

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5162587号  
(P5162587)

(45) 発行日 平成25年3月13日(2013.3.13)

(24) 登録日 平成24年12月21日(2012.12.21)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	I O 1
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
請求項の数 19 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-524844 (P2009-524844)  
 (86) (22) 出願日 平成19年8月22日(2007.8.22)  
 (65) 公表番号 特表2010-501164 (P2010-501164A)  
 (43) 公表日 平成22年1月21日(2010.1.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2007/001207  
 (87) 国際公開番号 W02008/022390  
 (87) 国際公開日 平成20年2月28日(2008.2.28)  
 審査請求日 平成22年8月16日(2010.8.16)  
 (31) 優先権主張番号 60/839,634  
 (32) 優先日 平成18年8月22日(2006.8.22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ECACC 06081801  
 微生物の受託番号 ECACC 06081803

(73) 特許権者 509050328  
 ジーツー インフラメイション プロプラ  
 イエタリー リミテッド  
 オーストラリア国 ニュー サウス ウェ  
 ールズ 2010, ダーリングハースト,  
 384 ヴィクトリア ストリート レベ  
 ル 10  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100095360  
 弁理士 片山 英二  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良された特性を持つ抗-C5aR抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号：3 [ 3 C 5 V h ] に示された配列と少なくとも90%同一性の配列を含む可変重鎖と、配列番号：4 [ 3 C 5 V l ] に示された配列と少なくとも90%同一性の配列を含む可変軽鎖；または

(ii) 配列番号：[ 3 C 5 V h ] に示された可変重鎖配列のアミノ酸残基26~36、アミノ酸残基51~66、およびアミノ酸残基97~108で特定される配列とそれぞれ少なくとも90%同一性のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む可変重鎖と、配列番号：4 [ 3 C 5 V l ] に示された可変軽鎖配列のアミノ酸残基24~39、アミノ酸残基55~61、およびアミノ酸残基94~102で特定される配列とそれぞれ少なくとも90%同一性のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む可変軽鎖

を含む抗体であり、

前記抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する、抗体。

【請求項2】

(i) 同一条件下で決定された場合にMAb7F3のそれよりも少なくとも1.5倍低いIC<sub>50</sub>値；または

(ii) 同一条件下で決定された場合にMAb7F3のそれよりも少なくとも1.5倍高い会合定数(K<sub>on</sub>)；または

(iii) 同一条件下で決定した場合MAb7F3のそれよりも少なくとも1.3倍低いK<sub>D</sub>親和性定数；

でもって、ヒトC5aRまたはその断片に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

(i) 500 pM未満である $IC_{50}$ 値；または

(ii) 少なくとも $6.8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ である会合定数(Kon)；または

(iii) 1.4 nM未満である $K_D$ 親和性定数；

でもって、ヒトC5aRまたはその断片に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

C5aRの断片が、配列LYRVVREEYFPVKVLCGVDSYSHDKRRERAVAV (配列番号：2)を含むペプチドである、請求項2または請求項3に記載の抗体。

【請求項5】

(i) 配列番号：7 [ 8 G 7 V h ] に示された配列と少なくとも90%同一性の配列を含む可変重鎖と、配列番号：8 [ 8 G 7 V l ] に示された配列と少なくとも90%同一性の配列を含む可変軽鎖；または

(ii) 配列番号：7 [ 8 G 7 V h ] に示された可変重鎖配列のアミノ酸残基26～36、アミノ酸残基51～66、およびアミノ酸残基97～108で特定される配列とそれぞれ少なくとも90%同一性のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む可変重鎖と、配列番号：8 [ 8 G 7 V l ] に示された可変軽鎖配列のアミノ酸残基24～39、アミノ酸残基55～61、およびアミノ酸残基94～102で特定される配列とそれぞれ少なくとも90%同一性のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む可変軽鎖

を含む抗体であり、

前記抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する、抗体。

【請求項6】

前記抗体が、モノクローナル、組換え抗体、キメラまたはヒト化抗体である、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項7】

アクセシオン番号06081801下でE C A C C に寄託されたハイブリドーマから製造されたMAb 3 C 5、およびアクセシオン番号06081803下でE C A C C に寄託されたハイブリドーマから製造されたMAb 8 G 7 からなる群より選択される、モノクローナル抗体。

【請求項8】

前記抗体が、ヒトC5aRの第二の細胞外ループ(残基175から206)と反応性である、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項9】

前記抗体が、ヒトC5aRの残基179から184(E E Y F P P)を含むエピトープに対して反応性である、請求項1から8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項10】

アクセシオン番号06081801下でE C A C C に寄託されたハイブリドーマ。

【請求項11】

アクセシオン番号06081803下でE C A C C に寄託されたハイブリドーマ。

【請求項12】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体、および治療剤を含むコンジュゲート。

【請求項13】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体、および検出可能な標識を含むコンジュゲート。

【請求項14】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体をコードする配列を含む単離された核酸分子。

【請求項15】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体、および医薬上許容される担体を含む組成

10

20

30

40

50

物。

【請求項 16】

医薬として用いられる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 17】

白血球または好中球の移動に関連する障害を検出する方法であって、前記方法は、インビトロにて対象から得られた試料を請求項 13 に記載のコンジュゲートと接触させ、次いで、前記コンジュゲートおよび前記試料の間の免疫特異的結合を検出することを含む方法。

【請求項 18】

白血球または好中球移動に関連する障害の治療用の医薬の調製で用いられる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 19】

対象における白血球または好中球移動に関連する障害の診断用の請求項 13 に記載のコンジュゲートを調製するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体の使用であって、前記コンジュゲートは、インビトロにて対象から得られた試料と接触させられ、次いで、前記コンジュゲートおよび前記試料の間の免疫特異的結合が検出される、前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C5aR に結合し、かつ診断および治療方法で有用な改良された抗体に関する。

20

【背景技術】

【0002】

補体タンパク質 C3 ~ C5 の各々のタンパク質分解は、アナフィラトキシン(6 - 9)と呼ばれるシグナリング分子でアミノ末端カチオン性断片を生起させる。これらのうち最も優れた C5a は、最も広い応答を誘導する。平滑筋を収縮させる能力と共に、白血球の辺縁趨向および浸潤としての炎症応答の成分、顆粒結合タンパク質分解酵素の放出、活性化された酸素および窒素由来ラジカルの生産、血流および毛細管漏出の変化を考慮すると、該 C5a 分子は「完全な」炎症促進性メディエーターである。ナノモル以下からナノモルレベルにおいて、C5a 分子は全ての骨髄細胞系列(好中球、好酸球および好塩基球、マクロファージおよび単球)の化学走性を誘導し、血管透過性を引き起こし、これは、プロスタグランジンおよび循環白血球によって顕著に増強される。より高いナノモラー濃度は脱顆粒および NADPH オキシダーゼの活性化を誘導する。生体活性のこの広さは、他の免疫メディエーターとは対照的である。C5a は慢性関節リウマチ、乾癬、敗血症、再灌流負傷、および成人呼吸窮迫症候群の病因に関連付けられてきた(非特許文献 1 ; 非特許文献 2)。

30

【0003】

C5a の活性は C5a のその受容体(C5aR)への結合によって媒介される。C5aR は 7 回膜貫通 G - タンパク質共役受容体のファミリーに属する。C5aR は約 1 nM の Kd を持つ C5a に対する高親和性受容体であって、白血球を含めた多数の異なる細胞型に位置している。細胞当たりの受容体の数は極端に高く、白血球当たり 200,000 部位までである。受容体の生物学的活性化は、結合を飽和する範囲に渡って起こる。

40

【0004】

C5aR 構造は 7 回膜貫通受容体ファミリーに適合し、細胞外 N - 末端には、細胞内および細胞外ループとして交互に存在するヘリックス間ドメインによって連結された 7 回の膜貫通ヘリックスが続き、細胞内 C - 末端ドメインで終わる。C5aR は伸長 N - 末端細胞外ドメインを含有する。この大きな N - 末端ドメインは、IL - 8 および fMet - Leu - Phe (FMLP) 受容体ファミリーを含めた、ペプチドに結合する G - プロテイン共役受容体に典型的である。

【0005】

50

C5a 応答の C5aR アンタゴニストでの阻害は、他の補体成分に影響することなく C5a を介して媒介される急性炎症応答を低下させるはずである。この目的で、C5aR ペプチドアンタゴニストおよび抗 C5a 受容体抗体は従前に記載されている(非特許文献 3; 非特許文献 4; 非特許文献 5; 非特許文献 6; 非特許文献 7)。例えば、特許文献 1 (Scripps Research Inst.) は、C5a 受容体の N-末端ペプチド(残基 9~29) に対して向けられた抗体を記載する。

【0006】

特許文献 2 (G2 Therapies) は、C5aR への C5a 結合を阻害するのに効果的な N-末端ドメイン以外の C5aR の細胞外ループに向けられた抗体を記載する。本出願に開示された特異的モノクローナル抗体は Mab 7F3、Mab 12D4 および Mab 6C12 である。これらのモノクローナル抗体のうち、Mab 7F3 は C5aR に対して最高の結合親和性を有する。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】WO95/00164

【特許文献 2】WO03/062278

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Gerard and Gerard, 1994

20

【非特許文献 2】Murdoch and Finn, 2000

【非特許文献 3】Watanabe et al., 1995

【非特許文献 4】Pellas et al., 1998

【非特許文献 5】Kontetis et al., 1994

【非特許文献 6】Kaneko et al., 1995

【非特許文献 7】Morgan et al., 1993

【発明の概要】

【0009】

本発明者らは、今回、Mab 7F3 と比較した場合、C5aR に対して実質的に改良された結合親和性を有し、かつマウス関節炎モデルにおいて炎症を逆行させるのにかなり効果的な新規なモノクローナル抗体を開発した。

30

【0010】

従って、本発明は、配列番号: 3 [3C5 Vh] に示された可変重鎖 CDR1、CDR2 または CDR3 ループ配列に対して少なくとも 80% 同一性を保有する少なくとも 1 つの CDR ループ配列を含む抗体を提供し、該抗体は C5a の C5aR への結合を低下させ、または阻害する。

【0011】

好ましい実施形態において、該抗体は、配列番号: 3 [3C5 Vh] に示された可変重鎖 CDR1、CDR2 または CDR3 ループ配列に対して少なくとも 80% 同一性を保有する少なくとも 2 つの CDR ループ配列を含む。

40

【0012】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、さらに、配列番号: 4 [3C5 V1] に示された可変軽鎖 CDR1、CDR2 または CDR3 ループ配列に対して少なくとも 80% 同一性を保有する少なくとも 1 つの CDR ループ配列を含む。

【0013】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、配列番号: 4 [3C5 V1] に示された可変軽鎖 CDR1、CDR2 または CDR3 ループ配列に対して少なくとも 80% 同一性を保有する少なくとも 2 つの CDR ループ配列を含む。

【0014】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、各々、配列番号: 3 および配列番号:

50

4 に示された重鎖および/または軽鎖配列に対して少なくとも80%同一性を保有する配列を含み、該抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する。

【0015】

好ましい実施形態において、該抗体は、

(i) 同一条件下で決定した場合、Mab7F3のそれよりも少なくとも1.5倍低いIC<sub>50</sub>値；または

(ii) 同一条件下で決定した場合、Mab7F3のそれよりも少なくとも1.5倍高い会合定数(Kon)；または

(iii) 同一条件下で決定した場合に、Mab7F3のそれよりも少なくとも1.3倍低いK<sub>D</sub>親和性定数；

でもって、ヒトC5aRまたはその断片に結合する。

【0016】

好ましくは、該抗体は、同一条件下で決定した場合に、Mab7F3のそれよりも少なくとも1.4倍低いK<sub>D</sub>親和性定数でもって、ヒトC5aRまたはその断片に結合する。

【0017】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、

(i) 500 pM未満、好ましくは300 pM未満、より好ましくは200 pM未満であるIC<sub>50</sub>値；または

(ii) 少なくとも $6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である会合定数(Kon)；または

(iii) 1.4 nM未満であるK<sub>D</sub>親和性定数；

でもって、ヒトC5aRまたはその断片に結合する。

【0018】

好ましくは、該抗体は、

(ii) 少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である会合定数(Kon)；または

(iii) 0.5 nM未満であるK<sub>D</sub>親和性定数；

でもって、ヒトC5aRまたはその断片に結合する。

【0019】

好ましくは、C5aRの断片は、配列LYRVVREEYFPKVL CGVDYSHDKRRE RAVAI V (配列番号：2)を含むペプチドである。

【0020】

本発明は、配列番号：5[7H3 Vh]に示された可変重鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも1つのCDRループ配列を含む抗体も提供し、該抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する。

【0021】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、配列番号：5[7H3 Vh]に示された可変重鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも2つのCDRループ配列を含む。

【0022】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、さらに、配列番号：6[7H3 V1]に示された可変軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも1つのCDRループ配列を含む。

【0023】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、配列番号：6[7H3 V1]に示された可変軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも2つのCDRループ配列を含む。

【0024】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、各々、配列番号：5および配列番号：6に示された重鎖および/または軽鎖配列に対して少なくとも80%同一性を保有する配列を含み、該抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 5 】

本発明は、さらに、配列番号：7[8G7 Vh]に示された可変重鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも1つのCDRループ配列を含む抗体を提供し、該抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する。

## 【 0 0 2 6 】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、配列番号：7[8G7 Vh]に示された可変重鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも2つのCDRループ配列を含む。

## 【 0 0 2 7 】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、さらに、配列番号：8[8G7 V1]に示された可変軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも1つのCDRループ配列を含む。

## 【 0 0 2 8 】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、配列番号：8[8G7 V1]に示された可変軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも2つのCDRループ配列を含む。

## 【 0 0 2 9 】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、各々、配列番号：7および配列番号：8に示された重鎖および/または軽鎖配列に対して少なくとも80%同一性を保有する配列を含み、該抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させまたは阻害する。

## 【 0 0 3 0 】

本発明のさらなる実施形態において、該抗体は、ヒトC5aRの第二の細胞外ループ(残基175~206)と反応性である。

## 【 0 0 3 1 】

さらなる好ましい実施形態において、該抗体は、ヒトC5aRの残基179~184(E E Y F P P)を含むエピトープと反応性である。

## 【 0 0 3 2 】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、該抗体はモノクローナル組換え抗体、キメラまたはヒト化抗体である。

## 【 0 0 3 3 】

該抗体はいずれのアイソタイプのものであってもよい。しかしながら、本発明のさらなる好ましい実施形態において、該抗体はクラスIgG2aまたはクラスIgG3抗体である。

## 【 0 0 3 4 】

本発明のもう1つの好ましい実施形態において、該抗体は、Mab3c5、Mab8G7およびMab7H3からなる群より選択されるモノクローナル抗体である。

## 【 0 0 3 5 】

本発明は、アクセション番号06081801の下で、E C A C Cに寄託されたハイブリドーマも提供する。

## 【 0 0 3 6 】

本発明は、アクセション番号06081802下でE C A C Cに寄託されたハイブリドーマも提供する。

## 【 0 0 3 7 】

本発明は、アクセション番号06081803下でE C A C Cに寄託されたハイブリドーマも提供する。

## 【 0 0 3 8 】

本発明の抗体の種々の化学的誘導體も生産することができるのは認識される。例えば、放射性同位体または他のトレーサー分子のような標識に結合した本発明の抗体からなる免疫コンジュゲートは、当分野で公知の技術によって作成することができる。別法として、

10

20

30

40

50

該抗体は、抗体の結合特異性によってその所望の作用部位に標的化される治療的に有用な分子に結合させてもよい。

【 0 0 3 9 】

従って、本発明は、本発明の抗体および治療剤を含むコンジュゲートも提供する。

【 0 0 4 0 】

ある範囲の治療剤を本発明との関係で用いることができるのは認識される。好ましい治療剤は、細胞死またはタンパク質不活化を媒介する薬剤を含む。治療剤は、当分野で公知の非常に多数のトキシンのいずれであってもよい。トキシンは、シュードモナス (Pseudomonas) エキソトキシンまたはその誘導体であってもよい。好ましい実施形態において、トキシンは P E 4 0 である。

10

【 0 0 4 1 】

本発明は、本発明の抗体および検出可能な標識を含むコンジュゲートも提供する。

【 0 0 4 2 】

該検出可能な標識は、当分野で公知のいずれの適当な標識であってもよい。例えば、該標識は放射性標識、蛍光標識、酵素標識またはコントラスト媒体であってもよい。

【 0 0 4 3 】

本発明は、単離された核酸分子も提供し、該拡散分子は本発明の抗体をコードする配列を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明は、本発明による抗体および医薬上許容される担体を含む組成物も提供する。

20

【 0 0 4 5 】

本発明は、医薬として用いる本発明の抗体も提供する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、対象において白血球または好中球移動に関連する障害を診断する方法も提供し、該方法は、インビトロにて対象から得られた試料を本発明のコンジュゲートと接触させ、次いで、該コンジュゲートおよび該試料の間の免疫特異的結合を検出することを含む。

【 0 0 4 7 】

本発明は、白血球または好中球移動に関連する障害の治療用の医薬の調製で用いる本発明の抗体も提供する。

30

【 0 0 4 8 】

本発明は、免疫病理学的疾病の治療用の医薬の調製で用いる本発明の抗体も提供する。

【 0 0 4 9 】

本発明の好ましい実施形態において、C 5 a R はヒト C 5 a R である。

【 0 0 5 0 】

本発明は、C 5 a R を担持する細胞とそのリガンドとの相互作用を阻害する方法も提供し、該方法は該細胞を本発明の抗体に暴露することを含む。

【 0 0 5 1 】

本発明は、細胞において C 5 a R 活性を阻害する方法も提供し、該方法は、該細胞を本発明の抗体に暴露することを含む。

40

【 0 0 5 2 】

本発明は、対象における好中球移動に関する障害を治療する方法も提供し、該方法は、本発明の抗体を対象に投与することを含む。

【 0 0 5 3 】

本発明の抗体を用いて、C 5 a R を発現する細胞を検出し、定量し、および/または位置を特定することもできることは当業者によって認識される。

【 0 0 5 4 】

従って、本発明は、対象において好中球移動に関する障害を診断する方法も提供し、該方法は、対象から得られた試料を本発明のコンジュゲートと接触させ、該コンジュゲートおよび該試料の間の免疫特異的結合を検出することを含む。

50

## 【0055】

種々の免疫アッセイを診断の方法で用いてもよい。そのような免疫アッセイは、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」免疫アッセイ、プレシピチン反応、ゲル拡散プレシピチン反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫ラジオメトリーアッセイ、蛍光イムノアッセイ等のような技術を用いる競合的および非競合的アッセイシステムを含む。インビトロおよびインビボアッセイの双方を用いることができる。

## 【0056】

対象から得られた試料は、末梢血液、血漿、リンパ液、腹水、脳脊髄液、または胸膜液のようないずれかの体液、あるいはいずれかの体組織を含んでもよい。インビトロ結合は、組織または流体の組織学的検体またはサブ画分を用いて行ってもよい。イン・ビボ結合は、免疫特異的結合を検出できるように、(静脈内、腹腔内、動脈内などのような)当分野で公知のいずれかの手段によってコンジュゲートを投与することによって達成することができる。

10

## 【0057】

加えて、イメージング技術を用いてもよく、そこでは、本発明の抗体は適当なイメージング標識に結合される。標識された抗体をイン・ビボで投与して、対象におけるC5aRの局所化を決定してもよい。

## 【0058】

従って、本発明は、対象において好中球移動に関連する障害を診断する方法も提供し、該方法は、対象において抗体およびC5aRを提示する細胞との間の複合体を形成するような条件下で、イメージング剤で標識された本発明の抗体を対象に投与し、次いで、該複合体をイメージすることを含む。

20

## 【0059】

本発明の1つの好ましい実施形態において好中球移動に関連する障害はC5aR媒介障害である。好ましくは、障害は免疫病理学的障害である。

## 【0060】

本発明は、対象において炎症の部位に治療剤を送達する方法も提供し、該方法は本発明のコンジュゲートを対象に投与することを含む。

## 【0061】

本発明は、C5aRを提示する細胞に遺伝子材料を導入する方法も提供し、該方法は、細胞を本発明の抗体と接触させることを含み、該抗体は遺伝子材料に付着され、またはそれと会合される。

30

## 【0062】

好ましい実施形態において、C5aRを提示する細胞は顆粒球、単球、マクロファージ、好塩基球および好酸球のような白血球、肥満細胞、およびT細胞を含むリンパ球、樹状細胞、および内皮細胞および平滑筋細胞のような非骨髄様細胞からなる群より選択される。

## 【0063】

哺乳動物C5aR機能の阻害および/または促進剤を含めた、C5aRに結合するさらなるリガンドまたは他の物質を同定する方法も本発明によって含まれる。例えば、本発明の抗体またはその機能的断片のそれと同一または同様な結合特異性を有する薬剤は、該抗体または断片との競合アッセイによって同定することができる。かくして、本発明は、受容体機能の阻害剤(例えば、アンタゴニスト)または促進剤(例えば、アゴニスト)を含めた、C5aRに結合するリガンドまたは他の物質を同定する方法も含む。1つの実施形態において、C5aRを天然に発現する細胞、または細胞に導入された核酸によってコードされるC5aRもしくは変異体を発現するように操作された適当な宿主細胞を、受容体機能のリガンド、阻害剤、または促進剤の効率を同定し、評価するためのアッセイで用いる。そのような細胞は、発現された受容体タンパク質またはポリペプチドの機能を評価するのにやはり有用である。

40

50

## 【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】L1.2/hC5aR細胞で免疫化されたマウスから作成した抗ヒトC5aR mAbは、 $^{125}\text{I}$ -C5aのヒト好中球への結合を種々の程度まで阻害した。誤差棒はSDを示す。

【図2】野生型マウスにおけるC5aR遺伝子座のマッピング、およびhC5aRノックインマウスを構築するのに用いられる標的化ベクターのマッピング。マウスC5aR遺伝子エクソン3 CDSを、標的化ベクター中のヒトC5aR遺伝子エクソン3 CDSで正確に置き換えた。相同組換えを可能とするマウスC5aR遺伝子フランキング配列。LoxP部位が近接する選択マーカーPGKneoは第一のノックインマウスからCreを用いて欠失させた。3'および5'プローブを用いて、標的化ベクターがマウスC5aR遺伝子座に正しく組み込まれたことを確認した。X、XbaI; V、EcoRV。

【図3】ヘテロ接合性hC5aRノックインマウス(hC5R $^{1+/-}$ )の間の交差からのマウスの尾からのEcoRV消化ゲノムDNAのサザンブロット。該ブロットを、マウスC5aR対立遺伝子(10.0 kb)およびhC5aRノックイン対立遺伝子(8.1 kb)の間を識別する3'プローブとハイブリダイズさせた。

【図4】hC5R $^{1+/+}$ 、hC5R $^{1+/-}$ および野生型マウス好中球でのC5aRの発現。好中球をFITC結合抗ヒトC5aR mAb(7F3)または抗マウスC5aR mAb 20/70で染色した。

【図5】hC5aR $^{+/+}$ マウスの好中球から生じた抗体は、mAbクローンに依存して、完全な阻害から部分的阻害または阻害なしまでの範囲の、 $^{125}\text{I}$ -C5a結合阻害の広いスペクトルを示した。結果は各抗体についての少なくとも2つの独立した実験の代表であって、誤差棒はs.e.m.を示す。

【図6】抗C5aR mAbはナノモル以下のIC<sub>50</sub>値を有する。hC5R $^{1+/+}$ マウス好中球(3C5、7H3および8G7)を用いて作成した抗体は、L1.2/hC5aRトランスフェクタント(7F3)を用いて作成した最良のmAbよりも5~10倍低いIC<sub>50</sub>を示した。IC<sub>50</sub>値は、3または4の独立した競合 $^{125}\text{I}$ -C5aリガンド結合実験から決定した。

【図7】7F3または3C5での、hC5aR-トランスフェクトL1.2細胞上のhC5aRからの $^{125}\text{I}$ -C5a置換を示す競合リガンド結合アッセイ。EC<sub>50</sub>値は2~3の独立した実験から決定した。

【図8】キメラヒト/マウスC5aR受容体に対するC5aR特異的mAbの相対的結合。キメラ受容体を模式的に示す(hC5aRから由来する領域は赤色で示し、mC5aRからのものは黒色で示す)。4つの細胞外ドメインの起源は4文字コードによって指定される(HHHHは野生型ヒトC5aRであり、mHHHはマウスN-末端細胞外ドメインおよびヒト第一、第二、および第三細胞外ループを有する、など)。キメラ受容体を発現する一過的にトランスフェクトされたL1.2細胞は種々の抗C5aR mAbで染色した。全ての抗hC5aR mAbは、ヒトC5aR N-末端または第二の細胞外ループを含有する受容体いずれかに結合する、区別されるドメイン-制限結合プロフィールを示した。抗マウスC5aR mAb 20/70は、マウスC5aR第二細胞外ループを含有するキメラ受容体に結合する。

【図9】各個々の抗hC5aR mAbがヒト好中球へのC5a結合を阻害した程度を示すドットプロット。mAbは、それらが認識した受容体ドメインに従ってグループ分けされる。最も優れたブロッキングmAb(C5a結合を>90%だけ阻害するもの)は、全て、hC5aRの第二の細胞外ループにマッピングされた。

【図10】ペプチドELISAによるhC5aR第二細胞外ループ上の抗体結合部位のマッピング。mAb 7F3および3C5は、配列 $^{179}\text{EEYFP}^{184}$ を含有するhC5aR第二細胞外ループからの重複ペプチドの全てに結合した。

【図11a】12マーペプチドのアラニン突然変異体を用いる抗体接触残基のマッピングは、mAb 7F3および3C5によって認識されたhC5aR上の臨界的残基を同定し

10

20

30

40

50

た。

【図11b】12マーペプチドのアラニン突然変異体を用いる抗体接触残基のマッピングは、mAb 8G7および7H3によって認識されたhC5aR上の臨界的残基を同定した。

【図12】Biacoreアッセイにおけるペプチド23に対するmAb 7F3、3C5、8G7および7H3の会合および解離速度、および結合親和性。

【図13】抗hC5aR mAbの治療効率の比較。hC5aR<sup>+/+</sup>マウスに、炎症が発生してから5日後に、(PBS中1mg/kgまたは3mg/kgの)7F3、3C5または8G7を1回腹腔内注射した。対照群はPBSを受けた。グラフは、0日からの足(踝)サイズの変化を示す。群平均(群当たりn=5~7)。

【図14】抗hC5aR mAbの治療効率の比較。hC5R<sup>+/+</sup>マウスに、炎症が発生してから5日後に、(PBS中の1mg/kgまたは3mg/kgの)7F3、3C5または8G7で1回腹腔内注射した。対照群はPBSを受けた。グラフは臨床的スコアを示す。群の平均(群当たりn=5~7)。

#### 【0065】

配列表に対するKET

配列番号：1 ヒトC5aRタンパク質配列

配列番号：2 ヒトC5aRペプチド

配列番号：3 3C5可変重鎖(タンパク質)配列

配列番号：4 3C5可変軽鎖(タンパク質)配列

配列番号：5 7H3可変重鎖(タンパク質)配列

配列番号：6 7H3可変軽鎖(タンパク質)配列

配列番号：7 8G7可変重鎖(タンパク質)配列

配列番号：8 8G7可変軽鎖(タンパク質)配列

配列番号：9 修飾されたヒトC5aRペプチド

配列番号：10~25 キメラマウス/ヒトC5aRの構築のためのプライマー

配列番号：26 ビオチニル化ヒトC5aRペプチド(第二の細胞外ループ)

配列番号：27 ヒトC5aRの第二の細胞外ループの残基179~184

配列番号：28~50 配列E E Y F P Pを含有するヒトC5aRの第二の細胞外ループからの重複する12マーペプチド

配列番号：51~62 ペプチド配列V R E E Y F P P K V L Cのアラニン突然変異体

配列番号：63 スクランブルド(scrambled)V R E E Y F P P K V L Cペプチド

#### 【0066】

発明の詳細な説明

C5aR構造

ヒトC5aRのアミノ酸配列を配列番号：1に掲げる。

#### 【0067】

ヒトC5aRの種々のドメインは以下のように定義される。

アミノ酸1~37 細胞外ドメインN-末端

アミノ酸38~61 膜貫通ドメイン

アミノ酸62~71 細胞内ドメイン

アミノ酸72~94 膜貫通ドメイン

アミノ酸95~110 細胞外ドメイン-細胞外ループ1

アミノ酸111~132 膜貫通ドメイン

アミノ酸133~149 細胞内ドメイン

アミノ酸150~174 膜貫通ドメイン

アミノ酸175~206 細胞外ドメイン-細胞外ループ2

アミノ酸207~227 膜貫通ドメイン

アミノ酸228~242 細胞内ドメイン

アミノ酸243~264 膜貫通ドメイン

アミノ酸 265 ~ 283 細胞外ドメイン - 細胞外ループ 3

アミノ酸 284 ~ 307 膜貫通ドメイン

アミノ酸 308 ~ 350 細胞外ドメイン C - 末端

【0068】

微生物寄託の詳細

3C5と命名されたモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは、アクセシオン番号06081801下でE C A C Cに寄託された。

【0069】

7H3と命名されたモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは、アクセシオン番号06081802下でE C A C Cに寄託された。

【0070】

8G7と命名されたモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは、アクセシオン番号06081803下でE C A C Cに寄託された。

【0071】

これらの寄託は、特許手続きのための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約およびその下での規則の規定に従ってなされた。これは、寄託の日から30年の間の生きた培養の維持を保証する。微生物は、関連特許の発行に際して公衆に対する培養の子孫の永久的かつ制限されない入手可能性を保証するブダペスト条約の条項の下でE C A C Cによって入手可能とされる。

【0072】

本出願の譲受人は、もし適当な条件下で培養された場合に培養寄託が死滅し、または失われ、または破壊されれば、それは同一培養の生きた検体に関する通知によって迅速に交換されることに同意した。寄託された株の入手可能性は、その特許法に従っていずれかの政府の権限の下で許可された権利に違反して本発明を実施するライセンスとして解釈されるべきではない。

【0073】

抗体

本発明の抗体はポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二特異的、およびヘテロコンジュゲート抗体を含む。

【0074】

本発明で用いる用語「抗体」は、無傷分子、ならびにエピトープ決定基に結合することができるF a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、およびF vのようなその断片を含む。これらの抗体断片は、その抗原または受容体と選択的に結合するいくらかの能力を保有し、以下のように定義される。

(1) 抗体分子の一価抗原結合断片を含有する断片であるF a bは、全抗体を酵素パインで消化して、無傷軽鎖および1つの重鎖の一部を得ることによって生産することができる；

(2) 抗体分子の断片であるF a b ' は、全抗体をペプシンで処理し、続いて還元して、無傷軽鎖および重鎖の一部を生じさせることによって得ることができる；2つのF a b ' 断片は抗体分子当たりで得られる；

(3) 引き続いての還元なくして全抗体を酵素ペプシンで処理することによって得ることができる抗体の断片である( F a b ' )<sub>2</sub>；F ( a b )<sub>2</sub>は2つのジスルフィド結合によって一緒に保持される2つのF a b ' 断片のダイマーである；

(4) 2つの鎖として発現された、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された断片として定義されるF v；

(5) 遺伝子的に融合された単一鎖の分子としての、適当なポリペプチドリンカーによって連結された、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子として定義される単一鎖抗体(「SCA」)；および

(6) 単ドメイン抗体、典型的には、軽鎖が欠如した可変重鎖ドメイン。

【0075】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい抗体は、M a b 3 C 5、7 H 3または8 G 7のそれと実質的に同一である、可変領域または1以上のC D Rループを含む。

【0076】

M a b 3 C 5、7 H 3または8 G 7についての可変領域の配列は配列番号：3～8に記載されている。これらの可変領域の各々についてのC D Rループは以下の通りに定義される。

M a b 3 C 5

- C D R H 1：配列番号：3の残基26～36(包括的)
- C D R H 2：配列番号：3の残基51～66(包括的)
- C D R H 3：配列番号：3の残基97～108(包括的)
- C D R L 1：配列番号：4の残基24～39(包括的)
- C D R L 2：配列番号：4の残基55～61(包括的)
- C D R L 3：配列番号：4の残基94～102(包括的)。

10

M a b 7 H 3

- C D R H 1：配列番号：5の残基26～35(包括的)
- C D R H 2：配列番号：5の残基50～68(包括的)
- C D R H 3：配列番号：5の残基99～108(包括的)
- C D R L 1：配列番号：6の残基24～39(包括的)
- C D R L 2：配列番号：6の残基55～61(包括的)
- C D R L 3：配列番号：6の残基94～102(包括的)。

20

M a b 8 G 7

- C D R H 1：配列番号：7の残基26～36(包括的)
- C D R H 2：配列番号：7の残基51～66(包括的)
- C D R H 3：配列番号：7の残基97～108(包括的)
- C D R L 1：配列番号：8の残基24～39(包括的)
- C D R L 2：配列番号：8の残基55～61(包括的)
- C D R L 3：配列番号：8の残基94～102(包括的)。

【0077】

L 1、L 2、L 3およびH 2 C D RはK a b a tによって定義される通りである。H 1およびH 3 C D Rの制限はK a b a t定義から修飾され、それらのN - 末端においてさらなる残基を含む。C D R H 1は、C D R - H 1の一部であるC h o t h i aによって定義された残基を含むように伸長される。C D R H 3は2つの「接触」残基を含むように伸長される。C D R、およびA bおよび抗原の間の接触残基を定義する、K a b a tナンバリングについての情報に関しては<http://www.bioinfo.org.uk/abs>参照。

30

【0078】

m A b 3 C 5および8 G 7のC D Rループは配列同一性の以下のレベルを保有することに注意するのは興味深い。

【表1】

%同一性	CDR 1	CDR 2	CDR 3
3C5 対 8G7	10/11 91%	13/16 81%	10/12 83%

40

【0079】

配列表に示された可変領域またはC D Rループは本発明で用いるために修飾してもよいのは理解される。典型的には、配列の結合特異性を維持する修飾がなされる。保存的置換は、例えば、抗体の結合特異性に影響することなくすることができる。本発明は、配列番号：3～8のいずれか1つ内のC D Rループに対して、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%同一性を有する少なくとも1つのC D Rループを含

50

む抗体を含む。例えば、1、2、3または4のアミノ酸置換をCDRループ内でなすことができ、但し、修飾された配列は実質的に同一の結合特異性を保有するものとする。

【0080】

別の実施形態において、本発明の抗体のアミノ酸配列に対する修飾を意図的に行って、抗体の生物学的活性を低下させてもよい。例えば、C5aRへ結合することができるままであるが、機能的エフェクタードメインを欠如する修飾された抗体は、C5aRの生物学的活性の阻害剤として有用である。

【0081】

アミノ酸置換は、例えば、治療で投与された抗体の血漿中半減期を増大させるための天然に生じないアナログの使用を含んでもよい。

【0082】

一般に、好ましくは、変異体または誘導体のアミノ酸残基の20%、10%、または5%未満が、配列表に描かれた対応する可変領域またはCDRループと比較して改変される。

【0083】

本発明との関係では、配列表に示された可変領域の1つと「実質的に同一の」配列は、その可変領域に対して、少なくとも20、好ましくは少なくとも50アミノ酸にわたってアミノ酸レベルにおいて、少なくとも80%、85%、90%同一、好ましくは少なくとも95または98%同一であるアミノ酸配列を含んでもよい。相同性は、典型的には、非必須隣接配列よりはむしろ結合特異性にとって必須であることが公知の配列の領域に關し

【0084】

相同性の比較は、目視により、より通常には、容易に入手可能な配列比較プログラムの助けを借りて行うことができる。これらの商業的に入手可能なコンピュータプログラムは、2以上の配列の間の%相同性を計算することができる。

【0085】

パーセンテージ相同性は連続配列にわたって計算することができ、すなわち、1つの配列を他の配列と整列させ、1つの配列中の各アミノ酸を、一度に1つの残基にて、他の配列中の対応するアミノ酸と直接的に比較する。これを「ギャップなしの」整列と呼ぶ。典型的には、そのようなギャップなしの整列は、比較的短い数の残基（例えば、50未満の連続アミノ酸）にわたってのみ行われる。

【0086】

これは非常に単純かつ一貫した方法であるが、それは、例えば、配列のそうでなければ同一の対において、1つの挿入または欠失が、続いてのアミノ酸残基が整列から外されるようにし、かくして、全体的整列が行われた場合に%相同性のかなりの低下を潜在的にもたらすことを考慮していない。結果として、ほとんどの配列比較方法は、総じて相同性スコアに不当にペナルティーを科すことなく可能な挿入および欠失を考慮する最適な整列を生じさせるように設計されている。これは、配列整列において「ギャップ」を挿入して、局所的な相同性を最大化するように試みることによって達成される。

【0087】

ほとんどの整列プログラムは、ギャップペナルティーが修飾されるようにする。しかしながら、配列比較のためのそのようなソフトウェアを用いる場合にデフォルト値を用いるのが好ましい。例えば、GCG Wisconsinベストフィットパッケージ（後期参照）を用いる場合、アミノ酸配列に対するデフォルトギャップペナルティーはギャップについて-12、および各伸長について-4である。

【0088】

最大%相同性の計算は、従って、最初に、ギャップペナルティーを考慮して、最適な整列の生成を要求する。そのような整列を行うための適当なコンピュータプログラムはGCG Wisconsinベストフィットパッケージである(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387)。配列比較を実行する

10

20

30

40

50

ことができる他のソフトウェアの例は、限定されるものではないが、BLASTパッケージ(Ausubel et al., 1999 ibid-Chapter 18参照)、FASTA(Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410)および比較ツールのGENEWORKSスイートを含む。BLASTおよびFASTAの両者は、オフラインおよびオンラインサーチで入手可能である(Ausubel et al., 1999 ibid, page 7-58 to 7-60参照)。しかしながら、GCGベストフィットプログラムを用いるのが好ましい。

#### 【0089】

最終%同一性が同一性の点で測定することができるが、整列プロセスそれ自体は、典型的には、オールオアナッシング対比較に基づかない。その代わりに、一定基準で判断した同源性スコアマトリックスが一般には用いられ、これは、化学的同源性または進化の距離に基づいてスコアを各対様式の比較に割り当てる。通常用いられるそのようなマトリックスの例はBLOSUM62マトリックス - プログラムのBLASTスイートに対するデフォルトマトリックスである。GCG Wisconsinプログラムは、一般には、もし供給されれば、公のデフォルト値または慣用的な記号比較表いずれかを用いる(さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照されたい)。GCGパッケージについての公のデフォルト値、あるいは他のソフトウェアの場合には、BLOSUM62のようなデフォルトマトリックスを用いるのが好ましい。

#### 【0090】

一旦ソフトウェアが最適な整列を生じさせたならば、%相同性、好ましくは%配列同一性を計算することが可能である。ソフトウェアは、典型的には、これを、配列比較の一部として行い、数値の結果を生じさせる。

#### 【0091】

##### ポリクローナル抗体

本発明の抗体はポリクローナル抗体であってよい。ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、例えば、トランスジェニック動物に由来する第一の種のポリペプチドを発現する細胞および、所望ならば、アジュバントの1回以上の注射によって哺乳動物において生起されることができる。典型的には、細胞および/またはアジュバントは、多数の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物において注射される。使用してもよいアジュバントの例はフロイント完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート)を含む。免疫化プロトコルは、過度な実験なくして当業者によって選択され得る。

#### 【0092】

##### モノクローナル抗体

本発明の方法によって生産された抗体は、別法として、モノクローナル抗体であってよい。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256:495(1975)によって記載されたもののようなハイブリドーマ方法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適当な宿主動物を、典型的には、トランスジェニック哺乳動物に由来する第一の種のポリペプチドを発現する細胞で免疫化して、第一の種のポリペプチドに特異的に結合する抗体を生産し、または生産することができるリンパ球を誘導する。

#### 【0093】

一般に、もしヒト起源の細胞が望まれるならば、末梢血液リンパ球(「PBL」)を用いて、あるいはもし非ヒト哺乳動物源が望まれるならば、脾臓細胞またはリンパ節細胞が用いられる。次いで、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いてリンパ球を不滅化細胞系と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986) pp.59-103)。不死化細胞系は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラットまたはマウスミエローマ細胞系が使用される。ハイブリドーマ細胞が、好ましくは、融合していない不死化細胞の成長または生存を阻害する1以上の物質を好ましくは含有する適当な培養培地中で培養することができる。例えば、もし親細胞

10

20

30

40

50

が酵素ヘボキサンチングアニンホスホシルトランスフェラーゼ (HGPRT または HPR T) を欠如するならば、ハイブリドーマのための培養培地は、典型的には、ヘボキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み、(「HAT」培地)を含み、それらの物質はHGPRT欠乏細胞の成長を妨げる。

【0094】

好ましい不死化細胞系は、効果的に融合し、選択抗体生産細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持し、およびHAT培地の様な培地に対して感受性であるものである。より好ましい不死化細胞系はネズミミエローマ細胞系であり、これは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. および American Type Culture Collection, Manassas, Va. から得ることができる。ヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系もまた、ヒトモノクローナル抗体の生産のために記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp.51-63)。

10

【0095】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、第一の種のポリペプチドに対して向けられたモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、あるいはラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) のようなインビトロ結合アッセイによって決定される。そのような技術およびアッセイは当分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析によって決定することができる。

20

【0096】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは、限界希釈法によってサブクローンし、標準的方法によって成長させることができる。この目的に適した培養培地は、例えば、ダルベッコの修飾イーグル培地およびRPMI-1640培地を含む。別法として、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物において腹水としてイン・ビボで成長させることができる。

30

【0097】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような慣用的な免疫グロブリン精製手法によって培養培地または腹水液から単離し、または精製することができる。

【0098】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されたもののような組換えDNA方法によって作製することもできる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、(例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)慣用的な手法を用いて容易に単離し、配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい源として働く。一旦単離されたならば、DNAを発現ベクターに入れることができ、次いで、これを、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を生じることのないミエローマ細胞のような宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。DNAは、例えば、相同ネズミ配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインについてのコーディング配列で置換することによって(米国特許第4,816,567号)、あるいは非免疫グロブリンポリペプチドについてのコーディング配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコーディング配列に共有結合により連結することによって、修飾してもよい。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常

40

50

ドメインに代えて置換することができるか、あるいは本発明の抗体の1つの抗原 - 組合せ部位の可変ドメインに代えて置換してキメラ二価抗体を作成することができる。

【0099】

抗体は一価抗体であってよい。一価抗体を調製するための方法は当分野で周知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖および修飾された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、一般には、Fc領域におけるいずれかの地点で切形して、重鎖架橋を妨げる。別法として、関連システイン残基は別のアミノ酸残基で置換し、あるいは欠失して、架橋を妨げる。

【0100】

インビトロ方法は、一価抗体を調製するのにやはり適当である。その断片、特にFab断片を生産するための抗体の消化は、当分野で公知のルーチンの技術を用いて達成することができる。

【0101】

ヒトおよびヒト化抗体

本発明の抗体はヒト化抗体またはヒト抗体であってよい。非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化形態はキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する(Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、または抗体の他の抗原結合サブ配列のような)その断片である。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。いくつかの具体例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体においても、または輸入CDRまたはフレームワーク配列においても見出されない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1、典型的には2の可変ドメインの実質的に全てを含み、そこでは、CDR領域の全てまたは実質的には全ては非ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、かつFR領域の全てまたは実質的には全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれをやはり含む(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992))。

【0102】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は当分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである源からそれに導入された1以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入」残基といい、これは、典型的には、「輸入」可変ドメインから取られる。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列に代えてげっ歯類CDRまたはCDR配列で置き換えることによって、Winterおよび共同研究者の方法に従って実質的に行うことができる(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))。従って、そのような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体(米国特許第4,816,567号)であり、実質的に無傷ではないヒト可変ドメインが非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実践的には、ヒト化抗体は、典型的には、いくらかのCDR残基および、恐らくは、いくらかのFR残基がげっ歯類抗体における類似部位からの残基によって置き換えられたヒト抗体である。

【0103】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含めた、当分野で公知の種々の技術を用いて生産することもできる(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。Cole et al.およびBoermer et al.の技術もまた、ヒトモノクローナル抗体調製のために入手可能である(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77(1985)およびBoermer et a

10

20

30

40

50

l., *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991)). 同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活化されているマウスに導入することによって作製することができる。抗原投与に際して、ヒト抗体生産が観察され、これは、遺伝子再編成、組立て、および抗体レパートリーを含めた、全ての点においてヒトで見られるものに非常に似ている。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号において、および以下の科学文献: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)において記載されている。

#### 【0104】

抗体は、当分野で公知のように、公知の選択および/または突然変異誘発方法を用いてアフィニティー突然変異することもできる。好ましいアフィニティー突然変異抗体は、成熟した抗体がそれから調製される出発抗体(一般に、ネズミ、ヒト化またはヒト)よりも5倍、より好ましくは10倍、なおより好ましくは20または30倍大きい親和性を有する。

#### 【0105】

##### 二特異的抗体

二特異的抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル、好ましくはヒトまたはヒト化抗体である。例えば、結合特異性の1つはC5aRに対するものであり得、他の1つはいずれかの他の抗原に対するものであり得、好ましくは、細胞-表面タンパク質または受容体もしくは受容体サブユニットに対するものであり得る。

#### 【0106】

二特異的抗体を作成するための方法は当分野で公知である。伝統的には、二特異的抗体の組換え生産は2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の共発現に基づき、そこでは2つの重鎖は異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダム分類のため、これらのハイブリドーマ(クワドローマ)は、そのうち1つのみが正しい二特異的構造を有する10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生じる。正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様な手法は、1993年5月13日に公開されたWO93/08829に、およびTrauncker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)において開示されている。

#### 【0107】

所望の結合特異性を持つ抗体可変ドメイン(抗体-抗原組合せ部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させることができる。該融合は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、CH2、およびCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとである。融合の少なくとも1つに存在する軽鎖結合で必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域(CH1)を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合および、所望により、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に共-トランスフェクトする。二特異的抗体を作製するさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)参照。

#### 【0108】

WO96/27011に記載されたもう1つのアプローチに従い、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養から回収されたヘテロダイマーのパーセンテージを最大化されるように作製することもできる。好ましい界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第一の抗体分子の界面からの1以上の小さなアミノ酸側鎖はより大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置き換えられている

10

20

30

40

50

。より大きな側鎖に対する同一または同様なサイズの補償「キャピティ」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置き換えることによって、第二の抗体分子の界面で作成される。これは、ホモダイマーのような他の望まない最終産物よりもヘテロダイマーの収率を増大させるためのメカニズムを提供する。

#### 【0109】

二特異的抗体は全長抗体または抗体断片（例えば、 $F(ab')_2$ 二特異的抗体）として調製することができる。抗体断片からの二特異的抗体を生じさせるための技術は文献に記載されている。例えば、二特異的抗体は化学結合を用いて調製することができる。Brennan et al., Science 229:81 (1985)は、無傷抗体がタンパク質分解により切断されて、 $F(ab')_2$ 断片を生じさせる手法を記載する。これらの断片はジチオール複合体化剤 10  
亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元して、隣接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を妨げる。次いで、生じた $Fab'$ 断片をチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、 $Fab'$ -TNB誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンでの還元によって $Fab'$ -チオールに再度変換し、等モル量の他の $Fab'$ -TNB誘導体と混合して二特異的抗体を形成する。生じた二特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として用いることができる。

#### 【0110】

$Fab'$ 断片を*E. coli*から直接的に回収し、化学的にカップリングさせて、二特異的抗体を形成することができる。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)は、十分にヒト化された二特異的抗体 $F(ab')_2$ 分子の生産を記載する。 20  
各 $Fab'$ 断片は*E. coli*から別々に分泌され、インピトロにて指向性化学的カップリングに付され、二特異的抗体を形成させた。そのように形成された二特異的抗体は、*ErbB2*受容体および正常ヒトT細胞を過剰発現する細胞に結合し、ならびにヒト乳癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性をトリガーすることができた。

#### 【0111】

組換え細胞培養から直接的に二特異的抗体断片を作成し、単離するための種々の技術もまた記載されている。二特異的抗体はロイシンジッパーを用いて生産されてきた。Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。*Fos*および*Jun*タンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体の $Fab'$ 部分に連結された。抗体ホモダイマーをヒンジ領域において還元して、モノマーを形成し、次いで、再度酸化して抗体ヘテロダイマーを形成させた。この方法は、抗体ホモダイマーの生産のために利用することもできる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に記載された「ダイヤボディ」技術は、二特異的抗体断片を作成するための代替メカニズムを提供している。該断片は、余りにも短くて、同一鎖上の2つのドメインの間の対合を可能とできないリンカーによって軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に連結された重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を含む。従って、1つの断片の $V_H$ および $V_L$ ドメインは、強制的に、もう1つの断片の相補的 $V_L$ および $V_H$ ドメインと対合させられ、それにより、2つの抗原結合部位を形成する。単一鎖 $Fv(sFv)$ ダイマーの使用によって二特異的抗体断片を作成するためのもう1つの戦略もまた報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)参照。 30  
40

#### 【0112】

2を超える価数を持つ抗体が考えられる。例えば、三特異的抗体を調製することができる。Tutt et al., Immunol. 147:60 (1991)。

#### 【0113】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた、本発明の範囲内にある。ヘテロコンジュゲート抗体は2つの共有結合により連結された抗体から構成される。そのような抗体は、例えば、望まない細胞に免疫系細胞を標的化するのに（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の治療のために（WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089）提案されている。抗体は、架橋剤が関連するものを含めた、合成タンパク 50

質化学における公知の方法を用いてインビトロで調製することができる。例えば、イムノトキシンはジスルフィド交換反応を用いて、あるいはチオエーテル結合を形成することによって構築することができる。この目的に適した試薬の例はイミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートおよび、例えば、米国特許第4,676,980号に開示されたものを含む。

#### 【0114】

##### エフェクター機能エンジニアリング

エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾して、例えば、癌を治療する際に抗体の有効性を増強させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能とすることができる。そのような生じたホモダイマー抗体は、改良された内部化能力および/または増大した補体媒介細胞殺傷および抗体-依存性細胞傷害性(ADCC)を有することができる。Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992)およびShopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)参照。増強された抗腫瘍活性を持つホモダイマー抗体はWolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)に記載されているヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。別法として、デュアルFc領域を有し、それにより、増強された補体溶解およびADCC能力を有することができる抗体を作製することができる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

10

#### 【0115】

##### 免疫コンジュゲート

本発明は、化学治療剤、トキシン(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素活性トキシンまたはそれらの断片)または放射性同位体(すなわち、放射性コンジュゲート)のような細胞傷害性剤にコンジュゲートした抗体を含む免疫コンジュゲートにも関する。

20

#### 【0116】

そのような免疫コンジュゲートの作成で有用な化学治療剤は前記した。用いることができる酵素的に活性なトキシンおよびその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合性活性断片、(*Pseudomonas aeruginosa*からの)エキソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ-サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、*Giantin*タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、*Momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*Saponaire officinalis*阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンを含む。種々の放射性核種が放射性コンジュゲート抗体の生産で入手可能である。その例は、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、および<sup>186</sup>Reを含む。抗体および細胞傷害性剤のコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、(ジメチルアジピミデートHLCのような)イミドエステルの二官能性誘導体、(ジスクシンイミジルスベレートのような)活性エステル、(グルタルアルデヒドのような)アルデヒド、(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンのような)ビス-アジド化合物、(ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンのような)ビス-ジアゾニウム誘導体、(トリレン2,6-ジイソシアネートのような)ジイソシアネート、および(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンのような)ビス-活性フッ素化合物のような種々の二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作成される。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、抗体に対する放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。WO94/11026参照。

30

40

#### 【0117】

50

もう1つの実施形態において、抗体は腫瘍標的化における利用のために（ストレプトアビジンのような）「受容体」にコンジュゲートさせることができ、抗体-受容体コンジュゲートは患者に投与され、続いて、キレート化剤を用いて循環から未結合コンジュゲートを除去し、次いで、細胞傷害性剤（例えば、放射性ヌクレオチド）にコンジュゲートされた「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。

【0118】

抗体アイソタイプ

ある状況下では、1つのアイソタイプのモノクローナル抗体は、診断または治療効果の点で他のものよりもより好ましい。例えば、抗体媒介細胞溶解についての研究から、アイソタイプガンマ-2aおよびガンマ-3の修飾されていないマウスモノクローナル抗体は、一般には、ガンマ-1アイソタイプの抗体である標的細胞を溶解させるのにより効果的であることが公知である。この異なる効率は、標的細胞の細胞溶解破壊により活動的に参画するガンマ-2aおよびガンマ-3アイソタイプの能力によるものと考えられる。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプは、クラス-スイッチ変異体を単離するためのsib選択技術を用いることによって、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製することができる(Steplewski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:8653, 1985; Spira, et al., J. Immunol. Methods, 74:307, 1984)。

10

【0119】

結合特徴

本発明の1つの実施形態において、抗体はその阻害濃度50値の点で規定される。

20

【0120】

用語「阻害濃度50%」（「 $IC_{50}$ 」と略される）は、阻害剤標的の分子の所与の活性（例えば、C5aのC5aRまたはその断片への結合）の50%阻害に必要な阻害剤（例えば、本発明の抗体）の濃度を表わす。より小さな $IC_{50}$ 値がより優れた阻害剤に対応するのは当業者に理解される。

【0121】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、同一条件下で測定した場合に、MAb7F3のそれよりも少なくとも1.5倍低い $IC_{50}$ の値をもって、C5aのC5aRへの結合を阻害する。

30

【0122】

もう1つの実施形態において、本発明の抗体は、500pM未満、より好ましくは400pM未満、より好ましくは300pM未満、より好ましくは200pM未満の $IC_{50}$ をもって、C5aのC5aRへの結合を阻害する。好ましくは、これらの $IC_{50}$ 値は、本明細書中の実施例に記載されたようにヒト好中球を用いて行われる結合アッセイによって決定される。

【0123】

本発明のもう1つの実施形態は、同一条件下で測定した場合、MAb7F3のそれよりも少なくとも1.3倍低い、好ましくは1.4倍低い $K_D$ （親和性定数）をもって、C5aRまたはその断片に結合する抗体に関する。

40

【0124】

もう1つの実施形態において、本発明の抗体は、1.4nM未満、より好ましくは0.7nM未満、より好ましくは0.5nM未満、より好ましくは0.3nM未満の $K_D$ をもって、C5aRまたはその断片に結合する。

【0125】

本発明のもう1つの実施形態は、同一条件下で測定した場合、MAb7F3のそれよりも少なくとも1.5倍高い会合定数または $k_a$ 速度をもって、C5aRまたはその断片に結合する抗体に関する。

【0126】

もう1つの実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも $6.8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、

50

より好ましくは少なくとも  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも  $3 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  の会合定数または  $k_a$  速度をもって、C5aR またはその断片に結合する。

【0127】

好ましい実施形態において、結合親和性は、ヒトC5aRに由来するペプチドへの抗体の結合のBIACore分析によって決定される。好ましくは、ヒトC5aRに由来するペプチドは配列LYRVVREELYFPKVLGVDYSHDKRRERAVAVI（配列番号：2）を含む。より好ましくは、結合分析は、本明細書中における実施例に記載された条件下でBIACore結合アッセイによって行われる。

【0128】

インビトロアッセイ

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、それらが液相で利用できる、または固相担体に結合させることができるイムノアッセイにおいてインビトロで用いるのに適している。抗体は、試料中のC5aRのレベルをモニターするのに有用であり得る。同様に、抗イデオタイプ抗体は試料中のC5aのレベルを測定するのに有用である。加えて、これらのイムノアッセイにおけるモノクローナル抗体は種々の方法で検出可能に標識することができる。本発明のモノクローナル抗体を利用することができるイムノアッセイのタイプの例は、直接的または間接的いずれかの様式の競合および非競合イムノアッセイである。そのようなイムノアッセイの例はラジオイムノアッセイ（RIA）およびサンドイッチ（イムノメトリー）アッセイである。本発明のモノクローナル抗体を用いる抗原の検出は、生理学的試料についての免疫組織化学アッセイを含めた、順方向、逆方向、または同時のいずれかのモードで実行させるイムノアッセイを利用してなすことができる。当業者であれば、過度の実験なくして他のイムノアッセイ様式を知っているか、あるいは容易に認識することができる。

【0129】

本発明の抗体は、多くの異なる担体に結合させ、それを用いて、C5aRの存在を検出することができる。周知の担体の例はガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトを含む。担体の性質は、本発明の目的では、可溶性または不溶性いずれかであり得る。当業者は、モノクローナル抗体を結合させるための他の適当な担体を知っているか、あるいはルーチンの実験を用いてそれを確認することができる。

【0130】

1つの実施形態において、C5aRを天然で発現する細胞、またはC5aRまたはその変異体をコードする組換え核酸配列を、本発明の結合アッセイで用いる。細胞は、受容体の発現に適した条件下で維持される。細胞は（例えば、適当な結合緩衝液中で）結合に適した条件下で抗体または断片と接触させ、標準的な技術によって結合を検出する。結合を決定するために、結合の程度を、適当な対照に対して決定することができる（例えば、抗体の不存在下で決定されたバックグラウンドと比較し、第二の抗体（すなわち、標準）の結合と比較し、トランスフェクトされていない細胞に対する抗体の結合と比較することができる）。受容体を含有する膜画分のような細胞画分、または受容体を含むリポソームを全細胞の代わりに用いることができる。

【0131】

結合阻害アッセイを用いて、C5aRに結合し、およびC5aのC5aRまたは機能的変異体への結合を阻害する抗体またはその断片を同定することもできる。例えば、結合アッセイを行うことができ、抗体の不存在下におけるC5aの結合と比較した、（抗体の存在下における）C5aの結合の低下を検出し、または測定する。単離されたおよび/または組換え哺乳動物C5aRまたはその機能的変異体を含む組成物をC5aおよび抗体に同時に、またはいずれかの順序で一方を先に一方を後に接触させることができる。抗体の存在下におけるリガンドの結合の程度の低下は、抗体による結合の阻害を示す。例えば、リガンドの結合は減少し、または無くなり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 2 】

他の適当な結合アッセイ、またはシグナリング機能および/または細胞応答の刺激（例えば、白血球トラフィック）を含めた、受容体結合によってトリガーされる事象をモニターする方法のような、C5aRに結合する抗体の存在を同定する他の方法が利用可能である。このようにして同定された抗体をさらに評価して、結合に引き続いて、それらがC5aRの他の機能を阻害し、および/またはそれらの治療的利用性を評価するように働くか否かを決定することができる。

## 【 0 1 3 3 】

## シグナリングアッセイ

C5aRへの、アゴニストのようなリガンドまたは促進剤の結合の結果、このGタンパク質結合受容体によるシグナリングをもたらすことができ、Gタンパク質ならびに他の細胞内シグナリング分子の活性が刺激される。化合物（例えば、抗体またはその断片）によるシグナリング機能の誘導は、いずれかの適当な方法を用いてモニターすることができる。そのようなアッセイを用いて、C5aRの抗体アゴニストを同定することができる。抗体またはその機能的断片の阻害活性は、アッセイにおいてリガンドまたは促進剤を用い、かつリガンドまたは促進剤によって誘導される活性を阻害する抗体の能力を評価して決定することができる。

10

## 【 0 1 3 4 】

GTPのGDPへの加水分解のようなGタンパク質活性、または細胞内（サイトゾル）遊離カルシウムの濃度の迅速かつ一過的な増加の誘導のような受容体結合によってトリガーされる後のシグナリング事象は、当分野で公知の方法、または他の適当な方法によってアッセイすることができる（例えば、Neote, K. et al., Cell, 72: 415-425, 1993; Van Riper et al., J. Exp. Med., 177:851-856, 1993; Dahinden, C. A. et al., J. Exp. Med., 179: 751-756, 1994参照）。

20

## 【 0 1 3 5 】

例えば、ハイブリッドGタンパク質結合受容体を用いるSledziewski et al.の機能的アッセイを用いて、受容体に結合し、かつGタンパク質を活性化するリガンドまたはプロモーターの能力をモニターすることができる(Sledziewski et al., 米国特許第5, 284, 746号)。

## 【 0 1 3 6 】

そのようなアッセイは抗体またはその断片の存在下で行って、評価することができ、リガンドまたは促進剤によって誘導される活性を阻害する抗体または断片の能力は、公知の方法および/または本明細書中に記載された方法を用いて決定される。

30

## 【 0 1 3 7 】

## 化学走性および細胞刺激のアッセイ

化学走性アッセイを用いて、リガンドのC5aRへの結合をブロックし、および/またはリガンドの受容体への結合に関連する機能を阻害する抗体またはその機能的断片の能力を評価することもできる。これらのアッセイは、化合物によって誘導されたインビトロまたはイン・ビボでの細胞の機能的移動に基づく。化学走性は、例えば、96-ウエル化学走性プレートを利用し、あるいは化学走性を評価するための他の分野で認められた方法を用い、アッセイにおいていずれかの適当な手段によって評価することができる。例えば、インビトロトランス内皮化学走性アッセイの使用は、Springer et al. (1994年9月15日に公開されたSpringer et al.のWO 94/20142; また、Berman et al., Immunol. Invest. 17:625-677 (1988)参照)によって記載されている。内皮を横切ったのコラーゲンゲルへの移動もまた記載されている(Kavanaugh et al., J. Immunol., 146:4149-4156 (1991))。マウスL1-2プレ-B細胞の、または化学走性が可能な他の適当な宿主細胞の安定なトランスフェクタントを、化学走性アッセイで用いることができる。

40

## 【 0 1 3 8 】

一般に、化学走性アッセイは、バリアー（例えば、内皮、フィルター）への、またはそれを通っての、化合物の増大したレベルに向けての、反対の第二の表面に向けてのバリア

50

一の第一の表面からの、(白血球(例えば、リンパ球、好酸球、好塩基球)のような)適当な細胞の方向性運動または移動をモニターする。膜またはフィルターは、フィルターへの、またはそれを通っての、化合物の増大したレベルに向けての、フィルターの反対の第二の表面へのフィルターの第一の表面からの、適当な細胞の方向性運動また移動がモニターされるような、便宜なバリアーを提供する。いくつかのアッセイにおいて、膜を、ICAM-1、フィブロネクチンまたはコラーゲンのような、接着を容易とする物質でコートする。そのようなアッセイは、白血球の「ホーミング」のインビトロ近似を供する。

【0139】

例えば、第一のチャンバーから、微多孔性膜への、またはそれを通っての、テストすべき抗体を含有し、かつ膜によって第一のチャンバーから分割された第二のチャンバーへの、適当な容器(含有手段)中の細胞の移動の阻害を検出し、または測定することができる。例えば、ニトロセルロース、ポリカルボネートを含めた、化合物に応答しての特異的移動をモニターするための適当なポアサイズを有する適当な膜が選択される。例えば、約3~8ミクロン、好ましくは約5~8ミクロンのポアサイズを用いることができる。ポアサイズはフィルター上で均一であるか、または適当なポアサイズの一定範囲内であり得る。

【0140】

移動および移動の阻害を評価するためには、フィルターへの移動の距離、フィルターの第二の表面に接着したままであるフィルターを横切る細胞の数、および/または第二のチャンバーに蓄積する細胞の数は、標準的な技術(例えば、顕微鏡)を用いて決定することができる。1つの実施形態において、細胞を検出可能な標識(例えば、放射性同位体、蛍光標識、抗原またはエピトープ標識)で標識し、(例えば、放射能、蛍光、イムノアッセイを検出することによって)適当な方法を用いて、膜に接着した、および/または第二のチャンバーに存在する標識の存在を決定することによって、抗体または断片の存在下および不存在下で移動を評価することができる。抗体アゴニストによって誘導された移動の程度は、(例えば、抗体の不存在下で決定されたバックグラウンド移動と比較し、第二の化合物(すなわち、標準)によって誘導された移動の程度と比較し、抗体によって誘導されたトランスフェクトされていない細胞の移動と比較して)適当な対照に対して決定することができる。1つの実施形態において、特に、T細胞、単球、またはC5aRを発現する細胞について、経内皮移動をモニターすることができる。この実施形態において、内皮細胞層を通じての貫通移動が評価される。細胞層を調製するために、内皮細胞を、場合により、コラーゲン、フィブロネクチン、または他の細胞内マトリックスタンパク質のような物質でコートされた微多孔性フィルターまたは膜上で培養して、内皮細胞の付着を容易とすることができる。好ましくは、密集単層が形成されるまで内皮細胞を培養する。例えば、ヒト臍静脈内皮細胞のような静脈、動脈または微小血管内皮を含めた、種々の哺乳動物内皮細胞を単層形成のために入手することができる(Clonetix Corp, San Diego, Calif.)。特定の哺乳動物受容体に応答しての化学走性をアッセイするために、同一哺乳動物の内皮細胞が好ましい;しかしながら、異種哺乳動物種または属からの内皮細胞を用いることもできる。

【0141】

一般に、アッセイは、フィルターの第一の表面から、フィルターの反対の第二の表面への、化合物の増大するレベルに向けての方向の、膜またはフィルターへのまたはそれを通っての細胞の方向性移動を検出することによって行われ、フィルターは第一の表面に内皮細胞層を含有する。方向性移動は、第一の表面に隣接する領域から、膜へ、または膜を通して、フィルターの反対側に位置した化合物に向けて起こる。第二の表面に隣接する領域に存在する化合物の濃度は、第一の表面に隣接する領域におけるそれよりも大きい。

【0142】

抗体阻害剤についてテストするのに用いる1つの実施形態において、移動が可能であり、かつC5aRを発現する細胞を含む組成物を第一のチャンバーに入れることができる。(化学誘引剤機能を有する)第一のチャンバー中の細胞の化学走性を誘導することができる1以上のリガンドまたは促進剤を含む組成物は第二のチャンバーに入れられる。好まし

10

20

30

40

50

くは、細胞を第一のチャンバーに入れて間もなく、または細胞と同時に、テストすべき抗体を含む組成物が、好ましくは、第一のチャンバーに入れられる。このアッセイにおいて、C5aRを発現する細胞の、リガンドまたは促進剤による、受容体に結合し、かつ化学走性の誘導を阻害することができる抗体またはその機能的断片は、受容体機能の阻害剤（例えば、刺激因子の阻害剤）である。抗体または断片の存在下でリガンドまたは促進剤によって誘導される移動の程度の低下は、阻害活性を示す。別々の結合実験を行って、阻害が抗体の受容体への結合の結果であるか、あるいは異なるメカニズムを介して起こるかを決定することができる。

#### 【0143】

組織中での化合物（例えば、ケモカインまたは抗体）の注射にตอบสนองしての、組織の白血球浸潤をモニターするインビボアッセイは、以下に記載する（炎症のモデル参照）。イン・ビボホーミングのこれらのモデルは、炎症の部位への移動および化学走性によりリガンドまたは促進剤にตอบสนองし、およびこの移動をブロックする抗体またはその断片の能力を評価する細胞の能力を測定する。

10

#### 【0144】

記載された方法に加えて、C5aRの刺激機能に対する抗体または断片の効果は、受容体を含有する適当な宿主細胞を用い、活性化受容体によって誘導される細胞応答をモニターすることによって評価することができる。

#### 【0145】

C5aRのさらなるリガンド、阻害剤および/または促進剤の同定

20

本発明の抗体および断片の結合および機能の評価するのに用いることができる前記したアッセイを適合させて、C5aRまたはその機能的変異体に結合するさらなるリガンドまたは他の物質、ならびにC5aR機能の阻害剤および/または促進剤を同定することができる。例えば、本発明の抗体またはその機能的部分のそれと同一または同様な結合特性を有する薬剤は、該抗体またはその部分との競合アッセイによって同定することができる。かくして、本発明は、C5aRに結合する受容体または他の物質のリガンド、ならびに受容体機能の阻害剤（例えば、アゴニスト）またはプロモーター（例えば、アゴニスト）を同定する方法も含む。1つの実施形態において、C5aRタンパク質またはその機能的変異体を担う細胞（例えば、哺乳動物C5aRタンパク質、または当該細胞に導入された核酸によってコードされた機能的変異体を発現するように作製された白血球、細胞系または適当な宿主細胞）をアッセイで用いて、受容体機能の阻害剤または促進剤を含めた、受容体に結合するリガンドまたは他の物質の効率を同定し、評価する。そのような細胞は、発現された受容体タンパク質またはポリペプチドの機能の評価する際において有用でもある。

30

#### 【0146】

本発明によると、受容体に結合するリガンドおよび他の物質、受容体機能の阻害剤および促進剤を、適当なアッセイで同定し、さらに、治療効果について評価することができる。受容体機能のアンタゴニストを用いて、受容体活性を阻害する（低下させ、または妨げる）ことができ、およびリガンドおよび/またはアゴニストを用いて、示される場合、正常な受容体機能を誘導する（トリガーし、または増強する）ことができる。かくして、本発明は、受容体機能のアンタゴニストを個体（例えば、哺乳動物）に投与することを含む、自己免疫疾患および移植片拒絶を含めた、免疫疾患を治療する方法を提供する。本発明は、さらに、受容体機能の新規なリガンドまたはアゴニストを個体に投与することによって受容体機能を刺激する方法を提供し、これは、例えば、感染症および癌の治療において有用な白血球機能の選択的刺激に対する新しいアプローチを提供する。

40

#### 【0147】

本明細書中で用いるように、C5aRタンパク質の「リガンド」とは、天然リガンドおよび天然リガンドの合成および/または組換え形態を含めた、哺乳動物C5aRタンパク質に結合する物質の特定のクラスをいう。好ましい実施形態において、C5aRタンパク質のリガンド結合が高い親和性にて起こる。

50

## 【0148】

本明細書中で用いるように、「アンタゴニスト」は、結合活性（例えば、リガンド結合、促進剤結合、抗体結合）、シグナリング活性（例えば、哺乳動物Gタンパク質の活性化、サイトゾル遊離カルシウムの濃度の迅速かつ一過的な増加の誘導）および/または細胞応答機能（例えば、化学走性の刺激、エクソサイトーシス、または白血球の炎症メディエーター放出）のような、C5aRタンパク質の特徴的な少なくとも1つの機能特徴を阻害する（減少させ、または妨げる）物質である。用語アンタゴニストは、受容体に結合する物質（例えば、抗体、天然リガンドの突然変異体、小分子量有機分子、リガンド結合の他の競合阻害剤）、およびそれに対する結合なくして受容体機能を阻害する物質（例えば、抗イディオタイプ抗体）を含む。

10

## 【0149】

本明細書中で用いるように、「アゴニスト」は、結合活性（例えば、リガンド、阻害剤および/またはプロモーター結合）、シグナリング活性（例えば、哺乳動物Gタンパク質の活性化、サイトゾル遊離カルシウムの濃度の迅速かつ一過性の増加の誘導）、および/または細胞応答機能（例えば、化学走性、エクソサイトーシス、または白血球による炎症メディエーター放出）のようなC5aRタンパク質に特徴的な少なくとも1つの機能を促進する（誘導する、引き起こす、増強させる、または増加させる）物質である。用語アゴニストは、受容体（例えば、抗体、もう1つの種からの天然リガンドのホモログ）に結合する物質、および（例えば、関連するタンパク質を活性化することによる）それに対する結合なくして受容体機能を促進する物質を含む。好ましい実施形態において、アゴニストは天然リガンドのホモログ以外である。

20

## 【0150】

かくして、本発明は、リガンド、アンタゴニスト、アゴニスト、およびC5aRまたは機能的変異体に結合する他の物質を含めた、C5aRまたはそのリガンド結合変異体に結合する薬剤を検出し、または同定する方法に関する。該方法に従い、テストすべき薬剤、本発明の抗体または抗原結合断片（例えば、7F3のそれと同一または同様なエピトープ特異性を有する抗体、およびその抗原結合断片）、およびC5aRまたはそのリガンド結合変異体を含む組成物を組合せることができる。これまでの成分は、抗体または抗原特異的断片のC5aRへの結合に適した条件下で組み合わせ、該抗体または断片のC5aRへの結合は、本明細書中に記載された方法、または他の適当な方法に従って、直接的または間接的に検出され、または測定される。（例えばテストすべき薬剤の不存在下における）適当な対照に対する形成された複合体の量の減少は、該薬剤が外受容体または変異体に結合することを示す。C5aRを含む組成物は、組換えC5aRタンパク質またはそのリガンド結合変異体を有する細胞の膜画分であり得る。該抗体またはその断片は、放射性同位体、スピン標識、抗原またはエピトープ標識、酵素標識、蛍光基およびケミルミネセント基のような標識で標識することができる。

30

## 【0151】

抗C5aR mAbの置換がC5a受容体アンタゴニストをより容易に同定することができる理由がある。C5aのC5aRへの結合は、C5aRの異なる領域に関する2行程プロセスであり（Kloc et al., 2005参照）、他方、抗C5aRモノクローナル抗体、すなわち、7F3または3C5は、第二の細胞外ループにおける阻害のための単一の臨界的領域を認識する。

40

## 【0152】

炎症のモデル

治療剤としてのイン・ピボでの本発明の抗体および断片の効果を評価するのに用いることができる炎症のイン・ピボモデルが入手可能である。例えば、白血球浸潤は、ケモカイン、およびC5aRと反応性である抗体またはその断片の、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、またはアカゲザルのような適当な動物への皮内注射に際して、モニターすることができる（例えば、Van Damme, J. et al., J. Exp. Med., 176:59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., J. Exp. Med. 171:2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., J.

50

Exp. Med. 179:881-887 (1994)参照)。1つの実施形態において、皮膚バイオプシーは、白血球（例えば、好酸球、顆粒球）の浸潤について組織学的に評価される。もう1つの実施形態において、化学走性および管外遊出が可能である標識された細胞（例えば、C5aRを発現する安定にトランスフェクトされた細胞）を動物に投与する。評価すべき抗体または断片を、標識された細胞がテスト動物に投与される前に、それと同時に、またはその後投与することができる。阻害剤の不存在下における浸潤の程度と比較した、抗体の存在下における浸潤の程度の減少は阻害を示す。

#### 【0153】

使用

本発明の抗体は、研究、診断および治療的適用を含めた、種々の適用で有用である。

10

#### 【0154】

C5aRは、白血球トラフィックにおいて重要な役割を有する。かくして、C5aRはある炎症部位への好中球、好酸球、T細胞またはT細胞サブセットまたは単球の移動のための化学誘引剤受容体であり、従って、抗C5aR抗体を用いて、白血球移動、特に、再灌流負傷および発作のような好中球組織負傷、自己免疫疾患のようなT細胞機能不全、またはアレルギー反応に、あるいはアテローム性動脈硬化症のような単球媒介障害に関連するものを阻害することができる（低下させ、または妨げることができる）。

#### 【0155】

本明細書中に記載された抗体は阻害剤として作用して、(a)受容体への（例えば、リガンド、阻害剤またはプロモーターの）結合、(b)受容体シグナリング機能、および/または(c)阻害性機能を阻害することができる（低下させ、または妨げることができる）。受容体機能の阻害剤として作用する抗体は、（例えば、立体配座変化を引き起こすことによって）直接的にまたは間接的にリガンドまたは促進剤の結合をブロックすることができる。例えば、抗体は、リガンドの結合を妨げることによって、または（リガンドの結合の阻害と共に、またはそれなくして）脱感受性化することによって受容体の機能を阻害することができる。

20

#### 【0156】

かくして、本発明は、有効量の本発明の抗体を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物（例えば、ヒト患者）における白血球トラフィックを阻害する方法を提供する。本発明は、好塩基球からのヒスタミン放出および好酸球、好塩基球および好中球からの顆粒放出のようなC5aR活性に関連する他の効果を阻害する方法も提供する。本発明の抗体の投与の結果、病気状態の緩和または排除をもたらすことができる。

30

#### 【0157】

モノクローナル抗体を、免疫病理学的関連疾患のために免疫治療的に用いることもできる。本発明の抗体と組合せて本明細書中で用いる用語「免疫治療的に」または「免疫治療」は、予防的ならびに治療的双方の投与を示す。かくして、抗体を高い危険性の患者に投与して、免疫病理学的疾患の確立および/または重症度を低下することができ、あるいは活性な病気、例えば、グラム陰性細菌感染による敗血症を既に証明している患者に投与することができる。

#### 【0158】

抗体を用いて、アレルギー、アテローム発生、アナフィラキシー、悪性疾患、慢性および急性炎症、ヒスタミンおよびIgE媒介アレルギー反応、ショック、および慢性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、同種移植片拒絶、線維性疾患、喘息、炎症性系球体症またはいずれかの免疫複合関連障害を治療することができる。

40

#### 【0159】

本発明の抗体で治療することができるヒトまたは他の種の病気または疾患は、限定されるものではないが、

(a)喘息、アレルギー性鼻炎、過敏肺病、過敏肺炎、間質性肺疾患（ILD）（例えば、特発性肺線維症、または慢性関節リウマチに関連するILD、全身エリテマトーデス、強直性脊椎炎、全身硬化症、シェーグレン症候群、多発性筋炎または皮膚筋炎）；アナ

50

フィラキシーまたは過敏応答、(例えば、ペニシリン、セファロスポリンに対する)薬物アレルギー、昆虫毒牙アレルギー;クローン病および潰瘍性結腸炎のような炎症性腸障害;脊椎関節症;強皮症;乾癬、および皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹のような炎症性皮膚病;血管炎(例えば、壊死性、皮膚、および過敏血管炎)のような呼吸器系アレルギー障害を含めた、炎症性またはアレルギー病および疾患;

(b) 関節炎(例えば、慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎)、多発性硬化症、全身エリテマトーデス、重症筋無力症、若年性開始糖尿病、糸球体腎炎のような腎炎、自己免疫甲状腺炎、ベーチェット病のような自己免疫疾患;

(c) 同種移植片拒絶、または移植片対宿主病を含めた(例えば、移植における)移植片拒絶;

(d) アテローム性動脈硬化症;

(e) 皮膚または器官の白血球浸潤を伴う癌;

(f) 限定されるものではないが、再灌流負傷、発作、成人呼吸窮迫症候群、ある種の皮膚化学的悪性疾患、サイトカイン-誘導毒性(例えば、敗血症ショック、エンドトキシンショック)、多発性筋炎、皮膚筋炎、類天疱瘡、アルツハイマー病、およびサルコイドーシスを含めた肉芽腫性疾患、白血病性滑膜炎および年齢-関連黄班変性を含めた、阻害すべき望ましくない炎症応答を治療することができる他の病気または疾患(C5aR媒介病または疾患を含む)を含む。

#### 【0160】

本発明の抗C5aR抗体は、1以上のリガンドの結合をブロックすることができ、それにより、前記障害に導く1以上の事象の下流カスケードをブロックする。

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、敗血症、発作または成人呼吸窮迫症候群の治療で用いられる。

もう1つの実施形態において、本発明の種々の抗体を用いて、C5aRを検出し、例えば、白血球(例えば、好中球、単球、B細胞)、内皮細胞上での、および/またはレポーター遺伝子でトランスフェクトされた細胞上の受容体の発現を測定することができる。かくして、それらは、診断または研究目的で、細胞ソーティング(例えば、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞ソーティング)のような適用において有用性をやはり有する。

#### 【0161】

本発明の抗C5aR抗体は、診断適用において価値を有する。典型的には、診断アッセイは、抗体またはその断片のC5aRへの結合からの複合体の形成を検出することを含む。診断目的で、抗体または抗原結合断片を標識することができ、または標識しないことができる。抗体または断片は直接的に標識することができる。限定されるものではないが、放射性核種、発蛍光体、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤およびリガンド(例えば、ビオチン、ハプテン)を含めた種々の標識を使用することができる。多数の適当な免疫アッセイが当業者に公知である(例えば、米国特許第3,817,827号;第3,850,752号;第3,901,654号;および第4,098,876号参照)。組織試料の免疫組織化学を本発明の診断方法で用いることもできる。標識しない場合、抗体または断片は、例えば、凝集アッセイにおけるように適当な手段を用いて検出することができる。標識されていない抗体または断片を、第一の抗体(例えば、抗イディオタイプ抗体、または標識されていない免疫グロブリンに対して特異的な他の抗体)または他の適当な試薬(例えば、標識されたプロテインA)と反応性である標識された抗体(例えば、第二の抗体)のような抗体を検出することができる別の(すなわち、1以上の)適当な試薬と組合せて用いることもできる。

#### 【0162】

生物学的試料中でのC5aRタンパク質の存在を検出するのに用いるキットを調製することもできる。そのようなキットは、C5aRに結合する抗体またはその機能的断片、ならびに抗体または断片とC5aRとの間の複合体の存在を検出するのに適当な1以上の付属試薬を含む。本発明の抗体組成物は、単独で、あるいは他のエピトープに特異的なさら

10

20

30

40

50

なる抗体と組合せた、凍結乾燥形態で供することができる。標識できる、または標識しないでおくことができる抗体は、補助的成分（例えば、トリス、リン酸および炭酸のような緩衝液、安定化剤、賦形剤、殺生物剤および/または不活性なタンパク質、例えば、ウシ血清アルブミン）と共にキットに含むことができる。例えば、抗体は、補助的成分との凍結乾燥混合物として供することができるか、あるいは補助的成分はユーザーによる組合せのために別々に供することができる。一般的に、これらの補助的物質は活性な抗体の量に基づいて約5%重量未満で存在させ、通常、抗体濃度に基づいて少なくとも約0.001重量%の合計量で存在させる。モノクローナル抗体に結合させることができる第二の抗体を使用する場合、そのような抗体は、例えば、別々のバイアルまたは容器中でキットにて供することができる。第二の抗体は、もし存在すれば、典型的には標識され、前記した抗体処方にて同様な方法で処方することができる。

10

#### 【0163】

同様に、本発明は、細胞によるC5aRの発現を検出し、および/または定量する方法にも関し、細胞またはその画分（例えば、膜画分）を含む組成物を、該抗体または断片のそれに対する結合に適した条件下で本発明の抗体と接触させ、結合をモニターする。抗体およびC5aRの間の複合体の形成を示す抗体の検出は、受容体の存在を示す。抗体の細胞への結合は、WO 03/062278に記載されたもののような技術を用いて決定することができる。該方法を用いて、（例えば、血液、唾液または他の適当な試料のような体液のような試料中での）個体からの細胞上でのC5aRの発現を検出することができる。T細胞または単球の表面でのC5aRの発現のレベルは、例えば、フローサイトメトリーによって決定することもでき、発現のレベル（例えば、染色強度）を病気罹患性、進行または危険性に相関させることができる。

20

#### 【0164】

##### 投与の様式

治療すべき病気または疾患に依存して、必ずしも限定されるものではないが、経口、食事により、局所、非経口（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下注射で）、吸入（例えば、気管支内、眼内、鼻内または経口吸入、点鼻剤）を含めた種々の投与の経路が可能である。他の投与の適当な方法は、再充填可能または生分解性デバイスおよび遅延放出ポリマーデバイスを含むこともできる。本発明の医薬組成物は、他の薬剤とのコンビナトリアル療法の一部として投与することもできる。

30

#### 【0165】

投与すべき抗体の処方は、投与の経路および選択された処方（例えば、溶液、エマルジョン、カプセル）に従って変化する。投与すべき抗体を含む適当な医薬組成物は、生理学的に許容される賦形剤または担体中で調製することができる。抗体の混合物を用いることもできる。溶液またはエマルジョンでは、適当な担体は、例えば、生理食塩水および緩衝化媒体を含めた、水性またはアルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含む。非経口賦形剤は塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンゲルまたは揮発性油を含むことができる。水、緩衝化水、緩衝化生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、デキストロース溶液およびグリシンを含めた、種々の適当な水性担体は当業者に公知である。静脈内賦形剤は種々の添加剤、保存剤、または流体、栄養または電解質補充物を含むことができる（一般に、Remington's Pharmaceutical Science, 16<sup>th</sup> Edition, Mack, Ed. 1980参照）。組成物は、場合により、pH調整のような生理学的条件を近似するのに必要な医薬上許容される補助的物質、ならびに緩衝剤および毒性調製剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および乳酸ナトリウムを含有することもできる。本発明の抗体および断片は、当分野で公知の凍結乾燥および復元技術に従い、貯蔵のために凍結乾燥し、使用に先立って適当な担体中に復元することができる。選択された培地中の有効成分の最適濃度は、当業者に周知の手法に従い経験的に決定することができ、これは、所望の最終医薬処方に依存する。吸入のために、抗体または断片を可溶化し、投与のために適当な分注器（例えば、アトマイザ

40

50

一、ネビュライザーまたは圧縮エアロゾル分注器)に負荷することができる。

【0166】

本発明の抗体の投与のための用量範囲は、免疫病理学的病気の兆候が緩和され、あるいは感染の、または免疫系の刺激についての確率が減少する所望の効果を生じさせるのに十分大きい。用量は過粘稠度症候群、肺浮腫、うっ血性心不全などのような有害な副作用を引き起こすのに十分大きくないはずである。一般に、用量は患者における年齢、状態、性別および病気の程度で変化し、当業者によって決定することができる。用量はいずれの合併症の事象においても個々の医師によって調整することができる。用量は1または数日間の、毎日の1以上の用量投与において、約0.1mg/kg～約300mg/kg、好ましくは約0.2mg/kg～約200mg/kg、最も好ましくは約0.5mg/kg～約20mg/kgで変化し得る。

10

【0167】

本発明の1以上の抗体は、適当な経路によって、単独で、あるいは別の薬物または薬剤と組合せて(前、同時に、または後に)、個体に投与することができる。例えば、本発明の抗体は、他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体と組合せて(例えば、限定されるものではないが、CCR2およびCCR3を含めたケモカイン受容体に結合する抗体と組合せて)、あるいは抗TNFまたは他の抗炎症剤と共に、または予防的または治療的処理で用いる商業的に入手可能なガンマグロブリンおよび免疫グロブリン製品のような現存の血漿産物と共に用いることもできる。本発明の抗体は、抗生物質および/または抗微生物剤と組合せて与えられる別々に投与される組成物として用いることができる。

20

【0168】

本発明の抗体は、抗体をコードする配列を含む核酸分子を投与することによって対象に導入してもよいのは当業者によって認識される。核酸分子は、DNAまたはRNA、あるいはDNAまたはRNA双方を含むキメラ分子の形態としてもよい。抗体をコードするヌクレオチド配列は、薬剤をコードする配列が発現制御エレメントに操作可能に連結された発現ベクターにクローン化することができる。発現調節エレメントは当分野で周知であり、例えば、プロモーター、エンハンサーおよび適当な開始および停止コドンを含む。

【0169】

種々の方法を、抗体をコードする核酸をイン・ピボにて標的細胞に導入するのに用いることができる。例えば、裸の核酸を標的部位において注射してもよく、リポソームにカプセル化してもよく、あるいはウイルスベクターによって導入してもよい。

30

【0170】

単独の、あるいは例えば、カチオン性リポソームにカプセル化された核酸分子の直接的注射を、イン・ピボでの、非分裂または分裂細胞への、TSP-1をコードする核酸の安定な遺伝子導入で用いてもよい(Ulmer et al., 1993)。加えて、粒子衝突方法を用い、イン・ピボにて、核酸を種々の組織に導入することができる(Williams et al., 1991)。

【0171】

ウイルスベクターは、イン・ピボでの特異的細胞型への、抗体をコードする核酸分子の遺伝子導入で有用である。ウイルスは、感染し、特定の細胞型において増殖することができる特殊化された感染剤である。特別な細胞型に感染するためのこの特異性は、イン・ピボで選択された細胞へ抗体を標的化するのに特に適している。ウイルスベクターの選択は、部分的には、標的化すべき細胞型に依存する。

40

【0172】

特定の細胞型に標的化することができる特殊化されたウイルスベクターは当分野で周知である。そのようなベクターは、例えば、一般的なまたは組織特異的プロモーターを有する組換えアデノ-関連ウイルスベクターを含む(米国特許第5,354,678号)。組換えアデノ関連ウイルスベクターは、組換えウイルスが休止非増殖細胞さえクロマチンに安定して組み込むことができる付加された利点を有する(Lebkowski et al., 1988)。

【0173】

ウイルスベクターは、組織特異的プロモーターまたはエンハンサーをベクターに取り込

50

むことによって、コードされた抗体を発現する細胞型をさらに制御するように構築することができる(Dai et al., 1992)。

【0174】

レトロウイルスベクターは、イン・ピボにて抗体をコードする核酸分子を送達する方法にも適している。そのようなベクターは、感染性粒子として、あるいは単一の感染初期ラウンドのみを受ける非感染性粒子として機能するように構築することができる。

【0175】

受容体媒介DNA送達アプローチを用いて、ブリッジング分子を介する核酸分子と非共有結合的に複合体化された組織特異的リガンドまたは抗体を用い、抗体をコードする核酸分子を組織特異的に細胞に送達することもできる(Curiel et al., 1992; Wu and Wu, 1987)。

10

【0176】

例えば、オートロガス細胞のエクソ・ピボトランスフェクションによって、対象において抗体の発現を得るための遺伝子導入を行うこともできる。そのようなエクソ・ピボトランスフェクションに適した細胞は血液細胞を含む。というのは、当分野で周知の方法によって、これらの細胞は操作、および対象へ戻す再導入のために容易に接近可能だからである。

【0177】

エクソ・ピボでの細胞のトランスフェクションを通じての遺伝子導入は、例えば、リン酸カルシウム沈澱、ジエチルアミノエチルデキストラン、エレクトロポレーション、リポフェクションまたはウイルス感染を含めた、種々の方法によって行うことができる。そのような方法は当分野で周知である(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)参照)。一旦、細胞がトランスフェクトされたならば、ついで、それらを、治療すべき対象に移植し、または移植して戻す。一旦身体に導入された細胞は、抗体を生産することができ、これは、循環に入ることができ、病気または疾患の部位において血小板凝集を阻害することができる。

20

【0178】

本明細書を通じて、用語「含む」、または「を含む」、または「含む」のような変形は、述べられたエレメント、整数または工程、あるいは複数のエレメント、複数の整数または複数の工程の群の包含を意味するが、いずれかの他のエレメント、整数または工程、あるいは複数のエレメント、複数の整数または複数の工程の群の排除を意味しないと理解される。

30

【0179】

本明細書に含まれている書類、行動、材料、デバイス、製品などのいずれの議論も、本発明についての関連を供する目的のためだけのものである。これらの事項のいずれかまたは全ては先行技術の基礎の一部を形成し、あるいは本出願の各請求項の優先日前にオーストラリアにおいて存在したかのように、本発明に関連する分野において通常の一般的知識であったことを自認するものと解釈されるべきではない。

【0180】

さて、本発明を以下の実施例によって説明するが、それは断じて限定的なものと解釈されるべきでない。本明細書中で引用した全ての文献の教示はここに参照により組み込む。

40

【実施例】

【0181】

実験の詳細

ヒトC5aRノックインマウスの作製

ノックアウト/ノックイン戦略を採用して、ヒトC5aRを発現するが、マウスC5aRを発現しないトランスジェニックマウスを、マウスC5aR遺伝子プロモーターの制御下で構築した。標的化ベクターは、ベクターpLOz(Ozgene, Perth, Australia)中に、C5aR遺伝子エクソン3の上流のマウスC57BL/6ゲノムDNAの3.5kbの領域、ヒトC5aR遺伝子エクソン3コーディング配列、マウスC

50

5 a R 遺伝子 3' 非翻訳領域、1 o x P 部位によって挟まれたホスホグルコキナーゼプロモーターおよびネオマイシン耐性遺伝子、ならびに C 5 a R 遺伝子の下流のマウスゲノム DNA の 3 k b 領域を含むものであった。PCR 増幅を用い、ゲノム DNA 断片を作製した。該ベクターを C 5 7 B L / 6 胚性幹細胞にトランスフェクトし、G 4 1 8 耐性コロニーからの DNA をサザンブロットによってスクリーニングした。X b a I および E c o R V 消化 DNA を、各々、5' および 3' プローブでハイブリダイズして、5' および 3' 両末端における正しい相同組換え事象にてクローンを同定した。正しく標的化された ES クローンを注入した胚盤胞から作製されたキメラを、C 5 7 B L / 6 雌と交配させた。ヒト C 5 a R 遺伝子の生殖系伝達は、マウス尾ゲノム DNA のサザンブロットによって確認した。ヒト C 5 a R 遺伝子 ( h C 5 R 1<sup>+/+</sup> ) についてホモ接合性のマウスが作製され、PCR、サザンブロットおよび F A C S 染色は m C 5 a R の不存在を確認した。

10

#### 【 0 1 8 2 】

##### 好中球の単離

ヒト好中球を、修飾を施して従前に記載されているように ( Haslett et al., (1985) )、健康なボランティアの末梢静脈血液から単離した。簡単に述べると、E D T A - 被覆バキュテイナーに収集された血液試料を 4 0 0 x g において 1 5 分間遠心し、次いで、血漿およびパフィーコートを除去した。3 0 分間の 1 % デキストラン沈積に続き、白血球細胞を 3 0 0 x g における 5 分間の遠心によってペレット化し、P B S で洗浄した。次いで、細胞を 6 5 % パーコールのクッション ( 密度、1 . 0 9 3 g / m l、A m e r s h a m B i o s c i e n c e ) 上にて 5 0 0 x g で 3 0 分間遠心した。遠心の後、好中球を P B S に再懸濁させた。1 0 % 胎児仔ウシ血清を含む 5 m l D M E M ( G I B C O ) 培地をシリンジで骨を通すことによって、マウス好中球を双方の後脚大腿骨から単離した。好中球を、F i c o l l - P a q u e ( A m e r s h a m B i o s c i e n c e ) での密度遠心によって分離した。赤血球細胞を低張緩衝液 ( 1 5 5 m M N H<sub>4</sub>C l、1 0 m M K H C O<sub>3</sub>、1 m M E D T A ) によって溶解させた。細胞生存率を、トリパンブルー排除によって決定し、好中球ペレットを P B S に再懸濁させた。

20

#### 【 0 1 8 3 】

##### モノクローナル抗体の作製

C 5 7 B L / 6 マウスを、高レベルの h C 5 a R ( Campbell et al. (1996) ) を発現する約 2 x 1 0<sup>7</sup> L 1 . 2 トランスフェクタントで、2 週間間隔で 5 回腹腔内、次いで、一回静脈内免疫化した。最終静脈内免疫化から 4 日後に、脾臓を摘出し、標準的手法を用い、細胞を S P 2 / 0 細胞系と融合させた。C 5 7 B L / 6 マウスを、h C 5 R I<sup>+/+</sup> マウスの大腸から摘出した約 1 x 1 0<sup>7</sup> 好中球で同様に、2 回静脈内、1 回腹腔内免疫化し、最後に静脈内免疫化した。ハイブリドーマを、1 0 % F e t a l c l o n e ( H y C l o n e ) および H A T 補足物 ( S I G M A ) を含有する D M E M ( G I B C O ) 中で成長させ、細胞上清を初期スクリーニングのために採取した。選択された抗体の生産をスケールアップし、プロテイン A または G クロマトグラフィーによって m A b を精製し、濃縮し、緩衝液を交換し、エンドトキシンを除去した。M A b 濃度を、マウス I g G E L I S A キット ( R o c h e ) を用いて決定した。

30

#### 【 0 1 8 4 】

##### フローサイトメトリー

トランスフェクトされた細胞または白血球に対する m A b の反応性を評価するために、本発明者らは、間接的免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーを用いた。細胞を P B S で 1 回洗浄し、2 % ヒト血清および 0 . 1 % アジ化ナトリウム ( 染色緩衝液 )、精製された抗体、5 0 μ l ハイブリドーマ培養上澄みを含む 1 0 0 μ l P B S に再懸濁させた。4 における 2 0 分後、細胞を染色緩衝液で 2 回洗浄し、染色緩衝液に 1 : 2 0 0 で希釈した 5 0 μ l F I T C コンジュゲートアフィニティ精製 F ( a b ' )<sub>2</sub> ヤギ抗マウス I g G ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s ) に再懸濁させた。4 で 2 0 分間インキュベートした後、細胞を染色緩衝液で 2 回洗浄し、F A C S C a l i b u r ( B e c t o n - D i c k i n s o n ) で分析して表面発現

40

50

のレベルを決定した。ヨウ化プロピジウム染色を用いて死滅細胞を排除した。

【0185】

結合アッセイ

ヒト好中球を洗浄し、結合緩衝液(50 mM HEPES、pH 7.5、1 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、および0.5% BSA)に $1 \times 10^7$ /mlで再懸濁させた。(120  $\mu$ lの最終用量中の)各結合反応では、適当な量の抗hC5aR mAb、アイソタイプがマッチした対照mAbまたは標識されていないヒトC5a (SIGMA)を含む40  $\mu$ lの細胞懸濁液( $4 \times 10^5$ 細胞)を室温にて15分間インキュベートした。<sup>125</sup>I標識ヒトC5a (Perkin Elmer)を0.4 nMの最終濃度で加え、反応を室温にて60分間インキュベートした。次いで、細胞を収集し、150 mM NaClを含む結合緩衝液で3回洗浄した。次いで、細胞を、MicroScint 20シンチレーション流体を用いるOptiプレート(Perkin Elmer)に移し、放射能をTopCount (Packard)でカウントした。各試料を三連でアッセイした。

10

【0186】

BIACore分析

1. 機器試薬、

1.1 ハードウェア/ソフトウェア: BIACore 2000 / BIACore 2000 対照ソフトウェア

実行緩衝液: HBS-EP (BIACore, #BR-1001-88)

20

再生緩衝液: 100 mM HCl

センサーチップ: センサーチップSA (ストレプトアビジン); BIACore, #BR-1003-98)

ビオチニル化ヒトC5aRペプチド(第二のループ): ビオチン-SGSGLYRVVREEYFPKVL CGVDYSHDKRRERAVAIV-OH (配列番号: 26)。

【0187】

2. アッセイ手法/機器の設定、

2.1 アッセイの流速: 30  $\mu$ l / 分

2.2 3 x 1の条件SAチップ(Fc1およびFc2) - 50 mM NaOH中の1 M NaClの微量な注入

30

【0188】

2.3 試料調製

HBS-EP (BIACore, #BR-12001-88)中の抗体試料を希釈する。各抗体について以下の濃度を用いる。

i) 100 nM

ii) 50 nM

iii) 25 nM

iv) 12.5 nM

v) 6.25 nM

vi) 3.125 nM

40

【0189】

2.4 対照アッセイ、

動的実験での継続前におけるストレプトアビジン(Fc1)への非特異的結合について抗体をテストする。動的アッセイで用いるべき抗体の最高濃度(HBS-EP中100 nM)を用いる。

2.5 ビオチニル化 - ペプチド23 (C5aRペプチド)のSAセンサーチップFc2への固定化、

1  $\mu$ g / mLにおいてHBS-EP中でBiot-ペプチドを調製する。手動注入約1000 RUにてFc2に固定化する。

【0190】

50

## 2.6 抗体動的アッセイ

動的分析 Wizard を用い、プロンプトに従い、以下に概説するようにアッセイパラメーターをエンターする。

2.6.1 濃度シリーズをエンターして実行する。

すなわち、3.125、6.25、12.5、25、50、100 nM。二連で試料を実行する。

【0191】

2.6.2 「直接的結合アッセイ」を選択する。

2.6.3 「濃度シリーズ」を選択する。

【0192】

2.6.4 以下のパラメーターをダイアログボックスにエンターする。

参照としての Fc1 と共に Fc2 を用いる。

流速：30  $\mu$ l / 分

注入時間：2 分

安定化時間：10 分

解離時間：20 分

「エンターされた試料の実行」を選択する。

「次」を選択する。

【0193】

2.6.5 再生方法、

単一注入

流速：30  $\mu$ l / 分

再生緩衝液：100 mM HCl

注入時間：2 分

再生後安定化時間：2 分

【0194】

2.6.6 抗体および再生緩衝液を指定されたラック位置に入れる。

【0195】

2.6.7 Wizard を実行する。

【0196】

カルシウムフラックスアッセイ

新たに単離されたヒト好中球に、従前に記載されているように (Ponath et al. (1996))、Fluo-3 AM (Molecular Probes) を 37 °C にて 30 分間負荷した。試料を FACSCalibur フローサイトメーターにかけ、直線的蛍光強度を経時的に測定した。

【0197】

化学走性アッセイ

50% M199 (SIGMA) および 2% 胎児仔牛血清 (HyClone) を含む化学走性緩衝液 (RPMI 1640) に懸濁させたヒトまたはマウス好中球 (ウエル当たり  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞) を 12-ウエルのトランス-プレート (Corning Costar Co.) の上方チャンバーに入れ、3  $\mu$ m フィルターを横切って、ヒトまたはマウス C5a を含有する下方チャンバーに 30 分間で移動させた。移動した細胞の数を、60 秒間カウントすることによって FACSCalibur で数えた。急な前角および側方散乱ゲートを、デブリスまたは無関係な細胞を排除するように設定した。

【0198】

キメラヒト/マウス C5aR を発現する細胞系の構築

キメラヒト/マウス C5a 受容体を、修飾された PCR ベースの重複延長技術を用いて構築した (Wurch et al. (1998))。簡単に述べると、ヒトまたはマウス C5aR 遺伝子の異なる断片を PCR によって増幅した。重複する断片を組み合わせ、変性させ、再度アニールし、第二ラウンドの PCR によって増幅した。適当な制限酵素部位を持つ全長キメラ

10

20

30

40

50

受容体配列を第三のPCR工程で増幅し、発現のためにp c D N A 3 . 1 ( + ) ( I n v i t r o g e n ) にクローン化した。PCRプライマーは、ヒトC5aRおよびマウスC5aR遺伝子配列(各々、GeneBankアクセション番号M62505およびS46665)に従って設計した。プライマーは隣接ヒトおよびマウスC5aR配列を含むものであった(表1)。

【0199】

表1

キメラマウス/ヒトC5a受容体を構築するのに用いたPCRプライマーの配列を示す。各々、赤色の配列はヒトC5aR遺伝子からのものであって、青色配列はマウスC5aRに対応する。C5aR遺伝子5'末端順方向プライマーはKozak配列(下線を施す)を、ATGおよびHindIII部位(太線)の上流に組み込む。3'逆プライマーはXbaI部位(太線)を組み込んで、発現ベクターへのクローニングを容易とする。

【表2】

プライマー	プライマー配列(5'>3')
HuC5aREX1.f	CGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGACCCCATAGATAACAGCAG (配列番号: 10)
HuC5aRIC1.f	GGCAACCTGGGGATGTTGCAGCCTTGGTCATCTTTGCAGTC (配列番号: 11)
HuC5aRIC1.r	CCAGTAGTTATGATTTAAAACGGTCGTGAACAAGATGGGCAGCG (配列番号: 12)
HuC5aRIC2.f	ATGCCACCGCCTGTATAGTCCTGCCCTCCCTCATECTGCTC (配列番号: 13)
HuC5aRIC2.r	CCTTATATGCCCTCCCGGTACACGAAGGAGGGTATGGTCAGCAG (配列番号: 14)
HuC5aRIC3.f	AGAAGGCTGTGCCATCCTGCGGCTGGTCTGGGCTTCC (配列番号: 15)
HuC5aRIC3.r	GGCAGCCACGCTATCATCACCCCGTCACCTGGTAGGGC (配列番号: 16)
HuC5aRIC4.f	AAGAGGGTGGAGAAGCTGAACTCCCTGTGTGTCTCCTTTGCC (配列番号: 17)
HuC5aRIC4.r	CCTCTAGAGTTAGGCCGGGGCCAC (配列番号: 18)
Mu5aREX1.r	GACTGCAAAGATGACCAAGGCTGCAACATCCCCAGGTTCGCC (配列番号: 19)
Mu5aREX2.f	CGCTGCCCATCTTGTTACAGACCGTTTAAATCATAACTACTGG (配列番号: 20)
Muc5aREX2.r	AGCAGGATGAGGGAGGGCAGGACTATACAGGCGGTGGCATC (配列番号: 21)
Mu5aREX3.f	CTGCTGACCATACCCTCCTTCGTGTACCGGGAGGCATATAAG (配列番号: 22)
Mu5aREX3.r	AGGAAAGCCAGGACCAGCCGAGGATGGCCACAGCCTTC (配列番号: 23)
Mu5aREX4.f	GCCCTACCAGGTGACGGGGTGATGATAGCGTGGCTGCC (配列番号: 24)
Muc5aREX4.r	GGCAAAGGAGACACACAGGGAGTTCAGCTTCTCCACCCCTTC (配列番号: 25)

【0200】

合成ペプチドでのエピトープ分析

10

20

30

40

50

N - 末端ビオチンおよびスペーサーGS GSを持つペプチドの2つの組を、プラスチックピン (Mimotopes Pty Ltd, Melbourne, Australia) 上にて固定化された形態で合成した。第一の組はヒトC5aRの第二の細胞外ループからの全ての可能な12マーを含有し、各々は1つのアミノ酸だけ食い違っている。第二の組は、各々がアラニンで置換された1つの残基を持つ、配列VRE EYFP PKVLCの12マーであった。ペプチドは最初に200 μl 60% DMSO中で還元させ、引き続いて、PBS中に希釈して、直接的にELISAについて10 μg/ml最終濃度を与えた。

#### 【0201】

##### ペプチドELISA

ストレプトアビジン - 被覆マイクロタイタープレート (NUNC) を200 μlの用量中の10 μg/mlのペプチド/ウエルで被覆し、4 にて一晩インキュベートした。プレートをELISA洗浄緩衝液 (PBS中の0.05% Tween 20) で3回洗浄した。MAbを2.5 μg/mlで加え、プレートを室温にて3時間インキュベートした。ELISA洗浄緩衝液中に1:1000希釈した、HRP結合ウサギ抗マウスIgG抗体を検出で用いた。TMB (3.3', 5.5' テトラメチルベンチジン、SIGMA) を用いてプレートを発色させ、A<sub>540nm</sub>で読んだ。

10

#### 【0202】

##### 発現ベクターのL1.2細胞へのトランスフェクション

マウスL1.2細胞を、10%胎児仔ウシ血清 (HyClone) を補足したRPMI 1640 (GIBCO) 中で成長させ、製造業者の指令に従って、リポフェクタミン2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクトした。

20

#### 【0203】

##### K/BxN慢性関節リウマチモデル

血清を、従前に記載されているように (Korganow et al. (1999))、K/BxN関節炎マウスから収集した。実験的関節炎は、0日および2日に150 μl血清を腹腔内注射することによって受容者マウスで誘導し、病気の進行を記載されているようにモニターした (Lee et al. (2002))。踝の厚みおよび臨床的スコアを毎日決定した。臨床スコアは、4つの脚についてのスコアを合計することによって各マウスについて計算した。0 - 正常、1 - 僅かな赤み、2 - 赤く、かつ僅かな腫れ、3 - 赤く、かつ広範囲にわたる腫れ。抗hC5aRまたはアイソタイプ対照mAb (PBS中1~10 mg/kg) を-1日および1日に (予防的処置) または5日に (治療的処置) 腹腔内注射した。

30

#### 【0204】

##### 統計学的分析

KxB/Nモデルにおける独立した対照および処置群の間の差の統計学的有意性は、Kruskal-Wallis検定、続いての、ダンの多重比較検定を伴う事後分析を用いて決定した。

#### 【0205】

##### 実施例1

トランスフェクトされたL1.2細胞を用いるC5aRに対するmAbの作成 (比較例)

40

本発明者らは、最初に、化学誘引剤受容体に対する公知のアプローチを用いてhC5aRに対するmAbを生起させた (Heath et al. (1997); Qin et al. (1998); Wu et al. (1997); Qin, et al. (1996))。マウスを、非常に高レベルのhC5aR (細胞当たり約80,000受容体) を発現するL1.2細胞 (マウスB細胞リンパ腫系) で免疫化した。5回の融合を行い、hC5aRトランスフェクタントと特異的に反応するが、CXCR1、CXCR2、または他のC5a結合受容体、C5L2 (Gerard et al. (2005)) のような他の密接に関連する化学誘引剤受容体を発現するトランスフェクタントとは特異的に反応しない40を超える異なるmAbを同定した。多数のこれらのmAbは、hC5aRトランスフェクタントへの<sup>125</sup>I - 標識ヒトC5a結合を阻害した。同定されたリードmAbである7F3は、C5a結合の優れた阻害を示し (図1)、化学走性アッセイにおいてヒト好

50

中球の C 5 a への化学走性を阻害し、ヒト好中球において C 5 a - 誘導カルシウムフラックスをブロックした(データは示さず)。

【 0 2 0 6 】

実施例 2

h C 5 a R ノックインマウスからの好中球を用いる C 5 a R に対する m A b の作成

優れた抗 C 5 a R m A b を開発するための第二のアプローチにおいて、ヒト C 5 a R ノックインマウスは、マウス C 5 a R 遺伝子 ( C 5 R 1 ) における標的化 - 相同組換えによって作製した。内因性 C 5 a R コーディング配列の同時欠失、および h C 5 a R コーディング配列でのその置換は、マウス胚性幹細胞 ( E S ) 細胞を標的化構築体でトランスフェクトすることによって達成した ( 図 2 )。スクリーニングされた 6 7 2 のうち 2 つの E S クローンを、正しく標的化された h C 5 a R 配列を含有するものとして同定した。h C 5 a R 導入遺伝子の生殖系伝達が達成され、5 匹のキメラマウスがこれらの E S 細胞から生産され、かくして、h C 5 a R ノックイン系を確立した。1 o x P 部位によって近接挟まれた P G K - n e o 遺伝子を、B L / 6 C r e デリター株を用いてノックイン遺伝子座から欠失した。ヒト C 5 a R 導入遺伝子 ( h C 5 R 1 <sup>+/+</sup> ) に対してホモ接合性のマウスは、サザンプロットによって同定した ( 図 3 )。これらのマウスからの好中球は、抗 h C 5 a R m A b での F A C S 染色によって判断して、非常に高レベルの h C 5 a R を発現することが示された ( 図 4 )。野生型マウスからの好中球は、抗ヒト C 5 a R m A b 7 F 3 によって染色されなかったが、抗マウス C 5 a R m A b、2 0 / 7 0 によって強く染色された ( Soruri et al. (2003) ) ( 図 4 )。ヒトおよびマウス C 5 a R は 6 5 % 相同性を保有するに過ぎないが、重要なことには、h C 5 a R ノックインマウスの開発のためには、マウスおよびヒト C 5 a は同様な親和性でもってヒト C 5 a R に結合する ( Gerard et al. (1992) ) ( および本発明者らの未公表の観察 )。h C 5 R 1 <sup>+/+</sup> マウスからの好中球は、ヒトおよびマウス C 5 a 双方に対して同様に移動した。

【 0 2 0 7 】

1 つの融合より、本発明者らは、多数の h C 5 a R 特異的 m A b を作成した。h C 5 R 1 <sup>+/+</sup> マウスからの好中球での野生型マウスの免疫化によって作成された抗 C 5 a R m A b は、全て、重鎖可変領域のアミノ酸配列が全て区別される点で全て区別され、それらが別々のクローンに由来したことを示す。

【 0 2 0 8 】

リガンド結合アッセイは、これらの m A b の多くが、m A b 7 F 3 よりも、ヒト好中球に対する <sup>125</sup>I - 標識 C 5 a 結合の優れた阻害を示したことを明らかとした。h C 5 a R <sup>+/+</sup> マウスの好中球から生じた抗体は、m A b クローンに依存して、実質的に完全な阻害 ( 例えば、3 C 5 , 8 G 7 , 7 H 3 ) から部分的阻害、またはほとんど少ない阻害までの範囲の、好中球に対する <sup>125</sup>I - C 5 a 結合の阻害の広いスペクトルを示した ( 図 5 )。最も優れた阻害剤である m A b 3 C 5 は、5 0 3 p M の m A b 7 F 3 についての I C <sub>50</sub> に対する比較において、1 7 1 p M の I C <sub>50</sub> 値を有した ( 図 6 )。さらなる競合リガンド結合実験を行って、7 F 3 または 3 C 5 での、h C 5 a R - トランスフェクト L 1 . 2 細胞上の h C 5 a R からの <sup>125</sup>I - C 5 a 置換を測定した。再度、3 C 5 ( E C 5 0 : 0 . 0 2 1 n M ) は、7 F 3 よりも C 5 a R に対して実質的に高い親和性を示した ( E C 5 0 : 0 . 4 8 n M ) ( 図 7 )。

【 0 2 0 9 】

実施例 3

m A b によって結合された C 5 a R エピトープの特徴付け

h C 5 a R トランスフェクタント、および h C 5 a R を発現するマウス好中球の使用は、潜在的に、細胞外ドメイン、ならびに三次構造に頼っているエピトープのいずれかを認識する m A b の作成を可能とした。従って、本発明者らは、本発明者らが作成した m A b をブロックすることによって認識された h C 5 a R 上の臨界的エピトープを決定した。これらの抗体はヒト C 5 a R を認識するが、マウス C 5 a R を認識しないので、本発明者らは、ヒト / マウス C 5 a R キメラ受容体のパネルを構築した ( 図 8 )。ヒト C 5 a R の単

—または多数の細胞外ドメインは、順次、重複伸長PCR方法 (Shevchuk et al. (2004)) を用い、マウスC5aRからの相同領域によって置き換えた。キメラ受容体はマウスL1.2細胞において発現され、mAb反応性はFACS染色によって決定された。mAb 7F3、3G5、7H3および8G7を含めたほとんどの優れたブロッキング活性を持つ全ての抗体は、hC5aRの第二の細胞外ループに結合した(図9)。C5aRの第二の細胞外ループ上の最も優れたブロッキング抗体の正確な接触残基を規定するために、本発明者らは、hC5aRの第二の細胞外ループをカバーする、各々が11アミノ酸だけ重複する、12マーペプチドの組、およびELISAを用いてペプチド走査分析を行った。mAb 3C5および7F3は、共通のヘキサペプチド配列<sup>179</sup>EEYFPP<sup>184</sup>を含有する、No.1~No.7の7つのペプチドに対して強力な結合を示した(図10)。エピトープ<sup>179</sup>EEYFPP<sup>184</sup>を、このペプチド領域にわたるあらゆるアミノ酸のアラニン置換を用いてさらに実験した。図11Aおよび11Bは、アミノ酸E<sup>179</sup>、E<sup>180</sup>、Y<sup>181</sup>、およびF<sup>182</sup>は、mAb 7F3、3C5、8G7および7H3によるペプチド認識にとって臨界的であることを示す。かくして、hC5aRに対して本発明者らが作成した多くのmAbのうち、C5a結合または機能の最も優れた阻害剤は、全て、C5aRの第二の細胞外ループにおける非常に特異的な領域にマッピングされた。

【0210】

#### 実施例4

##### mAb結合親和性

BIACore分析を用いて、抗体7F3、3C5、8G7および7H3のペプチド23(第二の細胞外ループ、ヒトC5aRの残基175~205-LYRVVREYFPKVLGVDYSHDKRRERAVAIV)への結合親和性を決定した。結果を図12に示し、表2にまとめる。

【0211】

【表3】

表2: 抗C5aRmAbの範囲についてのBIACoreデータのまとめ

	会合(オン)速度 ka(1/Ms)	解離(オフ)速度 kd(1/s)	結合親和性 KA(1/M)	結合親和性 KD(nM)
7H3-N9	5.95E+05	9.95E-03	5.97E+07	16.7
3C5	3.30E+06	1.60E-03	2.10E+09	0.48
8G7-M6	3.70E+06	5.90E-03	6.30E+08	1.6
7F3	6.40E+05	4.50E-04	1.40E+09	0.7
2D7(mIgG2a ctrl)	4.60E+03	1.90E-04	2.50E+07	40
6G7(mIgG3 ctrl)	1.90E+04	2.60E-04	7.20E+07	14

さらなるBIACore分析を行って、変化させる条件下で、抗体7F3および3C5のペプチド23に対する結合親和性を比較した。これらのさらなる分析の結果を表3に示す。これらのさらなるBIACore実験についての条件を、以下のように修飾を施して、「実験の詳細」下で前記したような通りとした。

実験2: 動的分析に含まれた抗体の濃度 - 100 nM ~ 0.78 nM; 20分の解離

【0212】

実験3: 動的分析に含まれた抗体の濃度 - 7F3: 25 nM ~ 0.78 nM; ; 3C5: 6.25 nM ~ 0.78 nM; 5分の解離

【0213】

実験4: 動的分析に含まれた抗体の濃度 - 7F3: 25 nM ~ 1.56 nM; ; 3C5: 6.25 nM ~ 0.4 nM; 1分の会合、3分の解離

【0214】

## 【表 4】

表 3 : 7 F 3 および 3 C 5 についてのさらなる B I A C o r e データのまとめ

実験	mAb	会合 (オン) 速度 ka(1/Ms)	解離 (オフ) 速度 kd(1/s)	結合親和性 KA(1/M)	結合親和性 KD(nM)
1.	7F3	2.10E+05	3.80E-04	5.40E+08	1.80
	3C5	6.80E+05	5.20E-04	1.30E+09	0.76
2.	7F3	2.90E+05	3.50E-04	8.10E+08	1.20
	3C5	1.50E+06	7.00E-04	2.20E+09	0.45
3.	7F3	3.32E+05	4.62E-04	7.19E+08	1.39
	3C5	1.06E+06	1.11E-03	9.60E+08	1.04
4.	7F3	2.86E+05	5.98E-04	4.79E+08	2.09
	3C5	1.03E+06	1.44E-03	7.16E+08	1.40

10

これらの結果は、3 C 5 が、7 F 3 よりも、C 5 a R ペプチドに対するほぼ 1 . 5 倍改良された親和性を有することを示す。

## 【 0 2 1 5 】

## 実施例 5

## マウス関節リウマチモデルにおける抗 h C 5 a R m A b テスト

ヒト分子を発現するトランスジェニックマウスの開発は、適当な動物モデルにおいて、ヒトでの使用について設計された、新しいヒト治療剤をテストするための便宜な手段である。C 5 a R は、マウスにおける炎症性関節炎の病因において必須の役割を演じる。例えば、C 5 a R 欠乏マウスは、抗グルコース 6 - リン酸イソメラーゼ自己 - 抗体 (Ji et al. (2002))、またはタイプ I I コラーゲン m A b いずれかによって誘導された関節炎から保護される (Grant et al. (2002))。抗 h C 5 a R m A b を、h C 5 R 1<sup>+/+</sup>マウスにおける実験的関節炎の進行を保護し、または逆行させるそれらの能力についてテストした。関節炎 K / B x N マウスからの血清の健康なマウスへの導入は、K / B x N 病を模倣する間接特異的炎症反応を誘導する (Kouskoff et al. (1996); Korganow et al. (1999))。h C 5 R 1<sup>+/+</sup>マウスを - 1 日および 1 日に抗 h C 5 a R m A b またはアイソタイプがマッチした対照 m A b いずれかで予備処理し、および K / B x N 血清を 0 日および 2 日に腹腔内 (i . p .) 注射した。血清導入後に、対照抗体で処理したマウスは関節の腫れおよび炎症性浸潤物を伴う典型的な慢性関節炎を呈し、他方、抗 h C 5 a R m A b で処理したマウスは臨床的にもまたは組織学的にも炎症の完全な不存在を示した。病気の発生における h C 5 R 1<sup>+/+</sup>マウスおよび対照同腹子の間に観察可能な差はなく (データは示さず)、K / B x N モデルにおける病気は C 5 a R に依存するように、ヒト C 5 a R が十分に機能的であることを示す (Ji et al. (2002); Grant et al. (2002))。最も重要なことには、抗体を病気誘導から 5 日後に投与すると、本発明者らは、確立された炎症の有意な逆行を観察した。h C 5 a R - 発現マウス好中球 (3 C 5 および 8 G 7) に対して生起された m A b の効果は m A b 7 F 3 よりも長く続いた (図 1 3 および 1 4)。1 m g / k g と少ない m A b 3 C 5 は炎症を逆行させ、維持された阻害を供することができた。

20

30

## 【 0 2 1 6 】

広く記載された本発明の精神および範囲から逸脱することなく、特別な実施形態において示すように、多数の変形および / または修飾を本発明に対してなすことができるのは当業者によって認識される。従って、本実施形態は、全ての点において、説明的かつ制限的でないと考えられるべきである。

40

## 【 0 2 1 7 】

## 文献

## 【表 5】

- Allegretti, M. et al. Targeting C5a: recent advances in drug discovery. *Curr. Med. Chem.* **12**, 217-236 (2005).
- Campbell, J.J., Qin, S., Bacon, K.B., Mackay, C.R. & Butcher, E.C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol* **134**, 255-266 (1996).
- Gerard, C. & Gerard, N.P. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 775-808 (1994). 10
- Grant, E.P. et al. Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J. Exp. Med.* **196**, 1461-1471 (2002).
- Guo, R.F. & Ward, P.A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 821-852 (2005).
- Haslett, C., Guthrie, L.A., Kopaniak, M.M., Johnston, R.B., Jr. & Henson, P.M. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* **119**, 101-110 (1985). 20
- Heath, H. et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* **99**, 178-184 (1997).
- Ji, H. et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* **16**, 157-168 (2002).
- Kaneko, Y., et al., Antagonistic peptides against human anaphylatoxin C5a. *Immunology*, 1995. 86(1): p. 149-54. 30
- Klco, J.M. et al *Nat Struct Mol Biol.* **12**:320-326 (2005).
- Kontetis, Z.D., et al., Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses. *Journal of Immunology*, 1994. 153(9): p. 4200-5.
- Korganow, A.S. et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* **10**, 451-461 (1999).
- Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**, 811-822 (1996).
- Luster, A.D., Alon, R. & von Andrian, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182-1190 (2005). 40
- Mackay, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* **2**, 95-101 (2001).

Morgan, E.L., et al., Anti-C5a receptor antibodies. Characterization of neutralizing antibodies specific for a peptide, C5aR-(9-29), derived from the predicted amino-terminal sequence of the human C5a receptor. *Journal of Immunology*, 1993. 151(1): p. 377-88.

Murdoch, C. and A. Finn, Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 2000. 95(10): p. 3032-43.

Murphy, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 593-633 (1994).

Pellas, T.C., et al., Novel C5a receptor antagonists regulate neutrophil functions in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 1998. 160(11): p. 5616-21.

Ponath, P.D. et al. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin.

Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* **97**, 604-612 (1996).

Qin, S. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur. J. Immunol.* **26**, 640-647 (1996).

Qin, S. et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* **101**, 746-754 (1998).

Riedemann, N.C., Guo, R.F. & Ward, P.A. The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* **112**, 460-467 (2003).

Shevchuk, N.A. et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* **32**, e19 (2004).

Sumichika, H. C5a receptor antagonists for the treatment of inflammation. *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 505-510 (2004).

von Andrian, U.H. & Mackay, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1020-1034 (2000).

Wang, Y., Rollins, S.A., Madri, J.A. & Matis, L.A. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8955-8959 (1995).

Watanabe, H., et al., Analysis of C5a receptor by monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*, 1995. 185(1): p. 19-29.

Wu, L. et al. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J. Exp. Med.* **186**, 1373-1381 (1997).

Wurch, T., Colpaert, F.C. & Pauwels, P.J. Chimeric receptor analysis of the ketanserin binding site in the human 5-Hydroxytryptamine1D receptor: importance of the second

extracellular loop and fifth transmembrane domain in antagonist binding. *Mol Pharmacol* **54**, 1088-1096 (1998).

本発明は、以下の態様を含む。

[ 1 ] 配列番号 : 3 [ 3 C 5 V h ] に示された可変重鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 1 つの C D R ループ配列を含む抗体であり、前記抗体は C 5 a の C 5 a R への結合を低下させ、または阻

10

20

30

40

50

害する、抗体。

[ 2 ] 前記抗体が、配列番号：3 [ 3 C 5 V h ] に示された可変重鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 2 つの C D R ループ配列を含む、上記 [ 1 ] に記載の抗体。

[ 3 ] 前記抗体が、さらに、配列番号：4 [ 3 C 5 V l ] に示された可変軽鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 1 つの C D R ループ配列を含む、上記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載の抗体。

[ 4 ] 前記抗体が、配列番号：4 [ 3 C 5 V l ] に示された可変軽鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 2 つの C D R ループ配列を含む、上記 [ 3 ] に記載の抗体。

[ 5 ] 前記抗体が、各々、配列番号：3 [ 3 C 5 V h ] および配列番号：4 [ 3 C 5 V l ] に示される重鎖および/または軽鎖配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する配列を含み、前記抗体は C 5 a の C 5 a R への結合を低下させ、または阻害する、上記 [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載の抗体。

[ 6 ] ( i ) 同一条件下で決定された場合に M A b 7 F 3 のそれよりも少なくとも 1 . 5 倍低い  $I C_{50}$  値；または

( i i ) 同一条件下で決定された場合に M A b 7 F 3 のそれよりも少なくとも 1 . 5 倍高い会合定数 ( K o n ) ；または

( i i i ) 同一条件下で決定した場合 M A b 7 F 3 のそれよりも少なくとも 1 . 3 倍低い  $K_D$  親和性定数；

でもって、ヒト C 5 a R またはその断片に結合する、上記 [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか一項に記載の抗体。

[ 7 ] ( i ) 5 0 0 p M 未満、好ましくは 3 0 0 p M 未満、より好ましくは 2 0 0 p M 未満である  $I C_{50}$  値；または

( i i ) 少なくとも  $6 . 8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  である会合定数 ( K o n ) ；または

( i i i ) 1 . 4 n M 未満である  $K_D$  親和性定数；

でもって、ヒト C 5 a R またはその断片に結合する、上記 [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか一項に記載の抗体。

[ 8 ] C 5 a R の断片が、配列 L Y R V V R E E Y F P P K V L C G V D Y S H D K R R E R A V A I V ( 配列番号：2 ) を含むペプチドである、上記 [ 6 ] または [ 7 ] に記載の抗体。

[ 9 ] 配列番号：5 [ 7 H 3 V h ] に示された可変重鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 1 つの C D R ループ配列を含む抗体であり、前記抗体は C 5 a の C 5 a R への結合を低下させ、または阻害する、抗体。

[ 1 0 ] 前記抗体が、配列番号：5 [ 7 H 3 V h ] に示された可変重鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 2 つの C D R ループ配列を含む、上記 [ 9 ] に記載の抗体。

[ 1 1 ] 前記抗体が、さらに、配列番号：6 [ 7 H 3 V l ] に示された可変軽鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 1 つの C D R ループ構造を含む、上記 [ 9 ] または [ 1 0 ] に記載の抗体。

[ 1 2 ] 前記抗体が、配列番号：6 [ 7 H 3 V l ] に示された可変軽鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 2 つの C D R ループ配列を含む、上記 [ 1 1 ] に記載の抗体。

[ 1 3 ] 前記抗体が、各々、配列番号：5 [ 7 H 3 V h ] および配列番号：6 [ 7 H 3 V l ] に示された重鎖および/または軽鎖配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する配列を含み、前記抗体は C 5 a の C 5 a R への結合を低下させ、または阻害する、上記 [ 9 ] から [ 1 2 ] のいずれか一項に記載の抗体。

[ 1 4 ] 配列番号：7 [ 8 G 7 V h ] に示された可変重鎖 C D R 1、C D R 2 または C D R 3 ループ配列に対して少なくとも 8 0 % 同一性を保有する少なくとも 1 つの C D R

10

20

30

40

50

ループ配列を含む抗体であって、前記抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害することを特徴とする、抗体。

[15] 前記抗体が、配列番号：7 [8G7 Vh] に示された可変重鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも2つのCDRループ配列を含む、上記[14]に記載の抗体。

[16] 前記抗体が、さらに、配列番号：8 [8G7 V1] に示された可変軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも1つのCDRループ配列を含む、上記[14]または[15]に記載の抗体。

[17] 前記抗体が、配列番号：8 [8G7 V1] に示された可変軽鎖CDR1、CDR2またはCDR3ループ配列に対して少なくとも80%同一性を保有する少なくとも2つのCDRループ配列を含む、上記[16]に記載の抗体。

[18] 前記抗体が、各々、配列番号：7および配列番号：8に示された重鎖および/または軽鎖配列に対して少なくとも80%同一性を保有する配列を含み、前記抗体はC5aのC5aRへの結合を低下させ、または阻害する、上記[14]から[17]のいずれか一項に記載の抗体。

[19] 前記抗体が、モノクローナル、組換え抗体、キメラまたはヒト化抗体である、上記[1]から[18]のいずれか一項に記載の抗体。

[20] MA b 3C5、MA b 8G7およびMA b 7H3からなる群より選択される、モノクローナル抗体。

[21] 前記抗体が、ヒトC5aRの第二の細胞外ループ(残基175から206)と反応性である、上記[1]から[20]のいずれか一項に記載の抗体。

[22] 前記抗体が、ヒトC5aRの残基179から184(EEYFPP)を含むエピトープに対して反応性である、上記[1]から[21]のいずれか一項に記載の抗体。

[23] アクセション番号06081801下でECACCに寄託されたハイブリドーマ。

[24] アクセション番号06081802下でECACCに寄託されたハイブリドーマ。

[25] アクセション番号06081803下でECACCに寄託されたハイブリドーマ。

[26] 上記[1]から[22]のいずれか一項に記載の抗体、および治療剤を含むコンジュゲート。

[27] 上記[1]から[22]のいずれか一項に記載の抗体、および検出可能な標識を含むコンジュゲート。

[28] 上記[1]から[22]のいずれか一項に記載の抗体をコードする配列を含む単離された核酸分子。

[29] 上記[1]から[22]のいずれか一項に記載の抗体、および医薬上許容される担体を含む組成物。

[30] 医薬として用いられる、上記[1]から[22]のいずれか一項に記載の抗体。

[31] 対象において白血球または好中球の移動に関連する障害を診断する方法であって、前記方法は、インビトロにて対象から得られた試料を本発明のコンジュゲートと接触させ、次いで、前記コンジュゲートおよび前記試料の間の免疫特異的結合を検出することを含む方法。

[32] 白血球または好中球移動に関連する障害の治療用の医薬の調製で用いられる、上記[1]から[22]のいずれか一項に記載の抗体。

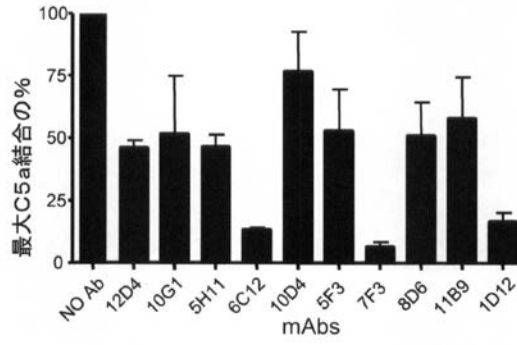
10

20

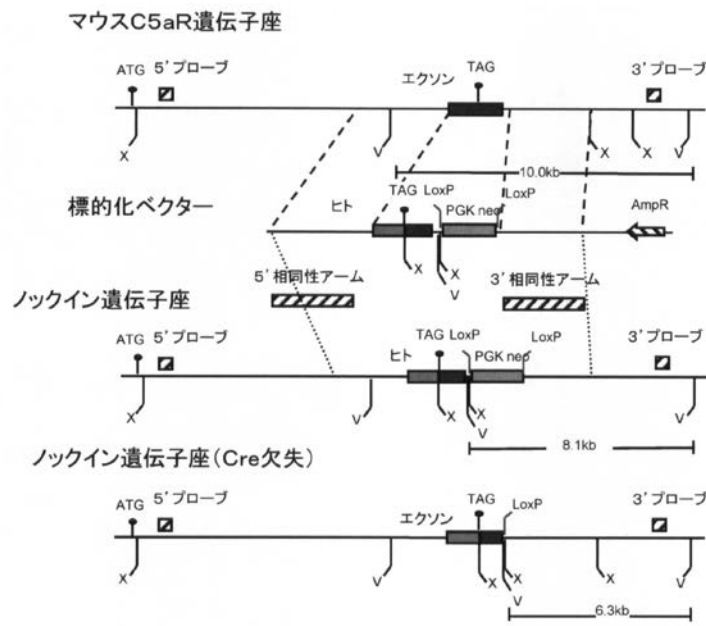
30

40

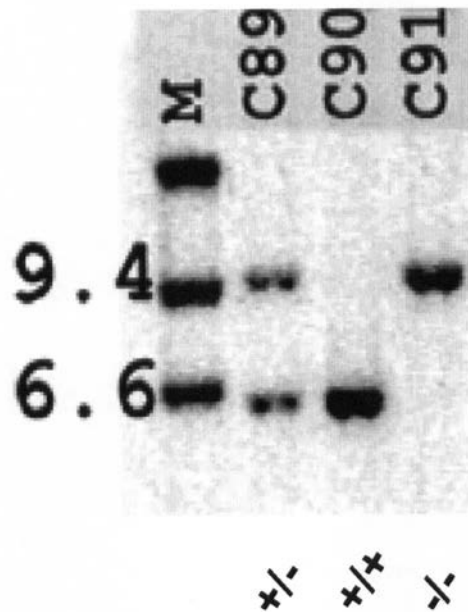
【 図 1 】



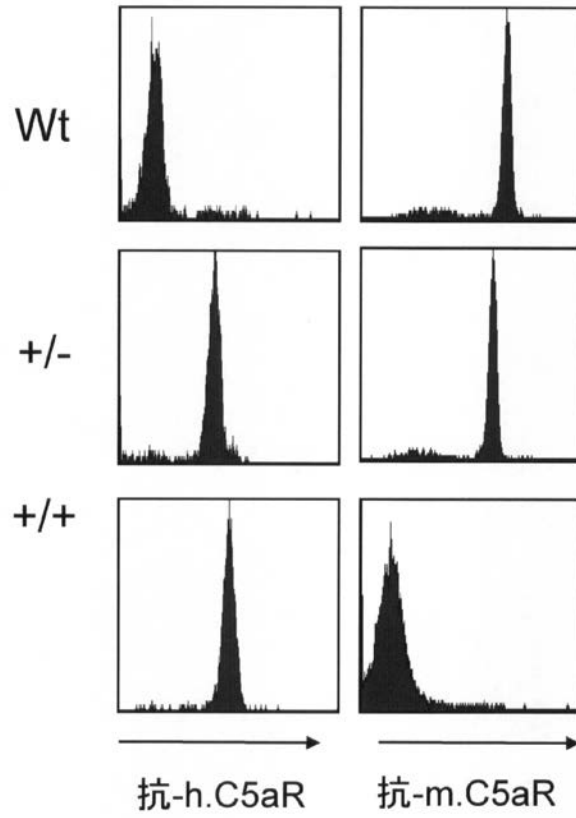
【 図 2 】



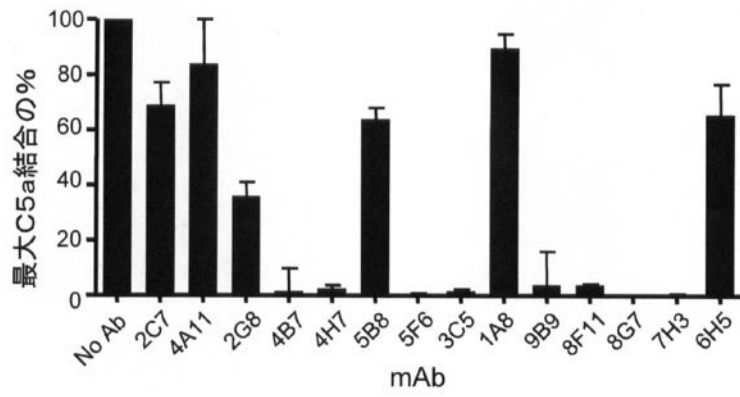
【 図 3 】



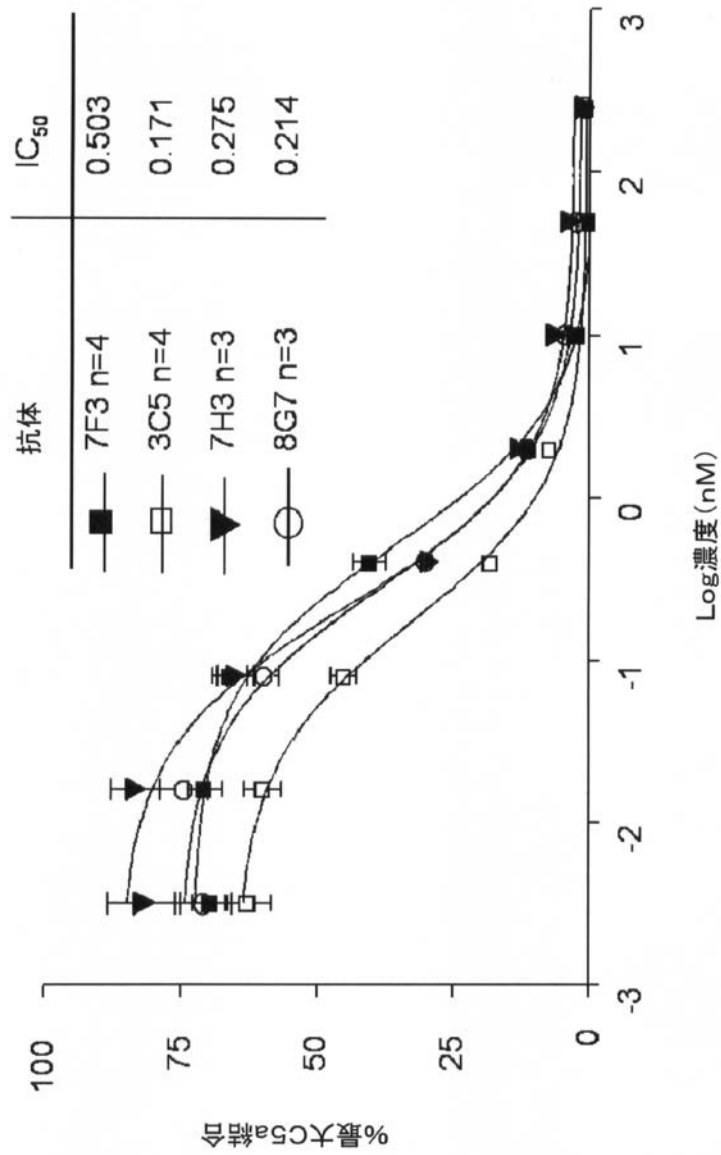
【 図 4 】



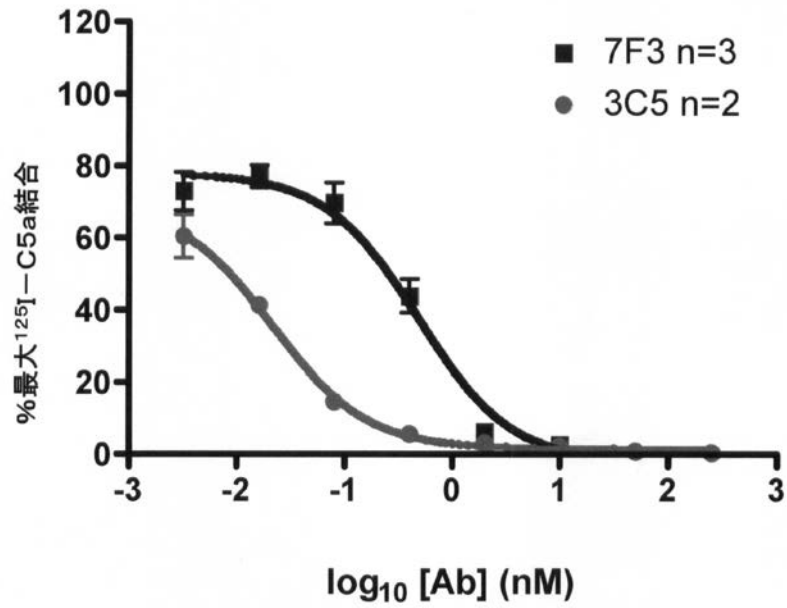
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

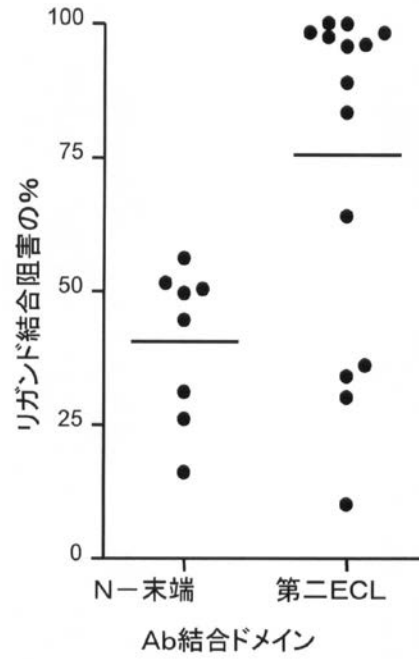


$$\text{EC}_{50}: \frac{7\text{F3 } n=3}{0.4831} \quad \frac{3\text{C5 } n=2}{0.02164}$$

【 図 8 】

キメラ受容体	mAb 結合第二E CL	mAb 結合 N-末端	抗マウス C5aR mAb(20/70)
HHHH	+++	+++	-
mHHH	+++	-	-
mmHH	+++	-	-
mmmH	-	-	+++
mmmm	-	-	+++
HmHH	+	-	-
HHmH	-	+++	+++
HHHm	+	+++	-
Hmmm	-	+	+++
mHmm	-	-	+++
mmHm	++	-	-

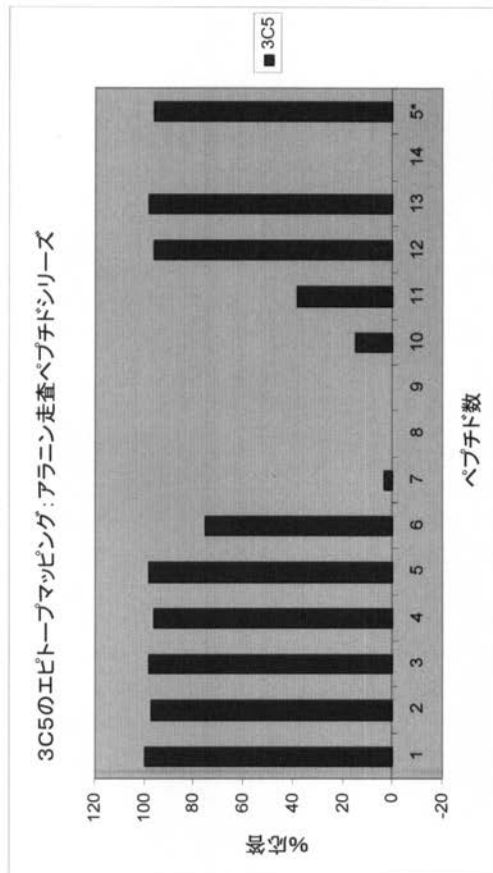
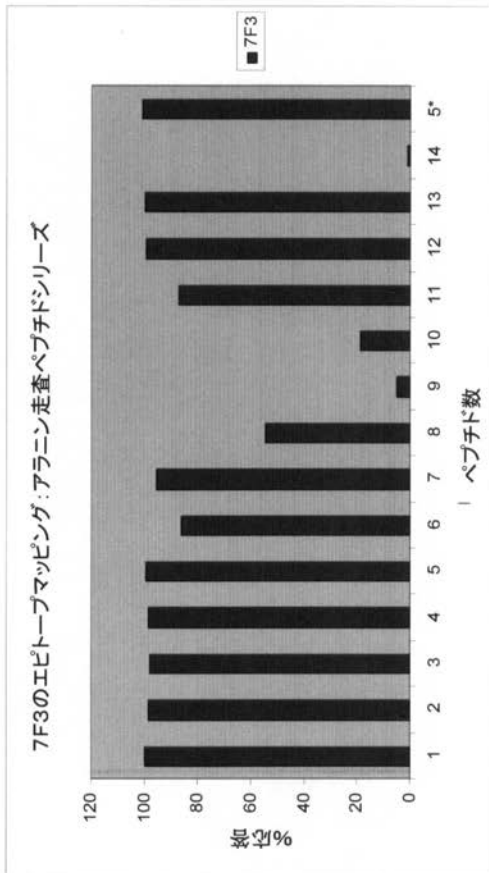
【 図 9 】



【 図 10 】

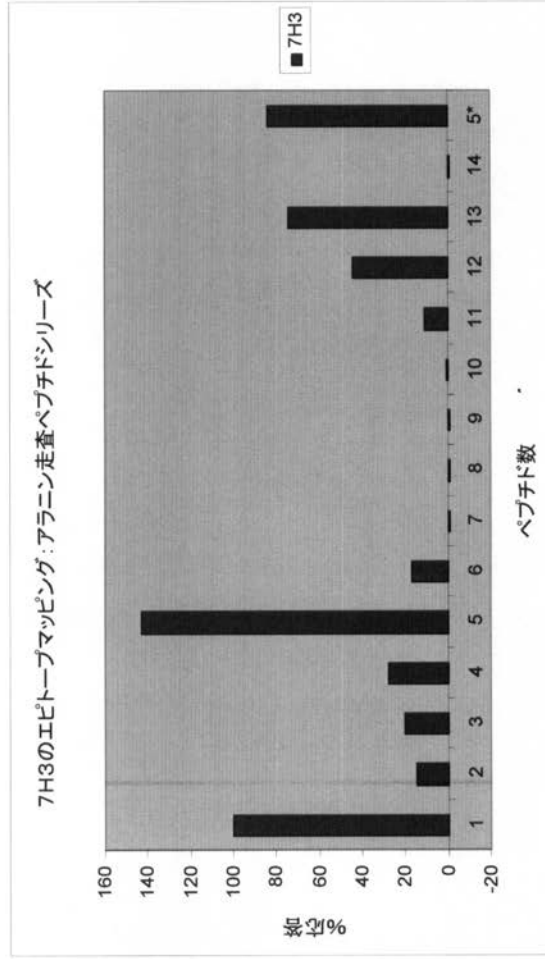
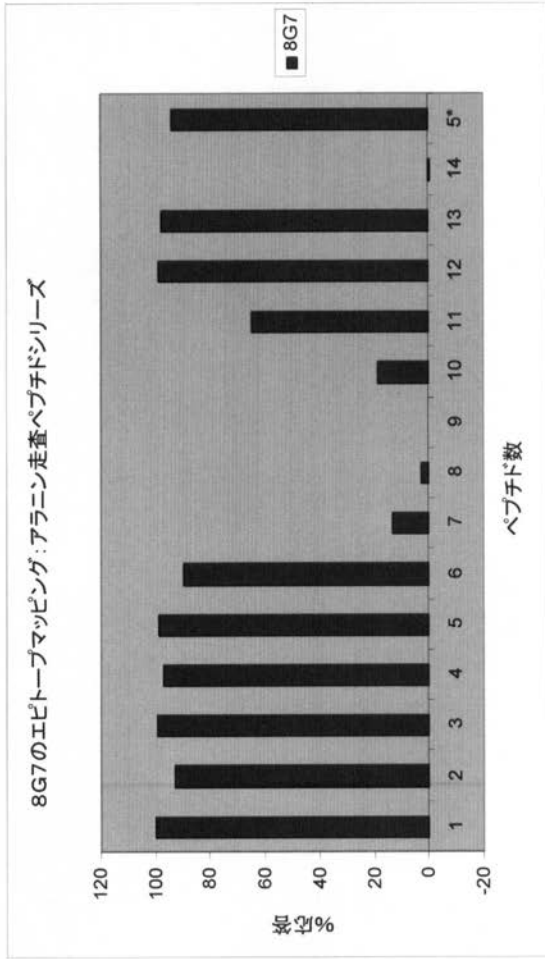


【 図 1 1 a 】



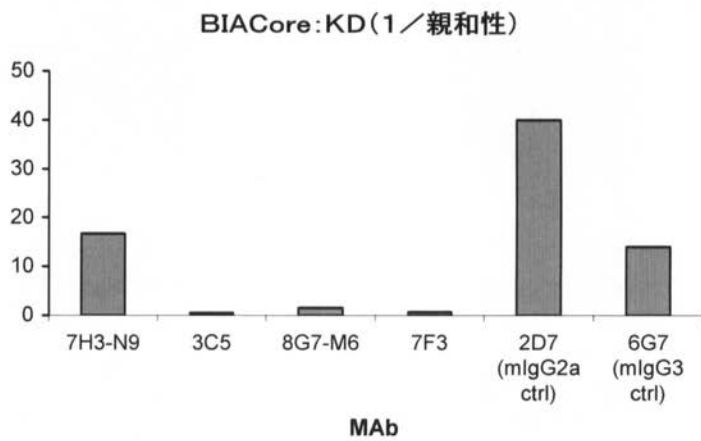
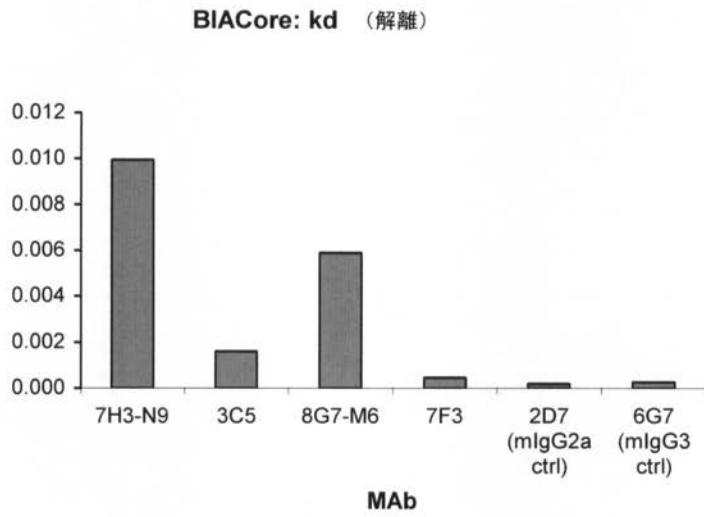
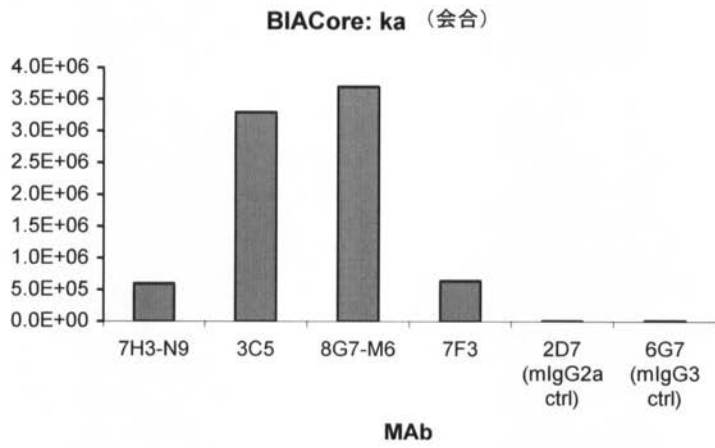
1. VREEYFPPKVLG
2. VREEYFPPKVLA
3. VREEYFPPKVAC
4. VREEYFPPKALC
5. VREEYFPPAVLG
6. VREEYFPAKVLG
7. VREEYFAPKVLG
8. VREEYAPPKVLG
9. VREEAFPPKVLG
10. VREAYFPPKVLG
11. VRAEYFPPKVLG
12. VAEEYFPPKVLG
13. AREEYFPPKVLG
14. PCYVLEKPEFVR (スクランブルド)
- 5\*. VREEYFPPKVLG (先のバッチから)

【 図 1 1 b 】

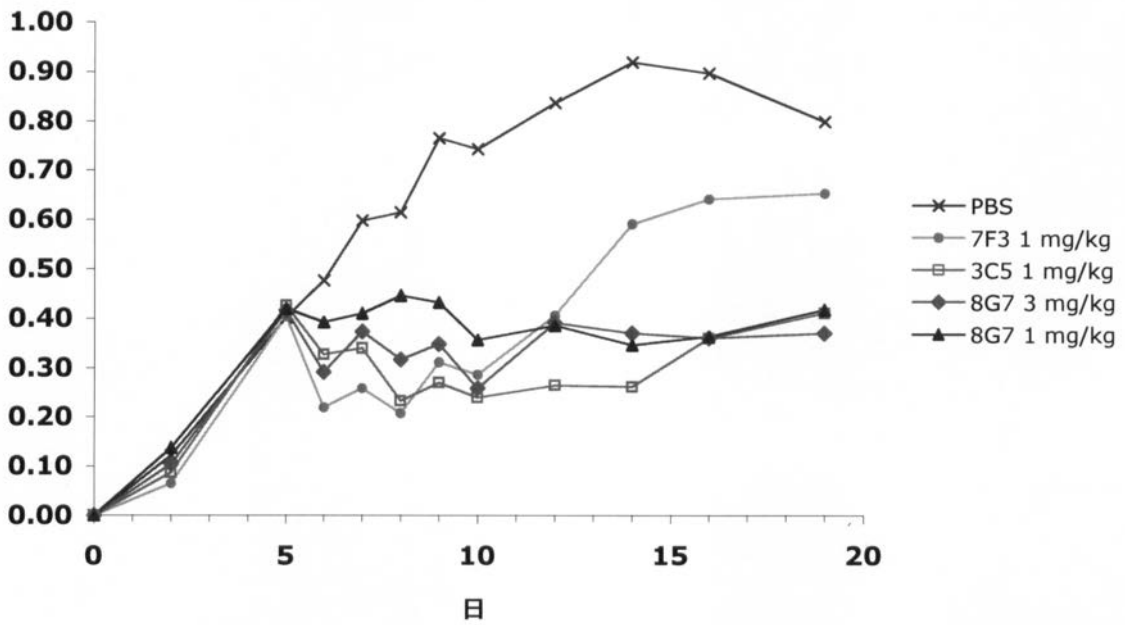


1. VREYFPPKVL
2. VREYFPPKVL
3. VREYFPPKVL
4. VREYFPPKAL
5. VREYFPPAVL
6. VREYFPAKVL
7. VREYFAPKVL
8. VREYAPPKVL
9. VREAFPPKVL
10. VREYFPPKVL
11. VRAEYFPPKVL
12. VAEYFPPKVL
13. AREYFPPKVL
14. PCYVLEKPEFVR (スクランブルド)
- 5\*. VREYFPPKVL (先のバッチから)

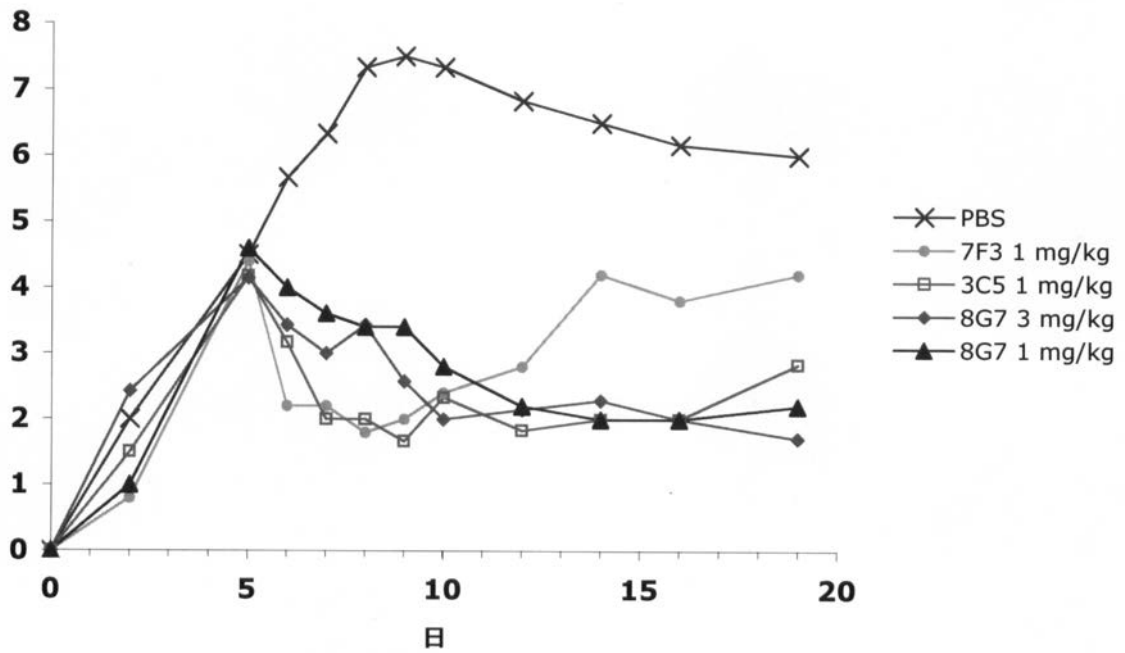
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

0005162587000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10 1 0 1
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/04
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/14
A 6 1 P	11/16 (2006.01)	A 6 1 P	21/04
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/16
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
		A 6 1 P	31/04
		C 1 2 P	21/08

(72)発明者 マツカイ, チャールズ レイ  
オーストラリア国 ニュー サウス ウェールズ 2 0 3 0, ヴォークルス, ベラ ガーデンズ  
1

審査官 引地 進

(56)参考文献 特表2005-535562(JP, A)  
国際公開第2006/037604(WO, A1)  
国際公開第97/015326(WO, A1)  
国際公開第2004/065423(WO, A1)  
金光修著, 「抗体工学入門」, 株式会社地人書館, 1994年, pp.228-234  
Bioベンチャー, 2002年, 第2巻、第4号, pp.59-66  
Immunol. Letters, 2003年, Vol.88, pp.47-52  
J. Immunol. Methods, 1995年, Vol.185, pp.19-29

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	具有改善特性的抗C5aR抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5162587B2</a>	公开(公告)日	2013-03-13
申请号	JP2009524844	申请日	2007-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	G2炎症		
申请(专利权)人(译)	柔术基础设施梅化专有有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柔术基础设施梅化专有有限公司		
[标]发明人	マツカイチャールズレイ		
发明人	マツカイ,チャールズレイ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P37/00 A61P29/00 A61P9/10 A61P35/00 A61P37/08 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/06 A61P11/06 A61P13/12 A61P11/02 A61P11/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P9/14 A61P21/04 A61P3/10 A61P11/16 A61P25/28 A61P35/02 A61P27/02 A61P31/04 C12P21/08		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K16/2896 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C07K16/18 C12N5/00.101 G01N33/53.D A61K39/395.N A61K39/395.D A61K45/00 A61P37/00 A61P29/00 A61P9/10.101 A61P35/00 A61P37/08 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/06 A61P11/06 A61P13/12 A61P11/02 A61P11/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P9/14 A61P21/04 A61P3/10 A61P11/16 A61P25/28 A61P35/02 A61P27/02 A61P31/04 C12P21/08		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
审查员(译)	进Hikichi		
优先权	60/839634 2006-08-22 US		
其他公开文献	JP2010501164A JP2010501164A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种改进的抗体，其与C5aR结合并可用于诊断和治疗方法。

%同一性	CDR 1	CDR 2	CDR 3
3C5 对 8G7	10/11 91%	13/16 81%	10/12 83%