスの膜の周囲に二十面体のタンパク質シェルを構成する（Voss JEら 2010, Nature 468: 709-712）。これらの糖タンパク質の折り畳み、表面への輸送および機能は、それらの相互の適切な相互作用に依存する。E1は、I、IIおよびIIIと称される3つのb-シートドメインからなり；E2は、3つの免疫グロブリン様ドメインを含有する（A、BおよびC、AがN末端にある）。複合体中で、ドメインBは、膜の遠方端部にあってE3に接し、ドメインCは、ウイルス膜に最も近く、およびドメインAは、中心にある（Fox JMら 2015, Cell 163: 1095-1107およびWO2015010125）。CHIKVのE1、E2およびE3タンパク質についての配列および情報は、PDBエントリーNo. 2xFBおよび2xFc（2010年11月24日に最新のアップデート）、PDBエントリーNo. 3N40、3N41、3N42、3N43および3N44（最新のアップデート、2010年12月1日）で、それぞれ、限定するものではない例として提供される。

#### 【0095】

本発明で主に扱う抗体

治療目的のために、特に、それらが標的とする抗原（単数または複数）に対するそれらの結合、それらの安定性、薬物動態および薬力学ならびにそれらの機能を改善することにより、それらに求められる薬学的性質に、より適したmAbを生成させることが望ましい。

#### 【0096】

第1の目的として、抗CHIKV抗体は、完全にヒトの親抗体、mAb1およびmAb2のそれぞれに基づいて、それは異なるCHIKV株に対して、特にそれらのそれぞれのタンパク質E2に高い結合親和性を有する（ナノモル濃度の範囲内）。それ故、それらは、種々のCHIKV株に対して広い、非常に強力な中和活性を発揮する。

#### 【0097】

mAb1は：

- 配列：

#### 【化1】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYSFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGWISTYK  
**GYTQYAQNFQGRVTITDTPATTVY**MELRSLRSDDTAVYY**CARVLSETGYF**YYYYYY  
**GMDVWGGQGTLTVSS** (配列番号1) (CDRはそれぞれ太字で示す)、  
CDRH1 (**GYSFTSYG**, 配列番号5), CDRH2 (**ISTYKGYT**, 配列番号6) および  
CDRH3 (**ARVLSETGYF**YYYYYY**GMDV**, 配列番号7)

からなる重鎖の可変ドメイン（フレームワーク領域は、CDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む）；

- 配列：

#### 【化2】

QAVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSS**SSNIGADYN**VHWYQLLPGTAPKLLI**YGNTNR**  
PSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED**EADYYCQSYDSSL**SASVFGGGTKLTVL  
(配列番号2) (CDRはそれぞれ太字で示す)、CDRL1 (**SSNIGADYN**, 配列番号8),  
CDRL2 (**GNT**) および CDRL3 (**QSYDSSL**SASV, 配列番号10)

からなる軽鎖の可変ドメイン（フレームワーク領域はCDRL1、CDRL2およびCDRL3を含む）

を含み、

10

20

30

40

50

m A b 2 は :

- 配列 :

【化 3】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYILSKLSVHWVRQAPGKGLEWMGGSERE  
**DGETVYAQKFKQGRISLTEDTSIETAYMELSSLSSEDTAVYYCATGGFWSMIGGNGV**  
**DYWGQGTLTVSS** (配列番号 3) (CDR はそれぞれ太字で示す) 、  
 CDRH1 (**GYILSKLS**, 配列番号 11), CDRH2 (**SEREDGET**, 配列番号 12) および  
 CDRH3 (**ATGGFWSMIGGNGVDY**, 配列番号 13)

10

からなる重鎖の可変ドメインを含み、フレームワーク領域は C D R H 1 、 C D R H 2 および C D R H 3 を含み ;

- 配列 :

【化 4】

QAVVTQSPSSL PASVGDRV TITCRAS **QDIRNN** LGWYQQKPGKAPERLIY **GTS** NLQS  
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCL**QHNSYPPT** FGRGTVKVEIK (配列番号 4)  
 (CDR はそれぞれ太字で示す) 、 CDRL1 (**QDIRNN**, 配列番号 14), CDRL2 (**GTS**)  
 および CDRL3 (**LQHNSYPPT**, 配列番号 16)

20

からなる軽鎖の可変ドメインを含み、フレームワーク領域は、 C D R L 1 、 C D R L 2 および C D R L 3 を含む。

【 0 0 9 8 】

第 1 の態様において、本発明は、 C H I K V に結合する m A b 1 および m A b 2 の変形抗体を提供し、それらは、それらの F c ドメインにおいて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含むので、酸性環境で F c R n 受容体に対する改善された結合を有する。そのような突然変異は、患者に投与されたときに、そのような変形抗体の血清半減期における増大をもたらす。そのような置換の例は、位置 250 ( 例えば、 E または Q ) ; 250 および 428 ( 例えば、 L または F ) ; 252 ( 例えば、 L / Y / F / W または T ) 、 254 ( 例えば、 S または T ) および 256 ( 例えば、 S / R / Q / E / D または T ) における改変 ; または位置 428 および / または 433 ( 例えば、 H / L / R / S / P / Q または K ) および / または 434 ( 例えば、 A 、 W 、 H 、 F または Y ) における改変 ; または位置 250 および / または 428 における改変 ; または位置 307 または 308 ( 例えば、 308 F 、 V 308 F ) および 434 における改変を含むが、これらに限定されず、ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスの番号づけを使用して与えられる ( 図 1 ) 。

30

【 0 0 9 9 】

本発明者らは、図 4 および実施例 2 で示したように、ヒトおよびマウス F c R n 受容体に対する p H 6 における結合は、下の群から選択された置換が m A b 1 または m A b 2 抗体の F c 領域内に導入された場合に強化されることを確認した :

40

i . 位置 434 におけるアラニン、または

i i . それぞれ位置 307 、 380 および 434 におけるアラニン、または

i i i . それぞれ位置 250 におけるグルタミンおよび位置 428 におけるロイシン  
 、または

i v . それぞれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリン、または

v . 位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256  
 におけるグルタミン酸。

【 0 1 0 0 】

さらに、本発明者らは、実施例 3 および図 5 で記載されたように、それらの C H I K V

50

標的 p E 2 - E 1 に対する m A b 1 および m A b 2 の結合は、それらの F c 領域に導入された場合に、上記の置換に影響されず、ヒトおよびマウスの F c R n に対する結合を強化することを示した。実施例 2 および図 4 に示したように、m A b 1 または m A b 2 の F c 領域の置換は、それぞれ位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256 におけるグルタミン酸、またはそれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリンのいずれかが、それらのそれぞれの F c 領域に導入された場合に、最も強いヒトおよびマウスの F c R n への結合を示す。

#### 【0101】

当技術分野で知られているように、F c 領域は、「エフェクター機能」と呼ばれる免疫グロブリンの生物学的機能の決定に必須である。ADC C は、免疫システムのエフェクター細胞（主としてナチュラルキラー細胞）が特異的抗体が結合した標的細胞を溶解する細胞媒介免疫の部分、機構の 1 つである。それ故、ADC C は、感染を制限して封じ込める機構の 1 つである。細胞に媒介される活性は、エフェクター細胞の F c R I (CD64)、F c R I I 、F c R I I I のような F c 受容体に対する F c ドメインの結合を含む。

10

#### 【0102】

モノクローナル抗体が CHIKV 株に高度に特異的であり、治療目的の処置に供される本発明で主に扱うように、それらの ADC C を活性化する能力は、ADC C は感染の制御における抗 CHIKV 抗体の活性に関係するように思われる所以、測定すべき重要なパラメーターである。実施例 4 および図 6 で示したように、本発明者らは、m A b 1 および m A b 2 の F c R I I I a への結合は、下の群から選択される置換がそれらのそれぞれの F c 領域に導入された場合に、保持されることを示した：

20

- i . 位置 434 におけるアラニン、または
- i i . それぞれ位置 307、380 および 434 におけるアラニン、または
- i i i . それぞれ位置 250 におけるグルタミンおよび位置 428 におけるロイシン、または
- i v . それぞれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリン。

#### 【0103】

対照的に、F c R I I I a への結合は、m A b 1 および m A b 2 が位置 252 でチロシン、位置 254 でトレオニンおよび位置 256 でグルタミン酸によりそれぞれ置換された場合に、低下した。

30

#### 【0104】

それ故、本発明者らは、ヒトの F c R n 受容体に対する改善された結合を有する抗体は、F c R I I I a への結合を保持しながら、本発明の抗体を、それらのエフェクター機能を維持しながら増大した半減期と適合性にすることを確認した。

#### 【0105】

それ故、第 1 の態様において、本発明は、CHIKV と結合し、3 つの重鎖相補性決定領域 (CDRH) および 3 つの軽鎖相補性決定領域 (CDRL) を含む単離されたモノクローナル抗体に関し、ここで：

i . 前記 CDRH は、配列番号 5、6 および 7 のアミノ酸配列を有し、および前記 CDRL は配列番号 8、GNT および配列番号 10 のアミノ酸配列を有するか、または

40

i i . 前記 CDRH は、配列番号 11、12 および 13 のアミノ酸配列を有し、および前記 CDRL は配列番号 14、GTS および配列番号 16 のアミノ酸配列を有するか、または

i i i . 前記 CDRH および CDRL は、i . または i i . の配列と 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有し；

前記抗体は：

i . 位置 434 におけるアラニン、または

i i . それぞれ位置 307、380 および 434 におけるアラニン、または

i i i . それぞれ位置 250 におけるグルタミンおよび位置 428 におけるロイシ

50

ン、または

i v . それぞれ位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、または

v . それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも 1 つの残基を含む F c 領域をさらに含み、ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる。

【 0 1 0 6 】

そのような置換を含む F c 領域を図 1 および 2 に示した (配列番号 1 7 ; 配列番号 5 9 10 から 6 3 )。

【 0 1 0 7 】

一実施形態において、抗 C H I K V 抗体は、少なくとも、位置 4 3 4 にアラニンを含む F c 領域を含む。別の実施形態において、抗 C H I K V 抗体は、位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 にアラニンを含む F c 領域を含む。別の実施形態において、抗 C H I K V 抗体は、位置 2 5 0 にグルタミンおよび位置 4 2 8 にロイシンを含む F c 領域を含む。別の実施形態において、抗 C H I K V 抗体は、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンを含む F c 領域を含む。別の実施形態において、抗 C H I K V 抗体は、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸を含む F c 領域を含む。

【 0 1 0 8 】

本発明で主に扱う抗体は、m A b 1 または m A b 2 から誘導され、3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) および 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) を含み、それらは：

i . それぞれ配列番号 5 、 6 および 7 のアミノ酸配列、および配列番号 8 、 G N T および配列番号 1 0 のアミノ酸配列、または

i i . それぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 1 3 のアミノ酸配列、および配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、または

i i i . i . もしくは i i . の配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列

をそれぞれ有する。

【 0 1 0 9 】

さらなる実施形態において、抗体は、配列番号 5 、 6 および 7 の配列、ならびに配列番号 8 、 G N T および配列番号 1 0 のアミノ酸配列とそれれ 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列、または配列番号 1 1 、 1 2 および 1 3 の配列、ならびに配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 と、それれ 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する C D R を含む。

【 0 1 1 0 】

本発明によるアミノ酸置換は、保存的であってもよく、または非保存的であってもよいアミノ酸置換である。保存的置換の例を下の表 1 に示す。

【 0 1 1 1 】

10

20

30

40

50

## 【表1】

表1

保存的置換	アミノ酸のタイプ
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Tyr	脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	無電荷であるが極性の側鎖を有するアミノ酸
Asp, Glu	酸性側鎖を有するアミノ酸
Lys, Arg, His	塩基性側鎖を有するアミノ酸
Gly	中性側鎖

10

20

## 【0112】

別の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列、またはこれらの配列と1つもしくは2つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)を含み、ならびに前記抗体は、それぞれ配列番号8、GNTおよび配列番号10のアミノ酸配列、またはこれらの配列と1つもしくは2つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)および：

i. 位置434におけるアラニン、または

ii. それぞれ位置307、380および434におけるアラニン、または

iii. それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシン、または

iv. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または

v. それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも1つの残基を含むFc領域を含み、

ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

## 【0113】

別の実施形態において、抗体は、mAb2から誘導され、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列、またはこれらの配列と1つもしくは2つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)を含み、ならびに前記抗体は、それぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列、またはこれらの配列と1つもしくは2つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに：

i. 位置434におけるアラニン、または

ii. それぞれ位置307、380および434におけるアラニン、または

iii. それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシン、または

iv. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または

v. それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸、

40

50

からなる群から選択される少なくとも1つの残基を含むF c領域を含み  
ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

【0114】

別の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号8、GNNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに：

i. 位置434におけるアラニン、または

ii. それぞれ位置307、380および434におけるアラニン、または

iii. それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシン  
、または

iv. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または

v. それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも1つの残基を含むF c領域を含み、  
ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

【0115】

さらなる実施形態において、変形抗体(mAb3)は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号8、GNNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、位置434にアラニンを含むF c領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスに従って与えられる。

【0116】

別のさらなる実施形態において、変形抗体(mAb4)は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、およびそれぞれ配列番号8、GNNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置307、380および434にアラニンを含むF c領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

【0117】

別のさらなる実施形態において、変形抗体(mAb5)は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号8、GNNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428にロイシンを含むF c領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

【0118】

別のさらなる実施形態において、変形抗体(mAb7)は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号8、GNNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリンを含むF c領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

【0119】

別のさらなる実施形態において、変形抗体(mAb6)は、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号8、GNNTおよび配列番号10のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸を含むF c領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

10

20

30

40

50

## 【0120】

別の実施形態において、変形抗体は、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに：

i. 位置434におけるアラニン、または

ii. それぞれ位置307、380および434におけるアラニン、または

iii. それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシン、または

iv. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または

v. それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸、

からなる群から選択される少なくとも1つの残基を含むFc領域を含み、

ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

## 【0121】

さらなる実施形態において、変形抗体は、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)を含み、ならびに位置434に少なくともアラニンを含むFc領域を含み、前記アミノ酸の位置はEUインデックスに従って与えられる。

10

## 【0122】

別のさらなる実施形態において、変形抗体は、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置307、380および434にアラニンを含むFc領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

20

## 【0123】

別のさらなる実施形態において、変形抗体は、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシンを含むFc領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

30

## 【0124】

別のさらなる実施形態において、変形抗体(mAb8)は、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリンを含むFc領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

40

## 【0125】

別のさらなる実施形態において、変形抗体(mAb9)は、それぞれ配列番号11、12および13のアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)、ならびにそれぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)、ならびに少なくとも、それぞれ位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸を含むFc領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置はEUインデックスにより与えられる。

## 【0126】

本発明者らは、実施例3および図5に記載されたように、mAb1およびmAb2のそ

50

れらの C H I K V 標的 p E 2 - E 1 に対する結合は、上記のように少なくとも 1 つの残基を含む F c 領域を含む場合に、影響されないことを示した。本発明者らは、上記のように少なくとも 1 つの残基を含む F c 領域を含むこれらの抗体は、全て、ヒトおよびマウスの F c R n に対して強化された結合を示し（実施例 2 および図 4）、それは、それらのそれぞれの半減期に対して好ましい影響を有して、その結果として抗 C H I K V 療法のために有益であり；それぞれ位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256 におけるグルタミン酸、またはそれぞれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリンのいずれかが、それらのそれぞれの F c 領域に導入された場合に、ヒトおよびマウスにおける最高の F c R n への結合が示されることも示した。

## 【0127】

10

それ故、典型的実施形態では、変形抗体は、それぞれ配列番号 5、6 および 7 のアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域（CDRH）、ならびにそれぞれ配列番号 8、GNT および配列番号 10 のアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域（CDRL）、ならびに少なくとも、それぞれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリンを含む F c 領域、または少なくとも、それぞれ位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256 におけるグルタミン酸を含む F c 領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置は EU インデックスにより与えられる。

## 【0128】

さらに、実施例 4 および図 6 で示されたように、本発明者らは、mAb1 および mAb2 の F c R IIIa に対する結合は、下の群：

20

- i. 位置 434 におけるアラニン、または
  - ii. それぞれ位置 307、380 および 434 におけるアラニン、または
  - iii. それぞれ位置 250 におけるグルタミンおよび位置 428 におけるロイシン、または
  - iv. それぞれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリン
- から選択される置換が、それらのそれぞれの F c 領域に導入された場合に保持されることを示した。

## 【0129】

対照的に、F c R IIIa への結合は、mAb1 および mAb2 が、それぞれ位置 252 におけるチロシン、位置 254 におけるトレオニンおよび位置 256 におけるグルタミン酸で置換された場合に低下した。

30

## 【0130】

それ故、本発明者らは、F c R IIIa への結合を保持しながら、その標的に対する結合は影響されず、およびヒト F c R n 受容体に対する結合が改善されており、一方それらのエフェクター機能を維持しており、そのため、その増大した半減期に関して、それを、C H I K V 疾患を防止および処置するための治療学の開発と適合性である、少なくとも 1 種の抗体を同定した。

## 【0131】

典型的な実施形態において、変形抗体は、それぞれ配列番号 5、6 および 7 のアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域（CDRH）、およびそれぞれ配列番号 8、GNT および配列番号 10 のアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域（CDRL）、ならびに少なくとも、それぞれ位置 428 におけるロイシンおよび位置 434 におけるセリンを含む F c 領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置は EU インデックスにより与えられる。

40

## 【0132】

換言すれば、本発明で主に扱う抗体は、C H I K V に結合し、3 つの重鎖相補性決定領域（CDRH）および 3 つの軽鎖相補性決定領域（CDRL）を含む単離されたモノクローナル抗体として記載することができ、ここで：

i. 前記 CDRH は、配列番号 5、6 および 7 のアミノ酸配列を有し、および前記 CDRL は、配列番号 8、GNT および配列番号 10 のアミノ酸配列を有するか、または

50

i i . 前記 C D R H は、配列番号 1 1 、 1 2 および 1 3 のアミノ酸配列を有し、および前記 C D R L は、配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有するか、または

i i i . 前記 C D R H および C D R L H は、 i . または i i . の配列と 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有し；

および前記抗体は：

i v . 位置 4 3 4 におけるアラニン、または

v . 位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 におけるアラニン、または

v i . 位置 2 5 0 におけるグルタミンおよび位置 4 2 8 におけるロイシン、または

v i i . 位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、または

v i i i . 位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸

からなる群から選択される少なくとも 1 つの残基を含む F c 領域をさらに含み、

ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられ；

および抗体は、以下の：

i . C H I K V p E 2 - E 1 標的に約 1 0 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D ) で結合する；

i i . ヒトの F c R n に約 2 0 0 n M 未満の K D で結合する；

i i i . ヒトの F c R I I I に約 6 0 0 n M 未満の K D で結合する

性質の 1 つまたはそれ以上を有する。

#### 【 0 1 3 3 】

一実施形態において、本発明による抗体は、 C H I K V p E 2 - E 1 標的に、約 5 n M 未満、約 4 n M 、 3 、 2 、 1 n M 未満、約 0 . 9 、 0 . 8 、 0 . 7 、 0 . 6 、 0 . 5 、 0 . 4 、 0 . 3 n M 未満または約 0 . 2 5 n M 、 0 . 2 0 n M 、 0 . 1 5 n M 、 0 . 1 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D ) で結合する。

#### 【 0 1 3 4 】

別の実施形態において、本発明による抗体は、ヒトの F c R n に約 2 0 0 n M 未満、約 1 0 0 n M 未満、約 5 0 n M 、 4 5 、 4 0 、 3 5 、 3 0 n M 未満または約 2 5 n M 、 2 0 、 1 5 または 1 0 n M 未満の K D で結合する。

#### 【 0 1 3 5 】

別の実施形態において、本発明による抗体は、ヒトの F c R I I I に、約 6 0 0 n M 未満、約 5 0 0 n M 、 4 0 0 n M 、 3 0 0 n M 未満、約 2 0 0 n M 、 1 5 0 、 1 0 0 または 5 0 n M 未満の K D で結合する。

#### 【 0 1 3 6 】

C H I K V p E 2 - E 1 標的、ヒト F c R n およびヒト F c R I I I に対する結合は、例えば、表面プラズモン共鳴アッセイにより、例えば、 3 7 で測定することができる。このアッセイは、例えば、実施例 1 から 4 に記載されているように実施することができる。

#### 【 0 1 3 7 】

本発明による「 F c 領域」は、抗体の機能的活性を決定する 4 つのヒトサブクラスの I g G ( I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 および I g G 4 ) の重鎖の 1 つに属することができる。一実施形態において、 F c 領域は、 I g G 1 サブタイプの重鎖に属する。別の実施形態において、 F c 領域は I g G 2 サブタイプの重鎖に属する。別の実施形態において、 F c 領域は、 I g G 3 サブタイプの重鎖に属する。別の実施形態において、 F c 領域は、 I g G 4 サブタイプの重鎖に属する。別の実施形態において、 F c 領域は、本明細書に記載された突然変異を除いて、 I g G 1 の F C 領域の配列 ( 配列番号 1 7 ) を含むかまたはそれらからなる ( 図 1 および 2 ) 。

#### 【 0 1 3 8 】

一実施形態において、抗体は、配列番号 1 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる F c 領域を有する。別の実施形態において、抗体は、配列

10

20

30

40

50

番号 1 7 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる F c 領域を有する。別の実施形態において、抗体は、配列番号 1 7 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる F c 領域を有する。さらなる実施形態において、抗体は、配列番号 1 7 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる F c 領域を有する。

【 0 1 3 9 】

一実施形態において、抗体は、上で記載されたおよび実施例内の 1 つまたは数個の置換を含む F c 領域を有する。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 9、6 0、6 1、6 2 および 6 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる F c 領域を有する。

10

【 0 1 4 0 】

あるいはまたはそれに加えて、システイン残基（単数または複数）を、F c 領域に導入することができて、それによりこの領域において鎖間のジスルフィド結合形成を可能にする。このようにして生成されたホモダイマーの抗体は、改善された内部移行能力および/または増大した補体に媒介される細胞殺滅および/または抗体依存性の細胞の細胞障害性（A D C C）を有することができる（Caron, P. C. ら, 1992, J. Exp. Med. 176 (4): 1191-1195 および Shope, B., 1992, J. Immunol. 148 (9): 2918-2922）。

【 0 1 4 1 】

別の実施形態において、抗体は、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 1 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 1 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。

20

【 0 1 4 2 】

別の実施形態において、抗体は、配列番号 2 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその軽鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 2 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその軽鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 2 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその軽鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 2 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその軽鎖の可変領域を含む。

30

【 0 1 4 3 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 1 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 1 9 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 1 9 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 1 9 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

40

【 0 1 4 4 】

別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号 2 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号 2 0 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号 2 0 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号 2 0 と

50

9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

【 0 1 4 5 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 3 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 3 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 3 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

10

【 0 1 4 6 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 5 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 5 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 5 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 5 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

【 0 1 4 7 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 7 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 7 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 7 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

20

【 0 1 4 8 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 9 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 9 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 2 9 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

30

【 0 1 4 9 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 3 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 3 1 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 3 1 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 3 1 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

40

【 0 1 5 0 】

一実施形態において、抗体は、重鎖と軽鎖との、または下の表 2 に記載された配列の又クレオチド配列によりコードされた重鎖と軽鎖との組み合わせである。

【 0 1 5 1 】

50

## 【表2】

表2

	アミノ酸配列		ヌクレオチド配列	
	HC	LC	HC	LC
<b>mAb3</b> = mAb1A	配列番号23	配列番号20	配列番号24	配列番号22
<b>mAb4</b> = mAb1AAA	配列番号25	配列番号20	配列番号26	配列番号22
<b>mAb5</b> = mAb1QL	配列番号27	配列番号20	配列番号28	配列番号22
<b>mAb6</b> = mAb1YTE	配列番号29	配列番号20	配列番号30	配列番号22
<b>mAb7</b> = mAb1LS	配列番号31	配列番号20	配列番号32	配列番号22

10

20

## 【0152】

別の実施形態において、抗体は、配列番号3と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号3と少なくとも85%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号3と少なくとも90%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号3と91、92、93、94、95、96、97、98または99%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。

30

## 【0153】

別の実施形態において、抗体は、配列番号4と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号4と少なくとも85%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号4と少なくとも90%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号4と91、92、93、94、95、96、97、98または99%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその軽鎖の可変領域を含む。

40

## 【0154】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号37と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号37と少なくとも85%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号37と少なくとも90%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号37と91、92、93、94、95、96、97、98または99%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

## 【0155】

別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号38と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番

50

号 3 8 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号 3 8 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の軽鎖は、配列番号 3 8 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

【 0 1 5 6 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 1 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 1 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 1 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

10

【 0 1 5 7 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 3 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 3 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 3 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

20

【 0 1 5 8 】

一実施形態において、抗体は、重鎖と軽鎖との、または下の表 3 に記載された配列のヌクレオチド配列によりコードされた重鎖と軽鎖との組み合わせである。

【 0 1 5 9 】

【表 3 】

表3

	アミノ酸配列		ヌクレオチド配列	
	HC	LC	HC	LC
mAb8 = mAb2YTE	配列番号41	配列番号38	配列番号42	配列番号40
mAb9 = mAb2LS	配列番号43	配列番号38	配列番号44	配列番号40

30

【 0 1 6 0 】

すでに言及したように、治療目的のためには、それらの特定の標的に対するそれらの結合親和性を保持しながら、安定性、薬物動態および薬力学ならびにそれらの機能の関係で頼みにできる mAb を生成させることが非常に望ましい。

40

【 0 1 6 1 】

第 2 の態様において、本発明者らは、均質性を向上させて、化学的性質、產生および制御 ( C M C ) の不利点を軽減するために使用することができるホットスポットを同定した。そのような分析は、分解生成物または抗体製剤の不均一性を潜在的に生ずることが、インシリコまたは実験的のいずれかで確認される酸化、脱アミノ化、異性化、酸性切断、グリコシル化ならびに追加の遊離システイン残基のような、溶媒に曝露された望ましくないモチーフに焦点を合わせた。例として、アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミノ化は、pH および表面曝露のような要因に依存して起こり得る。アスパラギン残基は、主と

50

して A s n - G 1 y という配列で存在する場合に、脱アミノ化を特に起こしやすく、 A s n - A 1 a のような他のジペプチド配列ではそれほどでもない。それ故、そのような脱アミノ化部位、特に A s n - G 1 y が、本明細書に記載された抗体またはポリペプチド中に存在する場合、典型的には関与する残基の 1 つを除去する保存的置換によりその部位を除去することが望ましい。

#### 【 0 1 6 2 】

実施例 1 および図 3 で示したように、本発明者らは、治療目的で使用される場合、それ自身有害な結果を有し得るか、またはそれらは以前の基準に基づいて不利なモチーフを生じるという理由で、 m A b 2 ( 配列番号 1 3 ) の C D R H 3 内の少なくとも 3 種のアミノ酸を同定した。図 3 に示したように、本発明者らは、望ましくないアミノ酸またはモチーフを抑制するために、配列番号 1 3 のそれぞれ位置 8 、 1 2 および 1 3 における单一置換により、 C H I K V の p E 2 - E 1 抗原に対するそれらの結合親和性を維持する、 m A b 2 の少なくとも 3 種の変形抗体を生成させる。それ故、本発明者らは、バイオリアクターで產生される場合、それらの標的親和性を保ちながら、生成物に關係する不純物を少なくて、 C M C 基準に対して、より高い安定性、均質性を有する m A b 2 の変形体を生成させた。

10

#### 【 0 1 6 3 】

それ故、第 2 の態様において、本発明は、 C H I K V に結合する抗原結合フラグメントであって、およびそれぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 のアミノ酸配列を有する、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含む m A b 2 変形抗体またはその抗原結合フラグメントに関し、ここで、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) をさらに含み :

20

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、および / または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく ; および / または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

#### 【 0 1 6 4 】

一実施形態において、変形抗体は、配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 の配列と 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する C D R H を含み、かつ配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 の配列と、それぞれ 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する C D R L を含む。「 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列 」により、本発明で主に扱う、配列番号 3 3 に関して、配列番号 3 3 の位置 8 、 1 2 および 1 3 で構想される置換と比較して追加のアミノ酸置換が意味される。

30

#### 【 0 1 6 5 】

アミノ酸置換は、保存的または非保存的アミノ酸置換であることができる。保存的置換の例は、上の表 1 に示す。

#### 【 0 1 6 6 】

別の実施形態において、変形抗体は、配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく ; および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 を含む。別の実施形態において、前記変形抗体は、配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M であり、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 を含む。他の実施形態において、前記変形抗体は、それぞれ : 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N であり、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 ; 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G である配列番号 3 3 の C D R H 3 ; 配列番号 3 3 の位

40

50

置 8 におけるアミノ酸は M であり、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N であり、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 ; 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M であり、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G である配列番号 3 3 の C D R H 3 ; 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N であり、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G である配列番号 3 3 の C D R H 3 ; 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N であり、および配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 を含む。言い換えれば、配列番号 3 3 は、配列番号 1 3 と同一ではあり得ない。

10

#### 【 0 1 6 7 】

「位置 X におけるアミノ酸は M ではない」という表現により、前記位置 X におけるアミノ酸は、M 以外のどのアミノ酸であってもよいことが意味される。同様に、「位置 X におけるアミノ酸は N ではなく」という表現により、前記位置 X におけるアミノ酸は、N 以外のどのアミノ酸であってもよいことが意味される。同様に、「位置 X におけるアミノ酸は G ではない」という表現により、前記位置 X におけるアミノ酸は、G 以外のどのアミノ酸であってもよいことが意味される。限定するものではない例として、配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 を含む変形抗体は、前記位置 8 において、A、G、V、L、I、F、W、Y、S、T、N、Q、C、D、E、K、R および H からなる群から選択される任意のアミノ酸を含むことができる。別の限定するものではない例として、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 を含む変形抗体は、前記位置 1 2 において、A、G、V、L、I、F、W、Y、S、T、M、Q、C、D、E、K、R および H からなる群から選択される任意のアミノ酸を含むことができる。別の限定するものではない例として、配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない配列番号 3 3 の C D R H 3 を含む変形抗体は、前記位置 1 3 において、A、N、V、L、I、F、W、Y、S、T、M、Q、C、D、E、K、R および H からなる群から選択される任意のアミノ酸を含むことができる。

20

#### 【 0 1 6 8 】

別の実施形態において、変形抗体またはその抗原結合フラグメントは：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ;
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ;
- 配列番号 3 3 の配列からなる C D R H 3 ;
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;
- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

30

を含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、および / または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく ; および / または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

#### 【 0 1 6 9 】

40

別の実施形態において、変形抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 1 、 1 2 および 3 3 のアミノ酸配列を有する、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、およびそれぞれ配列番号 1 4 、 G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) をさらに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく ; または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

#### 【 0 1 7 0 】

50

別の実施形態において、変形抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 1 1、1 2 および 3 3 のアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、ならびにそれぞれ配列番号 1 4、G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) をさらに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく；または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではない。

#### 【 0 1 7 1 】

換言すれば、実施例 1 および図 3 で示したように、本発明者らは、それぞれ配列番号 1 1、1 2 および 3 3 のアミノ酸配列を有するか、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの重鎖相補性決定領域 ( C D R H ) を含み、ならびにそれぞれ配列番号 1 4、G T S および配列番号 1 6 のアミノ酸配列、またはこれらの配列と 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する 3 つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R L ) をさらに含み、ここで：

- i . 配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は M ではなく、または
- i i . 配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は N ではなく；または
- i i i . 配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は G ではなく、

抗体は、以下の：

i . C H I K V p E 2 - E 1 標的に約 1 0 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D ) で結合する；

i i . ヒトの F c R n に約 2 0 0 n M 未満の K D で結合する；

i i i . ヒトの F c R I I I に約 6 0 0 n M 未満の K D で結合する

性質の 1 つまたはそれ以上を有する抗体またはその抗原結合フラグメントを同定した。

#### 【 0 1 7 2 】

一実施形態において抗体は、C H I K V p E 2 - E 1 標的に、約 5 n M 未満、約 4 n M、3、2、1 n M 未満、約 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3 n M 未満または約 0.25 n M、0.20 n M、0.15 n M、0.1 n M 未満の結合解離平衡定数 ( K D ) で結合する。

#### 【 0 1 7 3 】

別の実施形態において、抗体は、ヒトの F c R n に、約 2 0 0 n M 未満、約 1 0 0 n M 未満、約 5 0 n M、4 5、4 0、3 5、3 0 n M 未満または約 2 5 n M、2 0、1 5 または 1 0 n M 未満の K D で結合する。

#### 【 0 1 7 4 】

別の実施形態において、本発明による抗体は、ヒトの F c R I I I に、約 6 0 0 n M 未満、約 5 0 0 n M、4 0 0 n M、3 0 0 n M 未満、約 2 0 0 n M、1 5 0、1 0 0 または 5 0 n M 未満の K D で結合する。

#### 【 0 1 7 5 】

C H I K V p E 2 - E 1 標的に結合して、ヒト F c R n およびヒト F c R I I I は、例えば表面プラズモン共鳴アッセイにより、例えば 3 7 で測定することができる。このアッセイは、例えば、実施例 1 から 4 に記載されているように実施することができる。

#### 【 0 1 7 6 】

別の実施形態において、変形抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含み、配列番号 3 3 の位置 8 におけるアミノ酸は、I、L、V、Q および N からなる群から選択される。

#### 【 0 1 7 7 】

別の実施形態において、変形抗体 ( m A b 1 0 ) またはその抗原結合フラグメントは：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ；
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ；
- 配列番号 3 4 の配列からなる C D R H 3 ；
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ；

10

20

30

40

50

- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

を含む。

【 0 1 7 8 】

別の実施形態において、変形抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含み、配列番号 3 3 の位置 1 2 におけるアミノ酸は、Q、E、S、T および D からなる群から選択される。

【 0 1 7 9 】

別の実施形態において、変形抗体 ( m A b 1 1 ) またはその抗原結合フラグメントは :

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ;
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ;
- 配列番号 3 5 の配列からなる C D R H 3 ;
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;
- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

10

を含む。

【 0 1 8 0 】

別の実施形態において、変形抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含み、配列番号 3 3 の位置 1 3 におけるアミノ酸は、A、S および T からなる群から選択される。

20

【 0 1 8 1 】

別の実施形態において、変形抗体 ( m A b 1 2 ) またはその抗原結合フラグメントは :

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ;
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ;
- 配列番号 3 6 の配列からなる C D R H 3 ;
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ;
- G T S からなる C D R L 2 ;
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3

を含む。

【 0 1 8 2 】

30

別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 6 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 6 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 6 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 6 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。

【 0 1 8 3 】

40

別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 7 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 7 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 7 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。

【 0 1 8 4 】

別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗

50

体は、配列番号 5 8 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 8 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。別の実施形態において、抗体は、配列番号 5 8 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるその重鎖の可変領域を含む。

【 0 1 8 5 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 5 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 5 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 5 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 5 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

10

【 0 1 8 6 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 7 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 7 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 7 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

20

【 0 1 8 7 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 9 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかもしくはそれからなるか、または配列番号 5 0 と少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされる配列を含むかもしくはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 9 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 9 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 4 9 と 9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。

30

【 0 1 8 8 】

一実施形態において、抗体は、重鎖と軽鎖または下の表 4 に記載された配列のヌクレオチド配列によりコードされる重鎖と軽鎖の組み合わせである。

【 0 1 8 9 】

【表 4】

表4

	アミノ酸配列		ヌクレオチド配列	
	HC	LC	HC	LC
<b>mAb10</b> = mAb2M104I	配列番号45	配列番号38	配列番号46	配列番号40
<b>mAb11</b> = mAb2N108Q	配列番号47	配列番号38	配列番号48	配列番号40
<b>mAb12</b> = mAb2G109A	配列番号49	配列番号38	配列番号50	配列番号40

40

50

## 【0190】

第3の態様において、本発明者らは、上の有益な態様を組み合わせた。本発明者らは、一方で、化学的性質、製造および制御の(CMC)不利点の基準に基づいて有利ではないアミノ酸またはモチーフを抑制するようにCDRH3内で置換されて、他方で、それらはそれらのFcドメインに少なくとも1つのアミノ酸置換を含むという理由で、エフェクタ-機能と関連するFc RIIIAへの結合を保持しながら、酸性環境におけるFcRn受容体に対する改善された結合を有するmAb2の変形体を生成させた。

## 【0191】

実施例2および図4Cおよび4Dに記載されたように、本発明者らは、CDRH3内の置換が導入されたmAb2の変形体は、下の群：

- i. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または
- ii. 位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸

から選択される置換が、そのFc領域内に導入されたときに、pH6におけるヒトおよびマウスのFcRn受容体に対する強化された結合を示すことを示した。

## 【0192】

さらに、本発明者らは、実施例3および図5に記載したように、上で記載されたそれらのCDRH3およびそれらのFc領域内における置換を積み重ねる抗体について、それらのCHIKV標的pE2-E1に対する結合は影響されないことを確認した。

## 【0193】

実施例4および図6Bおよび6Dで示したように、本発明者らは、そのような抗体について、少なくとも、それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリンが、それらのFc領域に導入されたときに、Fc RIIIAに対する結合は、保持されることも確認した。対照的に、Fc RIIIA結合は、そのような抗体が、位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256におけるグルタミン酸でそれぞれ置換された場合に弱まった。

## 【0194】

それ故、本発明者らは、化学的性質、製造および制御(CMC)の不利点の基準に基づいて有利ではないアミノ酸またはモチーフを抑制する、CDRH3内で置換された本発明による抗体について、それらのそれぞれのFc領域内に導入された置換の有益な効果を確認した。

## 【0195】

それ故、この第3の態様において、本発明は、CHIKVに結合する抗原結合フラグメントであって、それぞれ配列番号11、12および33のアミノ酸配列を有する、またはこれらの配列と1つもしくは2つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する3つの重鎖相補性決定領域(CDRH)を含むmAb2の変形抗体またはその抗原結合フラグメントに関し、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号14、GTSおよび配列番号16のアミノ酸配列、またはこれらの配列と1つもしくは2つのアミノ酸置換により異なるアミノ酸配列を有する3つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)をさらに含み、ここで：

- i. 配列番号33の位置8におけるアミノ酸はMではなく、および/または
- ii. 配列番号33の位置12におけるアミノ酸はNではなく；および/または
- iii. 配列番号33の位置13におけるアミノ酸はGではなく；

前記抗体は、少なくとも：

- i. 位置434におけるアラニン、または
- ii. それぞれ位置307、380および434におけるアラニン、または
- iii. それぞれ位置250におけるグルタミンおよび位置428におけるロイシン、または
- iv. それぞれ位置428におけるロイシンおよび位置434におけるセリン、または
- v. 位置252におけるチロシン、位置254におけるトレオニンおよび位置256

10

20

30

40

50

### におけるグルタミン酸

からなる群から、それぞれ選択される突然変異を含む F c 領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる。

#### 【 0 1 9 6 】

第 3 の態様において、第 2 の態様の、すなわち、配列番号 3 3 の C D R H を含む任意の抗体は、第 1 の態様で記載された F c 領域中で任意の突然変異を含むことができて、前記抗体は：

- i . 位置 4 3 4 におけるアラニン、または
- i i . それぞれ位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 におけるアラニン、または
- i i i . それぞれ位置 2 5 0 におけるグルタミンおよび位置 4 2 8 におけるロイシン 10 、または
- i v . それぞれ位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリン、または
- v . それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸

からなる群から選択される少なくとも 1 つの残基を有する F c 領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられることが理解される。

#### 【 0 1 9 7 】

別の実施形態において、変形抗体 ( m A b 1 3 ) またはその抗原結合フラグメントは：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ；
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ；
- 配列番号 3 5 の配列からなる C D R H 3 ；
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ；
- G T S からなる C D R L 2 ；
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3 ；

ならびに少なくとも、それぞれ位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸を含む F c 領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる。

#### 【 0 1 9 8 】

別の実施形態において、変形抗体 ( m A b 1 4 ) またはその抗原結合フラグメントは：

- 配列番号 1 1 の配列からなる C D R H 1 ；
- 配列番号 1 2 の配列からなる C D R H 2 ；
- 配列番号 3 5 の配列からなる C D R H 3 ；
- 配列番号 1 4 の配列からなる C D R L 1 ；
- G T S からなる C D R L 2 ；
- 配列番号 1 6 の配列からなる C D R L 3 ；

ならびに少なくとも、それぞれ位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリンを含む F c 領域を含み、ここで、前記アミノ酸の位置は E U インデックスにより与えられる。

#### 【 0 1 9 9 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 1 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 1 少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 1 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 1 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

#### 【 0 2 0 0 】

別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 3 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 3 と少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実

10

20

30

40

50

施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 3 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。別の実施形態において、抗体の重鎖は、配列番号 5 3 と 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれらからなる。

【 0 2 0 1 】

一実施形態において、この特定の態様による抗体は、重鎖と軽鎖または下の表 5 に記載された配列のヌクレオチド配列によりコードされる重鎖と軽鎖の組み合わせである。

【 0 2 0 2 】

【表 5 】

表5

10

	アミノ酸配列		ヌクレオチド配列	
	HC	LC	HC	LC
<b>mAb13</b> = mAb2N108QYTE	配列番号51	配列番号38	配列番号52	配列番号40
<b>mAb14</b> = mAb2N108QLS	配列番号53	配列番号38	配列番号54	配列番号40

20

【 0 2 0 3 】

核酸、ベクターおよび組換え宿主細胞

本発明で主に扱うさらなる目的は、本発明で定義された抗体、または本明細書に記載された抗体を含むかまたはそれらからなるポリペプチド、重鎖、軽鎖またはそれらのフラグメントをコードする配列を含むかまたはそれらからなる核酸配列に関する。

【 0 2 0 4 】

典型的には、前記核酸は、DNA または RNA 分子であり、それらは、任意の適當なベクター、例えば、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージまたはウイルスのベクターなどに含まれ得る。

30

【 0 2 0 5 】

用語「ベクター」、「クローニングベクター」および「発現ベクター」は、DNA または RNA 配列（例えば、外来遺伝子）が、それにより宿主細胞に導入され、宿主を形質転換させて、導入された配列の発現（例えば、転写および翻訳）を促進することができるビヒクルを意味する。

【 0 2 0 6 】

したがって、本発明で主に扱うさらなる目的は、本明細書に記載された核酸を含むベクターに関する。

【 0 2 0 7 】

そのようなベクターは、調節要素、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター等を含み、対象に投与されると、前記ポリペプチドの発現を惹起または指示することができる。動物細胞のための発現ベクターで使用されるプロモーターおよびエンハンサーの例は、ヒトサイトメガロウイルスのエンハンサーおよびプロモーター（Nelson 、 J. 、 1996 J. Virology 70 : 32073986 ）、 SV40 の初期プロモーターおよびエンハンサー（Mizukami 、 T. および Itoh 、 S. ら、 1987 、 J. Biochem. 101 (5) : 1307-1310 ）、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーターおよびエンハンサー（Kuwana Y. ら、 1987 、 Biochem Biophys Res Commun. 149 : 960-968 ）、プロモーター（Mason 、 J. O. ら、 1985 、 Cell 41 : 479-487 ）および免疫グロブリンのH鎖のエンハンサー（Gillies 、 S. D. ら、 1983 、 C

40

50

e 1 1 3 3 : 7 1 7 - 7 2 8 ) 等を含む。

【 0 2 0 8 】

ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を挿入および発現することができる限り、動物細胞のための任意の発現ベクターを使用することができる。適当なベクターの例は、 p A G E 1 0 7 ( M i y a j i , H . ら , 1 9 9 0 , C y t o t e c h n o l o g y 3 ( 2 ) : 1 3 3 - 1 4 0 ) 、 p A G E 1 0 3 ( M i z u k a m i , T . a n d I t o h , S . ら , 1 9 8 7 , J B i o c h e m . 1 0 1 ( 5 ) : 1 3 0 7 - 1 3 1 0 ) 、 p H S G 2 7 4 ( B r a d y , G . ら , 1 9 8 4 , G e n e 2 7 ( 2 ) : 2 2 3 - 2 3 2 ) 、 p K C r ( O ' H a r e , K . ら , 1 9 8 1 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 7 8 ( 3 ) : 1 5 2 7 - 1 5 3 1 ) 、 p S G 1 b e t a d 2 - 4 - ( M i y a j i , H . ら , 1 9 9 0 , C y t o t e c h n o l o g y 4 : 1 7 3 - 1 8 0 ) 等を含む。

【 0 2 0 9 】

プラスミドの他の例には、複製 p C E P 5 の起源を含む複製プラスミド、または統合的なプラスミド、例えば p U C 、 p c D N A 、 p B R 等が含まれる。

【 0 2 1 0 】

ウイルスのベクターの他の例は、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスおよび A A V のベクターを含む。そのような組換えウイルスは、当技術分野で知られている技法により、例えば、パッケージング細胞にトランスフェクトすることによりまたはヘルパープラスミドもしくはウイルスを用いる一過性トランスフェクションにより產生することができる。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例は、 P A 3 1 7 細胞、 P s i C R I P 細胞、 G P e n v + 細胞、 2 9 3 細胞、その他を含む。そのような複製欠陥がある組換えウイルスを產生するための詳細なプロトコルは、例えば、 W O 9 5 / 1 4 7 8 5 、 W O 9 6 / 2 2 3 7 8 、 U S 5 , 8 8 2 , 8 7 7 、 U S 6 , 0 1 3 , 5 1 6 、 U S 4 , 8 6 1 , 7 1 9 、 U S 5 , 2 7 8 , 0 5 6 および W O 9 4 / 1 9 4 7 8 に見出すことができる。

【 0 2 1 1 】

一実施形態において、本発明は、配列番号 1 8 、 2 1 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 9 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 2 および 5 4 からなる群から選択される配列の 1 つと少なくとも 8 0 % の同一性を有するポリヌクレオチドに関する。別の実施形態において、本発明は、配列番号 1 8 、 2 1 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 9 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 2 および 5 4 からなる群から選択される配列の 1 つと少なくとも 8 5 % の同一性を有するポリヌクレオチドに関する。別の実施形態において、本発明は、配列番号 1 8 、 2 1 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 9 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 2 および 5 4 からなる群から選択される配列の 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有するポリヌクレオチドに関する。別の実施形態において、本発明は、配列番号 1 8 、 2 1 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 9 、 4 0 、 4 2 、 4 4 、 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 2 および 5 4 からなる群から選択される配列の 1 つと少なくとも 9 1 、 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 または 9 9 % の同一性を有するポリヌクレオチドに関する。別の実施形態において、本発明は、本発明に記載された抗体、すなわち、 m A b 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 または 1 4 の重鎖の 1 つまたは軽鎖の 1 つまたは重鎖および軽鎖の両方をコードするポリヌクレオチドに関する。別の実施形態において、本発明は、本発明で主に扱う抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【 0 2 1 2 】

本発明で主に扱うさらなる目的は、本明細書に記載された核酸および / またはベクターをトランスフェクト、感染または形質転換された細胞に関する。

【 0 2 1 3 】

したがって、本発明は、本明細書に記載された抗体の 1 種を產生する細胞株に関する。

【 0 2 1 4 】

用語「形質転換」は、宿主細胞が、導入された遺伝子または配列を発現して所望の物質

10

20

30

40

50

、典型的には、導入された遺伝子または配列によりコードされるタンパク質または酵素を产生することになる、「外来」（すなわち、外部からの）遺伝子、D N A またはR N A 配列の宿主細胞への導入を意味する。受けたおよび導入されたD N A またはR N A を発現する宿主細胞は、「形質転換」されている。

【0215】

本発明で主に扱う核酸は、適当な発現システムから組換え抗C H I K V 抗体を产生させるために使用することができる。用語「発現システム」は、例えば、ベクターにより運ばれて宿主細胞に導入された外来D N A によりコードされるタンパク質を発現するために適当な条件下にある宿主細胞および適合性ベクターを意味する。

【0216】

一般的な発現システムは、大腸菌（E . c o l i ）宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳動物の宿主細胞およびベクターを含む。宿主細胞の他の例は、原核細胞（細菌など）および真核生物細胞（酵母細胞、哺乳動物の細胞、昆虫細胞、植物細胞など）を含むが、これらに限定されない。特定の例は、大腸菌、クルイウェロマイセス属（K l u y v e r o m y c e s ）またはサッカロミセス属（S a c c h a r o m y c e s ）の酵母、哺乳動物の細胞株（例えば、ベロ細胞、C H O 細胞、3 T 3 細胞、C O S 細胞、H E K 2 9 3 細胞その他）ならびに第一次のまたは確立された哺乳動物の細胞培養（例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞、その他から產生される）を含む。例には、マウスP 2 / 0 - A g 1 4 細胞（A T C C C R L 1 5 8 1 ）、マウスP 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 細胞（A T C C C R L 1 5 8 0 ）、ジヒドロフォレートレダクターゼ遺伝子（この後「D H F R 遺伝子」と称する）に欠陥があるC H O 細胞（U r l a u b 、G . ら , ; 1 9 8 0 、P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 7 7 ( 7 ) : 4 2 1 6 - 4 2 2 0 ）、ラットY B 2 / 3 H L . P 2 . G 1 1 . 1 6 A g . 2 0 細胞（A T C C C R L 1 6 6 2 、この後「Y B 2 / 0 細胞」と称する）等も含まれる。Y B 2 / 0 細胞は、キメラまたはヒト化抗体のA D C C 活性が、この細胞で発現されたときに、増強されているので、興味深い。

【0217】

特に、ヒト化抗体の発現について、発現ベクターは、抗体の重鎖をコードする遺伝子および抗体の軽鎖をコードする遺伝子が別々のベクターに存在するタイプかまたは両方の遺伝子が同じベクターに存在するタイプ（タンデムタイプ）のいずれかである。ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、および動物細胞中における抗体のH およびL鎖の発現レベルの間のバランスに関して、タンデムタイプのヒト化抗体発現ベクターが、一般的に使用される（S h i t a r a 、K . ら , 1 9 9 4 , J I m m u n o l M e t h o d s . J a n . 3 : 1 6 7 ( 1 - 2 ) : 2 7 1 - 8 ）。タンデムタイプのヒト化抗体発現ベクターの例は、p K A N T E X 9 3 ( W O 9 7 / 1 0 3 5 4 ) 、p E E 1 8 等を含む。

【0218】

本発明は、本発明による抗体を発現する組換え宿主細胞を产生する方法にも関し、前記方法は：( i ) インピトロまたはエクスピボで、上で記載された組換え核酸またはベクターをコンピテントな宿主細胞中に導入すること、( i i ) 得られた組換え宿主細胞をインピトロまたはエクスピボで培養すること、および( i i i ) 、場合により、前記抗体を発現および/または分泌する細胞を選択することからなるステップを含む。

【0219】

そのような組換え宿主細胞は、本明細書に記載された抗C H I K V 抗体の产生のために使用することができる。

【0220】

したがって、本発明は、本発明によるモノクローナル抗体を产生する方法に関し、前記方法は、( i ) 上で記載された細胞株を培養するステップ；( i i ) 产生モノクローナル抗体を精製するステップ；および場合により( i i i ) 前記モノクローナル抗体を医薬組

10

20

30

40

50

成物に剤形化するステップを含む。

【0221】

抗C H I K V 抗体を產生する方法

本発明で主に扱う抗C H I K V 抗体は、当技術分野で知られている任意の技法、例えば、限定されないが、任意の化学、生物学的、遺伝的または酵素的技法の、単独または組み合わせのいずれかにより產生される。

【0222】

所望の配列のアミノ酸配列を知れば、当業者は、前記抗体または免疫グロブリン鎖を、ポリペプチドを產生するための標準的技法によって容易に產生することができる。例えば、それらは、周知の固相法を使用して、特に市販のペプチド合成装置 (App lied Biosystems、Foster City、カリフォルニア州により作製されたものなど) を使用して、メーカーの使用説明書に従って合成することができる。あるいは、抗体および免疫グロブリン鎖は、当技術分野で周知の組換えDNA技法によって合成することができる。例えば、これらのフラグメントは、所望の(ポリ)ペプチドをコードするDNA配列の発現ベクターへの組み込み、およびそのようなベクターの所望のポリペプチドを発現する適当な真核生物または原核宿主への導入後のDNA発現生成物として得ることができて、その後それから、フラグメントを周知の技法を使用して単離することができる。

10

【0223】

特に、本発明は、(i) 本発明により形質転換された宿主細胞を培養すること；(ii) 前記抗体またはポリペプチドを発現させること；および(iii) 発現された抗体またはポリペプチドを回収することからなるステップを含む、抗体を產生する方法にさらに関する。

20

【0224】

換言すれば、本発明は：

- (i) 抗C H I K V 抗体を発現する細胞を提供するステップ；
  - (ii) 前記細胞を培養するステップ；
  - (iii) 前記抗体を精製するステップ；および
  - (iv) 場合により、前記抗体を医薬組成物に剤形化するステップ
- を含む、抗体を產生する方法に関する。

30

【0225】

ヒト化またはキメラ抗体を產生する方法は、当技術分野で周知の通常の組換えDNAおよび遺伝子トランスフェクション技法を包含する (Morrison, S. L. および Oi, V. T. 、 1984, Annu Rev Immunol 2: 239-256 および特許文献 US5,202,238; および US5,204,244 を参照されたい)。

【0226】

特定の実施形態において、本発明のキメラ抗体は、前に記載されたように、マウスのVLおよびVHドメインをコードする核酸配列を得て、キメラ抗体発現ベクターを構築し、それらを、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞のための発現ベクター中に挿入して、発現ベクターを動物細胞に導入することによりそのコード配列を発現させることによって產生することができる。

40

【0227】

本発明で主に扱う抗体は、通常の免疫グロブリン精製手順、例えばタンパク質Aの親和性クロマトグラフィー、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、混合様式のクロマトグラフィー、サイズ-排除クロマトグラフィーなどにより培養媒体から適当に分離される。

【0228】

Fabは、C H I K V と特異的に反応する抗体をパパインのようなプロテアーゼで処理することにより得ることができる。Fabは、抗体のFabの両方の鎖をコードするDNA配列を、原核生物で発現、または真核生物で発現させるためのベクター中に挿入して、

50

そのベクターを原核細胞または真核生物細胞（適当な）中に導入して F a b を発現させることによって產生することもできる。

【 0 2 2 9 】

F ( a b ' ) 2 は、 C H I K V と特異的に反応する抗体を、プロテアーゼ、ペプシンで処理して得ることができる。F ( a b ' ) 2 は、下で記載されるように F a b ' を、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を通して結合することにより產生することもできる。

【 0 2 3 0 】

F a b ' は、 C H I K V と特異的に反応する F ( a b ' ) 2 を、ジチオスレイトールのような還元剤で処理することにより、得ることができる。F a b ' は、抗体の F a b ' 鎮をコードする D N A 配列を、原核生物で発現のためのベクター、または真核生物で発現のためのベクター中に挿入して、そのベクターを原核または真核生物細胞（適当な）中に導入して、その発現を実施することにより產生することもできる。

【 0 2 3 1 】

s c F v は、前に記載されたように、 C D R または V H および V L ドメインの配列を使用して、 s c F v フラグメントをコードする D N A を構築し、その D N A を原核または真核生物の発現ベクター中に挿入し、次にその発現ベクターを原核または真核生物細胞（適当な）中に導入して、 s c F v を発現させることにより產生することができる。ヒト化 s c F v フラグメントを生成させるためには、本発明により相補性決定領域（ C D R ）を選択して、それらを、知られた 3 次元の構造のヒト s c F v フラグメントのフレームワークにグラフトすることを含む、 C D R グラフトと呼ばれる周知の技術を使用することができる（例えば、 W O 9 8 / 4 5 3 2 2 ； W O 8 7 / 0 2 6 7 1 ； U S 5 , 8 5 9 , 2 0 5 ； U S 5 , 5 8 5 , 0 8 9 ； U S 4 , 8 1 6 , 5 6 7 ； E P 0 1 7 3 4 9 4 を参照されたい）。

【 0 2 3 2 】

C H I K V に対する単一鎖の抗体または V H H は、例えば、（ a ） C H I K V に対する抗体（および特に重鎖抗体）を誘発するために、ラクダ科に属する哺乳類を C H I K V またはそれらのフラグメントで免疫するステップ；（ b ）このように免疫されたラクダ科からの C H I K V に対する重鎖抗体配列および / または V H H 配列を含む生物学的試料を得るステップ；および（ c ）前記生物学的試料から、 C H I K V に対する重鎖抗体配列および / または V H H 配列を回収する（例えば単離する）ステップを含む方法により得ることができる。適当な単一鎖抗体または V H H は、限定するものではない例として、重鎖抗体配列および / または重鎖抗体配列の V H H 配列および / または C H I K V の p E 2 - E 1 との結合について競合する V H H 配列を含むライブラリーをスクリーニングすることにより得ることもできる。

【 0 2 3 3 】

本発明の抗 C H I K V 抗体の改変

本発明のさらなる目的は、本明細書に記載された抗体の機能保存的変形体を包含する。

【 0 2 3 4 】

例えば、あるアミノ酸は、タンパク質構造中で他のアミノ酸により、活性の認識され得る損失なしに置換され得る。タンパク質の相互作用する能力および性質がその生物学的機能性活性を定めるので、あるアミノ酸置換は、タンパク質配列中で、また言うまでもなくその配列をコードする D N A ( i t s D N A c o d i n g s e q u e n c e ) 中で行い、それにも拘わらず類似の性質を有するタンパク質を得ることができる。したがって、抗体配列、または前記抗体をコードする対応する D N A 配列に種々の変化を、それらの結合活性の認識され得る損失なしに、行うことができると考えられる。

【 0 2 3 5 】

あるアミノ酸は、同様な疎水性指数（ hydrophobic index ）またはスコアを有する他のアミノ酸により置換されて、それでも同様な生物学的活性を有するタンパク質を生ずる、すなわち、なおも生物学的機能的に等価のタンパク質を得ることができることが、当技術分野で知られている。抗体中において、抗原に対する結合の有意の損失なしに置換するこ

10

20

30

40

50

とができる全てのアミノ酸を同定するために、アラニンスキャニング手法のような十分に確立された技術を使用することも可能である。そのような残基は、抗原結合にまたは抗体の構造の維持に関与しないので、中性と定性することができる。1つまたはそれ以上のこれらの中性の位置は、抗体の主要な特性を変化させずに、アラニンによりまたは別のアミノ酸により置換することができる。

【0236】

それ故、上で概説したように、アミノ酸置換は、一般的に、アミノ酸の側鎖置換基の相対類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズ等に基づく。数種類の前述の特性を考慮に入れた典型的置換は、当業者に周知であり：アルギニンとリジン；グルタメートとアスパルテート；セリンとトレオニン；グルタミンとアスパラギン；およびバリン、ロイシンとイソロイシンを含む。

10

【0237】

別のタイプの抗体のアミノ酸改変は、抗体中に見出される1つまたはそれ以上の炭水化物部分を欠失させ、および/または抗体中に存在しない1つまたはそれ以上グリコシル化部位を付加することにより、すなわち、抗体の元々のグリコシル化パターンを変更するために有用であり得る。Xがプロリンを除く任意のアミノ酸であるトリペプチド配列アスパラギンX-セリン、およびアスパラギンX-トレオニンのいずれかの存在は、潜在的グリコシル化部位を生じる。抗体へのグリコシル化部位の添加または欠失は、1つまたはそれ以上の上記のトリペプチド配列を含有するようにアミノ酸配列を変更することにより、通常達成される（N-連結されたグリコシル化部位について）。

20

【0238】

別のタイプの共有結合改変は、グリコシドを、抗体に化学的にまたは酵素的にカップリングすることを包含する。これらの手順は、それらが、N-またはO-連結されたグリコシル化のために、グリコシル化の能力を有する宿主細胞における抗体の産生を必要としないという点で有利である。使用されるカップリング様式に依存して、糖（単数または複数）は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離のカルボキシル基、（c）システインの遊離基のような遊離のスルフヒドリル基、（d）セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンの遊離基のような遊離のヒドロキシル基、（e）フェニルアラニン、またはチロシンの残基のような芳香族残基、（f）グルタミンのアミド基に取り付けることができる。例えば、そのような方法は、WO 87/05330に記載されている。

30

【0239】

抗体に存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的にまたは酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または等価の化合物に対する抗体の曝露を必要とする。この処理は、連結糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除く大部分のまたは全ての糖類で切断を生じさせるが、抗体は完全なまま残る。化学的脱グリコシル化は、Sojahr, H.ら（1987, Arch Biochem Biophys. 259(1): 52-57）により、およびEdge, A. S.ら（1981, Anal Biochem. 118(1): 131-137）により記載されている。抗体における炭水化物部分の酵素的切断は、Totakura, NRら（1987, Methods Enzymol 138: 350-359）により記載された種々のエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用により達成することができる。

40

【0240】

別のタイプの抗体の共有結合改変は、抗体を、種々の非タンパク質ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンの1種に、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号または4,179,337号で説明されている様式で連結することを含む。

【0241】

医薬組成物

50

本発明で主に扱う抗 C H I K V 抗体は、薬学的に許容される賦形剤と、場合により生分解性ポリマーのような徐放性マトリックスと組み合わされて、治療用組成物を形成することもできる。

【 0 2 4 2 】

したがって、本発明は、本発明の抗 C H I K V 抗体および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物にも関する。

【 0 2 4 3 】

本発明は、医薬として使用するための、本発明による抗体にも関する。

【 0 2 4 4 】

「薬学的に」または「薬学的に許容される」とは、哺乳類、特にヒトに、適宜投与されたときに、有害なアレルギー性または他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤は、無毒性固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料または任意のタイプの剤形化助剤を指す。

10

【 0 2 4 5 】

医薬組成物の形態、投与の経路、投薬量および投与計画は、処置される状態、病気の重症度、患者の年齢、体重、および性別等に当然依存する。

【 0 2 4 6 】

医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉、皮下または眼内投与等のために剤形化することができる。

【 0 2 4 7 】

特に、医薬組成物は、注射することができる剤形のために薬学的に許容されるビヒクルを含有する。これらは、特に等張、滅菌、食塩水溶液（リン酸一ナトリウムまたは二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムまたは塩化マグネシウム等またはそのような塩の混合物）、または乾燥、特に場合に応じて、滅菌水または生理食塩水が添加されると、注射用溶液の構成を可能にする凍結乾燥された組成物であることができる。

20

【 0 2 4 8 】

投与のために使用される用量は、種々のパラメーターの関数として、特に、使用される投与様式、関係する病理、またはあるいは処置の所望の持続時間の関数として、適合させることができる。

【 0 2 4 9 】

医薬組成物を製造するために、薬学的に許容される担体または水性媒体中に、有効量の抗体を溶解または分散することができる。

30

【 0 2 5 0 】

一実施形態において、本発明は、予防または治療有効量の、本明細書に記載された C H I K V に結合する抗体またはその抗原結合フラグメント、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【 0 2 5 1 】

注射用の使用に適当な薬学的形態は、滅菌水溶液または分散液；および滅菌注射用溶液または分散液の即時製造のための滅菌散剤を含む。全ての場合に、形態は、滅菌でなければならずかつ容易に注射できる程度に流体でなければならない。それは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、かつ細菌およびカビのような微生物の汚染作用を防ぐように貯蔵されなければならない。

40

【 0 2 5 2 】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、適当なそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒体であることができる。適当な流動性は、例えば、レシチンのようなコートィングの使用により、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持により、および界面活性剤、安定剤、凍結保護材または抗酸化剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、抗菌剤および抗真菌剤により成し遂げることができる。多くの場合に、等張化剤、例えば、糖類または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。

50

## 【0253】

滅菌注射用溶液は、有効化合物を必要とされる量で適當な溶媒中に、必要とされる数種類の上で列挙した他の成分と共に組み込み、続いて濾過滅菌することにより製造される。一般的に、分散液は、種々の滅菌された有効成分を基本の分散媒体および上で記載されたものから必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことにより製造される。滅菌注射用溶液を製造するための滅菌散剤の場合、一般的な製造方法は、真空乾燥および凍結乾燥技法を含み、有効成分に加え、予め滅菌濾過したそれらの溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末を生ずる。

## 【0254】

剤形化されると、溶液は、投薬剤形と適合性の様式で、および治療有効であるような量で投与されるであろう。製剤は、種々の投与形態で、例えば、上で記載された注射用溶液のタイプなどで容易に投与されるが、薬物放出カプセル等も使用することができる。

10

## 【0255】

水溶液で非経口投与するためには、例えば、溶液は、必要であれば適当に緩衝されているべきであり、希釈液は、第1に十分な食塩水またはグルコースで等張にされているべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適当である。この関係で、当業者は、本開示に照らして、使用することができる滅菌水性媒体を知るであろう。例えば、1回の投薬量は、1 mLの等張NaCl溶液に溶解されて、1000 mLの大量皮下注射流体に加えられるかまたは点滴が提案された部位に注入されるかのいずれかが可能である、(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版, 1035-1038頁、1570-1580頁を参照されたい)。投薬量における若干の変動は、処置される対象の状態に依存して必然的に生ずるであろう。投与に責任がある人物は、任意の事象において、個体対象のために適当な用量を決定するであろう。

20

## 【0256】

抗体は、治療用混合物内に剤形化されて、1用量当たり約0.01から100ミリグラム、またはその付近を含むことができる。

## 【0257】

ある実施形態により、単回または複数の用量の本明細書に記載された抗CHIKV抗体は、規定された時間経過にわたって対象に投与することができる。

30

## 【0258】

この態様による方法は、対象に複数の用量のCHIKVに対する抗体を順次投与することを含む。本明細書において使用する、「順次投与する」は、各用量のCHIKVに対する抗体が、異なる時点で、例えば、異なる日に所定の間隔(例えば、時間、日、週または月)により分けられて、対象に投与されることを意味する。本発明は、患者に、1回の初期用量のCHIKVに対する抗体、続いて1回またはそれ以上の第二次用量のCHIKVに対する抗体、および場合により続いて1回またはそれ以上の第三次用量のCHIKVに対する抗体を順次投与することを含む方法を含む。

## 【0259】

用語「初期用量」、「第二次用量」および「第三次用量」は、時間の経過順のCHIKVに対する抗体の投与の配列を指す。したがって、「初期用量」は、処置の投与計画の開始時に投与される用量であり(「ベースライン用量」とも称される)、「第二次用量」は、初期用量の後に投与される用量であり; および「第三次用量」は、第二次用量の後に投与される用量である。初期、第二次、および第三次用量は、全てCHIKVに対する抗体の同じ量を含有することもあるが、一般的には、投与の頻度に関して互いに異なることがある。しかしながら、ある実施形態では、初期、第二次および/または第三次用量に含有されるCHIKVに対する抗体の量は、処置の経過中に互いに変わる(例えば、適宜、上下に調節される)。ある実施形態では、2用量以上の(例えば、2、3、4、または5)用量が、処置の投与計画の開始時に、「装薬用量」として投与され、その後、頻度を減らした基準で投与される用量が続く(例えば、「維持用量」)。

40

50

## 【0260】

## 治療的方法および使用

別の態様で、本発明は、それらを必要とする患者におけるC H I K Vによる感染を防止するため、またはC H I K Vによる感染を患う患者を処置するため、またはC H I K V感染と関連する少なくとも1種の症状または合併症を軽減するための方法を提供し、該方法は、C H I K V感染が防止され、または感染と関連する少なくとも1つの症状もしくは合併症の重症度および／もしくは持続時間が軽減され、緩和され、もしくは減少されるよう10に、本明細書に記載された1種もしくはそれ以上の抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または本明細書に記載された、本発明で主に扱う1種もしくはそれ以上の抗C H I K V抗体もしくはそれらのフラグメントを含む医薬組成物を、それらを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。

## 【0261】

幾つかの実施形態において、該方法は、C H I K V感染と関連する病状を軽快させる。

## 【0262】

幾つかの実施形態において、該方法は、急性、急性後または慢性の多発性関節炎／多発性関節痛と関連する症状／C H I K Vと関連する関節痛、発熱、発疹、筋肉痛および／または疲労を軽減する。一実施形態において、該方法は、対象におけるC H I K V感染と関連する疼痛を軽快させる。一実施形態において、抗体は、C H I K V感染と関連する症状を処置する／軽快させるために使用され、他のアルファウイルス感染と関連する症状と交差反応し、これを処置することができる。一実施形態において、抗体は、C H I K V感染と関連する急性、急性後および慢性の多発性関節炎／多発性関節痛期を処置する／軽快させるために使用される。20

## 【0263】

そのような他のアルファウイルスの例には、オニヨンニヨン(O N N V)、ロスリバー(R R V)、バーマーフォレスト(B F V)、西部ウマ脳炎(W E E V)、セムリキフォレスト(S F V)、シンドビス(S I N V)、東部ウマ脳炎(E E E V)、ベネズエラウマ脳炎(V E E V)が含まれるが、これらに限定されない。処置されるかまたは軽快される症状は、疼痛、発熱等を含むことができるが、これらに限定されない。

## 【0264】

別の実施形態において、表2から5で、それぞれリストに挙げられた抗体のC D R配列を含む、本発明によるC H I K Vに結合する抗体、または抗原結合フラグメントを、前記対象に送達することを含む、チクングニアウイルスに感染した対象を処置する、またはチクングニアウイルスに罹るリスクがある対象の感染の尤度を低下させる方法が提供される。30

## 【0265】

別の実施形態において、表2から5のリストに挙げたC H I K Vに結合する抗体を、それぞれ前記対象に送達することを含む、チクングニアウイルスに感染した対象を処置するか、またはチクングニアウイルスに罹るリスクがある対象の感染の尤度を低下させる方法が提供される。別の実施形態において、表2から5のリストに挙げられたものの中の1、2または数種の抗体を組み合わせることができる。別の実施形態において、抗体は、表2から5のリストに挙げられた抗体の1種の可変配列と70%、80%、90%または95%の同一性を有する可変配列を有する重および軽鎖を含む変形抗体をコードしていることもある。抗体フラグメントは、組換えS c F v(単一鎖の可変フラグメント)抗体、F a bフラグメント、F(a b')2フラグメント、またはF vフラグメントであってもよい。抗体は、I g G、および／またはキメラ抗体であってもよい。抗体または抗体フラグメントは、感染に先立って、または感染の後で投与することもできる。送達は、抗体または抗体フラグメントの投与、またはR N AもしくはD N A配列または抗体もしくは抗体フラグメントをコードするベクターを用いる遺伝的送達を含むことができる。40

## 【0266】

上で言及したように、本発明の方法は、C H I K Vによる感染／症状を防止または処置するために、それを必要とする対象に、本明細書に記載された、表2、3、4および5の

リストに挙げられたm A b 3、m A b 4、m A b 5、m A b 6、m A b 7、m A b 8、m A b 9、m A b 10、m A b 11、m A b 12、m A b 13およびm A b 14からなる群から選択される1種の抗体を投与することを含む。

【0267】

上で言及したように、本発明の方法は、C H I K Vによる感染／症状を防止または処置するために、本明細書に記載された、m A b 6、m A b 7、m A b 8、m A b 9、m A b 13およびm A b 14からなる群から選択される1種の抗体を、それを必要とする対象に投与することを含む。別の実施形態において、本発明の方法は、C H I K Vによる感染／症状を防止または処置するために、m A b 7およびm A b 14からなる群から選択される、本発明で主に扱う1種の抗体を、それを必要とする対象に投与することを含む。

10

【0268】

別の態様において、本発明は、医薬として使用するための本明細書に記載されたモノクローナル抗体に関する。一実施形態において、本発明は、C H I K V感染の処置で使用するための本明細書に記載されたモノクローナル抗体に関する。一実施形態において、本発明は、C H I K Vと関連する関節痛の処置で使用するためのモノクローナル抗体に関する。一実施形態において、本発明は、C H I K V感染と関連する急性、急性後および慢性の多発性関節炎／多発性関節痛期の処置で使用するためのモノクローナル抗体に関する。一実施形態において、本発明は、急性、急性後または慢性多発性関節炎／多発性関節痛／C H I K Vと関連する関節痛、発熱、発疹、筋肉痛。および／または疲労の処置で使用するためのモノクローナル抗体に関する。一実施形態において、本発明は、C H I K V感染と関連する対象における疼痛を軽快させるために使用するためのモノクローナル抗体に関する。別の態様において、本発明は、C H I K V感染の防止に使用するためのモノクローナル抗体に関する。別の実施形態において、本発明は、上の表2、3、4および5のリストに挙げた、感染および症状の処置で使用するためのm A b 3、m A b 4、m A b 5、m A b 6、m A b 7、m A b 8、m A b 9、m A b 10、m A b 11、m A b 12、m A b 13およびm A b 14からなる群から選択されるモノクローナル抗体に関する。別の実施形態において、本発明は、上のリストに挙げた感染および症状の処置で使用するための、表2、3および5のリストに挙げたm A b 6、m A b 7、m A b 8、m A b 9、m A b 13およびm A b 14からなる群から選択されるモノクローナル抗体に関する。別の実施形態において、本発明は、上のリストに挙げた感染および症状の処置で使用するための、表2および5のリストに挙げたm A b 7およびm A b 14から選択されるモノクローナル抗体に関する。

20

【0269】

別の態様において、本発明のモノクローナル抗C H I K V抗体またはその抗原結合フラグメントは、C H I K V感染または関連する症状を防止または処置するために、1種またはそれ以上の追加の治療剤との組み合わせで使用することもできる。本明細書において使用する「との組み合わせで」という表現は、追加の治療剤が、本発明で主に扱う抗C H I K V抗体を含む医薬組成物の前、後または同時に投与されることを意味する。用語「との組み合わせで」は、抗C H I K V抗体および第2の治療剤の順次または同時の投与も含む。

30

【0270】

例えば、抗C H I K V抗体を含む医薬組成物の「前に」投与される場合、追加の治療剤は、抗C H I K V抗体を含む医薬組成物の投与の約72時間、約60時間、約48時間、約36時間、約24時間、約12時間、約10時間、約8時間、約6時間、約4時間、約2時間、約1時間、約30分、約15分または約10分前に投与することができる。抗C H I K V抗体を含む医薬組成物の「後」で投与される場合、追加の治療剤は、抗C H I K V抗体を含む医薬組成物の投与の約10分、約15分、約30分、約1時間、約2時間、約4時間、約6時間、約8時間、約10時間、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約60時間または約72時間後に投与することができる。抗C H I K V抗体を含む医薬組成物と「同時に」またはそれと共に投与することは、追加の治療剤が、別の投与形態で、抗C H I K V抗体を含む医薬組成物の投与の5分未満以内に（前、後、または

40

50

同時に ) 対象に投与されるか、または追加の治療剤および抗 C H I K V 抗体を両方共含む单一の組み合わせ投薬剤形として対象に投与されることを意味する。

【 0 2 7 1 】

組み合わせ療法は、本明細書に記載された抗 C H I K V 抗体、および上記抗体と、または上記抗体の生物学的に活性なフラグメントと組み合わされることが有利であり得る任意の追加の治療剤を含むことができる。

【 0 2 7 2 】

例えば、第 2 のまたは第 3 の治療剤は、急性、急性後または慢性の多発性関節炎、多発性関節痛 / C H I K V と関連する関節痛、発熱、発疹、筋肉痛。および / または疲労を含むが、これらに限定されない C H I K V 感染と関連する症状の軽快を助けるために使用することができる。例えば、第 2 のまたは第 3 の治療剤は、C H I K V 感染と関連する疼痛の軽快を助けるために使用することができる。

10

【 0 2 7 3 】

診断のための使用

別の態様において、本発明で主に扱うモノクローナル抗体または抗原結合フラグメントは、試料中における C H I K V 抗原の存在または不在を検出するために使用される。一実施形態において、本明細書に記載された抗体は、試料を本明細書に記載された抗体または抗原結合フラグメントと接触させるステップ、モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントの C H I K V 抗原に対する結合を検出するステップを含むアッセイの構成要素として使用され、ここで、結合の検出は C H I K V 抗原の存在を示し、または C H I K V 抗原に対する結合の検出の不在は、C H I K V 抗原の不在を示す。

20

【 0 2 7 4 】

特に、本明細書に記載されたモノクローナル抗体または抗原結合フラグメントは、治療剤の構成要素および診断アッセイの構成要素の両方として使用される。

【 0 2 7 5 】

一実施形態において、抗体は、インビトロまたはエクスピボにおける使用が意図される。例えば、C H I K V は、対象から得られた生物学的試料中で、本明細書に記載された抗 C H I K V 抗体を使用して、インビトロまたはエクスピボで検出することができる。

【 0 2 7 6 】

本発明は :

30

i . 対象の生物学的試料を抗 C H I K V 抗体と、特に抗体が前記生物学的試料と複合体を形成するために十分な条件下で接触させること、

i i . 前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること、

i i i . 結合した抗体の測定されたレベルを対照と比較することにより C H I K V 感染の存在を検出すること、対照と比較して結合した抗体の増大したレベルが C H I K V 感染を示すこと、からなるステップを含む、対象における C H I K V 感染の存在を検出するインビトロまたはエクスピボにおける方法にさらに関する。

【 0 2 7 7 】

本発明は、C H I K V を標的とする治療剤、特に本明細書に記載された抗 C H I K V 抗体またはその抗原結合フラグメントに対する、C H I K V に感染した患者の感受性を決定するインビトロまたはエクスピボにおける方法にも関し、該方法は :

40

i . C H I K V に感染した患者の生物学的試料を、抗 C H I K V 抗体またはその抗原結合フラグメントと、特に抗体が前記生物学的試料と複合体を形成するために十分な条件下で接触させること、

i i . 前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること、

i i i . 前記生物学的試料に結合した抗体の測定されたレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること

からなるステップを含み、

ここで、対照と比較した前記生物学的試料に結合した抗体の増大したレベルが、C H I K

50

Vを標的とする治療剤に感受性の患者を示す。

【0278】

上の方法において、前記対照は、正常で、感染していない同じタイプの生物学的試料、または同じタイプの正常な生物学的試料における抗体結合レベルの代表的な値と決定される参考値であり得る。

【0279】

本発明は：

i. C H I K V 感染の治療を受けている対象の生物学的試料を、本明細書に記載された抗体またはその抗原結合フラグメント、特に、抗体が前記生物学的試料と複合体を形成するために十分な条件下で接触させること、

10

i i. 前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること、

i i i. 結合した抗体の測定されたレベルを対照に結合した抗体のレベルと比較すること

からなるステップを含む、C H I K V 感染の治療の効果をモニターする、インビトロまたはエクスピリオにおける方法にさらに関し、ここで、

前記生物学的試料に結合した抗体の、対照と比較して低下したレベルが、前記C H I K V 感染の治療の効果を示す。

【0280】

前記方法において、前記生物学的試料に結合した抗体の、対照と比較して増大したレベルは、前記C H I K V 感染の治療の無効性を示す。

20

【0281】

前記対照は、特に、分析にかける生物学的試料と同じタイプの生物学的試料であるが、時間的にC H I K V 感染の治療の経過の前に対象から得られたものである。

【0282】

一実施形態において、本明細書に記載された抗C H I K V 抗体またはその抗原結合フラグメント（例えば、E 2 結合フラグメント）は、検出可能な分子または物質、例えば、蛍光性分子、放射性分子または（直接または間接的のいずれかで）シグナルを提供する当技術分野で知られている任意の他の標識で標識することもできる。

【0283】

本発明による抗体に関して、本明細書において使用する、用語「標識され」は、検出可能な物質、例えば、放射性試剤または蛍光団（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）またはフィコエリスリン（P E）またはインドシアニン（C y 5））などをポリペプチドにカップリング（すなわち、物理的に連結）することによる抗体の直接標識、ならびにポリペプチドの検出が可能な物質を用いる反応性による間接標識を包含することが意図される。

30

【0284】

本発明によるC H I K V の診断アッセイで使用することができる「試料」または「生物学的試料」は、正常または病理学的状態の患者から得ることができる任意の組織または体液の試料を含む。

【0285】

生物学的試料は、生物学的起源の血液および他の液体試料、生検検体または組織培養またはそれに由来する細胞、およびそれらの子孫のような固体組織試料を含むが、これらに限定されない。それ故、生物学的試料は、臨床的試料、培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、体液、および組織試料を包含する。

40

【0286】

キット

本発明は、少なくとも1種の抗C H I K V 抗体または抗原結合フラグメントを含むキットも提供する。抗体または抗原結合フラグメントを含有するキットは、C H I K V の検出、または治療的または診断アッセイにおいて用途を見出す。キットは、固体支持体、例えば、組織培養プレートまたはビーズ（例えば、セファロースビーズ）にカップリングされ

50

たポリペプチドまたは抗体を含有することができる。インビトロで C H I K V を、例えば、E L I S A またはウェスタンプロットで検出および定量するための抗体を含有するキットを提供することができる。検出のために有用なそのような抗体は、蛍光性または放射性標識などで標識して提供することができる。

#### 【 0 2 8 7 】

一実施形態において、本発明は、本発明で主に扱う少なくとも 1 種の抗体を含むキット、および場合によりパッケージング材料、および場合により本発明で主に扱う前記抗体が、C H I K V 感染またはC H I K V 感染に関係する症状を防止 / 処置するために効果的であることを示す、前記パッケージング材料内に含有される標識またはパッケージング挿入物に関する。

10

#### 【 0 2 8 8 】

##### 配列の簡単な説明

配列番号 1 は、「m A b 1」抗体の V H 配列を示す。

配列番号 2 は、「m A b 1」抗体の V L 配列を示す。

配列番号 3 は、「m A b 2」抗体の V H 配列を示す。

配列番号 4 は、「m A b 2」抗体の V L 配列を示す。

配列番号 5 ~ 7 は、「m A b 1」抗体の C D R 1 H 、 C D R 2 H 、 C D R 3 H の配列を示す。

配列番号 8 は、「m A b 1」抗体の C D R 1 L の配列を示す。

配列番号 9 は、組換え p E 2 - E 1 の組換え標的「H i s タグ付き C H I K V E 2 L R 2 0 0 6」の配列を示す。

20

配列番号 10 は、「m A b 1」抗体の C D R 3 L の配列を示す。

配列番号 11 - 13 は、「m A b 2」抗体の C D R 1 H 、 C D R 2 H 、 C D R 3 H の配列を示す。

配列番号 14 は、「m A b 2」抗体の C D R 1 L の配列を示す。

配列番号 15 は、組換え p E 2 - E 1 組換え標的「H i s タグ付き C H I K V E 2 S L 1 5 6 4 9」の配列を示す。

配列番号 16 は、「m A b 2」抗体の C D R 3 L の配列を示す。

配列番号 17 は、本発明で主に扱われ、図 1 で示された置換のない I g G 1 の F c 領域の配列を示す。

30

配列番号 18 は、I g G 1 の F c 領域の核酸配列を示す。

配列番号 19 は、「m A b 1」抗体の H C の配列を示す。

配列番号 20 は、「m A b 1」抗体の L C の配列を示す。

配列番号 21 は、「m A b 1」抗体の H C の核酸配列を示す。

配列番号 22 は、「m A b 1」抗体の L C の核酸配列を示す。

配列番号 23 は、「m A b 3」抗体の H C の配列を示す。

配列番号 24 は、「m A b 3」抗体の H C の核酸配列を示す。

配列番号 25 は、「m A b 4」抗体の H C の配列を示す。

配列番号 26 は、「m A b 4」抗体の H C の核酸配列を示す。

配列番号 27 は、「m A b 5」抗体の H C の配列を示す。

40

配列番号 28 は、「m A b 5」抗体の H C の核酸配列を示す。

配列番号 29 は、「m A b 6」抗体の H C の配列を示す。

配列番号 30 は、「m A b 6」抗体の H C の核酸配列を示す。

配列番号 31 は、「m A b 7」抗体の H C の配列を示す。

配列番号 32 は、「m A b 7」抗体の H C の核酸配列を示す。

配列番号 33 は、「m A b 2」抗体の C D R H 3 のコンセンサス配列を示す。

配列番号 34 は、「m A b 1 0」抗体の C D R H 3 の配列を示す。

配列番号 35 は、「m A b 1 1」抗体の C D R H 3 の配列を示す。

配列番号 36 は、「m A b 1 2」抗体の C D R H 3 の配列を示す。

配列番号 37 は、「m A b 2」抗体の H C の配列を示す。

50

配列番号 3 8 は、「m A b 2」抗体の L C の配列を示す。  
 配列番号 3 9 は、「m A b 2」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 4 0 は、「m A b 2」抗体の L C の核酸配列を示す。  
 配列番号 4 1 は、「m A b 8」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 4 2 は、「m A b 8」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 4 3 は、「m A b 9」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 4 4 は、「m A b 9」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 4 5 は、「m A b 1 0」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 4 6 は、「m A b 1 0」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 4 7 は、「m A b 1 1」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 4 8 は、「m A b 1 1」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 4 9 は、「m A b 1 2」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 5 0 は、「m A b 1 2」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 5 1 は、「m A b 1 3」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 5 2 は、「m A b 1 3」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 5 3 は、「m A b 1 4」抗体の H C の配列を示す。  
 配列番号 5 4 は、「m A b 1 4」抗体の H C の核酸配列を示す。  
 配列番号 5 5 は、図 1 に示した I g G 1 定常領域の配列を示す。  
 配列番号 5 6 は、「m A b 1 0」抗体の V H 配列を示す。  
 配列番号 5 7 は、「m A b 1 1」抗体の V H 配列を示す。  
 配列番号 5 8 は、「m A b 1 2」抗体の V H 配列を示す。

配列番号 5 9 は、図 2 に示した本発明による、位置 4 3 4 にアラニンを有する I g G 1 の F c 領域の配列を示す。

配列番号 6 0 は、図 2 に示した本発明による、それぞれ位置 3 0 7、3 8 0 および 4 3 4 にアラニンを有する I g G 1 の F c 領域の配列を示す。

配列番号 6 1 は、図 2 に示した本発明による、位置 2 5 0 にグルタミンおよび位置 4 2 8 にロイシンを、それぞれ有する I g G 1 の F c 領域の配列を示す。

配列番号 6 2 は、図 2 に示した本発明による、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニン、および位置 2 5 6 にグルタミン酸を、それぞれ有する I g G 1 の F c 領域の配列を示す。

配列番号 6 3 は、図 2 に示した本発明による、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンを、それぞれ有する I g G 1 の F c 領域の配列を示す。

### 【実施例】

#### 【0 2 8 9】

##### 材料および方法

###### モノクローナル抗体の分析および操作：

抗 C H I K V 抗体のアミノ酸配列を、3 D モデル / 構造分析ツール (B i o v i a D i s c o v e r y S t u d i o S u i t e) とカップリングした抗体インスペクター (社内で開発された抗体配列分析のためのツール) を使用して分析し、開発にとっての潜在的な問題点および不利点をスクリーニングした。不利点分析は、酸化、脱アミノ化、異性化、酸性切断、グリコシリ化、および追加の遊離 C y s のような溶媒に曝露が望ましくないモチーフに焦点を合わせる。溶媒曝露の全ての不利点は、それらの位置 (C D R、可変ドメインのフレームワーク、定常ドメイン) に基づいて優先順位付けされる。突然変異が、配列に見出される不利点を最小化することが示唆された。

#### 【0 2 9 0】

##### 最適化された抗体の生成：

コドンが最適化された遺伝子のフラグメントを合成して、哺乳動物の発現ベクター中でクローニングした。トランスフェクションは、E x p i 2 9 3 F 発現システム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を使用してメーカーのプロトコルに従って実施した。収穫された状態調節された媒体中の試料を、タンパク質 A カラムに通して精製し

10

20

30

40

50

て、溶離した分画の緩衝液を交換してpH 7.4のGibco PBSにした。

【0291】

結合分析：抗原結合、ヒトおよびマウスのFcRn結合、Fc IIIa結合

組換えCHIKV E2抗原の結合を、Biacore T200装置を使用して表面プラズモン共鳴により測定した。CM5シリーズSセンサーチップに、抗テトラHis抗体(Qiagen)を、飽和レベルで、Biacoreにより提供された標準的アミンカップリング手順により固定化した。組換えCHIKV E2抗原、すなわち、Hisタグ付きCHIKV E2 LR2006(配列番号9)およびHisタグ付きCHIKV E2 SL15649(配列番号15)組換えタンパク質の構築物は、Vossら、2010(Voss JEら 2010, Nature 468: 709-712)に基づくものであり、HEK293細胞により一過性で発現されて精製された(Palら, 2013, PLoS Pathog 9, e1003312; Smithら, 2015, Cell Host & Microbe 18: 86-95)。基本的に、これらの構築物は、シグナルペプチド-E3-E2-(G4S)4-E1-His8として設計されるが、成熟形態で、シグナルペプチドおよびE3は切断により除去される。Hisタグ付きCHIKV E2 LR2006およびHisタグ付きCHIKV E2 SL15649組換え抗原を、HBS-EP+泳動緩衝液で希釈して、10ないし30RUの間の捕捉レベルを達成するために30秒間注入した。試験抗体は、30nMから1.1nMに逐次3倍希釈した。低親和性の結合剤は、900nMから逐次希釈した。各抗体を、捕捉された抗原および対照表面に3分間2連で、65μL/分の流速で注入し、5または15分間解離させた。表面をpH 1.5のグリシンで再生させた。反応速度定数を、Biacore T200評価ソフトウェアで、1:1結合モデルを使用して計算した。

10

【0292】

FcRnへの結合を測定するために、CM5シリーズSセンサーのチップに組換えヒトFcRnまたはマウスFcRnをアミン化学反応を使用して直接固定化し、それぞれ1700RUおよび800RUの表面密度を達成した。試験抗体を、pH 6.0またはpH 7.4の50mMのリン酸ナトリウム、150mMのNaCl、0.05%の界面活性剤P20中で、200および50nMに希釈した。希釈された試料を3分注入し、続いて、2連で緩衝液中10μL/分で5分間解離させた。表面をpH 8.5のホウ酸塩緩衝液で再生させた。

20

【0293】

Fc IIIaへの結合を、Biacore 3000装置を用いて測定した。CM5チップに、アミンカップリングにより抗HPC4抗体を飽和レベルで固定化した。組換えヒトFc IIIaの2つの多形を分析で比較した(Val158およびPhe158)。組換えヒトHPC4タグ付きFc IIIa-V158およびFc III-F158を、2mMのCaCl2を含有するHBS-EP+緩衝液で希釈し、Fc 2またはFc 4に、それぞれ、30秒間10μL/分で注入して、10~40RUの捕捉レベルを達成した。試料を、900、300、および100nMに希釈して2分間注入し、続いて緩衝液中30μL/分で3分、2連で解離させた。表面を、HBS-EP+緩衝液中10mMのEDTAを用いて20μL/分で3分間再生させた。

30

【0294】

結果

【実施例1】

【0295】

CDRH3中に置換を有するmAb2の抗原結合

結果を図3に示す。潜在的脱アミノ化および酸化モチーフを排除するために導入された、mAb2のCDRH3内の突然変異の効果を、CHIKVのLR2006株に由来するCHIKVのpE2-E1抗原に対する結合で測定した。結合は：

- mAb2、およびそのCDRH3の位置8にイソロイシン、そのCDRH3の位置12にグルタミン、およびそのCDRH3の位置13にアラニンをそれぞれ含むその誘導

40

50

された変形体 m A b 1 0 、 m A b 1 1 および m A b 1 2 について、ならびにその C D R H 3 の位置 8 にアラニンを含む変形体、および上のリストに挙げたこれらの中における 2 つの置換の異なる組み合わせを含む変形体についてそれぞれ測定した。

#### 【0296】

潜在的脱アミノ化および酸化モチーフを排除して作製した 7 種の突然変異体の中で、その C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミンを含む m A b 1 1 ( m A b 2 N 1 0 8 Q ) のみが、親の m A b と等価の標的結合親和性を保持していた。注意すると、その C D R H 3 の位置 8 にイソロイシンを含む m A b 1 0 ( m A b 2 M 1 0 4 I ) および、その C D R H 3 の位置 1 3 にアラニンを含む m A b 1 2 ( m A b 2 G 1 0 9 A ) は、中間的プロファイルを示し；二重突然変異体はそれらの標的結合親和性を失い、ならびにその C D R H 3 の位置 8 にアラニンを含む変形体 ( m A b 2 M 1 0 4 A ) も同様であった。

10

#### 【実施例 2】

#### 【0297】

##### F c R n の結合

結果を図 4 に示す。ヒト F c R n に対する結合 ( 図 4 A および 4 C ) およびマウスに対する結合 ( 図 4 B および 4 D ) を：

- それらの F c 領域において、位置 4 3 4 にアラニン、位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 のそれぞれにアラニン、位置 2 5 0 にグルタミンおよび位置 4 2 8 にロイシン、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 のそれぞれにセリン、ならびに位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸をそれぞれ含む m A b 1 および m A b 3 、 m A b 4 、 m A b 5 、 m A b 6 および m A b 7

20

- それらの F c 領域において、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンをそれぞれ、その C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミン、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸ならびにその C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミン、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンならびにその C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミンをそれぞれ含む m A b 2 および m A b 8 、 m A b 9 、 m A b 1 1 、 m A b 1 3 および m A b 1 4

20

について、p H 6 . 0 で測定した。

#### 【0298】

30

全ての突然変異体は、増大した半減期を生ずると予想される F c R n 結合親和性の増大、それ故、抗 C H I K V 療法におけるそれらの有用性に対する好ましい影響を示した。位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリンをそれぞれ、および位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸をそれぞれ含む突然変異体は、他の突然変異体と比較した場合、最も強い結合を示した。

#### 【実施例 3】

#### 【0299】

##### m A b 1 および m A b 2 の標的結合に対する F c 領域における置換の効果

結果を図 5 に示す。F c 領域における置換の効果を、 m A b 1 および m A b 2 について、 C H I K V 株 L R 2 0 0 6 ( 図 5 A ) および S L 1 5 6 4 9 ( 図 5 B ) に由来する C H I K V の p E 2 - E 1 抗原に対する結合で、それぞれ測定した。結合は：

40

- 位置 4 3 4 にアラニン、位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 にそれぞれアラニン、位置 2 5 0 にグルタミンおよび位置 4 2 8 にロイシン、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンをそれぞれ、ならびに位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸をそれぞれ含む m A b 1 および m A b 3 、 m A b 4 、 m A b 5 、 m A b 6 および m A b 7 ；

- 位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンをそれぞれ、その C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミン、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグ

50

ルタミン酸、ならびにその C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミン、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリン、ならびにその C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミンをそれぞれ含む m A b 2 および m A b 8 、 m A b 9 、 m A b 1 1 、 m A b 1 3 および m A b 1 4 。についてそれぞれ測定した。

#### 【 0 3 0 0 】

m A b 1 および m A b 2 の F c R n への結合を増強した F c 領域における置換は、標的とされる C H I K V の p E 2 - E 1 抗原に対する結合に影響しなかった。

#### 【 実施例 4 】

#### 【 0 3 0 1 】

##### F c R I I I a の結合

10

結果を図 6 に示す。 m A b 1 および m A b 2 の F c 領域における置換の効果を、 F c R I I I a に対する結合でそれぞれ測定した。 F C R I I I a ( C D 1 6 a ) は、 N K およびマクロファージにより発現されて、抗体依存性の細胞媒介される細胞障害性 ( A D C C ) およびマクロファージによるサイトカイン放出を誘発することができる。

#### 【 0 3 0 2 】

結合の結果を、ヒト F c R I I I a の高親和性受容体 ( F c R I I I a V 1 5 8 ) における m A b 1 ( 図 6 A ) および m A b 2 ( 図 6 B ) について、ならびにヒト F c R I I I a の低親和性受容体 ( F c R I I I a F 1 5 8 ) における m A b 1 ( 図 6 C ) および m A b 2 について ( 図 6 D ) それぞれ示す。

#### 【 0 3 0 3 】

20

##### 結合を：

- 位置 4 3 4 にアラニン、位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 にそれぞれアラニン、位置 2 5 0 にグルタミンおよび位置 4 2 8 にロイシン、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンをそれぞれ、ならびに位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸をそれぞれ含む、 m A b 1 および m A b 3 、 m A b 4 、 m A b 5 、 m A b 6 および m A b 7 ；

- 位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンをそれぞれ、その C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミン、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸、ならびにその C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミン、位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンならびにその C D R H 3 の位置 1 2 にグルタミンを含む、 m A b 2 および m A b 8 、 m A b 9 、 m A b 1 1 、 m A b 1 3 および m A b 1 4

30

についてそれぞれ測定した。

#### 【 0 3 0 4 】

F c R n への結合を増強した m A b 1 および m A b 2 の F c 領域における置換の中で、位置 2 5 2 におけるチロシン、位置 2 5 4 におけるトレオニンおよび位置 2 5 6 におけるグルタミン酸は、低下した F c R I I I a への結合親和性を導き、 F c 領域が置換されていない m A b 1 または m A b 2 と比較して、細胞に媒介されるエフェクター機能および抗 C H I K V 療法に対して負の影響を有し得た。それぞれ、位置 4 3 4 におけるアラニン、位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 におけるアラニン、それぞれ、位置 2 5 0 におけるグルタミンおよび位置 4 2 8 におけるロイシン、位置 4 2 8 におけるロイシンおよび位置 4 3 4 におけるセリンのような他の突然変異は、 F c R I I I a に対する結合親和性を保持した。

40

#### 【 0 3 0 5 】

位置 4 3 4 にアラニン、位置 3 0 7 、 3 8 0 および 4 3 4 にそれぞれアラニン、または位置 2 5 0 にグルタミンおよび位置 4 2 8 にロイシン、または位置 4 2 8 にロイシンおよび位置 4 3 4 にセリンを、それぞれ含むが、位置 2 5 2 にチロシン、位置 2 5 4 にトレオニンおよび位置 2 5 6 にグルタミン酸を含まない m A b 1 および m A b 2 は、エフェクター機能と連結される F c R I I I a 結合を保持した。

#### 【 0 3 0 6 】

50

それ故、位置 428 にロイシンおよび位置 434 にセリンを含む mAb1 または mAb2 は、最良の FcRn 結合を呈し、同時にエフェクター機能と連結される FcRRIIIa の結合も保持する。

【0307】

【表 6】

表 6

1 または数カ所の置換を担持する Fc 領域を有するかまたは有しない mAb1 の FcRn に対する結合の  $K_D$  の改善倍率

	リガンド	$K_D$ (nM)	親和性の 増大 (倍率)		リガンド	$K_D$ (nM)	親和性の 増大 (倍率)		リガンド	$K_D$ (nM)	リガンド	$K_D$ (nM)
mAb1	ヒトの FcRn	348	1.0	マウスの FcRn	20	1.0	抗原 (E2)	0.13	hFcγRIII	179	10 20 30	
mAb7		15	23.8		5.9	3.4		0.17		169		
mAb6		21	16.3		1.9	10.4				381		
mAb5		27	13.0		5.9	3.3				236		
mAb4		31	11.3		8.4	2.3				180		
mAb3		45	7.7		9.3	2.1				199		

【0308】

10

20

30

40

50

【表7】

表7

1または数か所の置換を担持するFc領域を有するかまたは有しない、CDRH3における置換を担持するmAb1およびmAb2のFcRnに対する結合の $K_D$ の改善倍率

	リガンド	$K_D$ (nM)	親和性の増大(倍率)	リガンド	$K_D$ (nM)	親和性の増大(倍率)	リガンド	$K_D$ (nM)	リガンド	$K_D$ (nM)
mAb2	ヒトのFcRn	328	1.0	マウスのFcRn	22	1.0	抗原(E2)	0.13	hFcγRIII	262
mAb9		20	16.6		7.5	3.0		0.25		207
mAb8		23	14.1		1.2	19.5				499
mAb11		301	1.1		20	1.1		0.22		289
mAb14		18	18.2		6.2	3.6		0.12		187
mAb13		24	13.7		1.6	13.7				387
mAb12								0.50		
mAb10								0.94		

## 【実施例5】

## 【0309】

標準的ブラーク縮小アッセイを使用するmAbの中和活性

mAb1、mAb7およびmAbCTR（抗リゾチームrhl1gG1対照抗体）を、3種のCHIKV系統（アジア、東中部および南部アフリカ（ESCA）および西部アフリカ系統）を代表するCHIKVの3種の異なる原型株（カリブ株、レユニオン（LR）および37997株）に対してインビトロで試験した。

## 【0310】

所定量のウイルスを、等体積のPBSまたは希釈剤で希釈された抗体と混合した。混合物を37℃で2時間インキュベートした。次に混合物を6ウェルのプレート中のコンフルエンントな単層のベロ細胞に加えた。2時間のインキュベーションの後、プレートにDME M中5%のCMCを重層した。注入後48時間において、プレートをホルマリンで固定して、次にメチレンブルー色素で染色した。ブラークを数えて、EC<sub>50</sub>を決定するために、Prism-Graph Padでデータを分析した。

## 【0311】

結果を、下の表8ならびに図7Aから7Cに示す。mAb1およびmAb7は、図7A、7Bおよび7Cに、それぞれ示したように、アジア、東中部および南部アフリカ（ESCA）および西部アフリカのCHIKV系統の3種全ての遺伝子型のウイルスを、非常に強力な活性（mAb1についてEC<sub>50</sub>値<10ng/mL、およびmAb7について<1ng/mL）で阻害した。抗リゾチーム抗体（mAbのCTR）を非特異的な陰性対照として使用した。

## 【0312】

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表8

CHIKV の遺伝子型	インビトロにおける中和- EC <sub>50</sub> (ng/ml)		
	mAb CTR	mAb1	mAb7
カリブ株のアジア系統	NA	7.6	0.6
LR 株の ECSA 系統	NA	3.9	0.3
37997 株の西部アフリカ系統	NA	4.8	0.2

10

## 【実施例 6】

## 【0313】

## マウスにおけるインビボの保護の研究

DBA1/Jマウスモデルを用いるインビボの研究を、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Healthにおける勧告に厳密に従って実施した。プロトコルは、Institutional Animal Care and Use Committee at National Institute of Allergy and Infection Diseases (NIH)により承認された。感染実験は、NIH Animal Studies Committeeの承認を得て、A-BSL3施設で実施した。

20

## 【0314】

7~8週齢のDBA/1Jマウスに、CHIKV-LR2006の0.05mlを、足首に向かって右後足の蹠の皮下に接種した。治療的研究のためには、10<sup>5.5</sup>CCID<sub>50</sub>/0.1mlのCHIKV-LR2006を、足の蹠に皮下接種を使用してCHIKV感染の3日後に、単回用量の組換えヒトIgGの抗CHIKV mAbを、個々の特化された用量で、腹腔内経路により投与した。注射の部位におけるウイルス力価を感染の5日後にモニターした。予防研究のためには、10<sup>5.5</sup>CCID<sub>50</sub>/0.1mlのCHIKV-LR2006を用いる足の蹠の皮下感染の2日前、7日前または14日前のいずれかに、組換えヒトIgGの抗CHIKV mAbを腹腔内注射により投与した。注射の部位におけるウイルス力価を、感染の3日後にモニターした。

30

## 【0315】

## インビボにおけるmAbによる予防

CHIKV-LR2006を皮下注射する前2、7または14日のいずれかに、マウスを、単回で250μg用量(約12.5mg/kg)の組換えヒトIgG抗CHIKV mAb(mAb1、mAb7)または対照の抗アイソタイプリゾームmAb(mAbCTR)で予め処置した。アイソタイプの対照mAbで処置された全てのマウスは、右後脚に接種(CCID<sub>50</sub>/g組織)の3日後に高いウイルス力価を示した(図8)。感染前の異なるときにおける(-2から-14日)、mAb7およびmAb1の両方による前処理は、それらのそれぞれの右後脚におけるウイルスレベルが、SHAM-PBS群からの非感染マウスとほぼ同等であったので、DBA1/J-マウスを、注射の部位に負荷されたウイルスから完全に保護した。

40

## 【0316】

## 曝露後のインビボにおけるmAb療法

50

7～8週齢のD B A / 1 J マウスに、足首に向かって右後足の蹠の皮下に、0.05 ml の  $10^{5.5}$  C C I D<sub>50</sub> / 0.1 ml の C H I K V - L R を接種した。単回で 250  $\mu$  g 用量の個々の m A b ( m A b 1, m A b 2, m A b 7, m A b 11 または m A b 14 ) を、 C H I K V 感染の 3 日後に腹腔内経路により投与した。注射の部位におけるウイルス力価を、感染の 5 日後にモニターした。全ての試験された m A b は、 C H I K V 感染のマウスモデルにおける組織のウイルスの負荷を中和する同じ力価を示した ( 図 9 A )。 m A b 7 および m A b 14 を、用量滴定研究でさらにキャラクタライズした。その目的で、 D B A 1 / J マウスに、足首に向かって右後足の蹠の皮下に、0.05 ml の  $10^{5.5}$  C C I D<sub>50</sub> / 0.1 ml の C H I K V - L R 2006 を接種した。 m A b 7 または m A b 14 を、 3 d p i に単回の腹腔内注射により 10, 25, 50, 100 および 250  $\mu$  g 用量 ( 約 0.5, 1, 2.5, 5, 12.5 mg / kg ) で与えた。第一次の結果は、後肢におけるウイルスチャレンジの部位における 5 d p i のウイルス力価であった。 m A b 7 は、 C H I K V に感染した D B A / 1 J マウスにおける関節のウイルスの力価を用量依存性の様式で低下させた ( 図 9 B )。有意の低下が、 50 から 250  $\mu$  g 用量で観察され、最高の効果は最高の用量で達成された。 m A b 14 は、用量がどうであれ、ウイルスの力価を有意に低下させたが、用量効果は試験条件では観察されなかった。

#### 【実施例 7】

#### 【0317】

#### 非ヒト霊長類における m A b の薬物動態

m A b 1 および m A b 7 を 2.5 mg / kg、静脈内 ( I V ) ボーラスにより、雄カニクイザルサル ( Macaca fascicularis ) に投与した。 m A b 1 および m A b 7 を受けた動物は異なる ( 2 つの別の研究 )。血漿の試料を、ヒト Ig G 1 に対する抗体を使用して、外挿 E l i s a バイオ分析法によりアッセイして、それによりウサギの免疫により発現された m A b 1 および m A b 7 を認識した。薬物動態の比較は、 m A b 7 で最終半減期 ( すなわち、  $t_{1/2}$  、身体中における薬物の濃度または量が厳密に半分まで減少するのに要する時間 ) の増大を示し、 m A b 1 および m A b 7 についてそれぞれ 2.7 および 25.5 日であった ( 図 10 )。

10

20

30

40

50

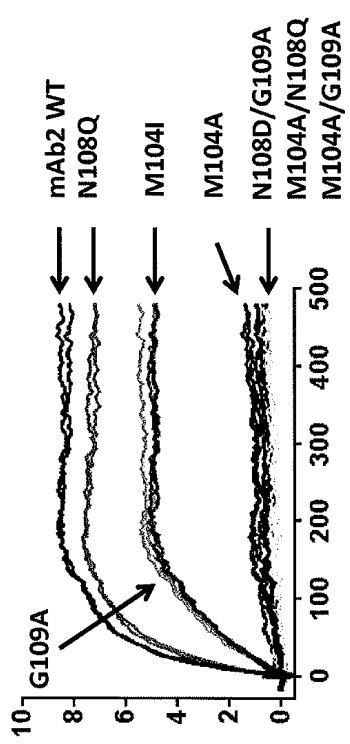
## 【図面】

### 【図 1】

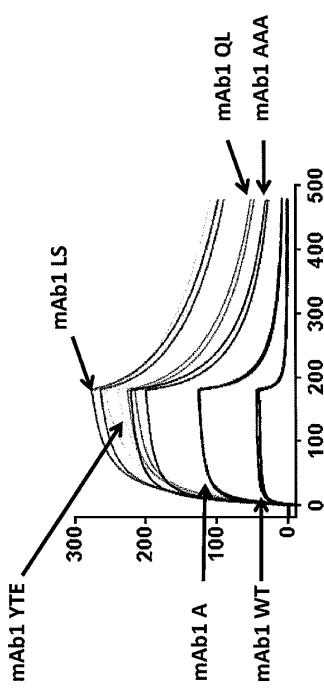
CH <sub>1</sub> Eo 107-118	ASTKGPSVFPLAASSKSTSGGTAALGCLVKDYPFEPVTWSWNS	<sup>260</sup>
CH <sub>2</sub> Eo 107-118	GALTGSVHTPEAQVLSQGGLYSSVVTYPSQSSLGQTQTYCNVNH	<sup>261</sup>
CH <sub>3</sub> Eo 107-118	KPSNTVDKKV	<sup>262</sup>
CH <sub>4</sub> Eo 107-118	EFKSKSCKTHTCPCKPCKD[RE]SRPPEVTVVVDYSHEDPEVKFNWYVG	<sup>263</sup>
CH <sub>5</sub> Eo 107-118	VVHNAATKPEEQINSTYRVVSE[RE]LHQDWLNGKEYKCKV	<sup>264</sup>
CH <sub>6</sub> Eo 107-118	S251KALPAPIEKTISAKG	<sup>265</sup>
CH <sub>7</sub> Eo 107-118	QPREPQVYTLPPSRD/EELMTKNAQVSITCLVKGFPSDIAVE	<sup>266</sup>
CH <sub>8</sub> Eo 107-118	EEINGQPNENYYKTTPTVLDSDGSEFLSKLTVDRSRWQQNSNVF	<sup>267</sup>
CH <sub>9</sub> Eo 107-118	SCSVWHEALH[RE]YTKSLSLSPG	<sup>268</sup>

【 図 2 】

【図3】



【図4-1】

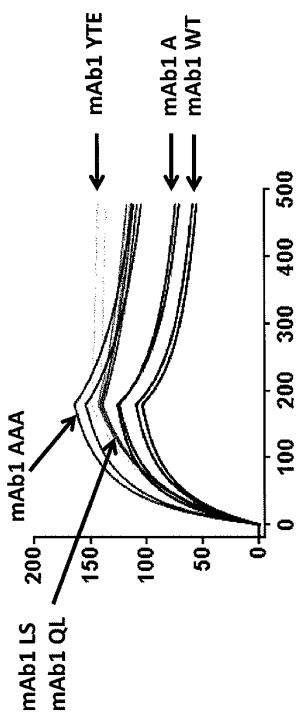


4A

10

20

【図4-2】

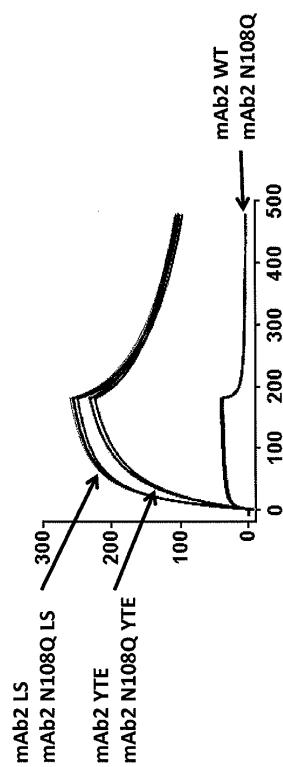


【図4-3】

4B

30

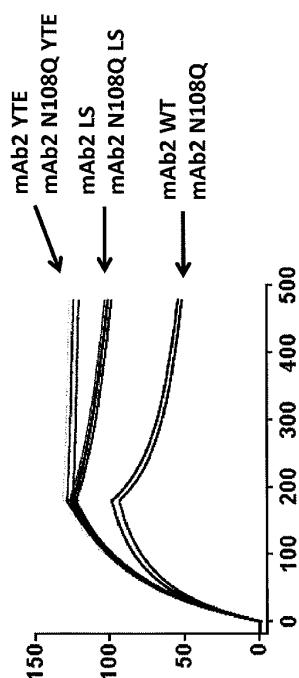
40



4C

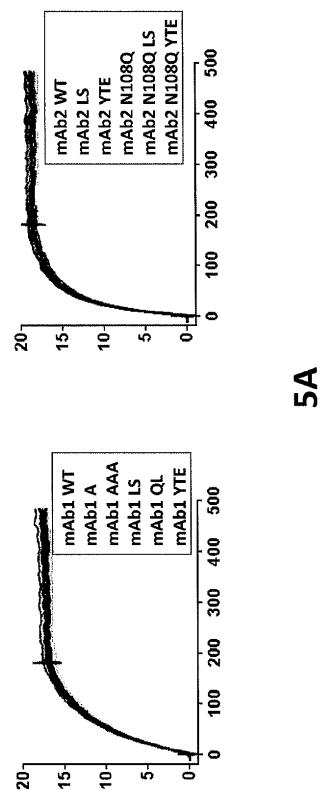
50

【図 4 - 4】



4D

【図 5 - 1】

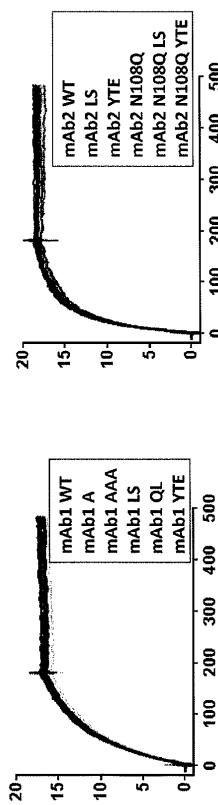


5A

10

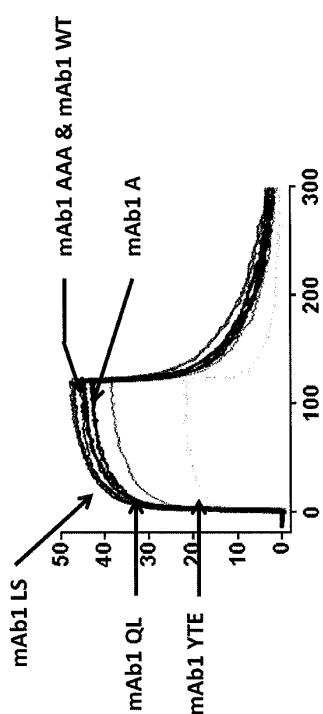
20

【図 5 - 2】



5B

【図 6 - 1】



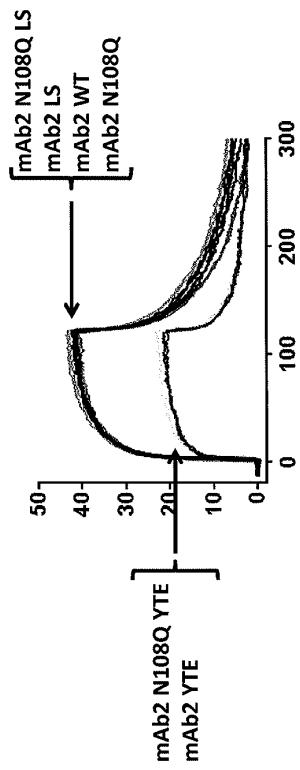
6A

30

40

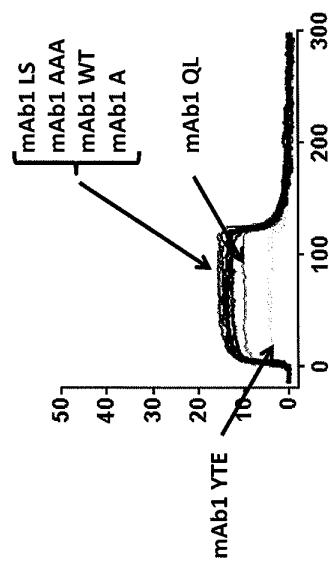
50

【図 6 - 2】



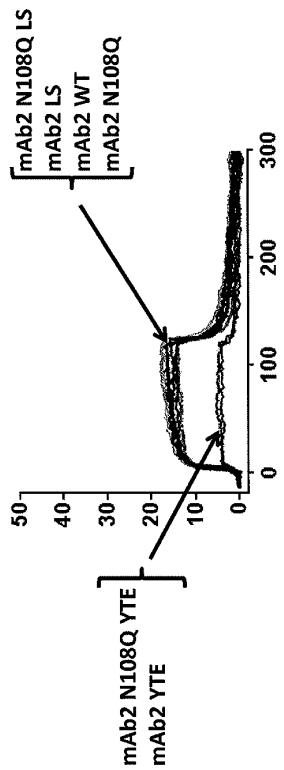
6B

【図 6 - 3】



6C

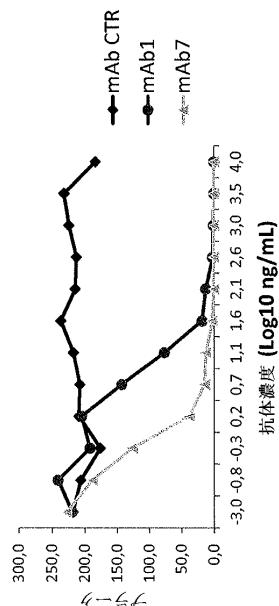
【図 6 - 4】



6D

【図 7 - 1】

インピトロにおける中和アッセイ  
カリブ株アジア系統のCHIKV



7A

10

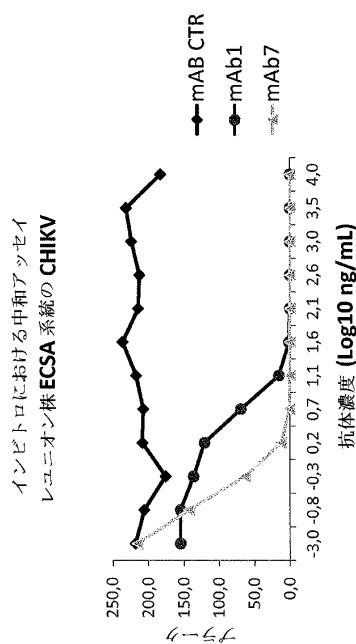
20

30

40

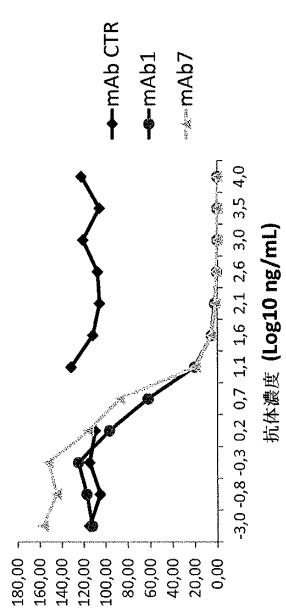
50

【図 7 - 2】



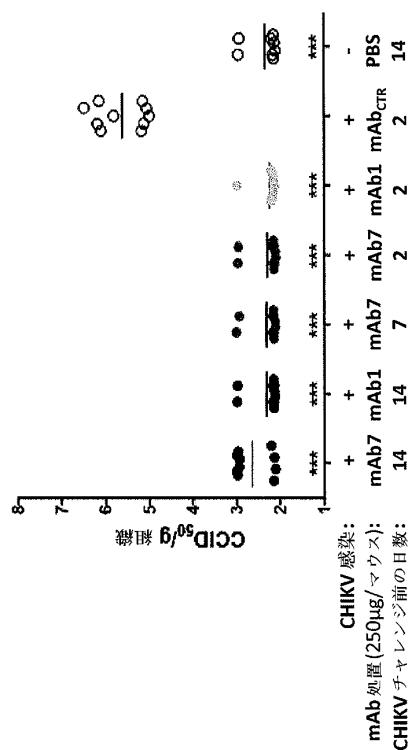
7B

【図 7 - 3】

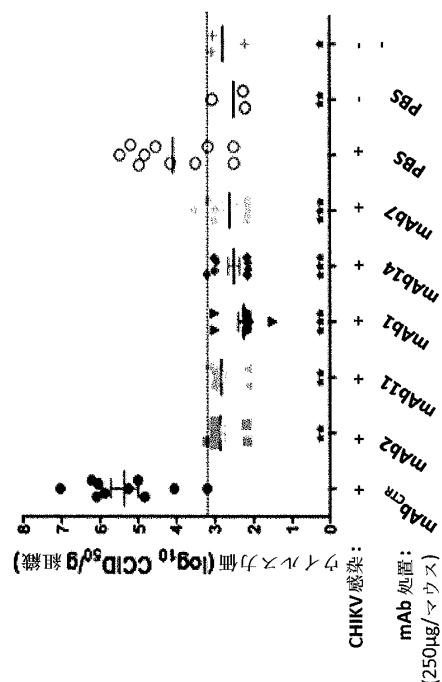


7C

【図 8】



【図 9 - 1】



9A

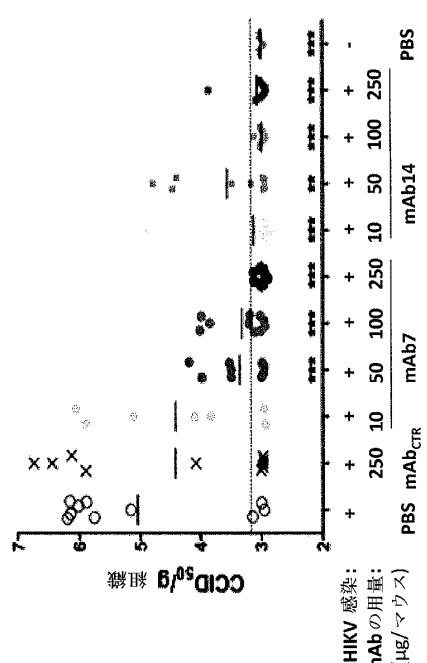
10

30

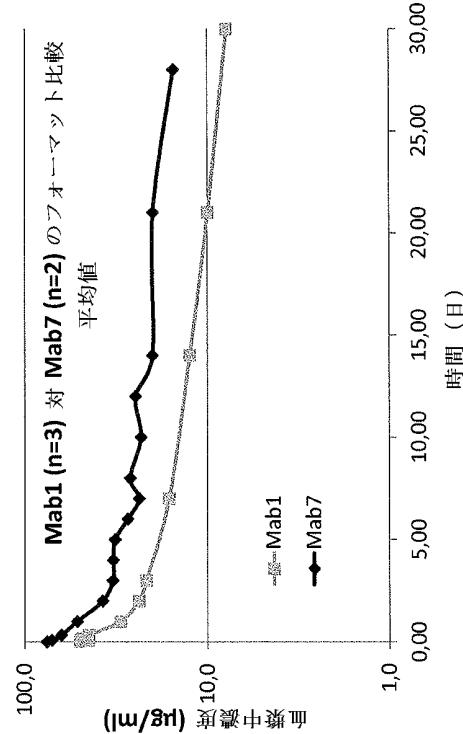
40

50

【図 9 - 2】



9B



10

20

30

40

50

【配列表】

0007181193000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I
C 1 2 N	1/21 (2006.01)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)
A 6 1 K	39/395 (2006.01)
A 6 1 P	19/02 (2006.01)
A 6 1 P	29/00 (2006.01)
A 6 1 P	31/14 (2006.01)
C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	31/14

## (72)発明者

センドリーヌ・ルモワンヌ  
フランス国 75008パリ . リュ・ラ・ボエティ 54 . パテント・デパートメント . サノフィ

## (72)発明者

マリー・マンドロン  
フランス国 75008パリ . リュ・ラ・ボエティ 54 . パテント・デパートメント . サノフィ

## (72)発明者

サングヘー・パーク  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 08807 . ブリッジウォーター . メイル - コード : 55エー - 505エー . コーポレートドライブ55 . サノフィ・ユース

## (72)発明者

ファーウェイ・チウ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 08807 . ブリッジウォーター . メイル - コード : 55エー - 505エー . コーポレートドライブ55 . サノフィ・ユース

## (72)発明者

ジョナサン・ロスプラット  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 08807 . ブリッジウォーター . メイル - コード : 55エー - 505エー . コーポレートドライブ55 . サノフィ・ユース

## 審査官

上村 直子

(56)参考文献  
米国特許出願公開第2016/0145323(US, A1)  
米国特許出願公開第2013/0189279(US, A1)  
国際公開第2012/106578(WO, A1)  
特表2008-519860(JP, A)  
特表2014-524748(JP, A)  
Cell Host & Microbe, 2015年, Vol.18, pp.86-95, Supplemental Information Table S1  
THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 2011年01月28日, Vol.186, No.5, pp.3258-3264, <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/186/5/3258.full.pdf>  
Clinical Immunology, 2013年, Vol.149, pp.487-497

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N 15 / 13  
C 1 2 P 21 / 08  
C 0 7 K 16 / 00 - 19 / 00  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
U n i P r o t / G e n e S e q