

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-519367

(P2013-519367A)

(43) 公表日 平成25年5月30日(2013.5.30)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|-----------------|-------------|
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 ZNAA | 4B024 |
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | 4B064 |
| C12N 1/15 (2006.01) | C12N 1/15 | 4B065 |
| C12N 1/19 (2006.01) | C12N 1/19 | 4C084 |
| C12N 1/21 (2006.01) | C12N 1/21 | 4C085 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 134 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2012-552459 (P2012-552459)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月10日 (2011.2.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年10月10日 (2012.10.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/000175
 (87) 国際公開番号 WO2011/098762
 (87) 国際公開日 平成23年8月18日 (2011.8.18)
 (31) 優先権主張番号 61/303,060
 (32) 優先日 平成22年2月10日 (2010.2.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 1002238.2
 (32) 優先日 平成22年2月10日 (2010.2.10)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 509268749
 アフィテック リサーチ エイエス
 ノルウェー, エヌー0349 オスロ,
 ガウスタダリーン 21, オスロ リ
 サーチ パーク
 (74) 代理人 110001070
 特許業務法人SSINPAT
 (72) 発明者 カヴライ, アニータ
 ノルウェー エヌー0287 オスロ,
 ストロムスドルグヴェイトジェイエヌ
 39エイチ
 (72) 発明者 キブリヤノフ, セルゲイ, ミハイロヴ
 イック
 ノルウェー エヌー0768 オスロ,
 ホヴセテルヴェイエン 98
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体

(57) 【要約】

本発明は、CXCケモカイン受容体4(CXCR4)と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない抗体を提供する。また、このような抗体を含む免疫複合体及び組成物、並びに特に医療及び診断の分野における、このような抗体が関与する方法及び使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C X C ケモカイン受容体 4 (C X C R 4) に結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない分離抗体。

【請求項 2】

0 . 4 μ g / m L 以上の濃度で用いた場合に、前記抗体が C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、C X C R 4 に対するリガンドの結合を阻害することができ、又は C X C R 4 発現細胞のリガンドが誘発する遊走を阻害することができ、又は C X C R 4 発現細胞内におけるリガンドが誘発するカルシウム流を阻害することができる、請求項 1 又は 2 記載の抗体。

10

【請求項 4】

前記抗体が、3つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域が、

(i) S / G Y X₃ M / I H / S (配列番号 : 1 2 6)、又は X₁ Y X₃ M H (配列番号 : 1 2 7)、又は S Y X₃ M H (配列番号 : 1 2 8) のアミノ酸配列を有する可変重 (V H) C D R 1

(ここで、X₁ は S 又は G であってよく、好ましくは S であり ; X₃ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは G 又は W 又は Y 又は A であり、更に好ましくは W である) ;

20

(i i) X₁ I X₃ X₄ D G S X₈ X₉ X₁₀ Y A D S V K G (配列番号 : 1 2 9) のアミノ酸配列を有する V H C D R 2

(ここで、X₁ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは V 又は R であり、更に好ましくは R であり ;

X₃ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは S 又は N であり、更に好ましくは N であり ;

X₄ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは Y 又は S であり、更に好ましくは S であり ;

X₈ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは N 又は S であり、更に好ましくは S であり ;

30

X₉ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは K 又は T であり、更に好ましくは T であり ;

X₁₀ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは Y 又は S であり、更に好ましくは S である) ; 又は

X₁ I X₃ P X₅ X₆ G X₈ X₉ N Y A Q K F Q G (配列番号 : 1 3 1) のアミノ酸配列を有する V H C D R 2

(ここで、X₁ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは R 又は G であり、更に好ましくは R であり ;

X₃ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは N 又は I であり、更に好ましくは N であり ;

40

X₅ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは N 又は I であり、更に好ましくは N であり ;

X₆ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは S 又は F であり、更に好ましくは S であり ;

X₈ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは G 又は T であり、更に好ましくは G であり ;

X₉ は任意のアミノ酸であってよく、好ましくは T 又は A であり、更に好ましくは T である) ; 及び

(i i i) 配列番号 : s 3、9、15 若しくは 21 のアミノ酸配列、又はそれらに実質

50

的に相同的な配列を有する V H C D R 3

(ここで、前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列と比べ、1、2又は3つのアミノ酸置換を含む配列であるか、又は前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である)

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、

(a) 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号：1 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変重 (V H) C D R 1 ；

(i i) 配列番号：2 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 ；及び

(i i i) 配列番号：3 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3 ；を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域が

(i v) 配列番号：4 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変軽 (V L) C D R 1 ；

(v) 配列番号：5 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 ；及び

(v i) 配列番号：6 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3 ；を含み、

(ここで、前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列と比べ、1、2又は3つのアミノ酸置換を含む配列であるか、又は前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列であり) ；又は

(b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、

(a) 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号：7 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変重 (V H) C D R 1 ；

(i i) 配列番号：8 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 ；及び

(i i i) 配列番号：9 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3 ；を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域が

(i v) 配列番号：10 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変軽 (V L) C D R 1 ；

(v) 配列番号：11 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 ；及び

(v i) 配列番号：12 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3 ；を含み、

(ここで、前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列と比べ、1、2又は3つのアミノ酸置換を含む配列であるか、又は前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列であり) ；又は

(b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である、

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、

(a) 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号： 1 3 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変重 (V H) C D R 1 ；

(i i) 配列番号： 1 4 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 ；及び

(i i i) 配列番号： 1 5 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3 ；を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域が

(i v) 配列番号： 1 6 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変軽 (V L) C D R 1 ；

(v) 配列番号： 1 7 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 ；及び

(v i) 配列番号： 1 8 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3 ；を含み、

(ここで、前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列と比べ、 1、 2 又は 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、又は前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列の保守的アミノ酸置換を含む配列であり) ；又は

(b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が、

(a) 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号： 1 9 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変重 (V H) C D R 1 ；

(i i) 配列番号： 2 0 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 ；及び

(i i i) 配列番号： 2 1 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3 ；を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域が

(i v) 配列番号： 2 2 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変軽 (V L) C D R 1 ；

(v) 配列番号： 2 3 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 ；及び

(v i) 配列番号： 2 4 のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3 ；を含み、

(ここで、前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列と比べ、 1、 2 又は 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、又は前記実質的に相同的な配列は、前記の C D R 配列の保守的アミノ酸置換を含む配列であり) ；又は

(b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体が、

(a) 3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、 3 つの C D R s を含む

10

20

30

40

50

少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号：1のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変重(VH)CDR1；

(ii) 配列番号：2のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有するVHCDR2；及び

(iii) 配列番号：3のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有するVHCDR3；を含み、及び/又は

前記軽鎖可変領域が

(iv) 配列番号：88のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有する可変軽(VL)CDR1；

(v) 配列番号：89のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有するVLCDR2；及び

(vi) 配列番号：90のアミノ酸配列又はそれに実質的に相同的な配列を有するVLCDR3；を含み、

(ここで、前記実質的に相同的な配列は、前記のCDR配列と比べ、1、2又は3つのアミノ酸置換を含む配列であるか、又は前記実質的に相同的な配列は、前記のCDR配列の保存的アミノ酸置換を含む配列であり)；又は

(b) CXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である、
請求項1~4のいずれか1項記載の抗体。

【請求項10】

VHCDRドメイン(i)、(ii)及び(iii)のそれぞれの1つ、及びVLCDRドメイン(iv)、(v)及び(vi)のそれぞれの1つを含む、請求項5~9のいずれか1項記載の抗体。

【請求項11】

前記抗体が、

(a) 配列番号：69又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVHドメインを有し、及び/又は配列番号：70又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVLドメインを有し；又は

(b) CXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である、
請求項1又は請求項5に記載の抗体。

【請求項12】

前記抗体が、

(a) 配列番号：71又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVHドメインを有し、及び/又は配列番号：72又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVLドメインを有し；又は

(b) CXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である、
請求項1又は請求項6に記載の抗体。

【請求項13】

前記抗体が、

(a) 配列番号：73又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVHドメインを有し、及び/又は配列番号：74又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVLドメインを有し；又は

(b) CXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である、
請求項1又は請求項7に記載の抗体。

【請求項14】

前記抗体が、

(a) 配列番号：75又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVHドメインを有し、及び/又は配列番号：76又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列のVLドメインを有し；又は

(b) CXCR4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である、請求項 1 又は請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 15】

前記抗体が、

(a) 配列番号：69 又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列の VH ドメインを有し、及び / 又は配列番号：103 又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列の VL ドメインを有し；又は

(b) CXCR4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である、請求項 1 又は請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 16】

前記抗体 (b) が前記抗体 (a) と実質的に同じエピトープに結合し得る、請求項 5 ~ 15 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 17】

前記抗体がヒト抗体、好ましくは完全なヒト抗体である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 18】

前記抗体が、抗体の重鎖定常領域及び / 又は抗体の軽鎖定常領域の全て又は一部を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体が IgG 抗体、好ましくは IgG1 抗体である、請求項 18 記載の抗体。

【請求項 20】

前記抗体が、配列番号：108 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む重鎖、及び / 又は配列番号：109 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む軽鎖を含む、請求項 18 又は 19 記載の抗体。

【請求項 21】

前記抗体が、配列番号：112 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む重鎖、及び / 又は配列番号：113 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む軽鎖を含む、請求項 18 又は 19 記載の抗体。

【請求項 22】

前記抗体が、配列番号：116 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む重鎖、及び / 又は配列番号：117 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む軽鎖を含む、請求項 18 又は 19 記載の抗体。

【請求項 23】

前記抗体が、配列番号：120 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む重鎖、及び / 又は配列番号：121 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む軽鎖を含む、請求項 18 又は 19 記載の抗体。

【請求項 24】

前記抗体が、配列番号：124 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む重鎖、及び / 又は配列番号：125 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む軽鎖を含む、請求項 18 又は 19 記載の抗体。

【請求項 25】

前記抗体が、抗体の抗原結合断片である、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 26】

前記抗体の前記抗原結合断片が、Fab'、Fab、F(ab')₂、単ドメイン抗体、TandAbs 二量体、Fv、scFv、dsFv、ds-scFv、Fd、直鎖状抗

10

20

30

40

50

体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、バイボディ、トリボディ、s c -ダイアボディ、カップ(ラムダ)ボディ、BiTE、DVD-Ig、SIP、SMIP、DART、又は1又はそれ以上のCDRsを含むスモール抗体模倣体である、請求項25記載の抗体。

【請求項27】

前記抗体が、少なくとも第2の診断薬又は治療薬と結合している、請求項1~26のいずれか1項記載の抗体。

【請求項28】

前記抗体が、少なくとも放射線治療薬、化学療法薬、抗血管新生薬、アポトーシス誘導薬、抗チューブリン薬、抗細胞又は細胞毒性薬、ステロイド、サイトカインアンタゴニスト、サイトカイン発現阻害剤、ケモカインアンタゴニスト、ケモカイン発現阻害剤、ATPアーゼ阻害剤、抗炎症薬、信号伝達経路阻害剤、抗癌剤、他の抗体、凝固剤又は抗ウイルス剤と結合しており、前記抗ウイルス剤が、好ましくは、ヌクレオシド、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される、請求項27記載の抗体。

10

【請求項29】

少なくとも第2の治療薬又は診断薬と結合した、請求項1~28のいずれか1項記載の抗体を含む免疫複合体。

【請求項30】

請求項1~28のいずれか1項記載の少なくとも第1の抗体又はその免疫複合体を含む組成物であって、前記組成物が、好ましくは薬学的に許容される組成物である、前記組成物。

20

【請求項31】

前記組成物が、少なくとも第2の治療薬を更に含む、請求項30記載の組成物。

【請求項32】

請求項1~28のいずれか1項記載の抗体をコードするヌクレオチド配列領域を含む核酸分子。

【請求項33】

前記ヌクレオチド配列領域が、配列番号：34、配列番号：45、配列番号：56、配列番号：67、若しくは配列番号：100のヌクレオチド配列、又はそれらと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を有する、請求項32記載の核酸分子。

30

【請求項34】

請求項32又は33記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項35】

請求項32若しくは33記載の核酸分子、又は請求項34記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項36】

請求項32若しくは33記載の核酸分子、又は請求項34記載の発現ベクターを含むウイルス。

【請求項37】

少なくとも第1の容器内に、

- (a) 請求項1~28のいずれか1項記載の抗体；
- (b) 請求項29記載の免疫複合体；
- (c) 請求項30~31のいずれか1項記載の組成物；
- (d) 請求項32又は33記載の核酸分子；
- (e) 請求項34記載の発現ベクター；
- (f) 請求項35記載の宿主細胞；又は
- (g) 請求項36記載のウイルス

40

を含むキット。

【請求項38】

50

(a) コードされた抗体を発現するのに効果的な条件下に、請求項 3 4 記載の発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること；及び

(b) 前記宿主細胞から、発現した抗体を得ることを含む、抗体の製造方法。

【請求項 3 9】

C X C R 4 を含む組成物を、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項記載の抗体又はその免疫複合体と接触させることを含む、C X C R 4 の結合方法。

【請求項 4 0】

C X C R 4 を含むと思われる組成物を請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項記載の抗体又はその免疫複合体と、前記 C X C R 4 と前記抗体との複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下で接触させ、そのようにして形成された前記複合体を検出することを含む、C X C R 4 の検出方法。

10

【請求項 4 1】

動物において、C X C R 4 の発現と関連する疾患の診断方法であって、

(a) 前記動物から得られた試験試料を、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項記載の抗体又はその免疫複合体と接触させる工程；場合により

(b) 試験試料中の抗体 - 抗原複合体の存在及び / 又は量及び / 又は位置を測定又は検出する工程；及び場合により

(c) 試験試料中の抗体 - 抗原複合体の存在及び / 又は量を、対照と比較する工程を含む、前記方法。

20

【請求項 4 2】

前記試験試料を前記動物から分離し、インビトロで前記抗体又は免疫複合体と接触させる、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

前記抗体又は免疫複合体を前記動物に投与し、それによって、インビボで前記試料と接触させる、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 4】

C X C R 4 の発現と関連する前記疾患が、C X C R 4 により介在される疾患、C X C R 4 + 細胞の異常な増殖により特徴づけられる疾患、又は C X C R 4 の過剰発現により特徴づけられる疾患である、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 4 5】

前記疾患が、癌、転移性癌、癌細胞による器官の浸潤、血管形成に関連する疾患、炎症若しくは免疫疾患、リウマチ様関節炎のような自己免疫疾患、H I V 感染のようなウイルス感染、又は免疫系を復元するために骨髄から幹細胞を移動させるのが望ましい病状である、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 6】

前記試料中の C X C R 4 の量の増加が、前記疾患の特徴である、請求項 4 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 7】

動物における、C X C R 4 の発現又は活性と関連する疾患の治療方法であって、前記疾患を患っている動物に、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項記載の抗体又はその免疫複合体の治療的有効量を投与することを含む方法。

40

【請求項 4 8】

C X C R 4 の発現又は活性と関連する前記疾患が、C X C R 4 により介在される疾患、C X C R 4 + 細胞の異常な増殖により特徴づけられる疾患、又は C X C R 4 の過剰発現により特徴づけられる疾患である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

前記疾患が、癌、転移性癌、癌細胞による器官の浸潤、血管形成に関連する疾患、炎症若しくは免疫疾患、リウマチ様関節炎のような自己免疫疾患、H I V 感染のようなウイルス感染、又は免疫系を復元するために骨髄から幹細胞を移動させるのが望ましい病状である

50

、請求項 47 又は 48 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 50】

前記抗体又はその免疫複合体が、以下の 1 又はそれ以上を引き起こす、請求項 47 ~ 49 のいずれか 1 項記載の方法。

- (a) CXCR4 の、少なくとも SDF-1 への結合の阻害；
- (b) CXCR4 リガンドに対する CXCR4 介在性細胞応答の阻害、好ましくは、CXCR4 リガンドに対する応答における、カルシウムイオンの流出の阻害、又は CXCR4 発現細胞のリガンドが誘発する遊走の阻害；
- (c) CXCR4 + 細胞の ADCC の誘導；
- (d) インビボにおける抗腫瘍効果の誘導；
- (e) CXCR4 + 細胞の CDC の誘導；
- (f) 既存の癌により引き起こされる転移形成の阻害；
- (g) 癌細胞の新しい器官への浸潤の阻害；
- (h) 腫瘍間質への CXCR4 + 細胞の誘引の阻害、及び / 又は腫瘍に有利な微小環境を引き起こすための前記細胞の活性化の阻害；
- (i) 他の治療に有効な化合物を用いた治療のための腫瘍細胞の感作。

10

【請求項 51】

第 2 の治療薬を前記動物に投与することを更に含む、請求項 47 ~ 50 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 52】

前記抗体が、前記抗体の少なくとも 2 つの抗原結合断片を含む、二価又は多価抗体である、請求項 41 ~ 51 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 53】

前記動物がヒトを対象としている、請求項 41 ~ 52 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 54】

治療、画像処理又は診断に用いるための、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項記載の抗体、又はその免疫複合体。

【請求項 55】

CXCR4 の発現又は活性と関連する病状の治療、画像処理又は診断に用いるための、請求項 54 記載の抗体又は免疫複合体。

30

【請求項 56】

前記疾患が、請求項 48 又は 49 のいずれか 1 項において定義されている、請求項 55 記載の抗体又は免疫複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して抗体の分野、CXCR4 生物学、及び関連する治療に関する。特に、本発明は、CXCR4 と結合する抗体を提供する。このような抗 CXCR4 抗体は、腫瘍血管の画像処理、転移形成の阻害若しくは減少、及び血管新生の阻害若しくは減少により、例えば、癌及びウイルス感染、特に HIV 感染の治療、炎症及び免疫疾患の治療、腫瘍増殖及び進行の監視又は予測のような、CXCR4 と関連する疾患及び病状における診断及び治療的用途を有している。本発明の抗体をベースとする組成物及び方法は、免疫複合体及び他の治療の組み合わせの使用、キット及び方法にまでも広がる。

40

【背景技術】

【0002】

800 以上のメンバーにより、G タンパク質共役受容体 (GPCRs) は、ヒトゲノムによりコードされる全遺伝子の > 2 % の割合を占める、信号伝達に参与する細胞表面分子の最も大きなファミリーを意味する。GPCR スーパーファミリーのメンバーは、共通の膜トポロジー：3 つの細胞内ループ及び 3 つの細胞外ループによって結合する、細胞外 N - 末端、細胞内 C - 末端及び 7 つの膜貫通 (TM) ヘリックスを共有する。それらの共通

50

の位相構造に基づいて、GPCRsは7回膜貫通(7TM)受容体とも呼ばれる。これらの受容体は、神経伝達、内分泌腺及び外分泌腺から遊離されるホルモン及び酵素、免疫応答、心筋及び平滑筋の収縮、及び血圧調整を含む、重要な生理的機能を制御する。それらの機能障害は、最も流行しているヒトの疾患のいくつかの原因である。新たな実験及び臨床データは、GPCRsが癌の進行及び転移において極めて重要な役割を有することを示す。したがって、ある種のGPCRsが抗癌剤の適切な標的になり得る可能性がある。

【0003】

ケモカインは、特に、癌、ウイルス感染、喘息及びアレルギー性疾患、並びにリウマチ様関節炎及びアテローム性動脈硬化症のような自己免疫疾患を含む、種々の疾患及び障害における免疫及び炎症応答において役割を果たしている。それらの構造に依存し、ケモカインは、C-Cケモカイン(システイン-システインモチーフを含む)又はC-X-Cケモカイン(システイン-X-システインモチーフを含む)として分類される。したがって、このようなケモカインと結合する受容体は、それぞれCCR又はCXCRファミリーのメンバーとして分類される。

【0004】

CXCR4(フュージン、HM89、LESTR、HUMSTRとも呼ばれる)は、ストローマ細胞由来因子-1(SDF-1、また、CXCL12及びPBSFと呼ばれる)に特異的なアルファ-ケモカイン受容体、リンパ球に対して強力な走化能を与える分子である。この受容体は、CD4⁺T細胞を感染させるためにHIV分離物が用いることができる、いくつかのケモカイン受容体のうちの1つである。いくつかの正常組織はCXCR4を発現する。mRNA及び機能タンパク質の両者に関して、発現が証明されている、注目に値する細胞の例には：造血細胞/骨髄前駆細胞；免疫系細胞、例えば、T細胞、プレB細胞及びプラズマ細胞、樹枝状細胞、NK細胞；血液細胞、例えば、単球、肥満細胞、血小板；神経系細胞、例えば、ニューロン、星状膠細胞、小膠細胞；他の細胞、例えば、内皮細胞、血管平滑筋、胃腸上皮、及び他の特定の上皮細胞が含まれる。

【0005】

CXCR4は、種々の腫瘍内で発現し、癌の病態生理学、特に癌転移において決定的な役割を演じている(Dorsam及びGutkind, 2007, G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer 7:79-94)。CXCR4の発現は、試験を行ったほとんど全ての腫瘍において見られた。SDF-1が、肝臓、肺、骨髄、リンパ節において特に高いレベルで、脳(いくらか低いレベルで)、すなわち、通常、癌が転移する部位において発現することも興味のあることである。CXCR4を標的とする抗体のような薬剤に対する潜在的な適応症には、癌(例えば、転移性の癌)、例えば、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、食道癌、結腸直腸癌、肝臓癌及び肺癌(SCLS及びNSCLCの両者)、並びに悪性及び転移性メラノーマ、脳腫瘍(神経膠腫)、頭頸部癌、特定の白血病、非ホジキンリンパ腫のようなリンパ腫、小児腫瘍(例えば、神経芽細胞腫)、腎臓癌、血管芽細胞腫が含まれる。肺腫瘍、非小細胞肺癌、卵巣癌、子宮頸癌、甲状腺乳頭癌、骨肉腫、及び他の悪性腫瘍を含む、他のいくつかの癌、において、CXCR4の過剰発現が見られた。抗CXCR4抗体は、HIV又は他のレトロウイルス感染のようなウイルス感染の治療、自己免疫疾患、炎症性疾患のような免疫疾患の治療、並びに血管形成及び血管新生の阻害のためにも用いることができる。

【0006】

それらの複合体構造のために、GPCRsは、特異抗体を増加させるには「困難な標的」であると考えられる。GPCRsは、溶解した細胞の膜画分から容易に精製することも、正確に折りたたまれた可溶性タンパク質として、種々の発現系で組換え技術によって生産することもできない。

【0007】

GPCRsに対する抗体の生成に関する問題は、Hoogenboomら、Eur. J. Biochem 260, 774-784(1999)に記載されている。更に、Su

10

20

30

40

50

ら、*Eur. J. Biochem* 270, 4497 - 4506 (2003) は、GPCR ケモカイン受容体 CXCR4 に対するヒト抗体を得る試みに関する問題を説明し、ステップバック選択を組み合わせたパスファインダー法を用いても、特異的抗体を確認することができなかったことを報告している。したがって、GPCRs の分野において、特異的抗体の生成には大きな課題が残っている。

【0008】

Northwest Biotherapeutics Inc. は、CXCR4 に対するモノクローナル抗体を開発し、そのうちのいくつかは前臨床開発の最終段階にある。CXCR4 抗体の潜在的有効性を示すデータは、NWB 及び他社によって動物モデルに集められた。次の開発は、選択された抗体のヒト化、第 I 相臨床試験のための調製における毒性試験を含む。

10

【0009】

MDX-1338 は、Medarex 社由来の、完全なヒトモノクローナル抗体である、抗ヒト CXCR4 - 特異的抗体である。インビトロにおける試験は、MDX-1338 が、CXCR-4 を発現する細胞と、低いナノモル親和性で結合することを示した。MDX-1338 は、CXCR4 発現細胞への CXCL12 リガンド結合を阻害し、CXCL12 が誘発する遊走及びカルシウム流を、低いナノモル EC₅₀ 値で阻害する。MDX-1338 は IgG4 であり、それ故、ADCC 及び CDC 活性を欠いている。MDX-1338 は、CXCR4 発現細胞系の範囲でアポトーシスを誘発し、多発性 AML 及びリンパ腫異種移植片モデルにおいて抗腫瘍活性をも有する。

20

【0010】

更に、CXCR4 / SDF-1 を標的とする、種々の開発段階の、多くの小分子化合物及びペプチドがある。

【0011】

発明者らは、CXCR4 を認識する追加の抗体の同定が、多くの治療法の選択肢を展開することに有効であると認識していた。しかし、上記で議論したように、CXCR4 のような GPCRs の性質は、このような抗体の開発が真の難題を引き起こすことを意味する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0012】

特に、その自然の膜結合形式において CXCR4 を認識する CXCR4 に対するヒト抗体に対する要求がある。ヒト抗体は、一般に、利点を示すと認識されるが、それらを、成功したヒトの治療のための候補とするために十分に高い親和性及び適切な機能特性を有するヒト抗体の開発が決して容易でないことが知られている。これは、その複雑さ及び膜貫通特性のために、GPCRs の場合と同様である。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、腫瘍、ウイルス感染、及び CXCR4 + 細胞が関与する、炎症又は免疫疾患のような他の疾患及び病状の安全かつ効果的な治療において用いるための新規な治療用組成物及び方法を提供することにより、先行技術における、特定の限定を克服する。本発明は、CXCR4、好ましくは CXCR4 の 1 つ又はそれ以上の細胞外ドメイン内のエピートと結合する抗体、特にヒト抗体を提供する。このような抗体は、腫瘍及びウイルス感染、並びに炎症又は免疫疾患のような、CXCR4 + 細胞が関与する他の疾患及び病状の治療に有効である。本発明の組成物及び方法は、この特定のカテゴリーの抗体を用いる免疫複合体及び組み合わせの使用にも拡張される。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】図 1 は、C-9P21 クローンの、特に、重鎖及び軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。scFv を NcoI / NotI 部位を介して pHOG21 内にクローニ

50

ングした。初期クローニングに使用した制限部位 (NcoI、HindIII、MluI 及び NotI) をイタリック体で下線を付して示す。VHとVLとの間のリンカー配列をイタリック体で示す。c-mycエピトープ及び6Hisをそれぞれ下線及び2重下線で示す。

【図2】図2は、B-1M22クローンの、特に、重鎖及び軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。scFvをNcoI/NotI部位を介してpHOG21内にクローニングした。初期クローニングに使用した制限部位 (NcoI、HindIII、MluI 及び NotI) をイタリック体で下線を付して示す。VHとVLとの間のリンカー配列をイタリック体で示す。c-mycエピトープ及び6Hisをそれぞれ下線及び2重下線で示す。

10

【図3】図3は、C-1I24クローンの、特に、重鎖及び軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。scFvをNcoI/NotI部位を介してpHOG21内にクローニングした。初期クローニングに使用した制限部位 (NcoI、HindIII、MluI 及び NotI) をイタリック体で下線を付して示す。VHとVLとの間のリンカー配列をイタリック体で示す。c-mycエピトープ及び6Hisをそれぞれ下線及び2重下線で示す。

【図4】図4は、D-1K21クローンの、特に、重鎖及び軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。scFvをNcoI/NotI部位を介してpHOG21内にクローニングした。初期クローニングに使用した制限部位 (NcoI、HindIII、MluI 及び NotI) をイタリック体で下線を付して示す。VHとVLとの間のリンカー配列をイタリック体で示す。c-mycエピトープ及び6Hisをそれぞれ下線及び2重下線で示す。

20

【図5】図5は、9N10クローンの、特に、重鎖及び軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。scFvをNcoI/NotI部位を介してpHOG21内にクローニングした。初期クローニングに使用した制限部位 (NcoI、HindIII、MluI 及び NotI) をイタリック体で下線を付して示す。VHとVLとの間のリンカー配列をイタリック体で示す。c-mycエピトープ及び6Hisをそれぞれ下線及び2重下線で示す。

【図6】図6Aは、B-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21scFvクローンの、CXCR4トランスフェクトHEK293細胞株への結合を、非トランスフェクトHEK293細胞株を対照に示しているEasyCyt染色である。図6Bは、B-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21scFvクローンの、トランスフェクトDT40細胞株への結合を、非トランスフェクトDT40細胞株を対照に示しているEasyCyt染色である。図6Cは、C-9P21、9N10及びF7IgGクローンの、Ramos及びCCRF-CEM細胞株への結合を示すEasyCyt染色である。

30

【図7】図7Aは、 10^5 個のJurkat細胞の、 $0.5\mu\text{g}$ のB-1M22、C-9P21、C-1I24又はD-1K21scFvクローンでの、リガンド及びAMD-3100との非競合下及び競合下のEasyCyt染色を示す。図7Bは、 10^5 個のRamos細胞の、 $0.5\mu\text{g}$ のB-1M22、C-9P21、C-1I24又はD-1K21scFvクローンでの、リガンド及びAMD-3100との非競合下及び競合下のEasyCyt染色を示す。図7Cは、 10^5 個のCCRF-CEM細胞の、 $0.1\mu\text{g}$ のC-9P21、9N10又はF7IgGクローンでの、 $4\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 及び $0.5\mu\text{g}$ のリガンドとの非競合下及び競合下のEasyCyt染色を示す。

40

【図8】図8Aは、 10^5 個のCCRF-CEM細胞の、 $0.5\mu\text{g}$ のC-1I24 (点線)、B-1M22 (濃い実線) 又はF7 (薄い実線) でのEasyCyt染色を、PBS (黒い陰影) と比較して示す。図8Bは、 10^5 個のCCRF-CEM細胞の、 $0.5\mu\text{g}$ のD-1K21 (点線)、C-9P21 (濃い実線) 又はF7 (薄い実線) でのEasyCyt染色を、PBS (黒い陰影) と比較して示す。全ての抗体がIgG1型であり、結合はヤギ抗ヒトIgGrPE2次抗体で検出した。

50

【図9】図9は、B-1M22、C-9P21、C-1I24又はD-1K21の、マウス又はサルCXCR4を一過性に発現するHEK293T/17細胞への結合を示す。「Fugene」と表記されたカラムは、DNA不存在下にトランスフェクション剤で処理した細胞を示し、陰性対照とする。

【図10】図10は、B-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21 scFvクローンをCCRf-CEM細胞上で滴定し、Ca⁺⁺流アッセイに使用する最適濃度を決定する、EasyCytel実験を示す。

【図11】図11A~11Eは、(Fluo-4で標識した)CCRf-CEM細胞上でのCa⁺⁺流アッセイの結果を示す。B-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21抗体は、scFvレベル(図11A)及びIgGレベル(図11B、11C及び11D)の両方で試験し、9N10クローンはIgGレベル(図11E)で試験した。CXCR4特異的リガンドであるSDF-1の添加前に、細胞を4µg/mLのscFv(図11A)、10及び100µg/mLのIgG(図11B、11C、11D)、又は1及び10µg/mLのIgG(図11E)と共に15分間、プレインキュベートした。リガンド添加の約10秒後にシグナルの記録を開始した。曲線下の面積(AUC)を積分して求め、SDF-1のみによる最大刺激でのAUCに対する百分率としてプロットした。

【図12】図12A及び図12Bは、(Fluo-4で標識した)CCRf-CEM細胞上でのCa⁺⁺流アッセイの結果を示す。C-9P21及び9N10抗体は、IgGレベルで試験した。CXCR4特異的リガンドであるSDF-1の添加前に、抗体の濃度を変えながら細胞とともに15分間、プレインキュベートした。リガンド添加の約10秒後にシグナルの記録を開始した。図12Aは、一連の濃度でのシグナル低下を示し、図12Bは、最初のデータを示す。

【図13】図13は、抗CXCR4 scFv C-9P21による、リガンド(SDF-1)誘導細胞移動の抑制を示す。BATDA標識ヒトT細胞白血病CCRf-CEM細胞は、ボイデンチャンパー内へ移動するように誘導された。ボイデンチャンパーでは、SDF-1リガンドはチャンパー下部に置かれ、細胞はチャンパー上部において抗体又は対照としての培地のみと共培養された。チャンパーの下部に移動した細胞は、Triton X-100により誘導された細胞溶解後の蛍光強度により検出した。3重試験での平均及び標準偏差をプロットする。

【図14】図14A、図14B、図14Cは、抗CXCR4抗体であるB-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21による、ADCCの誘導を示す。C-9P21及びD-1K21 scFv(a)、C-9P21及びD-1K21 IgG(b)、B-1M22及びC-1I24 IgG(c)について、CCRf-CEM細胞の用量応答致死を示す。

【図15】図15A及び図15Bは、B-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21抗体のCDC誘導能試験の結果を示す。B-1M22及びC-1I24 IgGはヒト血清存在下においてRamos細胞の用量応答致死を示すが(図15A)、C-9P21及びD-1K21はCDCを誘導しない(図15B)。対照として、IgG1型F7抗体を使用した。

【図16】図16Aは、抗CXCR4抗体であるB-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21のアポトーシス活性のアネキシンVによる分析を示す。対照として、F7抗体及びスタウロスポリン(S:25nM)を使用した。抗体及びスタウロスポリンを添加しない陰性対照(バックグラウンドレベル)を、0カラムに示す。薄灰色陰影は、アネキシンV及びPIの両者に対して陽性である死細胞全量を示し、濃灰色陰影は、アネキシンVに対しては陽性であるが、PIに対しては陰性であることによって定義されるアポトーシス細胞を示す。図16Bは、抗CXCR4抗体であるC-9P21及び9N10のアポトーシス活性のアネキシンVによる分析を示す。対照として、F7抗体を使用した。薄灰色陰影は、アネキシンV及びPIの両者に対して陽性である死細胞全量を示し、濃灰色陰影は、アネキシンVに対しては陽性であるが、PIに対しては陰性であることに

10

20

30

40

50

よって定義されるアポトーシス細胞を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の抗体の特定の利点は、抗体がCXCR4発現細胞において重大なアポトーシスを誘発しないことである。臨床分野における主要な抗体とは対照的であり（例えば、WO 2008/060367に記載されたMedarex抗体）、これはアポトーシスを誘発する。CXCR4は、多くの正常細胞で発現するので、アポトーシスを誘発しないことは、あまりにも多くの不要な細胞死滅とそのような抗体がこのように良好な安全プロファイルを有するために、実際の治療上の利点がある。

【0016】

本明細書に開示された本発明の抗体の追加又は他の好ましい特性は、抗体が拮抗的抗体であることである。したがって、重大なアポトーシスを誘発しない特性は、抗体が拮抗的抗体であるという特性をも兼ね備えている。すなわち、それらは例えば、受容体-リガンド相互作用を遮断又は阻害することにより、及び/又はCXCR4受容体からの下流シグナル伝達事象を遮断又は阻害することにより、例えば、リガンドが誘発又は介在するCXCR4によるシグナル伝達を遮断又は阻害することにより、CXCR4の機能を遮断又は阻害する。この特性は、例えば、診断のために、単にCXCR4発現細胞を標識するための使用に対するものとしての治療における抗体の使用にとって重要である。

【0017】

この点について、広範囲の健康/正常細胞でCXCR4が発現することが知られており、CXCR4及びそのリガンドSDF-1は、いずれも開発において重要である。しかし、前記で議論したように、CXCR4がほとんど全ての悪性腫瘍で過剰発現し、それらの増殖に寄与していることもわかっている。おそらく更に重要なことには、SDF-1は、通常、リンパ節、骨髄、肺、肝臓等の、最も転移しやすい組織中で強く発現しており、腫瘍細胞がSDF-1の勾配に沿って移動することが概して受け入れられている。したがって、本発明の抗体の主要な目的は、腫瘍の増殖を制限し、CXCR4の機能を阻害することにより、例えば、受容体-リガンド相互作用を遮断又は阻害することにより、転移の形成を防止することである。CXCR4は血管形成に関与していると考えられ、したがって、CXCR4の機能の遮断又は阻害は、血管新生及び腫瘍の血管新生に影響を及ぼすためにも用いることができる。

【0018】

機能の遮断又は阻害、特に受容体-リガンド相互作用の遮断又は阻害は、炎症性疾患及び自己免疫疾患を治療するための、本発明の抗体の使用においても重要である。また、主要な目的は、CXCR4+細胞を死滅させることなく、その活性を下方制御し（自己免疫疾患において）、CXCR4+細胞の炎症部位への移動を防止又は減少することである（炎症性疾患及び自己免疫疾患の両方で有用）。

【0019】

拮抗作用（CXCR4の機能の遮断又は阻害）も、感染症、例えば、CXCR4が機能的役割を果たすウイルス、細菌、真菌又は寄生虫感染を治療するための本発明の抗体の使用において重要である。このようなウイルス感染症の例は、いくつかの株（CXCR4指向性株）が、宿主細胞に感染するためにCXCR4受容体を使用することがわかっているレトロウイルス感染、特にHIVである。したがって、CXCR4受容体の遮断又は阻害は、例えば、HIVによるCXCR4+細胞の感染を遮断又は阻害することにより、HIVの拡張を制限し得る。

【0020】

しかし、前記で議論したように、本発明の抗体の作用の主な形態は、その拮抗特性により（有利には、CXCR4+細胞の重大なアポトーシスを誘導しない能力と組み合わせる）、ある実施形態においては、本発明の抗体は、CXCR4+細胞の選択的排除（殺傷）を誘発し得る。このような選択的排除は、ADC、CDC、有糸分裂の異常のようなメカニズムによる場合があり、重大なアポトーシスの誘発を引き起さないとされる。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明者らは、CXCR4と結合するCXCR4特異的抗体を調製した。

【0022】

例えば、前記抗体は、CXCR4でトランスフェクションした細胞及びCXCR4を自然に発現する細胞のような、CXCR4+細胞と結合する。特に、前記抗体は、CXCR4でトランスフェクションしたHEK293T-細胞、CXCR4でトランスフェクションしたDT40-細胞、並びに自然にCXCR4を発現するRamos(B-細胞)、Jurkat(T-細胞白血病)及びCCRF-CEM(ヒトT-細胞白血病)と結合する(実施例2、3及び4を参照されたい)。

【0023】

重要なことに、前記抗体は、CXCR4-細胞、すなわち、CXCR4を発現しない細胞とは有意に結合しない。特に、前記抗体は、CXCR4をトランスフェクションしていない細胞、又は自然にCXCR4を発現しない細胞とは有意に結合しない。

【0024】

前記抗体は、CXCR4と結合することが知られているリガンド、例えば、天然のリガンドSDF-1a(SDF-1とも呼ばれる)及び/又はCXCR4と結合する他のリガンド(例えば、非天然のリガンド)、例えば、AMD-3100(CXCR4と非常に高い特異性を有し、CXCR4を阻害する)の結合をも阻害する(実施例3を参照されたい)。

【0025】

したがって、本明細書に開示される抗体は、CXCR4と特異的に結合し、本明細書で議論する病状の診断及び治療のために適切な候補物質となる。

【0026】

相補性決定領域(CDRs)を含む、CXCR4、そのV_H及びV_Lドメインと結合する、本発明の好ましい抗体分子のアミノ酸及び/又はDNA配列を、本明細書に記載の種々の配列番号に示す。

【0027】

したがって、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない性質を有する抗体を提供する。好ましくは、前記抗体は、CXCR4の機能の1つ又はそれ以上を遮断又は阻害し、例えば、SDF-1(又はAMD-3100のような他のCXCR4リガンド)のCXCR4への結合を遮断又は阻害し、SDF-1(又は他のCXCR4リガンド)に対する応答におけるCXCR4+細胞の移動を遮断又は阻害し、SDF-1(又は他のCXCR4リガンド)をCXCR4+細胞に加えることにより誘発されるCa²⁺流を遮断又は阻害し、又はCXCR4受容体からの他の下流シグナル伝達事象を遮断又は阻害する拮抗的抗体である。

【0028】

好ましくは、前記抗体は分離される。また、好ましくは、前記抗体はヒト型であり、及び/又はCXCR4は好ましくはヒト型である。好ましくは、前記抗体は、CXCR4の細胞外ドメイン内のエピトープと結合する。したがって、「CXCR4との結合」に対するあらゆる言及には、「CXCR4の細胞外ドメイン内のエピトープとの結合」の好ましい実施形態が含まれる。本発明の抗体の他の好ましい特性は、CXCR4発現細胞(CXCR4+細胞)のADCCを誘発する能力、CXCR4発現細胞のCDCを誘発する能力及び少なくともヒトCXCR4、更に好ましくはヒト及びサルのCXCR4、又はヒト及びマウスのCXCR4、最も好ましくはヒト、マウス及びサルのCXCR4と結合する能力の1又はそれ以上である。異種間の反応性が観察される場合、更に好ましくは、抗体は、ヒト及びサル、又はヒト及びマウスのCXCR4と同様の親和性で結合する。好ましくは、本発明の抗体は、抗腫瘍活性、例えば、インビボにおける腫瘍細胞の増殖阻害を示す。

【0029】

したがって、本発明は、好ましくは、ヒトCXCR4の細胞外ドメイン中のエピトープ

10

20

30

40

50

と結合し、好ましくはC X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する分離ヒト抗体を提供する。したがって、本明細書に開示される全ての実施形態において、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性は好ましい特徴である。

【0030】

一実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：1、7、13若しくは19のアミノ酸配列、又はこれらの配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む、重鎖C D R 1ドメインを含む抗体を提供する。

【0031】

それに代え、又はそれに加え、本発明の一実施形態においては、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する抗体は、配列番号：2、8、14若しくは20のアミノ酸配列、又はこれらの配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む重鎖C D R 2ドメインを含む。

10

【0032】

それに代え、又はそれに加え、本発明の一実施形態においては、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する抗体は、配列番号：3、9、15若しくは21のアミノ酸配列、又はこれらの配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む重鎖C D R 3ドメインを含む。

【0033】

それに代え、又はそれに加え、本発明の一実施形態においては、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する抗体は、配列番号：4、10、16、22若しくは88のアミノ酸配列、又はこれらの配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む軽鎖C D R 1ドメインを含む。

20

【0034】

それに代え、又はそれに加え、本発明の一実施形態においては、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する抗体は、配列番号：5、11、17、23若しくは89のアミノ酸配列、又はこれらの配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む軽鎖C D R 2ドメインを含む。

【0035】

それに代え、又はそれに加え、本発明の一実施形態においては、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する抗体は、配列番号：6、12、18、24若しくは90のアミノ酸配列、又はこれらの配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む軽鎖C D R 3ドメインを含む。

30

【0036】

したがって、特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、1つ又はそれ以上の重鎖C D R ドメインを含む抗体であって、重鎖C D R ドメインが、

(a) 配列番号：1、7、13若しくは19のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を含む重鎖C D R 1ドメイン；

(b) 配列番号：2、8、14若しくは20のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を含む重鎖C D R 2ドメイン；及び

(c) 配列番号：3、9、15若しくは21のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を含む重鎖C D R 3ドメインからなる群から選択される抗体を提供する。

40

【0037】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、1つ又はそれ以上の軽鎖C D R ドメインを含む抗体であって、軽鎖C D R ドメインが、

(a) 配列番号：4、10、16、22若しくは88のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を含む軽鎖C D R 1ドメイン；

(b) 配列番号：5、11、17、23若しくは89のアミノ酸配列、又はこれらと実

50

質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメイン；及び

(c) 配列番号：6、12、18、24若しくは90のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインからなる群から選択される抗体をも提供する。

【0038】

特定の好ましい実施形態においては、抗体は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、

(a) 配列番号：3のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3、及び

(b) 配列番号：6のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 の両方を含む。

10

【0039】

更に好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び/又は配列番号：4のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメイン、及び/又は配列番号：2のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び/又は配列番号：5のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインも存在する。

【0040】

特定の好ましい実施形態においては、抗体は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、

(a) 配列番号：9のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3、及び

(b) 配列番号：12のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 の両方を含む。

20

【0041】

更に好ましくは、配列番号：7のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び/又は配列番号：10のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメイン、及び/又は配列番号：8のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び/又は配列番号：11のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインも存在する。

30

【0042】

特定の好ましい実施形態においては、抗体は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、

(a) 配列番号：15のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3、及び

(b) 配列番号：18のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 の両方を含む。

【0043】

更に好ましくは、配列番号：13のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び/又は配列番号：16のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメイン、及び/又は配列番号：14のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び/又は配列番号：17のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインも存在する。

40

【0044】

特定の好ましい実施形態においては、抗体は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、

(a) 配列番号：21のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C

50

D R 3、及び

(b) 配列番号：24のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3の両方を含む。

【0045】

更に好ましくは、配列番号：19のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1ドメイン、及び/又は配列番号：22のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1ドメイン、及び/又は配列番号：20のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2ドメイン、及び/又は配列番号：23のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2ドメインも存在する。

10

【0046】

特定の好ましい実施形態においては、抗体は、C X C R 4と結合し、C X C R 4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、

(a) 配列番号：3のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3、及び

(b) 配列番号：90のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3の両方を含む。

【0047】

更に好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1ドメイン、及び/又は配列番号：88のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1ドメイン、及び/又は配列番号：2のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2ドメイン、及び/又は配列番号：89のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2ドメインも存在する。

20

【0048】

好ましい一実施形態においては、配列番号：1のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号：2のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 2、及び配列番号：3のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0049】

更に他の好ましい実施形態においては、配列番号：4のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号：5のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 2、及び配列番号：6のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

30

【0050】

好ましい一実施形態においては、配列番号：7のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号：8のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 2、及び配列番号：9のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0051】

更に他の好ましい実施形態においては、配列番号：10のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号：11のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 2、及び配列番号：12のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

40

【0052】

好ましい一実施形態においては、配列番号：13のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号：14のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 2、及び配列番号：15のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む C D R 3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0053】

50

更に他の好ましい実施形態においては、配列番号：16のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1、配列番号：17のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR2、及び配列番号：18のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0054】

好ましい一実施形態においては、配列番号：19のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR1、配列番号：20のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR2、及び配列番号：21のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0055】

更に他の好ましい実施形態においては、配列番号：22のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1、配列番号：23のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR2、及び配列番号：24のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0056】

更に他の好ましい実施形態においては、配列番号：88のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1、配列番号：89のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR2、及び配列番号：90のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含むCDR3が、個々に、又は組み合わせて存在する。

【0057】

また、特定の実施形態においては、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：3のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR3ドメイン、及び/又は配列番号：6のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR3ドメインを含む抗体を提供する。

【0058】

前記抗体は、配列番号：2のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR2ドメイン、及び/又は配列番号：5のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR2ドメインを更に含んでもよく、及び/又は配列番号：1のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR1ドメイン、及び/又は配列番号：4のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1ドメインを更に含んでもよい。

【0059】

特定の実施形態においては、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：9のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR3ドメイン、及び/又は配列番号：12のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR3ドメインを含む抗体を提供する。

【0060】

前記抗体は、配列番号：8のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR2ドメイン、及び/又は配列番号：11のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR2ドメインを更に含んでもよく、及び/又は配列番号：7のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR1ドメイン、及び/又は配列番号：10のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1ドメインを更に含んでもよい。

【0061】

特定の実施形態においては、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：15のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR3ドメイン、及び/又は配列番号：18のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR3ドメインを含む抗体を提供

10

20

30

40

50

する。

【 0 0 6 2 】

前記抗体は、配列番号： 1 4 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号： 1 7 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号： 1 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号： 1 6 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 2 1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号： 2 4 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを含む抗体を提供する。

10

【 0 0 6 4 】

前記抗体は、配列番号： 2 0 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号： 2 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号： 1 9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号： 2 2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

20

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号： 9 0 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 0 6 6 】

前記抗体は、配列番号： 2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号： 8 9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号： 1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号： 8 8 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

30

【 0 0 6 7 】

また、特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号： 5 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを含む抗体を提供する。

40

【 0 0 6 8 】

前記抗体は、配列番号： 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号： 6 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号： 1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号： 4 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

【 0 0 6 9 】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 8 のアミノ酸配列、又はこれと実

50

質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 1 1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 0 7 0 】

前記抗体は、配列番号 : 9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 1 2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号 : 7 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 1 0 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

10

【 0 0 7 1 】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号 : 1 4 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 1 7 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 0 7 2 】

前記抗体は、配列番号 : 1 5 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 1 8 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号 : 1 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 1 6 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

20

【 0 0 7 3 】

また、特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号 : 2 0 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 2 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 0 7 4 】

前記抗体は、配列番号 : 2 1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 2 4 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号 : 1 9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 2 2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

30

【 0 0 7 5 】

また、特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号 : 2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 8 9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを含む抗体を提供する。

40

【 0 0 7 6 】

前記抗体は、配列番号 : 3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 9 0 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号 : 1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号 : 8 8 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを更に含んでいてもよい。

【 0 0 7 7 】

50

また、特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号：4 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを含む抗体を提供する。

【0078】

前記抗体は、配列番号：3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号：6 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号：2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号：5 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよい。

10

【0079】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：7 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号：10 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを含む抗体を提供する。

【0080】

前記抗体は、配列番号：9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号：12 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号：8 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号：11 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよい。

20

【0081】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：13 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号：16 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを含む抗体を提供する。

30

【0082】

前記抗体は、配列番号：15 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号：18 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号：14 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号：17 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよい。

【0083】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：19 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号：22 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを含む抗体を提供する。

40

【0084】

前記抗体は、配列番号：21 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号：24 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号：20 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号：23 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖

50

C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよい。

【 0 0 8 5 】

特定の実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：1 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメイン、及び / 又は配列番号：8 8 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 0 8 6 】

前記抗体は、配列番号：3 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメイン、及び / 又は配列番号：9 0 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメインを更に含んでいてもよく、及び / 又は配列番号：2 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメイン、及び / 又は配列番号：8 9 のアミノ酸配列、又はこれと実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメインを更に含んでいてもよい。

10

【 0 0 8 7 】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号：1、2、3、4、5 及び 6、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列からなる群から選択される 1 又はそれ以上の C D R s を含む。

【 0 0 8 8 】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号：7、8、9、10、11 及び 12、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列からなる群から選択される 1 又はそれ以上の C D R s を含む。

20

【 0 0 8 9 】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号：13、14、15、16、17 及び 18、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列からなる群から選択される 1 又はそれ以上の C D R s を含む。

【 0 0 9 0 】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号：19、20、21、22、23 及び 24、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列からなる群から選択される 1 又はそれ以上の C D R s を含む。

30

【 0 0 9 1 】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号：1、2、3、88、89 及び 90、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列からなる群から選択される 1 又はそれ以上の C D R s を含む。

【 0 0 9 2 】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号 4、5 及び 6；又は 10、11 及び 12；又は 16、17 及び 18；又は 22、23 及び 24；又は 88、89 及び 90、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の、2 又はそれ以上の軽鎖 C D R s を含む。

【 0 0 9 3 】

特に好ましい結合分子は、配列番号 4、5 及び 6；又は 10、11 及び 12；又は 16、17 及び 18；又は 22、23 及び 24；又は 88、89 及び 90、又は前記配列番号の任意の 1 つと実質的に相同的な配列のうち 3 つを含む（すなわち、前記軽鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3 のそれぞれ、又はそれらの実質的に相同的な配列の 1 つ）。

40

【 0 0 9 4 】

他の特定の好ましい抗体は、配列番号：1、2 及び 3；又は 7、8 及び 9；又は 13、14 及び 15；又は 19、20 及び 21、又は前記配列番号のいずれか 1 と実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 2 つ又はそれ以上を含む。

【 0 0 9 5 】

特に好ましい抗体は、配列番号：1、2 及び 3；又は 7、8 及び 9；又は 13、14 及び 15；又は 19、20 及び 21、又は前記配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な

50

配列の重鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記重鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3 又はそれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ) を含む。

【 0 0 9 6 】

更に特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 4、5 及び 6、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記軽鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ)、並びに配列番号： 1、2 及び 3、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記重鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ) を含む。

【 0 0 9 7 】

更に特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 10、11 及び 12、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記軽鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ)、並びに配列番号： 7、8 及び 9、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記重鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ) を含む。

【 0 0 9 8 】

更に特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 16、17 及び 18、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記軽鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ)、並びに配列番号： 13、14 及び 15、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記重鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ) を含む。

【 0 0 9 9 】

更に特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 22、23 及び 24、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記軽鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ)、並びに配列番号： 19、20 及び 21、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記重鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ) を含む。

【 0 1 0 0 】

更に特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 88、89 及び 90、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記軽鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ)、並びに配列番号： 1、2 及び 3、又はこれらの配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 3 つ (すなわち、前記重鎖 C D R 1 及び C D R 2 及び C D R 3、又はこれらと実質的に相同的な配列のそれぞれの 1 つ) を含む。

【 0 1 0 1 】

特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 1 の重鎖 C D R 1 ドメイン、配列番号： 2 の重鎖 C D R 2 ドメイン、及び配列番号： 3 の重鎖 C D R 3 ドメイン、又は前記配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列を含み；及び / 又は配列番号： 4 の軽鎖 C D R 1 ドメイン、配列番号： 5 の軽鎖 C D R 2 ドメイン、及び配列番号： 6 の軽鎖 C D R 3 ドメイン、又は前記配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列を含む。

【 0 1 0 2 】

特に好ましい特定の抗体は、配列番号： 7 の重鎖 C D R 1 ドメイン、配列番号： 8 の重鎖 C D R 2 ドメイン、及び配列番号： 9 の重鎖 C D R 3 ドメイン、又は前記配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列を含み；及び / 又は配列番号： 10 の軽鎖 C D R 1 ドメイン、配列番号： 11 の軽鎖 C D R 2 ドメイン、及び配列番号： 12 の軽鎖 C D R 3 ドメイン、又は前記配列の任意の 1 つと実質的に相同的な配列を含む。

【 0 1 0 3 】

特に好ましい特定の抗体は、配列番号：13の重鎖CDR1ドメイン、配列番号：14の重鎖CDR2ドメイン、及び配列番号：15の重鎖CDR3ドメイン、又は前記配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含み；及び/又は配列番号：16の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号：17の軽鎖CDR2ドメイン、及び配列番号：18の軽鎖CDR3ドメイン、又は前記配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む。

【0104】

特に好ましい特定の抗体は、配列番号：19の重鎖CDR1ドメイン、配列番号：20の重鎖CDR2ドメイン、及び配列番号：21の重鎖CDR3ドメイン、又は前記配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含み；及び/又は配列番号：22の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号：23の軽鎖CDR2ドメイン、及び配列番号：24の軽鎖CDR3ドメイン、又は前記配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む。

10

【0105】

特に好ましい特定の抗体は、配列番号：1の重鎖CDR1ドメイン、配列番号：2の重鎖CDR2ドメイン、及び配列番号：3の重鎖CDR3ドメイン、又は前記配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含み；及び/又は配列番号：88の軽鎖CDR1ドメイン、配列番号：89の軽鎖CDR2ドメイン、及び配列番号：90の軽鎖CDR3ドメイン、又は前記配列の任意の1つと実質的に相同的な配列を含む。

【0106】

更なる実施形態においては、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が：

20

(i) 配列番号：1のアミノ酸配列を有する可変重(VH)CDR1、

(ii) 配列番号：2のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び

(iii) 配列番号：3のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む抗体を提供する。

【0107】

この実施形態の好ましい態様においては、前記軽鎖可変領域CDRsの1つ又はそれ以上が、

(i) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、

(ii) 配列番号：5のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び

(iii) 配列番号：6のアミノ酸配列を有するVL CDR3からなる群から選択される。好ましくは、前記軽鎖可変領域CDRsの2つ又は3つが、前記群から選択される。前記配列の1又はそれ以上に実質的に相同的な配列を含む抗体も、本実施形態において提供される。

30

【0108】

更なる実施形態においては、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が：

40

(i) 配列番号：7のアミノ酸配列を有する可変重(VH)CDR1、

(ii) 配列番号：8のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び

(iii) 配列番号：9のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む抗体を提供する。

【0109】

この実施形態の好ましい態様においては、前記軽鎖可変領域CDRsの1つ又はそれ以上が、

(i) 配列番号：10のアミノ酸配列を有するVL CDR1、

(ii) 配列番号：11のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び

(iii) 配列番号：12のアミノ酸配列を有するVL CDR3からなる群から選択

50

される。好ましくは、前記軽鎖可変領域 C D R s の 2 つ又は 3 つが、前記群から選択される。前記配列の 1 又はそれ以上に実質的に相同的な配列を含む抗体も、本実施形態において提供される。

【 0 1 1 0 】

更なる実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号：13 のアミノ酸配列を有する可変重 (V H) C D R 1、

(i i) 配列番号：14 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び

(i i i) 配列番号：15 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む抗体を提供する。

10

【 0 1 1 1 】

この実施形態の好ましい態様においては、前記軽鎖可変領域 C D R s の 1 つ又はそれ以上が、

(i) 配列番号：16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、

(i i) 配列番号：17 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び

(i i i) 配列番号：18 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 からなる群から選択される。好ましくは、前記軽鎖可変領域 C D R s の 2 つ又は 3 つが、前記群から選択される。前記配列の 1 又はそれ以上に実質的に相同的な配列を含む抗体も、本実施形態において提供される。

20

【 0 1 1 2 】

更なる実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号：19 のアミノ酸配列を有する可変重 (V H) C D R 1、

(i i) 配列番号：20 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び

(i i i) 配列番号：21 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む抗体を提供する。

30

【 0 1 1 3 】

この実施形態の好ましい態様においては、前記軽鎖可変領域 C D R s の 1 つ又はそれ以上が、

(i) 配列番号：22 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、

(i i) 配列番号：23 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び

(i i i) 配列番号：24 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 からなる群から選択される。好ましくは、前記軽鎖可変領域 C D R s の 2 つ又は 3 つが、前記群から選択される。前記配列の 1 又はそれ以上に実質的に相同的な配列を含む抗体も、本実施形態において提供される。

40

【 0 1 1 4 】

更なる実施形態においては、本発明は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が：

(i) 配列番号：1 のアミノ酸配列を有する可変重 (V H) C D R 1、

(i i) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び

(i i i) 配列番号：3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む抗体を提供する。

【 0 1 1 5 】

この実施形態の好ましい態様においては、前記軽鎖可変領域 C D R s の 1 つ又はそれ以上

50

上が、

(i) 配列番号： 88 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、

(i i) 配列番号： 89 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び

(i i i) 配列番号： 90 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 からなる群から選択される。好ましくは、前記軽鎖可変領域 C D R s の 2 つ又は 3 つが、前記群から選択される。前記配列の 1 又はそれ以上に実質的に相同的な配列を含む抗体も、本実施形態において提供される。

【 0 1 1 6 】

本発明の更なる好ましい特定の実施形態は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 1、2 若しくは 3、又は配列番号： 1、2 若しくは 3 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V H ドメイン、及び / 又は配列番号： 4、5 若しくは 6、又は配列番号： 4、5 若しくは 6 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V L ドメインを含む。

10

【 0 1 1 7 】

本発明の更なる好ましい特定の実施形態は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 7、8 若しくは 9、又は配列番号： 7、8 若しくは 9 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V H ドメイン、及び / 又は配列番号： 10、11 若しくは 12、又は配列番号： 10、11 若しくは 12 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V L ドメインを含む。

20

【 0 1 1 8 】

本発明の更なる好ましい特定の実施形態は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 13、14 若しくは 15、又は配列番号： 13、14 若しくは 15 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V H ドメイン、及び / 又は配列番号： 16、17 若しくは 18、又は配列番号： 16、17 若しくは 18 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V L ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 1 1 9 】

本発明の更なる好ましい特定の実施形態は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 19、20 若しくは 21、又は配列番号： 19、20 若しくは 21 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V H ドメイン、及び / 又は配列番号： 22、23 若しくは 24、又は配列番号： 22、23 若しくは 24 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V L ドメインを含む抗体を提供する。

30

【 0 1 2 0 】

本発明の更なる好ましい特定の実施形態は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 1、2 若しくは 3、又は配列番号： 1、2 若しくは 3 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の重鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V H ドメイン、及び / 又は配列番号： 88、89 若しくは 90、又は配列番号： 88、89 若しくは 90 の 1 又はそれ以上と実質的に相同的な配列の軽鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つを含む V L ドメインを含む抗体を提供する。

40

【 0 1 2 1 】

好ましい実施形態においては、軽鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つは配列番号： 4、5 及び 6；又は 88、89 及び 90 において定義されており、及び / 又は重鎖 C D R s の 1、2 又は 3 つは配列番号： 1、2 及び 3 において定義されている。

【 0 1 2 2 】

本発明の好ましい特定の実施形態は、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号： 69、71、73 若しくは 75 のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を有する V H ドメイン、及び / 又は配列

50

番号：70、72、74、76若しくは103のアミノ酸配列、又はこれらと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体を提供する。

【0123】

更なる好ましい実施形態は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：69、71、73若しくは75のアミノ酸配列を有するVHドメイン、及び3つの軽鎖CDRsを含むVLDドメインを含む抗体を提供する。好ましくは、前記軽鎖CDRsは、配列番号4、5及び6；又は10、11及び12；又は16、17及び18、又は22、23及び24、又は88、89及び90を有する。

【0124】

更なる好ましい実施形態は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：69のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVHドメイン、及び/又は配列番号：70のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体を提供する。

【0125】

更なる好ましい実施形態は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：71のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVHドメイン、及び/又は配列番号：72のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体を提供する。

【0126】

更なる好ましい実施形態は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：73のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVHドメイン、及び/又は配列番号：74のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体を提供する。

【0127】

更なる好ましい実施形態は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：75のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVHドメイン、及び/又は配列番号：76のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体を提供する。

【0128】

更なる好ましい実施形態は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：69のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVHドメイン、及び/又は配列番号：103のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体を提供する。

【0129】

配列番号：69のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVHドメイン、及び/又は配列番号：103若しくは70のアミノ酸配列又はこれと実質的に相同的な配列を有するVLDドメインを含む抗体が特に好ましい。

【0130】

更なる実施形態においては、本発明は、CXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、配列番号：35（前記抗体はC-9P21 scFvとも呼ばれる）、配列番号：46（前記抗体はB-1M22 scFvとも呼ばれる）、配列番号：57（前記抗体はC-1I24 scFvとも呼ばれる）、配列番号：68（前記抗体はD-1K21 scFvとも呼ばれる）、若しくは配列番号：101（前記抗体は9N10 scFvとも呼ばれる）のアミノ酸配列を含み、又はCXCR4と結合し、CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する前記配列のいずれかの断片、又は前記配列のいずれかに実質的に相同的な配列を含む抗体を提供する。

【0131】

C-9P21又は9N10配列をベースとする抗体が特に好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

本発明は、モノクローナル抗体 C - 9 P 2 1、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、D - 1 K 2 1 及び 9 N 1 0 により例示され、その一本鎖形態を表 1、2、3、4 及び 5 に示す（それぞれ、配列番号：35、46、57、68 及び 101）。抗体 C - 9 P 2 1、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、D - 1 K 2 1 及び 9 N 1 0 の完全長 I g G 形態が製造され、それらの配列を、それぞれ表 6、7、8、9 及び 10 に示す。C - 9 P 2 1、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、D - 1 K 2 1 及び 9 N 1 0 抗体の C D R ドメイン、V H 及び V L ドメインを表 1 ~ 5 及び図 1 ~ 5 に示す。これらの C D R ドメイン又は V H 及び V L ドメイン（又はこれらと実質的に相同的な配列）を含む抗体は、本発明の好ましい態様である。C - 9 P 2 1 又は 9 N 1 0 をベースとする抗体が特に好ましい。

10

【 0 1 3 3 】

本発明の好ましい実施形態は、好ましくは配列番号：34 によりコードされる、配列番号：35 を含むか、又はそれからなる C - 9 P 2 1 抗体の s c F v 形態である。更に好ましくは、抗体は、図 1 に示すアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり、好ましくは、この抗体は、図 1 に示す核酸配列によりコードされる。

【 0 1 3 4 】

本発明の他の好ましい実施形態は、好ましくは配列番号：45 によりコードされる、配列番号：46 を含むか、又はそれからなる B - 1 M 2 2 抗体の s c F v 形態である。更に好ましくは、この抗体は、図 2 に示すアミノ酸配列を含むか、それからなり、好ましくは、この抗体は図 2 に示す核酸配列によりコードされる。

20

【 0 1 3 5 】

本発明の他の好ましい実施形態は、好ましくは配列番号：56 によりコードされる、配列番号：57 を含むか、又はそれからなる C - 1 I 2 4 抗体の s c F v 形態である。更に好ましくは、この抗体は、図 3 に示すアミノ酸配列を含むか、それからなり、好ましくは、この抗体は図 3 に示す核酸配列によりコードされる。

【 0 1 3 6 】

本発明の他の好ましい実施形態は、好ましくは配列番号：67 によりコードされる、配列番号：68 を含むか、又はそれからなる D - 1 K 2 1 抗体の s c F v 形態である。更に好ましくは、この抗体は、図 4 に示すアミノ酸配列を含むか、それからなり、好ましくは、この抗体は図 4 に示す核酸配列によりコードされる。

30

【 0 1 3 7 】

本発明の他の好ましい実施形態は、好ましくは配列番号：100 によりコードされる、配列番号：101 を含むか、又はそれからなる 9 N 1 0 抗体の s c F v 形態である。更に好ましくは、この抗体は、図 5 に示すアミノ酸配列を含むか、それからなり、好ましくは、この抗体は図 5 に示す核酸配列によりコードされる。

【 0 1 3 8 】

他の好ましい実施形態は、C - 9 P 2 1、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、D - 1 K 2 1 及び 9 N 1 0 の I g G 形態であり、好ましくは全長 I g G 形態である。これらの任意の抗体の I g G 1 抗体が最も好ましい。

【 0 1 3 9 】

したがって、本発明の他の好ましい実施形態は、配列番号：108（アミノ酸）の重鎖及び / 又は配列番号：109（アミノ酸）の軽鎖を含む全長 I g G 抗体である。また、好ましくは、配列番号：106 によりコードされる重鎖及び / 又は配列番号：107 によりコードされる軽鎖を含む I g G 抗体である。当然に、I g G 抗体が、実質的に同一の 2 本の重鎖及び実質的に同一の 2 本の軽鎖を含むであろうことが理解される。

40

【 0 1 4 0 】

本発明の他の好ましい実施形態は、配列番号：112（アミノ酸）の重鎖及び / 又は配列番号：113（アミノ酸）の軽鎖を含む全長 I g G 抗体である。また、好ましくは、配列番号：110 によりコードされる重鎖及び / 又は配列番号：111 によりコードされる軽鎖を含む I g G 抗体である。

50

【0141】

本発明の他の好ましい実施形態は、配列番号：116（アミノ酸）の重鎖及び／又は配列番号：117（アミノ酸）の軽鎖を含む全長IgG抗体である。また、好ましくは、配列番号：114によりコードされる重鎖及び／又は配列番号：115によりコードされる軽鎖を含むIgG抗体である。

【0142】

本発明の他の好ましい実施形態は、配列番号：120（アミノ酸）の重鎖及び／又は配列番号：121（アミノ酸）の軽鎖を含む全長IgG抗体である。また、好ましくは、配列番号：118によりコードされる重鎖及び／又は配列番号：119によりコードされる軽鎖を含むIgG抗体である。

10

【0143】

本発明の他の好ましい実施形態は、配列番号：108（アミノ酸）の重鎖及び／又は配列番号：125（アミノ酸）の軽鎖を含む全長IgG抗体である。また、好ましくは、配列番号：106によりコードされる重鎖及び／又は配列番号：123によりコードされる軽鎖を含むIgG抗体である。

C-9P21又は9N10配列をベースとする抗体が特に好ましい。

本発明の更なる実施形態においては、VH CDR1は、配列番号：126（S/YX₃M/IH/S）、又は配列番号：127（X₁YX₃MH）、又は配列番号：128（SYX₃MH）を有するか、含む。

【0144】

これらの実施形態においては、X₁はS又はGであってもよく、好ましくはSである。X₃は任意のアミノ酸であってもよく、好ましくは、G又はW又はY又はAであり、最も好ましくはWである。本実施形態の好ましいVH CDR1配列は、配列番号：1、7、13又は19である。特に好ましいVH CDR1は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するか、又は含む。

20

【0145】

本発明の更なる実施形態においては、VH CDR2は、配列番号：129（X₁IX₃X₄DGSX₈X₉X₁₀YADSVK G）のアミノ酸配列を有するか、又は含む。これらの実施形態においては、X₁、X₃、X₄、X₈、X₉及びX₁₀は任意のアミノ酸であってもよい。好ましくは、これらXの1つ又それ以上、好ましくは全ては、以下の群から選択される：X₁はV又はRであり、（好ましくはR）、X₃はS又はN（好ましくはN）、X₄はY又はS（好ましくはS）、X₈はN又はS（好ましくはS）、X₉はK又はT（好ましくはT）、X₁₀はY又はSである（好ましくはS）。したがって、好ましいVH CDR2は、配列番号：130（V/RIS/NY/SDGSN/SK/TY/SYADSVK G）を有するか、又は含む。例えば、本実施形態の好ましいVH CDR2配列は、配列番号：2又は14を有するか、又は含む。配列番号：2が特に好ましい。

30

【0146】

本発明の更なる実施形態においては、VH CDR2は、配列番号：131（X₁IX₃PX₅X₆GX₈X₉NYAQKFQG）のアミノ酸を有するか、又は含む。これらの実施形態においては、X₁、X₃、X₅、X₆、X₈及びX₉は任意のアミノ酸であってもよい。好ましくは、これらXの1つ又それ以上、好ましくは全ては、以下の群から選択される：X₁はR又はGであり（好ましくはR）、X₃はN又はIであり（好ましくはN）、X₅はN又はIであり（好ましくはN）、X₆はS又はFであり（好ましくはS）、X₈はG又はTであり（好ましくはG）、X₉はT又はAである（好ましくはT）。したがって、好ましいVH CDR2は、配列番号：132（R/GIN/IPN/IS/FGG/TT/ANYAQKFQG）のアミノ酸配列を有するか、又は含む。例えば、本実施形態の好ましいVH CDR2は、配列番号：8及び20を有するか、又は含む。配列番号：20が特に好ましい。

40

【0147】

CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しないという本発明の抗体の能力（C

50

X C R 4 抗体について以前には開示されていなかった能力) のため、本発明の抗体が公知の抗 C X C R 4 抗体に対して異なるエピトープと結合すると考えられる (例えば、アポトーシスから C X C R 4 + 細胞を保護するエピトープ、又はアポトーシスのメカニズムに関与しないか、又はアポトーシスを引き起こさないエピトープであるが、C X C R 4 に対するリガンドの結合には関与する)。

【0148】

したがって、C X C R 4 に対する結合について、本明細書で開示される抗体 (C - 9 P 2 1、C 1 I 2 4、D - 1 K 2 1、B - 1 M 2 2 又は 9 N 1 0) のいずれかと競合し得る抗体が提供される。

【0149】

本明細書で用いられる場合、「競合抗体」という用語は、「関連抗体」と実質的又は基本的に同じ、又は一様に同一にエピトープについて結合する抗体を意味する。「競合抗体」には、エピトープ特異性が重複した抗体が含まれる。したがって、競合抗体は、C X C R 4 に対する結合について関連抗体と効果的に競合することができる。好ましくは、競合抗体は、関連抗体と同じエピトープと結合し得る。また、競合抗体は、好ましくは、関連抗体と同一のエピトープ特異性を有する。

【0150】

本明細書で用いられる場合、「関連抗体」は、ヒト C X C R 4 の細胞外ドメイン内でエピトープと結合し、C D R 配列の 1 又はそれ以上を有するものが本明細書に定義されており、好ましくは、本明細書で定義される場合、V H 及び V L ドメインは、更に好ましくは配列番号：69 の V H 及び配列番号：70 の V L、又は配列番号：71 の V H 及び配列番号：72 の V L、又は配列番号：73 の V H 及び配列番号：74 の V L、又は配列番号：75 の V H 及び配列番号：76 の V L、又は配列番号：69 の V H 及び配列番号：103 の V L である。最も好ましい関連抗体は、C - 9 P 2 1、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、D - 1 K 2 1 及び 9 N 1 0 から選択される。

【0151】

1 種又はそれ以上の競合抗体の同定は、現在では容易な技術的事項であり、C - 9 P 2 1、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、D - 1 K 2 1 及び 9 N 1 0 の I g G のような関連抗体が提供される。競合抗体の同定が、関連抗体との比較において特定されるように、それは、実際にはいずれか一方又は両方の抗体の結合が、競合抗体を同定するために必要な任意の方法でエピトープを実際に決定することが理解されるであろう。しかし、所望であれば、標準的方法を用いてエピトープマッピングを実施することができる。

【0152】

例として、エピトープの同定及び定義のための以下の方法が本明細書において言及される。C X C R 4 のアミノ酸配列は公知であり、したがって、例えば、P e p s c a n アッセイを用い、エピトープマッピングのために合成ペプチドを用いてもよい。部位特異的突然変異誘発も、エピトープマッピングにおける強力な手段であり、免疫複合体形成における、単一のアミノ酸の役割を評価するために用いることができる。タンパク質フットプリンティングは、エピトープが抗体 - 抗原複合体として結合する場合に切断から保護されているという事実に依存している。酵素免疫測定アッセイ (E L I S A) 及び血液凝集及びスロットプロットティングも、エピトープマッピングに用いることができる。抗体を用いた抗原の結晶化は、非線形エピトープをマッピングするために用いることができる。このような方法を実施するためのプロトコールは広く利用可能であり、当業者は、エピトープマッピングの適切な代替の方法を知っているであろう。

【0153】

競合抗体の同定は、抗体の競合を評価し得る、種々の免疫学的スクリーニングアッセイの任意の 1 つを用いて容易に決定することができる。このような全てのアッセイは当該技術分野において通常であり、本明細書に更に詳細に記載される。米国特許第 6, 342, 219 号、第 6, 524, 583 号、第 7, 056, 509 号、第 6, 887, 468 号、第 6, 342, 221 号、第 6, 676, 941 号、第 6, 703, 020 号及び第 6

10

20

30

40

50

、416、758号のそれぞれは、特に、競合抗体をどのように特定するかに関する現在の教示を更にもっと補うために、参照として本明細書に組み入れられる。

【0154】

例えば、種々の起源動物から得られ、又は種々のアイソタイプであるとされている、試験すべき試験抗体の場合、基準及び試験抗体を混合し（又は予備吸着し）、CXCR4含有組成物、好ましくはCXCR4を発現する細胞、CXCR4を示すファージ、又は固定化CXCR4を含むバイオチップに適用する、簡易な競合アッセイを使用することができる。ELISAをベースとするプロトコールは、このような簡易な競合試験において用いるのに特に適切である。

【0155】

特定の実施形態においては、基準抗体（例えば、C-9 P21、C1I24、D1K21、B-1M22又は9N10）を、種々の量の試験抗体（例えば、1:10、1:100又は1:1000）と、抗原組成物に適用する前に、一定期間予め混合する。他の実施形態においては、基準抗体及び種々の量の試験抗体を、抗原組成物にさらしている間に簡単に混合することができる。いずれの事象においても、種又はアイソタイプ二次抗体を用いることにより、基準抗体の結合のみを検出することができ、その結合は、結合のために「競合する」試験抗体の存在により減少するであろう。

【0156】

基準抗体と任意の試験抗体（種又はアイソタイプに関係なく）との間の抗体競合試験の実施において、最初に基準抗体（例えば、C-9 P21、C1I24、D1K21、B-1M22又は9N10）を、例えば、次の同定に検出可能な、ビオチン、又は酵素若しくは放射性標識のような検出可能な標識で標識する。このケースにおいては、標識された基準抗体を、種々の比（例えば、1:10、1:100又は1:1000）で試験抗体と予備混合又はインキュベートして試験を行い、次いで、標識された基準抗体の反応性をアッセイし、これを、潜在的に競合しない試験抗体をインキュベーション中でインキュベートする対照の値と比較する。

【0157】

アッセイは、抗体結合をベースとする、さまざまな範囲の免疫学的アッセイの任意の1つであってもよく、ビオチニル化抗体の場合にはストレプトアビジンを用い、又は酵素標識と関連する発色物質を用い（ペルオキシダーゼ酵素と共に3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質等）、又は放射性標識を容易に検出することにより、基準抗体を、それらの標識を検出することにより検出する。CXCR4について基準抗体と競合する抗体は、結合標識において証明されるように、CXCR4との基準抗体の結合を効果的又は有意に減少することができるであろう。

【0158】

完全に不適切な抗体の存在下に、（標識された）基準抗体の反応性は高い値で制御されるだろう。制御された低い値は、競合が生じ、標識抗体の結合が減少する場合に、標識された基準抗体（例えば、C-9 P21、C1I24、D1K21、B-1M22又は9N10）を、正確に同じタイプの未標識抗体とインキュベートすることにより得られる。

試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下における、標識抗体の反応性における有意な減少は、CXCR4に対する結合についての標識抗体と「競合する」試験抗体を示す。

【0159】

有意な減少は、結合の減少において、「再現可能」、すなわち常に観察される。本発明に関し、「有意な減少」は、約1:10～約1:100の任意の比において、少なくとも約20%、更に好ましくは少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60又は65%、更に好ましくは約70%、約75%、又は約80%の再現可能な減少（ELISA又は他の適切なアッセイにおいてCXCR4に対する基準抗体の結合において）として定義される。更にストリンジェントな競合活性を有する抗体は、少なくとも約82%、約85%、約88%、約90%、約92%又は約95%ほどの再現可能な減少（ELISA又は他の適切なアッセイにおいてCXCR4に対する基準抗体の結合において）を

10

20

30

40

50

示すであろう。本発明を実施するために、必ずしも必要でないが、約 99%、約 98%、約 97%、又は約 96% ほどの CXCR4 に対する基準抗体の結合における再現可能な減少を示すような、完全又は完全に近い競合は、確実に除外するものではない。

【0160】

上記に記載した方法は、適切な競合アッセイの唯一の例である。当業者は、適切な方法及び変形を知っているであろう。他の競合アッセイを後述する。

【0161】

フローサイトメトリーを用いて、他の競合アッセイを実施する前に、ある量の試験抗体を、例えばビオチニル化により標識すべきである。ビオチニル化生成物の機能性（細胞結合特性の保持）、及び CXCR4 + 細胞の固定数に対する最大に近い結合を与える、本発明のビオチニル化抗体（Ab1）の最小濃度を決定する。対数増殖培養物から集めた、 10^6 細胞の全てを、適切な温度で適切な時間、例えば、4℃ で 1 時間、種々の濃度の抗体とインキュベートする。細胞を洗浄し、適切な温度で適切な時間、例えば、4℃ で更に 1 時間、適切な検出抗体とインキュベートする。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーにより分析する。各試験抗体について、抗体濃度に対する蛍光強度の平均値（MFI）をプロットすることにより、データから飽和曲線を作成する。

【0162】

他の競合アッセイについては、CXCR4 + 細胞を上述のようにして調製し、固定濃度の標識（ビオチニル化）抗体（bio-Ab1）及び高濃度の非標識競合抗体の混合物を二連で処理し得る。固定濃度は、上記で決定した、固定数の腫瘍細胞に対する妥当な蛍光シグナルを生成する抗体の最小濃度である。理想的には、nM で表わされる、この固定濃度は、平衡状態（ K_D ）で試験抗体の親和性よりも低いべきである。このケースにおいては、記載した方法は、競合抗体の効果の評価に用いることができる（Schodrin 及び Kranz, 1993, Binding affinity and inhibitory properties of a single-chain anti-T cell receptor antibody. J Biol Chem 268: 25722-7）。抗体混合物を、適切な温度で適切な時間、例えば、4℃ で 1 時間、標的細胞とインキュベートする。細胞を洗浄し、ビオチニル化抗体の細胞結合を、FITC-標識ストレプトアビジンとのインキュベーションにより表す。各試験試料（bio-Ab1 + Ab2）についての平均の蛍光読み取りからバックグラウンドの蛍光（PBS-5% FCS）を引いた後、阻害の割合を、以下の式に従い、各 Ab2 濃度「c」について計算する：

$$\text{阻害\%} = (1 - \text{MFI}^{\text{bio-Ab1+Ab2 } c} / \text{MFI}^{\text{bio-Ab1}}) \times 100$$

が計算される。

【0163】

CXCR4 と結合することができ、本明細書に開示される任意の抗体と競合し得る任意の抗体が予期されるが、好ましい抗体を以下に示す。したがって、好ましい一部の実施形態においては、以下のものが提供される。

【0164】

ヒト CXCR4 の細胞外ドメイン内のエピトープと結合し、好ましくは CXCR4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、前記抗体は

(a) 3つの CDRs を含む少なくとも 1つの重鎖可変領域と、3つの CDRs を含む少なくとも 1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記軽鎖可変領域が、

(i) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有する可変軽（VL）CDR1；

(ii) 配列番号：5 のアミノ酸配列を有する VL CDR2；及び / 又は

(iii) 配列番号：6 のアミノ酸配列を有する VL CDR3 を含み；及び / 又は

前記重鎖可変領域が、

(iv) 配列番号：1 のアミノ酸配列を有する可変重（VH）CDR1；

(v) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有する VH CDR2；及び / 又は

10

20

30

40

50

(v i) 配列番号：3のアミノ酸配列を有するVH CDR3；を含み、
又は(b)前記抗体はCXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である。

【0165】

ヒトCXCR4の細胞外ドメイン内のエピトープと結合し、好ましくはCXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、前記抗体は

(a) 3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記軽鎖可変領域が、

(i) 配列番号：10のアミノ酸配列を有する可変軽(VL)CDR1；

(ii) 配列番号：11のアミノ酸配列を有するVL CDR2；及び/又は

(iii) 配列番号：12のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含み；及び/又は前記重鎖可変領域が、

(iv) 配列番号：7のアミノ酸配列を有する可変重(VH)CDR1；

(v) 配列番号：8のアミノ酸配列を有するVH CDR2；及び/又は

(vi) 配列番号：9のアミノ酸配列を有するVH CDR3；を含み、

又は(b)前記抗体はCXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である。

10

【0166】

ヒトCXCR4の細胞外ドメイン内のエピトープと結合し、好ましくはCXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、前記抗体は

(a) 3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記軽鎖可変領域が、

(i) 配列番号：16のアミノ酸配列を有する可変軽(VL)CDR1；

(ii) 配列番号：17のアミノ酸配列を有するVL CDR2；及び/又は

(iii) 配列番号：18のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含み；及び/又は前記重鎖可変領域が、

(iv) 配列番号：13のアミノ酸配列を有する可変重(VH)CDR1；

(v) 配列番号：14のアミノ酸配列を有するVH CDR2；及び/又は

(vi) 配列番号：15のアミノ酸配列を有するVH CDR3；を含み、

又は(b)前記抗体はCXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である。

20

30

【0167】

ヒトCXCR4の細胞外ドメイン内のエピトープと結合し、好ましくはCXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、前記抗体は

(a) 3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記軽鎖可変領域が、

(i) 配列番号：22のアミノ酸配列を有する可変軽(VL)CDR1；

(ii) 配列番号：23のアミノ酸配列を有するVL CDR2；及び/又は

(iii) 配列番号：24のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含み；及び/又は前記重鎖可変領域が、

(iv) 配列番号：19のアミノ酸配列を有する可変重(VH)CDR1；

(v) 配列番号：20のアミノ酸配列を有するVH CDR2；及び/又は

(vi) 配列番号：21のアミノ酸配列を有するVH CDR3；を含み、

又は(b)前記抗体はCXCR4と結合する抗体(a)と競合し得る抗体である。

40

【0168】

ヒトCXCR4の細胞外ドメイン内のエピトープと結合し、好ましくはCXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有し、前記抗体は

(a) 3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記軽鎖可変領域が、

50

- (i) 配列番号： 8 8 のアミノ酸配列を有する可変軽 (V L) C D R 1 ；
 (i i) 配列番号： 8 9 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；及び / 又は
 (i i i) 配列番号： 9 0 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含み；及び / 又は
 前記重鎖可変領域が、
 (i v) 配列番号： 1 のアミノ酸配列を有する可変重 (V H) C D R 1 ；
 (v) 配列番号： 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；及び / 又は
 (v i) 配列番号： 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；を含み、
 又は (b) 前記抗体は C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 1 6 9 】

一実施形態においては、前記抗体は、

10

- (a) 配列番号： 6 9 の V H ドメイン及び配列番号： 7 0 の V L ドメインを有するか；
 又は
 (b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 1 7 0 】

一実施形態においては、前記抗体は、

- (a) 配列番号： 7 1 の V H ドメイン及び配列番号： 7 2 の V L ドメインを有するか；
 又は
 (b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 1 7 1 】

一実施形態においては、前記抗体は、

20

- (a) 配列番号： 7 3 の V H ドメイン及び配列番号： 7 4 の V L ドメインを有するか；
 又は
 (b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 1 7 2 】

一実施形態においては、前記抗体は、

- (a) 配列番号： 7 5 の V H ドメイン及び配列番号： 7 6 の V L ドメインを有するか；
 又は
 (b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 1 7 3 】

一実施形態においては、前記抗体は、

30

- (a) 配列番号： 6 9 の V H ドメイン及び配列番号： 1 0 3 の V L ドメインを有するか；
 又は
 (b) C X C R 4 と結合する抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 1 7 4 】

好ましくは、抗体 (b) は、本明細書で開示された C D R 配列の 1 又はそれ以上、V H ドメイン及び / 又は V L ドメインを有する。

【 0 1 7 5 】

好ましくは、抗体 (b) は抗体 (a) と同じエピトープと結合し得る。

【 0 1 7 6 】

実質的に相同的な配列の特定の例は、開示されたアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列である。特定の実施形態においては、C X C R 4 と結合し、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する本発明の抗体は、配列番号： 7 0、7 2、7 4、7 6 又は 1 0 3 のアミノ酸配列に対し、少なくとも約 7 5 %、更に好ましくは少なくとも約 8 0 %、更に好ましくは少なくとも約 8 5 %、更に好ましくは少なくとも約 9 0 % 又は 9 5 %、最も好ましくは約 9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % のアミノ酸配列の同一性を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域、及び / 又は配列番号： 6 9、7 1、7 3、又は 7 5 のアミノ酸配列に対し、少なくとも約 7 5 %、更に好ましくは少なくとも約 8 0 %、更に好ましくは少なくとも約 8 5 %、更に好ましくは少なくとも約 9 0 % 又は 9 5 %、最も好ましくは約 9 7 %、又は 9 8 % 又は 9 9 % のアミノ酸配列の同一性を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域を含む。

40

50

【 0 1 7 7 】

実質的に相同的な配列の他の好ましい例は、開示されたアミノ酸の保存的アミノ酸置換を含む配列である。

【 0 1 7 8 】

実質的に相同的な配列の他の好ましい例は、開示された 1 又はそれ以上の C D R 領域において 1、2、3 又は 4 個、好ましくは 1 又は 2 個の変更したアミノ酸を含む配列である。このような変更は保存的又は非保存的アミノ酸置換であるか、又はそれらの混合である。

【 0 1 7 9 】

このような全ての実施形態においては、好ましい変更は保存的アミノ酸置換である。

10

【 0 1 8 0 】

全ての実施形態においては、実質的に相同的な配列を含む抗体は、C X C R 4 との結合能力を保持しており、好ましくは、本明細書に開示した他の特性の 1 又はそれ以上、例えば、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性、及び / 又は拮抗的特性を保持している。

【 0 1 8 1 】

本発明の他の実施形態は、C X C R 4 と結合し、好ましくは本明細書に開示された他の特性の 1 又はそれ以上、例えば、C X C R 4 発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない特性、及び / 又は拮抗的特性を有し、本発明の抗体、本発明の V H 若しくは V L ドメイン、又は本発明の C D R s の 1 又はそれ以上を含む結合タンパク質を提供する。好ましい実施形態においては、このような結合タンパク質は抗体である。

20

【 0 1 8 2 】

本発明の好ましい抗体は、3つの C D R s を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3つの C D R s を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含む。これらの C D R s の例及び好ましい配列を本明細書に開示する。

【 0 1 8 3 】

本明細書で用いられる場合、「C X C R 4」という簡易な用語は、特に示さないか、科学用語から明瞭でない場合、C X C ケモカイン受容体 4 (フュージン、H M 8 9、L E S T R、H U M S T R と呼ばれる) を意味する。

【 0 1 8 4 】

C X C R 4 は遊離の C X C R 4、例えば組み換え型又は精製型 C X C R 4 であってもよいが、好ましくは天然型、例えば細胞表面に存在する。

30

【 0 1 8 5 】

本発明の抗体又は結合タンパク質は C X C R 4 の断片、特に C X C R 4 の細胞外ドメインの全て又は一部を含むか、それらからなる断片にも結合することができ、又は C X C R 4 又は C X C R 4 の断片を含む要素に結合することができる。実際、本発明の抗体のエピトープは、C X C R 4 の細胞外ドメインに位置する。

【 0 1 8 6 】

「C X C R 4」は、任意の形態の C X C R 4 をも意味し、特に C X C R 4 は哺乳動物種を超えて保存されている。したがって、本発明の抗体又は抗体断片は、例えばヒト、サル (例えば、カニクイザル又はアカゲザル / 赤毛猿)、マウス (ネズミ科の動物)、乳牛 (ウシ亜科の動物)、ラット、ハムスター、フェレット、モルモット及び / 又はウサギの C X C R 4 と結合し得る。好ましくは、本発明の抗体又は抗体断片は、少なくともヒトの C X C R 4 と結合する。したがって、特に示さない限り、本明細書における「C X C R 4」に対するあらゆる言及は、「ヒト C X C R 4」を意味するものと読むことができる。好ましい特定の実施形態においては、本発明の抗体又は抗体断片は、少なくともヒト及びサル (例えば、カニクイザル又はアカゲザル / 赤毛猿) の C X C R 4 と結合する。他の好ましい実施形態においては、本発明の抗体又は抗体断片は、少なくともヒト及びマウスの C X C R 4 と結合する。他の好ましい実施形態においては、本発明の抗体又は抗体断片は、ヒト、サル及びマウスの C X C R 4 と結合する。

40

50

【0187】

本明細書で用いられる場合、本明細書の抗体又は抗体断片との関連で、「CXCR4と結合する」又は「抗CXCR4」という用語は、以下の1又はそれ以上；好ましくは、以下の1以上；最も好ましくは以下の全てであり得る抗体又は抗体断片を意味する；

(a) 例えば、フローサイトメトリー又は免疫組織科学により評価し、細胞、例えば、CXCR4又はCXCR4を自然に発現する細胞でトランスフェクションした細胞の表面で発現するCXCR4と結合し；

(b) 例えば、非還元条件下でウェスタンブロットにおいてCXCR4との結合により評価し、構造的に依存して（例えば、非線形）CXCR4エピトープと結合し；

(c) 少なくともヒトのCXCR4と、更に好ましくはヒト及びサル（ヒト及びマウスのCXCR4と、最も好ましくはヒト、サル及びマウスのCXCR4と結合し；

(d) 本明細書の他の箇所でも議論したように、ヒト及びサルのCXCR4と、又はヒト及びマウスのCXCR4と同様の親和性で、例えば10nM以下、好ましくは5nM以下、更に好ましくは3nM以下又は2nM以下、例えば1nM以下のKdで結合する。

【0188】

本明細書で用いられる場合、本明細書の抗体又は抗体断片は、以下の1又はそれ以上；以下の1以上、最も好ましくは以下の機能的特性の全てであり得る。

(e) CXCR4発現細胞の重大なアポトーシスを誘発しない；

(f) CXCR4のその1又はそれ以上のリガンドへの結合を遮断又は阻害し、例えば、CXCR4の少なくともSDF-1又はCXCR4についての他のリガンド、例えば、化合物AMD-3100への結合を遮断又は阻害し、好ましくはCXCR4のSDF-1及びAMD-3100の少なくとも両方への結合を阻害し；

(g) CXCR4受容体からの下流シグナル事象を遮断又は阻害し、例えば、SDF-1のようなCXCR4リガンドへのCXCR4が介在する細胞応答を阻害例えば、好ましくはSDF-1のようなCXCR4-1に対する応答においてカルシウムイオンの放出を阻害し、又はCXCR4細胞の移動を誘発するリガンド（例えば、SDF-1）を遮断又は阻害する。

(h) 本明細書の他の箇所に開示されているように、CXCR4+細胞のADCCを誘発し；

(i) インビボにおいて抗腫瘍効果を誘発し；

(j) 腫瘍を有する動物に投与することにより腫瘍を局部にとどめ；

(k) CXCR4+細胞のCDCを誘発し；

(l) インビトロ又はインビボにおいて、抗ウイルス効果、特に抗HIV効果を誘発し；

(m) CXCR4受容体についてアゴニスト活性を阻害しない。

【0189】

CXCR4+細胞の結合に関し、本発明の抗体はCXCR4+細胞と結合し、CXCR4⁻細胞と有意に結合しないことを理解すべきである（実施例2において示すように）。

【0190】

「CXCR4⁻細胞と有意に結合しない」という用語は、CXCR4⁻細胞との抗体のあらゆる結合が治療又は診断目的のために前記抗体の使用を妨げないことであると理解すべきである。したがって、CXCR4⁻との「有意でない」結合は、抗体のCXCR4⁻細胞との結合が、1種又はそれ以上のCXCR4⁺細胞との結合よりも有意に弱いことを含むか、バックグラウンドレベルである、例えば、陰性対照実験において観察されるレベルに匹敵するかそれから有意に異なると考えることができる。

【0191】

治療又は診断目的のために、主な検討事項は、抗体が、治療又は診断適用の際に接触し得る抗体と任意のCXCR4⁻細胞よりも、1種又はそれ以上のタイプのCXCR4⁺細胞と強く結合しなければならないことである。

10

20

30

40

50

【0192】

本発明の抗体は、「CXCR4 - 特異的」として言及される場合がある。「CXCR4 - 特異的」という用語は、抗体のCXCR4発現細胞との結合が、治療又は診断目的のために前記抗体の使用を可能にするのに十分に特異的であると解釈すべきである。本明細書に開示されるCXCR4 - 特異的抗体は、CXCR4（例えば、細胞表面上の）と結合する能力を有するが、非-CXCR4タンパク質とは有意に結合しない（例えば、CXCR4 - 細胞とは有意に結合しない）。当業者は、標的CXCR4⁺細胞（例えば、トランスフェクトされ、CXCR4を発現する細胞、又は自然にCXCR4を発現する細胞、例えば、Ramos細胞、Jurkat細胞、CCRF-CEM細胞、Raji細胞）との結合強度を、1種又はそれ以上のCXCR4⁻細胞、例えば、HEK293T細胞又はDT

10

20

【0193】

CXCR4が、それを発現する細胞タイプに依存し、いくらか異なる構造を生じる傾向にあることが先行技術に開示されている。したがって、本発明の抗体は、それらが、CXCR4でトランスフェクションされるか、自然にCXCR4を発現する1種又はそれ以上の細胞型と結合し得る場合、細胞表面上のCXCR4と結合する能力を有すると考えられる。好ましい抗体は複数の細胞型上のCXCR4と結合する能力を有し、それ故、CXCR4の複数の構造と結合する能力を有する、例えば、本明細書に開示されるC-9P21

【0194】

当業者は、例えば、フローサイトメトリー及び適切なアッセイを用いてCXCR4⁻細胞と比較したCXCR4⁺細胞との結合が、実施例2及び3に開示されていることに気付くであろう。

【0195】

当該技術分野において周知の免疫組織化学的方法は、抗体の細胞又は試料との結合を採点することを用い得る。このようなアッセイは、特定の抗体の特異性を試験するため、又は組織試料中のCXCR4発現を検出するに用いることができ、手短に言えば、抗体は、例えば、陽性対照（CXCR4 - 陽性として知られる細胞）及び陰性対照（CXCR4 - 陰性として知られる細胞）を含むヒト組織の高密度アレイ上で試験することができる。膜形成性染色の強度は、4段階スケール（0、1、2、3）における目視検査によって評価し得る。好ましい抗体は、CXCR4⁺組織について、弱いか又は強い（すなわち、0を超えるスコア）、好ましくは強い免疫組織学的スコアを示す。

30

40

50

【0196】

前記で議論したように、本発明の抗体は、CXCR4⁺細胞（CXCR4発現細胞）の重大なアポトーシスを誘発しない特性を有する。「CXCR4⁺細胞の重大なアポトーシスを誘発しない」という用語は、抗体の存在下に誘発されるアポトーシスのレベルが、抗体の非存在下、例えば、陰性対照条件又はバックグラウンドレベル、例えば、培地のみの存在下に誘発されるアポトーシスのレベルに匹敵するか、又は有意に異なることを意味する。したがって、好ましくは、本発明の抗体は、天然、バックグラウンド、又はアポトーシスの対照レベルを超えて、アポトーシスの測定可能又は有意な増加を誘発しない。これは、抗体の非存在下に観察されるアポトーシスと比較し、重大な測定可能かつ重大なアポトーシスを誘発する、WO2008/060367（例えば図7）に開示されたMedarex抗体のような先行技術の抗体とは異なっている（本明細書の実施例10も参照されたい）。好ましくは、本発明の抗体は、0.4 µg/mLの濃度、例えば、以下に示す濃度、又は少なくとも0.4 µg/mL、1 µg/mL、2 µg/mL、3 µg/mL、4 µg/mL、5 µg/mL、6 µg/mL、7 µg/mL、8 µg/mL、9 µg/mL、10 µg/mL、11 µg/mL、12 µg/mL、15 µg/mL、20 µg/mL、25 µg/mL、30 µg/mL、40 µg/mL、50 µg/mL、75 µg

/mL及び100 µg/mLで、重大なアポトーシスを誘発しない(好ましくはIgG、例えばIgG1形態)。更に好ましくは、本発明の抗体は、インビトロにおいてCXCR4 + Ramos細胞において評価した場合に、重大なアポトーシスを誘発しない(例えば、実施例10に開示するようなアッセイを用いて評価した場合)。好ましくは、本発明の抗体は、0.14 µg/1×10⁵細胞の濃度、例えば、以下に示す濃度、又は少なくとも0.14 µg/1×10⁵細胞、0.25 µg/1×10⁵細胞、0.5 µg/1×10⁵細胞、1 µg/1×10⁵細胞、2 µg/1×10⁵細胞、3 µg/1×10⁵細胞、3.5 µg/1×10⁵細胞、4 µg/1×10⁵細胞、5 µg/1×10⁵細胞、10 µg/1×10⁵細胞、15 µg/1×10⁵細胞、20 µg/1×10⁵細胞、25 µg/1×10⁵細胞、30 µg/1×10⁵細胞及び35 µg/1×10⁵細胞を用いた場合に、
 10
 重大なアポトーシスを誘発しない。更に好ましい細胞はRAMOS細胞である。好ましくは、本発明の抗体は、治療に有用な濃度(例えば、0.4 µg/mLの濃度、例えば、以下に示す濃度、又は少なくとも0.4 µg/mL、1 µg/mL、2 µg/mL、3 µg/mL、4 µg/mL、5 µg/mL、6 µg/mL、7 µg/mL、8 µg/mL、9 µg/mL、10 µg/mL、11 µg/mL、12 µg/mL、15 µg/mL、20 µg/mL、25 µg/mL、30 µg/mL、40 µg/mL、50 µg/mL、75 µg/mL及び100 µg/mL)で用いた場合に重大なアポトーシスを誘発しない(好ましくはIgG、例えば、IgG1形態、好ましくは抗体濃度は血清中の抗体濃度である)。例として、CXCR4 + 細胞の重大なアポトーシスを誘発しない抗体は、アネキシンV結合に対して陽性であるとしてアポトーシス細胞を定義するアッセイにおいて抗体と
 20
 インキュベーションすることにより、10%以上の細胞がアポトーシスを引き起こさない抗体である。好ましいアッセイは実施例10に記載され、Ramos細胞と、10 µg/mL以下の濃度のIgG1抗体を必要とする。また、CXCR4 + 細胞の重大なアポトーシスを誘発しない抗体は、バックグラウンド又は対照レベル以上のアポトーシスにおける増加が、アネキシンV結合に対して陽性であるとしてアポトーシス細胞を定義するアッセイにおいて、前記バックグラウンド及び対照レベルにわたり最大の50%の増加である抗体である。好ましいアッセイを実施例10に開示し、Ramos細胞及び10 µg/mL以下の濃度のIgG1抗体の使用を必要とする。

【0197】

アポトーシスの誘発は、周知の標準法、例えば、アネキシンV染色を分析する方法を用いてアッセイすることができる(アネキシン染色を必要とする例示的方法について、実施例10を参照されたい)。簡単に言えば、細胞(例えば、Ramos細胞)を抗体(例えば、IgG1形式の抗体)と、適切な時間、例えば24又は48時間インキュベートし、細胞収集及びアネキシンV染色後に、効果をFACS分析(例えば、EasyCyteを用いて)により測定することができる。アネキシンV染色は、アポトーシス細胞を示すが、死細胞は、例えばPI染色により同定される(また、アポトーシス細胞から区別される)。
 30

【0198】

抗体C-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21及び9N10は、特に、SDF-1のようなCXCR4リガンドに対する応答におけるカルシウムイオンの放出を阻害することにより、CXCR4によるリガンド誘発シグナル伝達を阻害し、例えば、SDF-1のようなCXCR4リガンドに対するCXCR4介在性細胞応答を阻害し得ることがわかった(実施例6を参照されたい)。したがって、本発明の抗体は、好ましくは、特に、SDF-1のようなCXCR4リガンドに対する応答におけるカルシウムイオンの放出を阻害することにより、SDF-1のようなCXCR4リガンドに対するCXCR4介在性細胞応答を阻害し得る。特に、前記抗体は、好ましくは、SDF-1が誘発するカルシウム流を阻害し得る。適切なアッセイ法は公知であり、1つのアッセイを実施例6に開示する。
 40

【0199】

CXCR4からの下流シグナル伝達事象は、CXCR4によるリガンド誘発シグナル伝
 50

達、CXCR4リガンドに対するCXCR4介在性細胞応答、カルシウムイオンの放出、リガンド誘発性遊走等のような、本明細書に開示された、種々のCXCR4介在事象の「遮断」又は「阻害」は、問題となっている性質が抗体の非存在下に比べ、本発明の抗体の存在下に、測定可能又は有意に減少することを意味する。例えば、前記性質は、抗体の非存在下における結合に比べ、抗体の存在下に、少なくとも10、20、30又は40%、更に好ましくは、少なくとも45、50、55、60、65、70又は75%、より好ましくは少なくとも80%減少し得る。少なくとも85、90又は95%の減少は、特定の性質については期待される。

【0200】

少なくとも20%又は30%阻害におけるカルシウムイオンの放出(カルシウム流)の遮断又は阻害のケースにおいては、本発明の抗体について、少なくとも70%、75%、80%、又は95%以下の阻害まで上昇するのがしばしば示される(実施例6を参照されたい)。このような阻害を達成するために用いられる抗体の典型的な濃度は4 μ g/mL、10 μ g/mL又は100 μ g/mLである。本発明の特定の実施形態においては、インビトロにおいて、CXCR4+細胞、例えばCCRF-CEM細胞からのカルシウムイオンの放出を50%阻害まで上昇させることのできる抗体濃度(IC₅₀)は、好ましくは50nM未満、40nM、35nM又は30nM(又は30~50の任意の整数)、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM又は5nM(又は5~30の任意の整数)である。例えば、本発明のC-9P21抗体は、CCRF-CEM細胞について29nMのIC₅₀を有することがわかっている。9N10抗体は、CCRF-CEM細胞について3.85nMのIC₅₀を有することがわかっている。

【0201】

ある実施態様においては、抗体は、SDF-1のようなCXCR4のリガンドに対して、CXCR4+細胞の遊走又は走化性を遮断又は阻害し得る(実施例7を参照されたい)。遊走又は走化性の阻害は、標準法を用い、例えばトランスウェルアッセイを用いてアッセイすることができる。すなわち、走化性を可能にし、CXCR4を発現する細胞を、1つのチャンパー内で抗体と接触させ、適切なポアサイズを有するフィルターの膜により、SDF-1のようなCXCR4のリガンドを第一のチャンパーから分離して他のチャンパー内に置く。リガンドに向かう細胞の移動(走化性)における抗体の効果は、抗体の非存在下における走化性に対する、抗体の存在における走化性を比較することにより測定される。適切なアッセイを実施例7に開示する。少なくとも50%、また100%以下の遊走の阻害が、抗体の濃度に依存して示される。

【0202】

本発明の特定の実施形態においては、インビトロにおいて、CXCR4+細胞、例えば、CCRF-CEM細胞の細胞遊走の阻害を50%まで上昇させ得る抗体濃度(IC₅₀)は、好ましくは20 μ g/mL未満、15 μ g/mL(又は15~20の任意の整数)、10 μ g/mL(又は10~15の任意の整数)、5 μ g/mL(又は5~10の任意の整数)、4 μ g/mL、3 μ g/mL、2 μ g/mL又は1 μ g/mLである。例えば、本発明のC-9P21抗体は、CCRF-CEM細胞について、2.9 μ g/mLのIC₅₀を有することがわかった。本発明の特定の実施形態においては、インビトロにおいて、5 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、25 μ g/mL又は30 μ g/mL(又は6~30 μ g/mLの間の任意の整数)で100%阻害し得る。

【0203】

好ましくは、本発明の抗体(例えば、C-9P21、C-1I24、D-1K21、B-1M22、及び9N10)は、CXCR4の1又はそれ以上のリガンドへの結合を阻害し得る。好ましくは少なくともSDF-1の結合が阻害される。更に好ましくは、SDF-1及びAMD-3100への結合が阻害される。例えば、抗体C-9P21、C-1I24、9N10及びD-1K21は、そのリガンドSDF-1へのCXCR4の結合を阻害し得ることがわかった(実施例3)。抗体C-9P21、C-1I24及びD-1K21は、CXCR4の、CXCR4のAMD-3100への結合を阻害し得ることがわかつ

10

20

30

40

50

た（実施例 3）。カルシウム流における、それらの効果を考えると、B - 1 M 2 2 が C X C R 4 への結合についてリガンドとも競合することが予想される。

【 0 2 0 4 】

リガンドの C X C R 4 との「結合の遮断」又は「結合の阻害」は抗体の非存在下に対し、抗体の存在下に、リガンドの C X C R 4 との結合が、測定可能に、又は有意に減少すること、例えば、少なくとも 1 0、2 0、3 0 又は 4 0 %、更に好ましくは少なくとも 4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0 又は 7 5 %、より好ましくは少なくとも 8 0 % 減少することを意味する。リガンドの C X C R 4 との結合が少なくとも 8 5、9 0 又は 9 5 % 減少する実施態様も検討される。また、リガンドが最初に C X C R 4 と接触し、次いで抗体を加える場合、リガンドは、C X C R 4 に対する抗体の結合を阻害し得る。

10

【 0 2 0 5 】

抗体が、リガンドの C X C R 4 との結合を阻害し得るかどうかを測定するためのアッセイは周知であり、当業者には直ちに明らかである。適切なアッセイを実施例 3 に開示する。手短かに言えば、C X C R 4 + 細胞を S D F - 1（又は必要に応じて A M D - 3 1 0 0）と、又は S D F - 1（又は必要に応じて A M D - 3 1 0 0）なしでインキュベートし、抗体を加え、次いで、標識抗ヒト抗体で抗体を検出した。リガンドの C X C R 4 との結合を阻害する能力を有する抗体について、S D F - 1（又は必要に応じて A M D - 3 1 0 0）の存在下におけるプレインキュベーションは、C X C R 4 との抗体の結合の減少をもたらす。特に、自然に C X C R 4 を発現する R a m o s 細胞、J u r k a t 細胞又は C C R F - C E M 細胞との抗体の結合、及び S D F - 1 又は A M D - 3 1 0 0 を用いたプレインキュベーションが阻害される。また、試験される抗体を、リガンドとして、同時に細胞に加えることができ又は抗体を最初に加えることができる。

20

【 0 2 0 6 】

抗体が、リガンドの C X C R 4 との結合を遮断し得るかどうかを測定するための他のアッセイには、標識リガンド、例えば、放射性標識リガンドの使用が含まれる。

【 0 2 0 7 】

本発明の抗体の主なメカニズムではないが、本発明の抗体は、好ましくは、C X C R 4 + 細胞の抗体依存性細胞毒性（A D C C）を誘発する能力を有している。A D C C は、当該技術分野において周知の方法を用いてインビトロでアッセイすることができる。P B M C s の存在下に A D C C 溶解を評価するために C X C R 4 + 細胞、例えば、C C R F - C E M 細胞が蛍光標識で標識される、適切な方法を実施例 8 に開示する。また、例えば、C r 5 1 放出アッセイを用いてもよい。したがって本発明の抗体は、例えば、例えば、ヒト P B M C s の存在下に、インビトロにおいて、C X C R 4 + 細胞の少なくとも 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 2 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % 又は 9 8 % の死滅を引き起こし得る。1 0 0 % 又はほとんど 1 0 0 % の死滅を引き起こし得る抗体も含まれる。例えば、B - 1 M 2 2 抗体は、ある実験（基本的に、ヒト P B M C 及び B - 1 M 2 2 抗体の存在下に C X C R 4 + 細胞系 C C R F - C E M の 1 0 0 % の死滅が誘発される実施例 8 を参照されたい）において 1 0 0 %（又は実験誤差の結合を考えるとほとんど 1 0 0 %）の死滅を誘発することがわかっている。更に、I g G レベルにおいて、抗体 C - 9 P 2 1 及び C - 1 I 2 4 は、ヒト P B M C s の存在下に C X C R 4 + 細胞系 C C R F - C E M の少なくとも 5 0 %、5 5 % 又は 6 0 % の死滅を引き起こすことがわかり、抗体 D - 1 K 2 1 は、ヒト P B M C s の存在下に C X C R 4 + 細胞系 C C R F - C E M の少なくとも 1 5 %、2 0 % 又は 2 5 % の死滅を引き起こすことがわかった（実施例 8 を参照されたい）。

30

40

【 0 2 0 8 】

本発明の抗体の主なメカニズムではないが、A D C C は、ある用途、特にある治療用途に有利である。したがって、好ましい実施形態においては、抗体は、P B M C s の存在下に、C X C R 4 + 細胞、好ましくは C X C R 4 + 腫瘍細胞の A D C C を誘発し得る。他の実施形態においては、抗体は、A D C C を誘発しないか、又はわずかに誘発する。

【 0 2 0 9 】

50

本発明の抗体は、好ましくは、このようなA D C Cレベルを達成するのに必要な抗体濃度に関して適切な効果を有する。また、適切なインビトロ試験を実施例8に開示する。

【0210】

したがって、インビトロにおける、C X C R 4 + 細胞、例えばC C R F - C E M細胞の最大の半分の細胞溶解に必要な抗体濃度 (E C ₅₀) は、好ましくは、2000 ng / mL 未満、1500 ng / mL、1000 ng / mL、700 ng / mL、650 ng / mL、620 ng / mL、600 ng / mL、550 ng / mL、500 ng / mL、450 ng / mL、400 ng / mL、350 ng / mL、300 ng / mL、250 ng / mL、200 ng / mL、150 ng / mL、125 ng / mL、100 ng / mL、90 ng / mL、80 ng / mL、70 ng / mL、60 ng / mL、50 ng / mL、45 ng / mL、40 ng / mL、35 ng / mL、30 ng / mL、25 ng / mL、20 ng / mL、15 ng / mL、10 ng / mL、9 ng / mL、7 ng / mL、5 ng / mL、2 ng / mL、1 ng / mL、0.5 ng / mL又は0.25 ng / mLである。例えば、I g Gレベルで、本発明のC - 9 P 2 1抗体は、C C R F - C E M細胞について1852 mg / mLのE C ₅₀を有し、本発明の抗体C 1 I 2 4は、C C R F - C E M細胞について49.2 mg / mLのE C ₅₀を有することがわかった。本発明の抗体D - 1 K 2 1は79.9 ng / mLのE C ₅₀を有することがわかり、本発明の抗体B - 1 M 2 2は115.7 ng / mLのE C ₅₀を有することがわかった。

10

【0211】

ある実施形態においては、抗体は、C X C R 4 + 細胞の補体依存細胞毒性 (C D C) を誘発し得るが、他の実施形態においては、抗体はC D Cを誘発することができない。例えば、抗体B - 1 M 2 2及びC 1 I 2 4、特にC 1 I 2 4は、C X C R 4 + 細胞、例えばR a m o s細胞のC D Cを誘発する良好な能力を示した(実施例9参照)。

20

【0212】

C D Cの誘発は、周知の標準法を用い、例えば、ヒト血清の存在下にC D C溶解を評価するための、R a m o s細胞のようなC X C R 4 + 細胞を、蛍光標識で標識することによりアッセイすることができる。適切なアッセイを実施例9で議論する。

【0213】

他の好ましい特性には、本発明の抗体が投与された場合に、インビボにおける重大な毒性のないこと、及びインビボにおける他の重大な副作用のないことである。

30

【0214】

好ましくは、本明細書に開示された能力は、適切な対象レベルと比較した場合に、測定可能又は有意なレベルで、更に好ましくは統計的に有意なレベルで観察される。

【0215】

一部の抗体は、それが結合するようになる細胞内に内在化し得る。したがって、本発明のある実施形態においては、抗体は内在化し得る。抗体分子と付着する他の任意の薬剤が抗体分子内に内在化するので、この特性は、免疫複合体における使用にとって特に有利である。他の実施形態においては、有意な内在化は示されない。

【0216】

当業者は、例えば、フローサイトメーター又は共焦点顕微鏡による温度差動蛍光標識を用いた、内在化をアッセイする適切な方法を知っているであろう。適切なアッセイの例には、塩基性pH(細胞外で見られるように)で蛍光が最小であり、酸性pH(細胞内部で見られるように)で蛍光が最大である、pH感受性色素(例えば、C y p H e r 5 E)により標識した二次抗体を含む。

40

【0217】

C X C R 4の「リガンド」という用語には、自然に生産され、組換え的に発現し、又は研究室で合成される、S D F - 1のような天然のC X C R 4のリガンドが含まれる。この用語には、C X C R 4と結合し得るA M D - 3 1 0 0のような、C X C R 4の非天然又は改変リガンドも含まれる。

【0218】

50

「CXCR4 + 細胞」又は「CXCR4 発現細胞」は、その表面で、好ましくは少なくとも実質的に野生型の構造でCXCR4を発現する細胞を意味する。CXCR4細胞は、CXCR4について自然に陽性であるか、又はそれらは組換え型CXCR4を発現する形質転換体である。

【0219】

したがって、本発明を考慮すると、抗CXCR4抗体の範囲を製造することができ、本明細書の他の箇所で議論される任意の疾患、特に、癌（転移性癌を含む）、自己免疫疾患、炎症性疾患及び感染症、特にHIVのようなウイルス感染の治療を含む、種々の実施形態において用いることができる。

【0220】

明細書全体を通して用いられる場合、上限が後で特に示されない限り、「a」及び「an」は、基準の化合物又は工程の「少なくとも1」「少なくとも最初」、「1又はそれ以上」又は「複数」を意味する感覚で用いられる。したがって、本明細書で用いられる場合、「抗体」は「少なくとも最初の抗体」を意味する。任意の単一の薬剤の量と同様に、組み合わせの動作可能な限界及びパラメータは、本明細書の開示を考慮して当業者が知っているであろう。

【0221】

本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1種の本発明の抗CXCR4抗体、又はその抗原結合断片を含む組成物である。

【0222】

本明細書に定義される本発明の抗体、又はその一部若しくは断片をコードするヌクレオチド配列、又はそれと実質的に相同的な核酸配列を含む核酸分子は、本発明の更なる態様を形成する。好ましい核酸分子は、配列番号：35（好ましくは配列番号：34によりコードされる）、配列番号：46（好ましくは配列番号：45によりコードされる）、配列番号：57（好ましくは配列番号：56によりコードされる）、配列番号：68（好ましくは配列番号：67によりコードされる）又は配列番号：101（好ましくは配列番号：100によりコードされる）で示されるアミノ酸配列をコードする配列を含む。他の好ましい核酸分子は、配列番号：69、71、73又は75（好ましくは、配列番号：77、79、81又は83によりコードされる）のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（VH）をコードする配列を含み、及び/又は配列番号：70、72、74、76又は103（好ましくは、配列番号：78、80、82、84又は105によりコードされる）のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（VL）をコードする配列を含む。更に好ましくは以下の組み合わせ：配列番号69及び70；又は配列番号：71及び72；又は配列番号：73及び74；又は配列番号：75及び76；又は配列番号：69及び103をコードする核酸である。また、好ましいものは、配列番号77及び78；又は配列番号：79及び80；又は配列番号：81及び82；又は配列番号83及び84；又は配列番号：77及び105を含む核酸配列である。

【0223】

他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体のIgG形態をコードする配列、例えば、実施例4に開示する配列、又はマウスキメラ形態を含む。

【0224】

上記に示したように、本発明に包含される他の核酸分子は、本発明のヒト抗体の一部又は断片をコードするもの、例えば、抗体の重鎖可変領域（VH）をコードするもの（例えば、それぞれ配列番号：77、79、81又は83のような、配列番号：69、71、73、75をコードするもの）、又は抗体の軽鎖可変領域（VL）をコードするもの（例えば、それぞれ配列番号：78、80、82、84又は105のような、配列番号：70、72、74、76又は103をコードするもの）である。他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の重鎖をコードするもの（例えば、それぞれ配列番号：106、110、114又は118のような、配列番号：108、112、116又は120をコードするもの）、又は抗体の軽鎖をコードするもの（例えば、それぞれ、配列番号：107、111、1

10

20

30

40

50

15、119又は123のような、配列番号：109、113、117、121又は125をコードするもの)である。

【0225】

したがって、本明細書で定義されるように、本発明の抗体の断片、又はそれに実質的な配列、又はこのような断片をコードする配列を含む核酸分子は、本発明の更なる態様を形成する。

【0226】

有利には、IgG形式である場合、本発明の抗体は、CXCR4について高い結合親和性を有し、すなわち、 1×10^{-8} M又は 1×10^{-9} M、又はそれ未満の範囲にKdを有する。重要なことに、このような親和性を有する抗体は、治療に有用である確立した範囲内である。

10

【0227】

ある実施形態においては、本発明の抗体は、ヒトのCXCR4及びサルのCXCR4の両方に結合し得る。例えば、抗体C-9P21、C1I24、D1K21、9N10及びB-1M22は、この能力を有している。このような、種間、特にヒトと、前臨床動物モデルとして一般に用いられる種間の交差反応性は、前臨床試験から臨床用途への、より効果的な移行を可能にするので、有利である。例えば、用いられる特定の動物モデル内に存在する天然のCXCR4と交差反応する抗体を有することは、このモデルにおける結果が、どちらかといえばヒト患者における事態を反映させることを意味し、それにより、例えば、なされる投与、及び潜在的に関連があり、問題のある副作用を特定する可能性の、より正確な評価を可能にする。抗体がサル及びヒトの両方のCXCR4と同様の親和性を有する場合に、特にそうである。

20

【0228】

ヒトのCXCR4及びサルのCXCR4の両方と結合する、本発明の抗体の能力は、このような抗体が、治療の有害な副作用、及び適切な耐性用量を評価するための前臨床試験において試験を行い得ることを意味する。

【0229】

更に、ヒトのCXCR4及びマウスのCXCR4の両方と結合する能力は、マウスモデル、例えば、免疫正常マウスを用いたマウス同系モデルにおける本発明のこのような抗体により示される結果が、ヒトを対象とした場合の抗体の活性の代表である可能性が高いことを意味する。この理由は、ヒトのCXCR4と結合し得るが、マウスのCXCR4と結合し得ない抗体が、マウスモデル内のヒト腫瘍細胞により発現するCXCR4と結合するが、内在性マウスCXCR4とは結合し得ないことである。これは、腫瘍により発現するCXCR4及び内在性CXCR4が存在するヒト患者における状況とは当然に異なる。

30

【0230】

このような状況の潜在的な欠点は、ヒトのCXCR4と結合するが、マウスのCXCR4とは結合しないが、有意に低い親和性を有する抗体が免疫不全のマウス(例えば、ヌードマウス又はSCIDマウス)におけるヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて良好に機能するが、これは、より多くのCXCR4が存在するヒトの系において同様の性能により反映されないことである。言い換えると、ヒトのCXCR4とは結合し得るが、マウスのCXCR4とは結合し得ない抗体を用いた、マウス異種移植片系において見られる抗腫瘍効果は、現実の臨床よりも優れていると思われる場合がある。一方、ヒト及びマウスのいずれのCXCR4とも結合し得る抗体を用いた作業の場合、これは、マウスモデル系に存在する全ての形態のCXCR4と結合し、抗体をヒトに入れた状況の代表である場合がある。抗体が、マウス及びヒトのいずれのCXCR4とも同様の親和性を有する場合に、特にそうである。

40

【0231】

好ましい実施形態においては、本発明の抗体は、ヒト及びサルのCXCR4と、又はヒト及びマウスのCXCR4と、又はヒト及びサル及びマウスのCXCR4と、同様の親和性で結合する。

50

【0232】

「同様の親和性」は、ヒト、及び1種又はそれ以上の興味のある他の種（例えば、サル又はマウス）のCXCR4に対する抗体の結合親和性が同程度であり、例えば、20倍以上異なることを意味する。更に好ましくは、結合親和性の相違は、15倍未満であり更に好ましくは10倍未満、最も好ましくは、5、4、3又は2倍未満である。結合親和性の比較は、任意の適切な方法で実施することができる。CXCR4のような細胞表面リガンドについて、FACSのようなフローサイトメトリー法は、結合曲線における比較の便利な方法を提供し、例えば同じ実験における中間値を比較することができる。適切な方法を実施例5に記載する。

【0233】

しかし、他の実施形態においては、本発明の抗体は、サルのCXCR4とは結合しない場合があり、及び/又はそれらはマウスのCXCR4とは結合しない場合がある。

【0234】

組成物、免疫複合体、薬剤、組み合わせ、カクテル、キット、第一及び第二の医療用途、並びに本発明の全ての方法の以下の記載において、「抗体」及び「免疫複合体」という用語、又は抗原結合領域又はその断片は、特に示さず、科学用語から明瞭にならない限り、抗CXCR4抗体の範囲、並びに特異的C-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21及び9N10抗体を意味する。

【0235】

本明細書で用いられる場合、「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、広く、ヒト抗原結合ドメインを含む、あらゆる免疫学的結合剤又は分子を意味し、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む。重鎖中の定常領域のタイプに依存し、全抗体は、5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの1つに割り当てられ、本発明の抗体はこれらのクラスのいずれか1つであり得る。これらのいくつかは、更に、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のサブクラス又はイソタイプに分けられる。種々のクラスの免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ、及び μ と命名される。種々のクラスの免疫グロブリンのサブユニットの構造及び三次元構造は周知である。

【0236】

一般に、本発明においては、抗原結合領域よりもむしろ、全抗体が用いられ、生理学的状況において最も一般的な抗体であり、研究室の環境において、最も容易に製造されるので、IgG及び/又はIgMが好ましい。IgG1抗体が特に好ましい。

【0237】

哺乳動物抗体の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列、その可変ドメインのフレームワーク領域のアミノ酸配列をベースとし、明らかに異なる2つのタイプの1つ：カッパ()及びラムダ()に割り当てられる。基本的に本発明の抗体の又は軽鎖定常領域の使用には選択の優先傾向はない。

当業者により理解されるように、「抗体」という用語に包含される免疫学的結合剤は、抗体及びその抗原結合断片にまで拡大され、全抗体、二量体、三量体及び多量体抗体；二種特異性抗体；キメラ抗体、組換え型及び改変抗体、及びそれらの断片が含まれる。

【0238】

したがって、「抗体」という用語は、任意の抗原結合領域を有する抗体様分子にも言及して用いられ、この用語には、Fab'、Fab、F(ab')₂などの抗原結合ドメイン、単一ドメイン抗体(DABs)、TandAbs二量体、Fv、sdFv(単一鎖Fv)、dsFv、ds-scFv、Fd、直鎖抗体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、パイボディ、トリボディ(それぞれ、scFv-Fab融合体、二種特異性又は三種特異性)；sc-ダイアボディ；カッパ(ラムダ)ボディ(scFv-CL融合体)を含む抗体断片；二種特異性T-細胞Engager(BiTE)(T細胞を引きつけるためのscFv-scFvタンデム)；二重可変ドメイン(DVD)-Ig(二種特異性形態)；小さい免疫タンパク質(SIP)(ミニボディの一種)；SMP1(「小

10

20

30

40

50

さいモジュールの免疫薬理的」) s c F V - F c 二量体 ; D A R T (d s 安定化ダイアボディ「Dual Affinity ReTargeting」) : 1種又はそれ以上の C D R s を含む、小さい抗体模倣体などが含まれる。

【0239】

種々の抗体をベースとする構築物及び断片を製造し、使用方法は、当該技術分野において周知である(特に、本明細書に参照として組み入れられる K a b a t ら、1991を参照されたい)。特に、ダイアボディは E P 404,097 及び W O 93/11161 に更に開示されているが、直鎖抗体は、Z a p a t a ら(1995)に開示されている。

【0240】

抗体は、従来の方法を用いて断片化することができる。例えば、F(a b')₂断片は、抗体をペプシンで処理することにより生成し得る。得られた F(a b')₂断片を処理してジスルフィド架橋を還元し、F a b'断片を生成することができる。パイン消化は、F a b断片の形成をもたらし得る。F a b、F a b'及び F(a b')₂、s c F V、F v、d s F v、F d、d A b s、T a n d A b s、d s - s c F v、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二種特異性抗体断片及び他の断片は、組換え技術を用いて合成することもでき、又は化学的に合成することができる。抗体断片を生成する技術は周知であり、当該技術分野において開示されている。例えば、B e c k m a n ら、2006; H o l l i g e r 及び H u d s o n, 2005; L e G a l l ら、2004; R e f f 及び H e a r d, 2001; R e i t e r ら、1996; 及び Y o u n g ら、1995のそれぞれは、効果的な抗体断片の生産を開示し、可能にする。

10

20

【0241】

抗体又は抗体断片は、天然に産生され、又は全部又は一部について合成的に生成される。したがって、抗体は任意の適切な原料から製造することができ、例えば、組換え起源からであってもよく、及び/又はトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物、又は I g Y 方法を用いて卵中で製造することができる。したがって、抗体分子はインビトロ又はインビボで生成することができる。

【0242】

好ましくは、抗体又は抗体断片は、3つの C D R ドメインを含む抗体軽鎖可変領域(V L)、及び3つの C D R ドメインを含む抗体重鎖可変領域(V H)を含む。前記 V L 及び V H は、一般に抗原結合部位を形成する。

30

【0243】

「F v」断片は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、硬く、非共有結合で連結した、1本の重鎖と一本の軽鎖可変ドメインを有する。この構造においては、各可変ドメインの3つの超可変領域(C D R s) V_H-V_L二量体の表面の抗原結合部位を定義するために相互作用する。集合的に、6つの超可変領域(C D R s)が、抗体に対して抗原結合特異性を与える。

【0244】

しかし、抗体の軽鎖可変領域からの3つの C D R s 及び重鎖可変領域からの3つの C D R s の存在は抗原結合に必要なことが、当該技術分野において十分に立証されている。したがって、上記古典的な抗体断片が効果的であることは公知である。

40

【0245】

例えば、ラクダ科の動物の抗体(H a m e r s - C a s t e r m a n ら、1993; A r b a b i G h a h r o u d i ら、1997)は、広範囲の抗原結合レパートリーを有しているが、軽鎖を欠いている。また、V H ドメインのみを含む単一ドメイン抗体(W a r d ら、1989; D a v i e s 及び R i e c h m a n n, 1995)、又は V L ドメインのみを含む単一ドメイン抗体(v a n d e n B e u c k e n ら、2001)を用いた結果は、これらのドメインが、容認できる高い親和性で抗原と結合し得ることを示す。したがって、3つの C D R s は抗原と効果的に結合し得る。

【0246】

1個の C D R、又は2個の C D R s が抗原と効果的に結合し得ることも公知である。第

50

一の例として、GFPのような異種タンパク質に挿入されたVH CDR3が、この異種タンパク質に抗原結合能力を与えることが示されているように(Kissら、2006; Nicaisseら、2004)、1個のCDRは異種タンパク質に挿入され、この異種タンパク質に抗原結合能力を与える

【0247】

更に、2個のCDRsが抗原と効果的に結合し、親抗体により所有するものよりも優れた特性を与えさえることが知られている。例えば、親抗体からの2個のCDRs(VH CDR1及びVL CDR3領域)が、親分子の抗原認識特性を維持しているが、腫瘍に浸透させる優れた能力を有していることが示された(Qiuら、2007)。これらのCDRドメインを適切なリンカー配列(例えば、VH FR2由来)と接続すると、天然の親抗体に類似する様式でCDRsを配向し、等しく良好な抗原認識をもたらす。したがって、親抗体において見られる構造を維持するような適切なフレームワーク領域を用いて、2つのCDRドメイン(好ましくはVHドメインからの1つ及びVLドメインからの1つ、更に好ましくは、2つのCDRドメイン1つがCDR3ドメインである)を含む抗原結合抗体模倣体を構築することが可能であることは当該技術分野において公知である。

10

【0248】

したがって、本発明の好ましい抗体は6つのCDR領域(軽鎖からの3つ、及び重鎖からの3つ)を含むが、6つより少ないCDR領域を含む抗体、及び1又は2つのCDR領域を含む抗体は本発明に包含される。更に、重鎖又は軽鎖のみからのCDRsを有する抗体も意図される。

20

【0249】

CXCR4と結合する本発明の好ましい抗体は、3つのCDRsを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRsを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域は：

(a) 配列番号：1のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有する可変重(VH)CDR1、

(b) 配列番号：2のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR2、及び

(c) 配列番号：3のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR3、又は

30

(d) 配列番号：7のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有する可変重(VH)CDR1、

(e) 配列番号：8のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR2、及び

(f) 配列番号：9のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR3、又は

(g) 配列番号：13のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有する可変重(VH)CDR1、

(h) 配列番号：14のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR2、及び

40

(i) 配列番号：15のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR3、又は

(j) 配列番号：19のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有する可変重(VH)CDR1、

(k) 配列番号：20のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR2、及び

(l) 配列番号：21のアミノ酸配列又はそれと実質的に相同的な配列を有するVH CDR3を含む。

【0250】

特定の重鎖CDR領域と併せて用いるための、好ましい軽鎖CDR領域は、本明細書の

50

他の箇所が開示されている。しかし、本発明の重鎖可変領域と併せて用いるための3つのCDRsを含む、他の軽鎖可変領域も意図される。本発明の重鎖可変領域と併せて用いることができ、CXCR4と結合する抗体を産生する適切な軽鎖可変領域は、当業者によって容易に特定することができる。

【0251】

例えば、本発明の重鎖可変領域は、1本の軽鎖可変領域又は軽鎖可変領域のレパートリーと組み合わせることができ、得られた抗体を、CXCR4との結合について試験を行った。種々の軽鎖可変領域を有する、本発明の重鎖可変領域のこのような組み合わせの妥当な数が、CXCR4との結合能力を維持していることが期待される。実際、9N10抗体は、C-9P21と同じ重鎖可変領域を有しているが、異なる軽鎖可変領域を有している。

10

【0252】

本発明の好ましい軽鎖可変領域と併せて用いるための他の重鎖可変領域を特定するための類似の方法を用いることができた。

【0253】

特定の実施形態においては、抗体又は抗体断片は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgE、IgM又はIgDの定常領域のような、重鎖定常領域の全て又は一部を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域又はその一部である。更に、抗体又は抗体断片は、カップ軽鎖定常領域又はラムダ軽鎖定常領域、又はそれら的一部を含む。このような定常領域の全て又は一部は、天然に製造することができ、又は全体的に若しくは部分的に合成によってもよい。このような定常領域の適切な配列は周知であり、当該技術分野において立証されている。重及び軽鎖からの定常領域の完全な補体が本発明の抗体に含まれる場合、このような抗体は、本明細書において通常、「完全長」抗体又は「全」抗体と呼ばれる。

20

【0254】

Fc領域を含む抗体は、特定の用途、特にインビボにおける治療用途に好ましい。ここで、Fc領域はADCCのようなエフェクター機能を媒介する。適切なFc領域は当業者に周知であり、したがって、選択することができる。

【0255】

本明細書で用いられる場合、アミノ酸又は核酸配列に関して「実質的に相同的」という用語は、開示されたアミノ酸又は核酸配列に対し、少なくとも70%又は75%、好ましくは少なくとも80%、更に好ましくは、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列を含む。したがって、本発明の実質的に相同的な配列には、本発明の配列に対し、1個又は複数の塩基又はアミノ酸の変更（付加、置換、挿入又は欠失）が含まれる。アミノ酸レベルにおいては、好ましい実質的に相同的な配列は、本発明の配列を作成する、1若しくはそれ以上のフレームワーク領域及び/又は1若しくはそれ以上のCDRsにおいて、1、2、3、4又は5個以下、好ましくは1、2又は3個、更に好ましくは1又は2個のみの変更されたアミノ酸を含む。前記変更は、保存的又は非保存的アミノ酸であってもよい。好ましくは、前記変更は保存的アミノ酸置換である。

30

40

【0256】

実質的に相同的な核酸配列は、中程度のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件で、開示された核酸配列（又はその相補的配列）とハイブリダイズするヌクレオチド配列をも含み、例えば、本発明の1又はそれ以上の軽鎖又は重鎖CDRs、本発明の軽又は重鎖可変領域、又は本発明の抗体をコードする核酸配列とハイブリダイズする（又はそれらの相補配列とハイブリダイズする）。

【0257】

「実質的に相同的」という用語は、実質的に同じ方法で、本発明のタンパク質又は核酸分子のように、実質的に同じ機能を果たす本発明のアミノ酸及びヌクレオチド配列の修飾又は化学的同等物をも含む。例えば、任意の実質的に相同的な抗体（又はそれをコードす

50

る実質的に相同的な核酸)は、前述したように、C X C R 4 と結合する能力を維持すべきである。好ましくは、任意の実質的に相同的な抗体は、本明細書の他の箇所で定義したように、1種又はそれ以上の抗体の機能的能力を維持すべきである。好ましくは、任意の実質的に相同的な抗体は、問題となる抗体により認識されるC X C R 4 の同じエピトープ、例えば、本明細書に開示されたように、本発明のC D R ドメイン又は本発明のV H 及びV L ドメインにより認識されるのと同じエピトープと特異的に結合する能力を維持すべきである。同じエピトープ/抗原との結合は周知の方法により、例えば、結合アッセイを用い、例えば、競合アッセイを用い、容易に試験を行うことができ、当該技術分野において開示されている。他の機能的特性の維持も、周知の方法により容易に試験を行うことができ、当該技術分野において開示されている。本発明の抗体については、拮抗特性及び/又はアポトーシス特性の非誘発性が維持されていることが特に好ましい。

10

【0258】

したがって、当業者は、結合アッセイを「実質的に相同的な」抗体が、本発明の抗体及び抗体断片と同じ結合特異性を有するかどうかを試験するために用いることができることを認め、例えば、フローサイトメトリー、E L I S A アッセイ又はB I A コアアッセイのような結合アッセイは、このような「実質的に相同的な」抗体がC X C R 4 と結合し得るかどうかを確立するために容易に用いることができるであろう。細胞におけるフローサイトメトリーは、C X C R 4 のような細胞表面受容体との結合を分析するための最も好都合なアッセイである。上記に概要を述べたように、競合結合アッセイは、「実質的に相同的な」抗体が、本発明の抗体により認識されるC X C R 4 の同じエピトープと実質的に特異的に結合する能力を維持しているかどうかを試験するために用いることができる。前述の方法は、適切な競合アッセイの唯一の例である。当業者は他の適切な方法及び変更を知っているであろう。

20

【0259】

本発明のタンパク質の実質的に相同的な配列には、限定されないが、保存的アミノ酸置換が含まれ、例えば、抗体のV H、V L 又はC D R ドメインに影響を及ぼさない変更が含まれ、例えば、異なるリンカー配列が用いられるs c F V 抗体、t a g 配列又は他の成分が加えられ、抗原の結合に寄与しない抗体、抗体分子又は断片の1つのタイプ又は形式の、抗体分子又は断片の他のタイプ又は形式への交換又は変換(例えば、F a b からs c F V への変換又はその逆)、又は抗体の、抗体分子の特定のクラス又はサブクラスへの変換(例えば、抗体分子の、I g G 又はそのサブクラス、例えば、I g G 1 又はI g G 3 への変換)が含まれる。

30

【0260】

本明細書で用いられる場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸が、類似の側鎖を有する他のアミノ酸残基と置換されることである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野において定義されており、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、グリシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。

40

【0261】

相同性は、従来 of 任意の方法により評価することができる。しかし、配列間の相同性の程度の決定については、配列の多重アライメントを作成するコンピュータプログラム、例えば、C l u s t a l W (T h o m p s o n ら、1994)が有用である。配列の1つの全長の少なくとも50%がアライメント中に含まれる場合に、最も高いオーダーの適合が、2つの配列間で得られるように、所望であれば、C l u s t a l W アルゴリズムは、B L O S U M 6 2 スコアリングマトリクス(H e n i k o f f 及びH e n i k o f f、1992)、並びに10のギャップ開始ペナルティ及び0.1のギャップ伸長ペナルティ

50

を一緒に用いることができる。配列を整列させるために用いることができる他の方法は、最も高いオーダーの適合が、2つの配列間で得られ、同一のアミノ酸の数が、2つの配列間で決定されるような、Smith及びWaterman(1981)により改訂されたNeedleman及びWunsh(1970)である。2つのアミノ酸配列間の同一性を計算するための他の方法は、一般に当該技術分野において認識されており、例えば、Carillo及びLipton(1988)、並びにComputational Molecular Biology, Lesk編、Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projectsに開示されたものが含まれる。

【0262】

一般に、このような計算のためにはコンピュータプログラムが使用されるであろう。この目的のためには、ALIGN(Myers and Miller, 1988)、FASTA(Pearson及びLipman, 1988; Pearson, 1990)及びgapped BLAST(Altschulら, 1997)、BLASTP、BLASTN、又はGCG(Devereuxら, 1984)のような配列対を比較し、整列させるプログラムも有用である。更に、European Bioinformatics instituteにおけるDaliサーバーは、タンパク質配列の構造を基準とする配列を提供する(Holm, 1993; 1995; 1998)。

【0263】

基準ポイントの提供の例としては、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の相同性を有するか、配列同一性を有する本発明の配列は、初期パラメータ(例えば、GENESTREAMネットワークサービス、IGH、Montpellier, Franceにおいてインターネットにより得られる)を有するALIGNプログラムを用いて決定することができる。

【0264】

「少なくとも中程度のストリンジェントのハイブリダイゼーション条件」については、条件は、溶液中の2つの相補的核酸分子間の選択的ハイブリダイゼーションを促進するものを選択することを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全て又は一部に対して起こり得る。ハイブリダイゼーション部分は、通常、少なくとも15(例えば、20、25、30、40又は50)ヌクレオチド長である。当業者は、核酸二重鎖又はハイブリッドの安定性は、 T_m により測定され、ナトリウム含有バッファーはナトリウムイオン濃度及び温度の関数である($T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%(G+C) - 600/l)$ 、又は類似の式)。したがって、ハイブリッド安定性を決定する洗浄条件におけるパラメータは、ナトリウムイオン濃度及び温度である。公知の核酸分子と類似するが同一でない分子を特定するため、1%のミスマッチを、 T_m における約1の減少をもたらすと推測することができる。例えば、>95%の同一性を有する核酸分子は、最終的な洗浄温度が約5下がることが求められる。これらの条件に基づき、当業者は、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができるであろう。好ましい実施形態においては、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が選択される。例として、ストリンジェントなハイブリダイゼーションを達成するために、次の条件を使用することができる：上記式に基づき、 $T_m - 5$ において、 $5 \times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)/5倍デンハート溶液/1.0% SDSでハイブリダイゼーションし、次いで60で、 $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ で洗浄する。中程度のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、42における3倍SSCにおける洗浄工程を含む。更なる例について、「ハイブリダイズする」配列を、非ストリンジェントな条件下(例えば、室温において、 $6 \times \text{SSC}$ 、50%ホルムアミド)、結合させ(ハイブリダイズさせ)、低ストリンジェント条件下(例えば、 $2 \times \text{SSC}$ 、室温、更に好ましくは $2 \times \text{SSC}$ 、42)又は高ストリンジェントな条件下(例えば、 $2 \times \text{SSC}$ 、65)に洗浄する(ここで、 $\text{SSC} = 0.15 \text{M NaCl}$ 、 0.015M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.2$)。

10

20

30

40

50

しかし、同等のストリンジェンシーは、他のバッファー、塩及び温度を用いて達成することもできることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関する他のガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley及びSons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6:及び Sambrookら、Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3に見出される。

【0265】

一般的に言えば、コード縮重のために、高ストリンジェンシーな条件下でハイブリダイズするであろう配列があるので、高ストリンジェンシーな条件下にハイブリダイズする配列が好ましい。

10

【0266】

他の好ましい実施形態においては、C-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21又は9N10のような、元の抗CXCR4抗体と比べ、向上した、又は優れた特性を有する第二世代の抗体が提供される。例えば、第二世代の抗体は、CXCR4について強力な結合親和性、優れた交差反応プロフィールを有し、よりいっそう低いレベルのCXCR4+細胞のアポトーシスの誘発、CXCR4+細胞、特に腫瘍細胞を標的とする優れた能力、例えば、腫瘍細胞を阻害する改善された能力、改善された拮抗能力、例えばSDF-1のCXCR4への結合により誘発されるカルシウム流入を阻害する能力の改善、リガンドが誘発する遊走の阻害の改善、出願に依存したADCC又はCDCを誘発する能力の改善、又は本明細書の他の箇所で議論した疾患の治療の改善を有する。

20

【0267】

効果的な第二世代の抗体を特定するための比較は、例えば、本明細書に詳細に、又は当該技術分野において詳細に開示された種々のアッセイの1種又はそれ以上を用いて、容易に実施及び定量される。C-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21又は9N10抗体により例示されるような、本発明の抗CXCR4抗体と比較し、少なくとも約2倍、5倍、10倍、20倍、及び好ましくは少なくとも約50倍の向上した生物学的特性又は活性を有する、抗体の抗体は本発明に包含される。特に好ましい第二世代の抗体には、本発明の抗体のVH鎖、又はそのVH CDRsを、他のVL鎖(又は他のVLCDRs)と組み合わせて含む。

30

【0268】

ヒト又は動物の身体に由来する、ヒト又は動物の身体又は組織試料内にインサイチューで存在し得る、任意のこのような成分から識別される限りにおいて、本発明の抗体、結合タンパク質及び核酸分子は、一般に、「分離された」又は「精製された」分子である。しかし、配列は、ヒト又は動物の身体内に見られるような配列と一致するか、又は実質的に相同的である。したがって、核酸分子又は配列及びタンパク質又はポリペプチド、例えば抗体に関し、本明細書で用いられる場合、「分離された」又は「精製された」という用語は、分離され、精製され、又はその自然環境では実質的に存在しない場合に、例えば、ヒト又は動物の身体(必要であれば、それらは天然に存在する)から分離又は精製された、そのような分子を意味し、又は技術的過程により製造された場合に、そのような分子、すなわち、組換え及び合成的に製造された分子を意味する

40

【0269】

したがって、核酸分子に関して用いられる場合、このような用語は、他の核酸分子/遺伝子又はポリペプチドのような天然に関連する物質を実質的に含まない核酸を意味し得る。この用語は、組換えDNA技術により製造した場合に細胞物質若しくは培地を実質的に含まない、又は化学的に合成した場合に、化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない核酸分子をも意味する。分離又は精製された核酸は、更に核酸が由来する核酸(すなわち、核酸の5'及び3'末端に位置する配列)が自然にフランキングする配列、又は例えば遺伝子工学によって核酸(例えば、治療的価値のないタグ配列又は他の配列)がフランキングするように製造した配列を実質的に含まない。

50

【0270】

したがって、軽鎖CDRs 1、2及び3、重鎖CDRs 1、2及び3、軽鎖可変領域、重鎖可変領域のようなタンパク質又はポリペプチド分子、並びに全長抗体を含む、本発明の結合タンパク質又は抗体に関して用いる場合、「分離された」又は「精製された」という用語は、通常、それが由来する原料からの細胞物質又は他のタンパク質を実質的に含まないタンパク質を意味する。ある実施形態においては、特に、タンパク質をヒト又は動物に投与する場合、このような分離又は精製されたタンパク質は、組換え技術により製造された場合に培地を実質的に含まず、化学的に合成された場合、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。このような分離又は精製されたタンパク質は、分離された核酸分子について前述したような、フランキング配列をも含まない

10

【0271】

本明細書で用いられる場合、「核酸配列」又は「核酸分子」という用語は、天然の塩基、糖類及び内部の糖（骨格）結合からなるヌクレオシド又はヌクレオチドモノマーの配列を意味する。この用語は、非天然のモノマー又はその一部を含む、修飾又は置換配列をも含む。本発明の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）又はリボ核酸配列（RNA）であってもよく、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン及びウラシルを含む天然の塩基を含んでいてもよい。配列は、修飾塩基を含んでいてもよい。このような修飾塩基の例には、アザ及びデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミジン及びウラシル；並びにキサンチン及びヒポキサンチンが含まれる。核酸分子は、二重鎖又は一本鎖であってもよい。核酸分子は、全部又は一部が合成又は組換え型であってもよい。

20

【0272】

好ましい実施形態においては、本発明の抗体は、ヒト抗体、更に好ましくは完全なヒト抗体である。これに関し、ヒト抗体は、一般に、ヒトの治療において用いるための少なくとも3つの潜在的な利点を有している。第一に、ヒト免疫系は、抗体を異物として認識すべきでない。第二に、ヒトの血液循環における半減期は、天然のヒト抗体と同様であり、それによって、より少量で頻繁でない用量が与えられることを可能にする。第三に、エフェクター部分がヒトであるので、作用モードが標的細胞の死滅を必要とする実施形態においては、例えば、補体依存細胞毒性（CDC）又は抗体依存細胞毒性（ADCC）により、更に効果的に標的細胞を破壊するために、ヒト免疫系の他の部分とよりいっそう相互作用するであろう。

30

【0273】

しかし、一般に、ヒト抗体はこれらの利点を示すことは認識されているが、それらを成功したヒトの治療のための候補とするために十分に高い親和性及び適切な機能特性を有するヒト抗体の開発は、決して簡単でないことが知られている。したがって、当該技術分野は、安全かつ効果的なヒトの治療のための抗CXCR4を欠いており、このような薬剤の開発のための課題を有している。

【0274】

本明細書で用いられる場合、抗体分子及び結合タンパク質に関し、「ヒト」という用語は、可変領域（例えば、V_H、V_L、CDR又はFR領域）、場合により、ヒトのレパートリーから分離され、又は由来し、又はヒト又はヒトのレパートリー、例えば、ヒトの生殖細胞又は体細胞内に見られる配列に由来するか関連する定常抗体領域を有する抗体及び結合タンパク質を意味する。本発明のC-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21及び9N10抗体は、可変領域が、ヒトレパートリーから分離されている、このようなヒト抗体分子の例である。

40

【0275】

本発明の「ヒト」抗体及び結合タンパク質は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基、例えば、ランダムに導入された突然変異、又はインビトロにおける部位特異的突然変異、例えばインビトロクローニング又はPCRにより導入される突然変異を更に含む。このような突然変異の特定の例は、抗体又は結合タンパク質の残基の少ない数、例えば、抗体又は結合タンパク質の5、4、3、2又は1個以下、好ましくは、抗体又は結合タ

50

ンパク質のCDRの1以上を作成する残基の5、4、3、2又は1個で保存的置換又は他の突然変異を含む突然変異である。このような「ヒト」抗体の特定の例には、潜在的な免疫原性部位の量を減少するために標準的修飾法に供される抗体及び可変領域が含まれる。

【0276】

したがって、本発明の「ヒト」抗体には、ヒト内に見られる配列に由来するか、又は関連する配列が含まれるが、これらはインビボにおいてヒト抗体生殖レパートリー内には存在しない場合がある。更に、本発明のヒト抗体及び結合タンパク質には、ヒト配列から特定されるヒトコンセンサス配列、又はヒト配列と実質的に相同的な配列を含むタンパク質が含まれる。

【0277】

更に、本発明のヒト抗体及び結合タンパク質は、それ自体、ヒト抗体分子内に組み合わせて見られる V_H 、 V_L 、CDR又はFR領域の組み合わせであるが、これらに限定されない。したがって、本発明のヒト抗体及び結合タンパク質は、ヒト内において自然には存在する必要のない、このような領域の組み合わせを含むか、又は対応し得る。

【0278】

好ましい実施形態においては、ヒト抗体は完全なヒト抗体である。本明細書で用いられる場合、「完全なヒト」抗体は、実質的に非ヒト抗体配列を含まないか、任意の非ヒト抗体配列を含まない、前記で定義した、「ヒト」可変領域ドメイン及び/又はCDRsを含む抗体である。例えば、「実質的に非ヒト抗体配列を含まない」ヒト可変領域ドメイン及び/又はCDRsを含む抗体は、ドメイン及び/又はCDRsの5、4、3、2又は1個のみのアミノ酸がヒト抗体配列によりコードされないアミノ酸である、抗体である。したがって、「完全なヒト」抗体は、実質的に非ヒト可変領域ドメイン、例えば、特定のアミノ酸が、ヒト抗体において通常に存在するアミノ酸によく一致するように変更されているマウスの可変領域ドメインをベースとする「ヒト化」抗体からは区別される。

【0279】

本発明の「完全なヒト」抗体は、一本鎖抗体であるとして、任意の他の実質的な抗体配列を含まない、可変領域ドメイン及び/又はCDRsであってもよい。また、本発明の「完全ヒト」抗体は、1以上のヒト抗体定常領域と統合又は動作可能に結合した、ヒト可変領域ドメイン及び/又はCDRsであってもよい。特定の好ましい完全ヒト抗体は、IgGの定常領域の全補体を含むIgG抗体である。

【0280】

他の実施形態においては、本発明の「ヒト」抗体は、一部ヒトキメラ抗体である。本明細書で用いられる場合、「一部ヒトキメラ」抗体は、ラット又はマウスのような、非ヒト種の定常領域に動作可能に結合し、又はグラフトした、「ヒト」可変領域ドメイン及び/又はCDRsを含む抗体である。このような一部ヒトキメラ抗体は、例えば、定常領域が、好ましくは前臨床試験において用いられる動物種と同じである、前臨床試験において用いることができる。これらの一部ヒトキメラ抗体は、例えば、非ヒト種の定常領域が、抗体検出について追加のオプションを提供し得る、生体外診断において用いることができる。

【0281】

本明細書で用いられる場合、「断片」という用語は、生物学的に関連のある断片、例えば、抗原結合に寄与する断片、例えば、抗原結合部位の一部を形成し、及び/又はCXCR4抗原の機能を阻害又は減少するのに寄与する断片を意味する。特定の好ましい断片は、本発明の抗体の重鎖可変領域(V_H ドメイン)及び/又は軽鎖可変領域(V_L ドメイン)を含む。他の好ましい断片は、本発明の抗体の1又はそれ以上の重鎖CDRs(又は本発明の V_H ドメイン)、又は本発明の抗体の1又はそれ以上の軽鎖CDRs(又は本発明の V_L ドメイン)を含む。特定の好ましい断片は、少なくとも5つのアミノ酸長であり、少なくとも1つのCDR領域、好ましくはCDR3領域、更に好ましくは重鎖CDR3領域を含む。

【0282】

10

20

30

40

50

本発明の抗体が、定義された配列のいずれかの断片を含む（例えば、配列番号：35、46、57、68又は101の断片を含む）実施形態においては、例えば、本発明のV_H及び/又はV_Lドメインを含む抗体、本発明の1又はそれ以上のCDRsを含む抗体又は結合タンパク質であり、これらの領域/ドメインは、各領域/ドメインがその生物学的機能を果たし、抗原結合に対する寄与を維持し得るように、通常、抗体又は結合タンパク質内で分離されている。したがって、天然の抗体及び/又は効果的な設計された抗体において見られるもののように、V_H及びV_Lドメインは、好ましくは適切な骨格配列/リンカー配列により分離されており、CDRsは、好ましくは適切なフレームワーク領域により分離されている。したがって、本発明のV_H、V_L及び個々のCDR配列は、好ましくは、抗原結合が可能ないように、適切なフレームワーク又は骨格内に組み込まれて提供される。このようなフレームワーク配列又は領域は、適切な骨格を形成するのに適しているように、天然のフレームワーク領域、FR1、FR2、FR3及び/又はFR4と一致し、又は例えば、種々の天然のフレームワーク領域と比較することにより特定されるコンセンサスフレームワーク領域と一致していてもよい。また、非抗体骨格又はフレームワーク、例えば、T細胞受容体フレームワークを用いることができる。

10

【0283】

フレームワーク領域のために用いることのできる適切な配列は周知であり、当該技術分野において文書にて立証されており、これらのいずれかを用いることができる。フレームワーク領域のための好ましい配列は、本発明のV_H及び/又はV_Lドメインを生成する、1又はそれ以上（すなわち、1、2、3又は4）のフレームワーク領域であり、すなわち、表1、2、3、4又は5に開示されたフレームワーク領域の1若しくはそれ以上、又はそれに実質的に相同的なフレームワーク領域、特に、抗原特異性を維持することを可能にする特定のフレームワーク領域、例えば、抗体と実質的に同じ又は同じ3次元構造をもたらすフレームワーク領域である。

20

【0284】

特定の好ましい実施形態においては、必要に応じて、4種全ての可変軽鎖（配列番号：30、31、32及び33）及び/又は可変重鎖（配列番号：25、26、27及び28）、配列番号：35（表1にも示す）のFR領域、又はそれと実質的に相同的なFR領域が、本発明の抗体において見い出される。

30

【0285】

特定の好ましい実施形態においては、必要に応じて、4種全ての可変軽鎖（配列番号：41、42、43及び44）及び/又は可変重鎖（配列番号：36、37、38及び39）、配列番号：46（表2にも示す）のFR領域、又はそれと実質的に相同的なFR領域が、本発明の抗体において見い出される。

特定の好ましい実施形態においては、必要に応じて、4種全ての可変軽鎖（配列番号：52、53、54及び55）及び/又は可変重鎖（配列番号：47、48、49及び50）、配列番号：57（表3にも示す）のFR領域、又はそれと実質的に相同的なFR領域が、本発明の抗体において見い出される。

40

【0286】

特定の好ましい実施形態においては、必要に応じて、4種全ての可変軽鎖（配列番号：63、64、65及び66）及び/又は可変重鎖（配列番号：58、59、60及び61）、配列番号：68（表4にも示す）のFR領域、又はそれと実質的に相同的なFR領域が、本発明の抗体において見い出される。

【0287】

特定の好ましい実施形態においては、必要に応じて、4種全ての可変軽鎖（配列番号：96、97、98及び33）及び/又は可変重鎖（配列番号：25、26、27及び28）、配列番号：101（表5にも示す）のFR領域、又はそれと実質的に相同的なFR領域が、本発明の抗体において見い出される。

【0288】

更に、本発明の好ましい抗体は、本発明のV_H、V_L又はCDRsからなるが、本発明の

50

抗体が、本発明の1又はそれ以上の V_H 、 V_L 又はCDRsを、本発明以外の他の V_H 、 V_L 又はCDRsと組み合わせて含むことにも留意すべきである（本明細書で概要を述べた、本発明の抗体のCXCR4結合特性又は抗CXCR4特性がまだ存在しているという条件で）。

【0289】

本明細書で用いられる場合、「重鎖相補性決定領域」（「重鎖CDR」）という用語は、抗体分子の重鎖可変領域（ V_H ドメイン）内の超可変領域を意味する。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端に、重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3と命名された3つのCDRsを有する。重鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端にFR1、FR2、FR3及びFR4）をも有している。これらのフレームワーク領域はCDRを分離している。

10

【0290】

本明細書で用いられる場合、「重鎖可変領域」（ V_H ドメイン）は、抗体分子の重鎖の可変領域を意味する。

【0291】

本明細書で用いられる場合、「軽鎖相補性決定領域」（「軽鎖CDR」）という用語は、抗体分子の軽鎖可変領域（ V_L ドメイン）内の超可変領域を意味する。軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端に、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3と命名された3つのCDRsを有する。軽鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端にFR1、FR2、FR3及びFR4）をも有している。これらのフレームワーク領域はCDRsを分離している。

20

【0292】

本明細書で用いられる場合、「軽鎖可変領域」（ V_L ドメイン）は、抗体分子の軽鎖の可変領域を意味する。

【0293】

CDRsの位置を定義するために、必要に応じて、Kabata（参照により本明細書に特に組み入れられる、Kabataら、1991）の命名が本明細書に付随することに留意すべきである。

【0294】

当業者は、軽及び重鎖CDRs、軽及び重鎖可変領域、抗体、抗体断片、及び免疫複合体のような、本発明のタンパク質及びポリペプチドは、種々の周知の方法及び当該技術分野で開示されている方法のいずれかにより調製することができるが、最も好ましくは組換え法を用いて調製されることを理解するであろう。

30

【0295】

本発明の抗体の軽及び重鎖可変領域をコードする核酸断片は、任意の適切な方法により、例えばクローニング又は合成により、誘導又は製造することができる。例えば、このような配列は、例えば、ヒト生殖系遺伝子から適切な配列をクローニングし、生殖系配列に必要な修飾を行い、周知かつ当該技術分野で開示された方法を用いることにより、本発明の配列を得ることができる。かつより効率的なその他の方法は、プライマーを重複させて適切な軽鎖又は重鎖可変領域配列を合成し、完全な配列を得るためにプライマー伸長を用いる。次いで、この完全配列は、例えば、適切な発現ベクターにクローニングするために、更なるクローニング及び取扱のための適切な制限部位を含むプライマーを用いたPCRにより増幅することができる。可変領域あたり5～7つの重複プライマーは、通常は十分であり、それによって、この技術を非常に効率的かつ正確にすることができる。

40

【0296】

本発明の抗体の軽及び重鎖可変領域をコードする核酸断片がいったん得られると、これらの断片は、更に標準的組換えDNA技術により操作され、例えば、可変領域断片を、適切な定常領域ドメインを有する全長抗体分子に変換し、又は本明細書の他の箇所でも議論した抗体断片の特定の形式、例えば、Fab断片、scFv断片等に変換される。典型的には、又はこの更なる操作手順の一部として、本発明の抗体の生産を促進するために、本発

50

明の抗体分子をコードする核酸断片を、一般的に適切な発現ベクターに導入する。

【0297】

ベクターが、用いられる宿主細胞と適合する限りは、可能な発現ベクターには、限定はされないが、コスミド、プラスミド又は修飾ウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）が含まれる。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換にとって適切であり」、これは、核酸分子と動作可能なように連結している、発現のために用いるための宿主細胞に基づいて選択される、本発明の核酸分子及び調節配列を含むことを意味する。動作可能なように連結は、核酸が核酸の発現を可能にする様式で調節配列と連結していることを意味すると意図される。

【0298】

したがって、本発明は、本発明の核酸分子又はその断片、本発明の核酸分子によりコードされるタンパク質配列の転写及び翻訳のために必要な調節配列を含む組換え発現ベクターを意図する。

【0299】

適切な調節配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物又は昆虫の遺伝子を含む種々の起源に由来し得る（例えば、Goeddel, 1990に開示された調節配列を参照されたい）。適切な調節配列の選択は、以下に議論するように、選択された宿主細胞に依存し、当業者によって容易に達成することができる。このような調節配列の例には：転写プロモーター及びエンハンサー又はRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含むリボソーム結合配列が含まれる。更に、選択した宿主細胞及び使用するベクターに依存し、複製起点、追加のDNA制限部位、エンハンサー及び転写誘導能を与える配列のような他の配列が発現ベクターに組み込まれる。

【0300】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の組換え分子で形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞の選択を容易にする選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよい。選択可能なマーカー遺伝子の例は、特定の薬剤、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ、蛍ルシフェラーゼ、又は免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン、好ましくはIgGのFc部分のような免疫グロブリンの一部に対して耐性を与える、ネオマイシン及びハイグロマイシンのようなタンパク質をコードする遺伝子である。選択可能なマーカー遺伝子の転写は、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、又は蛍ルシフェラーゼのような選択可能なマーカータンパク質の濃度の変化により測定される。選択可能なマーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性形質転換細胞のような、抗生物質に対する耐性を与えるタンパク質をコードする場合、細胞はG418を用いて選択することができる。選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生き残るが、他の細胞は死滅する。これは、本発明の組換え発現ベクターの発現について可視化及びアッセイを可能にし、特に、発現及び表現型における突然変異の効果を判定することを可能にする。選択可能なマーカーは、興味のある核酸から別個のベクターに導入することができることが認識されるであろう。

【0301】

組換え発現ベクターは、組換えタンパク質の発現の増大；組換えタンパク質の溶解度の増大をもたらす；親和性精製におけるリガンドとして作用することにより、標的組換えタンパク質の精製に役立つ融合部分をコードする遺伝子を含んでもよい（例えば、精製及び/又は同定を可能にする適切な「タグ」、例えば、Hisタグ又はmycタグが存在している）。例えば、タンパク質分解による切断部位が標的組換えタンパク質に加えられ、融合部分から組換えタンパク質の分離を可能にし、次いで融合タンパク質の精製を可能にする。典型的な融合発現ベクターには、それぞれ、組換えタンパク質にグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、又はプロテインAを融合する、pGEX（Amrad Corp, Melbourne, Australia）、pMal（New England Biolabs, Beverly, MA）及びpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が含まれる。

10

20

30

40

50

【0302】

組換え発現ベクターは、宿主細胞内に導入され、形質転換宿主細胞を生成し得る。「～で形質転換される」、「～でトランスフェクションされる」、「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、当該技術分野において公知の多くの可能な方法の1つにより細胞に核酸（例えば、ベクター）を導入することを包含することを意図する。本明細書で用いられる場合、「形質転換宿主細胞」という用語は、本発明の組換え発現ベクターで形質転換されたグリコシル化が可能な細胞をも含むことを意図する。原核細胞は、例えば、エレクトロポレーション又は塩化カルシウムが介在する形質転換により、核酸で形質転換することができる。例えば、核酸は、従来技術、例えば、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション又はマイクロインジェクションにより、哺乳動物細胞に導入することができる。宿主に形質転換及びトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrookら、1989、及び他の研究用教科書に見出すことができる。

10

【0303】

適切な宿主細胞には、多種多様の真核宿主細胞及び原核細胞が含まれる。例えば、本発明のタンパク質は、酵母細胞又は哺乳動物細胞内で発現させることができる。他の適切な宿主細胞は、Goeddel、1990に見出すことができる。更に、本発明のタンパク質は、大腸菌のような原核細胞内で発現させることができる（Zhangら、2004）。

【0304】

本発明を実施するのに適切な酵母及び真菌宿主細胞には、サッカロミセス・セレビスエ、ピチア属又はクルイベロミセス属、及びアスペルギルス属の様々な種が含まれるが、これらに限定されない。サッカロミセス・セレビスエにおける発現ベクターの例には、pYepSec1（Baldariら、1987）、pMFa（Kurjan及びHerskowitz、1982）、pJRY88（Schultzら、1987）、及びpYES2（Invitrogen Corporation, San Diego, CA）が含まれる。

酵母及び真菌のトランスフェクションのためのプロトコールは当業者に周知である（Hinnenら、1978；Itoら、1983、及びCullenら、1987参照）。

【0305】

本発明を実施するのに適した哺乳動物細胞には、中でも、COS（例えば、ATCC番号CRL1650又は1651）、BHK（例えば、ATCC番号CRL6281）、CHO（ATCC番号CCL61）、HeLa（例えば、ATCC番号CCL2）、293（ATCC番号1573）、NS-1細胞、NS0（ATCC CRL-11177）、及びPer.C6（登録商標）（CruceCell, Leiden, Netherlands）が含まれる。哺乳動物細胞中における発現に向けられた適切な発現ベクターには、一般的に、プロモーター（例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス及びシミアンウイルス40）、並びに他の転写及び翻訳制御配列が含まれる。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8（Seed, B., 1987）及びpMT2PC（Kauffmanら、1987）が含まれる。

30

40

【0306】

本明細書において提供される教示を考慮すると、植物、鳥類及び昆虫細胞に適切なタイプの発現ベクターを導入するためのプロモーター、ターミネーター、及び方法も容易に達成され得る。例えば、一実施形態においては、本発明のタンパク質は植物細胞から発現させることができる（アグロバクテリウム・リゾゲネスベクターの使用を概説するSinkarら、1987を参照されたい；中でも、PAPS2022、PAPS2023、及びPAPS2034を含む植物細胞のための発現ベクターの使用を開示するZambryskiら、1984も参照されたい）。

【0307】

本発明を実施するのに適した昆虫細胞には、カイコガ属（Bombyx）、ヤガ科（T

50

richoplusia)又はスポドテラ(Spodotera)種由来の細胞及び細胞系が含まれる。培養昆虫細胞(SF9細胞)中でタンパク質の発現に利用可能なバキュロウィルスベクターには、pAcシリーズ(Smithら、1983)及びpVLシリーズ(Luckow及びSummers 1989)が含まれる。本発明の組換えタンパク質の発現のために適した、いくつかのバキュロウィルス-昆虫細胞発現系は、PCT/US/02442に開示されている。

【0308】

また、本発明のタンパク質は、ラット、ウサギ、ヒツジ、及びブタのような、非ヒトトランスジェニック動物内でも発現させることができる(Hammerら、1985; Palmiterら、1983; Brinsterら、1985; Palmiter及びBrinster 1985、及び米国特許第4,736,866号)。

10

【0309】

本発明のタンパク質は、固相合成(Merrifield(1964); Frischeraら、1996)、又は均質溶液中での合成(Houbenweyl, 1987)のような、タンパク質の化学において周知の方法を用いて化学合成により調製することもできる。

【0310】

他の分子、例えばタンパク質と結合した、本発明の抗体及びタンパク質を含む、N-末端又はC-末端融合タンパク質は、組換え技術による融合により調製することができる。得られた融合タンパク質は、本明細書に開示される、選択されたタンパク質若しくはマーカータンパク質、又はタグタンパク質と融合した、本発明の抗体又はタンパク質を含む。本発明の抗体及びタンパク質は、公知の方法により、他のタンパク質と結合させることもできる。例えば、タンパク質は、WO90/10457に開示された、ヘテロ二官能性チオール含有リンカー、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ-プロピオネート)又はN-スクシニミジル-5チオアセテートを用いて連結させることができる。融合タンパク質又は複合体を調製するために用いることのできるタンパク質の例には、免疫グロブリン、ホルモン、成長因子、レクチン、インスリン、低密度リポタンパク質、グルカゴン、エンドルフィン、トランスフェリン、ボンベシン、アシアログリコプロテイン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ヘムアグルチニン(HA)及び末端が切断されたmycのような細胞結合タンパク質が含まれる。

20

30

【0311】

第一の抗CXCR4抗体核酸断片の調製方法に関係なく、更なる適切な抗体核酸断片は、標準的な分子生物学の方法により容易に調製することができる。あらゆる変異、突然変異又は第二世代の抗CXCR4抗体核酸断片が、本発明における使用に適していることを確認するため、核酸断片について、本発明の抗CXCR4抗体の発現を確認するために試験を行うであろう。好ましくは、変異、突然変異又は第二世代の核酸断片について、標準条件下、更に好ましくは標準的ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下におけるハイブリダイゼーションを確認するためにも試験を行うであろう。典型的な適切なハイブリダイゼーション条件は、約50における、約7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5MのNaPO₄、約1mMのEDTA内でのハイブリダイゼーション;及び約42における約1%のSDSによる洗浄を含む。

40

【0312】

種々の抗体を容易に調製することができるので、本発明の治療法は、患者内で少なくとも本発明の第一の抗CXCR4抗体の生物学的有効量を発現する少なくとも第一の核酸断片又は分子を、動物又は患者に提供することにより達成することができる。「抗CXCR4抗体を発現する核酸断片又は分子」は、一般に、少なくとも発現構築物又はベクターの形状であり、ウィルス内、又は組換え宿主細胞内に含まれる発現構築物又はベクターの形状であってもよい。本発明の好ましい遺伝子治療ベクターは、一般に、組換えレトロウィルス、単純ヘルペスウィルス(HSV)、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス(AAV)、サイトメガロウィルス(CMV)等の内部に含まれるようなウィルスベクターである

50

。

【0313】

更なる態様は、本発明の1又はそれ以上の核酸断片又は分子を含む発現構築物又は発現ベクターを提供する。好ましくは、発現構築物又はベクターは組換え型である。好ましくは、前記構築物又はベクターは、本発明の核酸分子によってコードされるタンパク質配列の転写及び翻訳のために必要な調節配列を更に含む。

【0314】

更なる態様は、本発明の1又はそれ以上の発現構築物又は発現ベクターを含む宿主細胞又はウイルスを提供する。また、本発明の1又はそれ以上の核酸分子を含む宿主細胞又はウイルスも提供される。本発明の抗体を発現する細胞又はウイルスは更なる態様を形成する。

【0315】

本発明の更なる態様は、本発明の宿主細胞を培養する工程を含む、本発明の抗体の製造方法を提供する。好ましい方法は、(i)コードされた抗体又はタンパク質の発現に適した条件下に、本発明の1若しくはそれ以上の組換え発現ベクター、又は1若しくはそれ以上の核酸配列を含む宿主細胞を培養し、場合により、(ii)宿主細胞から、又は培地/上清から、抗体又はタンパク質を分離し、又は得る工程を含む。このような製造方法は、抗体又はタンパク質生成物を精製し、及び/又は前記抗体又は生成物を、少なくとも1種の追加成分、例えば、薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む組成物に製剤化する工程を含んでもよい。

【0316】

本発明の抗体又はタンパク質を1種以上のポリペプチド鎖(例えば、Fab断片のような特定の断片)により精製する実施形態においては、全てのポリペプチドは、好ましくは、同一又は異なる発現ベクターのいずれかから、宿主細胞内において発現され、例えば、本発明の結合タンパク質は、宿主細胞内で会合し、そこから分離又は精製することができる。

【0317】

本発明の抗体は、CXCR4と結合する、更なる抗体を生成するためにも用いることができる。このような使用は、例えば、新しい抗体を生成するために、親抗体のアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換又は挿入を含み、ここで、前記親抗体は、本明細書の他の箇所で定義されており、本発明の抗体の1つであり、得られた新しい抗体について、CXCR4と結合する抗体を特定し、本明細書に開示された他の好ましい機能特性の1以上を有する新しい抗体を得られたかについて試験を行なう。このような方法は、CXCR4と結合する能力、及び他の機能特性について全て試験を行うことのできる、複数の新規抗体を生成するために用いることができる。好ましくは、1個又はそれ以上のアミノ酸の前記付加、欠失、置換又は挿入は、1又はそれ以上のCDRドメインにおいて起こる。

【0318】

親抗体に対する、このような修飾又は突然変異は、例えば、ランダム又は定方向突然変異誘発を実施することにより、周知の方法及び当該技術分野における文献を用いて、任意の適切な方法により実施することができる。定方向突然変異誘発を用いる場合、抗原結合に關与する主要な残基を特定するために、突然変異誘発のための適切な残基を同定するための1つの戦略は、結合タンパク質-抗原複合体、例えば、Ab-Ag複合体の結晶構造の分解を利用する(Davies及びCohen, 1996)。次いで、相互作用を増強させるために、それらの残基を変異させる。また、1個又はそれ以上のアミノ酸残基は、単に定方向突然変異について標的となり得、評価されるCXCR4への結合において影響する。

ランダム突然変異誘発は、任意の適切な方法、例えば、エラープローンPCR、チェーンシャッフリング又は大腸菌株の変異誘発により実施することができる。

したがって、本発明の1つ又はそれ以上のV_Hドメインを、任意の適切な起源由来の1

10

20

30

40

50

個のV_Lドメイン又はV_Lドメインのレパートリーと組み合わせることができ、得られた新しい抗体について、CXCR4に対して特異的な抗体を特定するために試験を行う。これは好ましい。逆に言えば、本発明の1つ又はそれ以上のV_Lドメインを、任意の適切な起源由来の1個のV_Hドメイン又はV_Hドメインのレパートリーと組み合わせることができ、得られた新しい抗体について、CXCR4に対して特異的な抗体を特定するために試験を行う。

【0319】

同様に、本発明の、V_H及び/又はV_Lドメインの1つ又はそれ以上、好ましくは全ての3つのCDRsを、必要に応じて、1つのV_H及び/又はV_Lドメイン、又はV_H及び/又はV_Lドメインのレパートリーにグラフトし、得られた新しい抗体について、CXCR4に対して特異的な抗体を特定するために試験を行う。

10

【0320】

軽鎖及び/又は重鎖のCDRs、特にCDR3の標的突然変異は、抗体親和性を増大させるのに効果的な方法であり、好ましいことがわかっている。好ましくは、CDR3の3~4個のアミノ酸のブロック又は「ホットスポット」と呼ばれる特定の領域が、突然変異誘発のための標的となる。

【0321】

「ホットスポット」は、体細胞過剰変異がインビボで起こる配列である（及び、下記のNeuberger and Milstein, 1995）。ホットスポット配列はあるコドンの形をとるコンセンサヌクレオチド配列として定義され得る。そのコンセンサ配列はテトラヌクレオチド、RGYWであり、RはAかGのどちらかであることができ、YはCかTであることができ、WはAかTのどちらかであることができる（Neuberger and Milstein, 1995）。加えて、ヌクレオチドAGYによりコードされるセリン残基は、潜在的なホットスポット配列に該当するTCNによりコードされるセリンよりも可変ドメインのCDR領域に圧倒的に存在する（Wagner et al., 1995）。

20

【0322】

したがって、本発明の各抗体の重鎖、及び、軽鎖のCDRのヌクレオチド配列はホットスポット配列とAGYコドンの存在について精査され得る。軽鎖、及び、重鎖のCDR領域の同定されたホットスポットは、それから、International Immunogeneticsデータベース（IMGT、HYPERLINK "<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>）（Davies et al., 1990）を用いて胚の重鎖の配列、及び、軽鎖の配列と任意選択的に比較されることができる。生殖系列と同一な配列により、体細胞突然変異は起こらなかったと示唆され、それ故、インビボで起きる体細胞事象を模倣して無作為に突然変異が導入され得る、又は、代わりに部位特異的突然変異誘発が、例えば、ホットスポット、及び/又は、AGYコドンに対して行われ得る。対照的に、異なる配列により、体細胞変異は既に起こったと示される。インビボでの体細胞変異が最適であったかどうか決定されずにいるであろう。

30

【0323】

突然変異のために好ましいホットスポットは外側に露出されるアミノ酸をコードするホットスポットであり、好ましくは、抗原結合部位の部分形成するアミノ酸をコードするホットスポットである。突然変異のために好ましいその他のホットスポットは非保存的アミノ酸をコードするホットスポットである。CDRの内側に埋め込まれる、又は、保存されるアミノ酸をコードするホットスポットは突然変異誘発されないのが好ましい。これらの残基は通常、全体の構造に重要であり、それらは内側に埋められているので抗原と相互作用しそうにない。

40

【0324】

アミノ酸とタンパク質ドメインの上述した操作を行う方法は当業者に周知である。例えば、前記の操作であれば、適切な結合タンパク質及びそのドメインをコードする核酸分子

50

が修飾され、その結果発現したタンパク質のアミノ酸配列が次に適切な方法で修飾されるその核酸のレベルで遺伝子工学により都合よく行われることができるであろう。

【0325】

1つ以上の抗体がCXCR4に特異的に結合する能力をテストすることは、本分野において周知であり記述される適切な方法により行われ得る。CXCR4+細胞株は培養物保存機関より入手可能であり、又は、それらはCXCR4陰性細胞を組換えCXCR4の発現を可能にするコンストラクトで形質転換することにより調製され得る。そのような細胞は、例えば、ELISA、BIACore、FACSなどのような従来の方法により結合をアッセイするために容易に使用されることができる。

【0326】

これらの方法により作製された新しい抗体は改善された機能上の特質、例えば、もとの抗体よりCXCR4について高い、又は、向上した親和性（又は、少なくとも同等の親和性）を好んで持つであろう。そして、それらは本明細書のどこかに記載される本発明の抗体と同じ方法で処理され、使用されることができる（例えば、治療、診断について、組成物などにおいて）。あるいは、又は、加えて、その新しい抗体は、本明細書のどこかに記載される1つ以上のその他の改善された機能上の特質を持つであろう。

【0327】

これらの方法により作製された、獲得された、又は、獲得可能な新しい抗体は本発明のそのうえにさらなる態様を形成する。

【0328】

本発明は、本発明の抗体、又は、抗体断片の少なくとも1つを、任意選択によるが希釈剤と共に含む組成物をさらに提供する。そのような組成物は医薬的に許容できる組成物、又は、基礎研究で使用される組成物であり得る。医薬的な組成物に関して、それらは非経口投与のため、静脈内投与のため、又は、皮下投与のためでも好んで製剤され得る。

【0329】

本発明は、本発明のヒト抗体、及び、抗体断片の多数の方法、及び、使用を提供する。全ての方法に関して、「a」及び「an」という用語は、特に言明された場合を除いて、列挙された方法の中の「少なくとも1つの」工程、「少なくとも第1の」工程、「1つ以上の」工程、又は、「複数の」工程を意味するために使用される。これは治療法の中の投与工程と特に関連がある。したがって、本発明について、様々な用量が用いられることができるだけでなく、様々な投与回数、例えば、多数回の注射までを含む注射が用いられ得る。抗CXCR4治療用抗体の投与前、投与後、又は、投与中に複合型治療法が用いられ得る。

【0330】

重要な生物学的意味を持つ、本発明の抗体、又は、免疫複合体の様々な有益なインビトロの方法と使用が提供される。CXCR4を含む組成物を少なくとも本発明の第1抗CXCR4抗体、又は、その抗原結合断片と効率的に接触させることを全般的に含むCXCR4を結合する方法と使用がまず提供される。本発明の抗体、又は、その免疫複合体はしたがって結合アッセイにおいて使用され得る。適切に有益な結合アッセイには免疫プロット、ウェスタンプロット、ドットプロット、RIA、ELISA、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分取（FACS）、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィーなどのような本分野で一般に用いられるアッセイが含まれる。

【0331】

CXCR4/抗体複合体の形成とそのように形成された複合体を検出することを可能にするのに効率的な条件でCXCR4を含むのではないかと考えられる組成物を少なくとも本発明の第1抗体、又は、その免疫複合体、又は、その抗原結合断片と接触させることを全般的に含むCXCR4を検出する方法と検出における使用が提供される。その検出方法と使用は、生物学的サンプルとの関連で、例えば、腫瘍の診断において用いられることができる、そして、それに基づく診断キットもまた提供される。CXCR4の検出はある疾病の予後徴候となることができるということも信じられており、したがって、本明細書に

10

20

30

40

50

おける診断の言及はまた、適切である場合、予後を含む。特に、C X C R 4 は転移性再発と生存、神経膠腫といくつかの小児癌について予後における有用性を持つことが示されてきた。

【0332】

本発明の抗体、又は、結合タンパク質はインビボ、又は、インビトロでC X C R 4 を、特に、C X C R 4 + 細胞を検出するために使用されることができる。例えば、C X C R 4 がある腫瘍細胞で過剰発現されるとき、本発明の抗体、又は、結合タンパク質は腫瘍細胞をインビボ、又は、インビトロで検出するために使用されることができる。さらに、その抗体のC X C R 4 + 細胞に局在化する能力は、本発明の抗体はC X C R 4 + 細胞が存在する身体の一部を標的にすることができ、標的部位においてその抗体が作用できることを意味する。特に、その抗体のC X C R 4 + 腫瘍細胞に局在化する能力は、本発明の抗体はC X C R 4 + 腫瘍細胞が存在し、標的部位において抗体が作用できる身体の一部を標的にすることができることを意味する。

10

【0333】

本発明の方法、及び、本発明の使用は特に、任意の疾病、又は、C X C R 4 の発現、若しくは、C X C R 4 の活性に関連する健康状態、又は、C X C R 4 が生物学的役割を果たす健康状態を有する、又は、それらを発生させる危険のある動物、及び、患者において用いられることを意図されている。そのような疾病、及び、疾患には、C X C R 4 陽性細胞、典型的にはリガンドがC X C R 4 に結合して疾患、若しくは、疾病の原因となる、又は、それに寄与するシグナル伝達系に関連する可能性がある免疫調節性C X C R 4 + T細胞によって媒介される疾病が含まれる。それらはまた、C X C R 4 を発現する細胞の異常増殖によって引き起こされる疾病を含む。そのような異常に増殖する細胞はもともとC X C R 4 + である可能性があり、又は、それらは突然変異を誘発されて/癌化されてC X C R 4 を発現することとなったのかもしれない。上述したように、C X C R 4 の発現が、癌細胞がS D F - 1の勾配に沿って転移するのを助ける可能性がある。また、先天的にC X C R 4 + である細胞でのC X C R 4 の過剰発現によって特徴づけられる疾病が含まれる。さらに、H I VのC X C R 4 指向性株は宿主細胞に侵入するためにC X C R 4 を使用し、それで、その受容体を妨害することでこの疾病の拡大を制限できる。

20

【0334】

したがって、C X C R 4 によって媒介される、及び/又は、C X C R 4 陽性細胞の異常増殖によって特徴づけられる、及び/又は、先天的にC X C R 4 + の細胞でのC X C R 4 の過剰発現により特徴づけられる疾病、又は、疾患を治療する方法が提供される。

30

【0335】

別の観点で見ると、次の

(i) C X C R 4 のそのリガンドへの結合の阻害、
 (i i) C X C R 4 のリガンドに対するC X C R 4 介在的細胞性反応の阻害、特に、例えば、癌転移/器官侵襲、若しくは、炎症反応に関連する走化性、若しくは、移動の阻害、又は、細胞内カルシウムイオン濃度(細胞活性化)の上昇の阻害、

(i i i) C X C R 4 + 細胞の選択的除去、

(i v) 骨髄間質において生産されるS D F - 1とC X C R 4 受容体の相互作用により骨髄において不活化されたままの細胞であるC X C R 4 + 造血幹細胞の活性化と移動の誘導、

40

(v) 感染中にC X C R 4 を共受容体として使用するH I VのX 4 株によるC X C R 4 + 細胞の感染の阻止のうちの一つ以上から利益を受けることができる健康状態の治療が提供される。

【0336】

C X C R 4 リガンドはS D F - 1であることが好ましい。

【0337】

C X C R 4 が広範囲の疾病、及び、疾患に関係するので、任意の許容できるモデル系において効果的であると一旦示された既知の抗C X C R 4 治療法がC X C R 4 発現と関連す

50

る全ての範囲の疾病、及び、疾患の治療に用いられることができるということが当業者に周知である。

【0338】

ある実施形態において、CXCR4に介在される健康状態は癌であり、特に、CXCR4、及び、そのリガンドとの相互作用により介在される、又は、助けられる拡大、転移形成、器官侵襲、及び/又は、腫瘍成長である。

【0339】

CXCR4は様々な腫瘍において発現し、この発現が癌の病態生理、特に、癌転移において決定的な役割を果たすことを示すかなりの考証が今や存在する。いくつかの証拠から、CXCR4の発現により悪性細胞がSDF-1ベースの勾配を転移性移動のために用いることが可能になるという現在広く受け入れられる考えに至ってきた。CXCR4はこれまで癌細胞において最も一般的に発現されるケモカイン受容体である。研究されたほとんどすべての腫瘍において発現が見つけられてきた。SDF-1(CXCL12)は肝臓、肺、骨髄、リンパ節、及び、(比較的やや低いレベルで)脳、すなわち、癌が典型的に転移する部位、又は、血液学的な腫瘍により侵襲される部位において特に高いレベルで発現することも興味深い。SDF-1により引き起こされるCXCR4シグナル伝達の妨害がマウスモデルにおいて転移の形成を低下させる、又は、防ぐことができるという多数の証拠が存在する。シグナル伝達のこの阻害は抗体(Muller et al, 2001及びその他多数)、CXCR4に対するsiRNA(Liang et al, 2007)、及び、ペプチド(Kim et al, 2008)により達成され得る。

10

20

【0340】

CXCR4を妨害することはまた、血管新生に影響、例えば、阻害的影響(抗血管新生作用)を有すると記述されている。したがって、さらなる実施形態において、本発明の抗体は、血管新生をもたらすために(例えば、抗血管新生作用を有するために)使用されることができる。さらに別の実施形態において、本発明の拮抗的な抗体は本分野において記述される抗血管新生剤と一緒に使用されることができる。特に、本発明の抗体は癌の治療のために、又は、腫瘍がアバスチンに対する耐性を獲得した患者の第2選択治療としてペバシズマブ(アバスチン)と組み合わせて使用されることができる。

【0341】

Xu et al, 2009による研究は、腫瘍細胞のCXCR4はアバスチン処理により発現が上昇することを示す。このことは腫瘍細胞をCXCR4を標的とする抗体での処置に対しより敏感にするであろう。これは、アバスチン処置に耐性になった患者にとって特別興味深い。あるいは、前記の2つの薬剤は一緒に投与され得る。

30

【0342】

さらに、抗転移作用を有すると記述されるCXCR4シグナル伝達を妨害する化合物の多くが腫瘍成長を抑制すると知られてもいる。CXCR4受容体を妨害することにより腫瘍成長を制限することについての正確な作用はあまりよく理解されていないが、新生物細胞と周囲の間質との間の相互作用が最も重要であることを示す証拠が増えてきている。ある研究により、CXCR4に対するsiRNAによる膵臓癌細胞、及び、大腸癌細胞の形質移入はインビトロでの細胞成長にほとんど影響をおよぼさないが、これらの細胞に由来する腫瘍のインビボでの成長はかなり抑制されることが示された(Guleng et al, 2005)。さらに、筋繊維芽細胞の形質を有する癌腫関連筋繊維芽細胞が同じ患者に由来する正常な乳腺筋繊維芽細胞よりも混合された乳癌細胞の成長を顕著に刺激し、内皮性前駆細胞を呼び込むことにより血管新生を促進することが示された(Orimo et al, 2005)。これらの作用は腫瘍筋繊維芽細胞/筋繊維芽細胞により分泌されたSDF-1を通して媒介された。SDF-1に対する抗体、又は、CXCR4に対するsiRNAは腫瘍成長を阻害した。したがって、まとめると、これらの研究は、腫瘍の微小環境が癌の挙動にとり重要であり、インビボのSDF-1/CXCR4相互作用を標的とすることにより顕著な腫瘍成長の阻害が得られたことを示す。したがって、本発明の抗体はCXCR4+細胞の腫瘍間質への誘引を阻害するために、及び/又は、腫瘍に好都合

40

50

な微小環境を作り出す前記細胞の活性化を阻害するために用いられることができる。

【0343】

別の実施形態において、治療されるCXCR4介在性健康状態はCXCR4を発現する癌化した細胞の存在である。

【0344】

すでに記述したように、CXCR4は多数の腫瘍において強く発現している。アポトーシスを誘導する方法であるADC又はCDCによりそれらの細胞を殺すためにこのことが用いられ得る。もちろん、CXCR4はまた広範囲の健康な細胞でも発現するので、安全面と副作用は不安の種である。CXCR4に対する小分子アンタゴニストについての限られた数の入手可能な第1相試験により、大部分は軽度の懸念ではあるが、いくつかの副作用が示された。しかしながら、CXCR4を標的とする薬剤の長期の使用について入手可能なデータはない。さらに、使用される薬剤に応じた変化が存在する可能性がある。アポトーシスを誘導するMDX-1338のような抗体は、そうではない抗体と非常に異なる安全性プロファイルを持つ可能性がある。さらに、ペプチド由来薬剤CTCE-9908は多核化、G₂-M期停止、及び、異常体細胞分裂（分裂期細胞死）の誘導を介して卵巣癌細胞の死を引き起こすことが最近になり示された（Kwong et al, 2009）。この作用機構、例えば、分裂期細胞死は、体細胞分裂を行うにしてもきわめてまれな十分に分化したCXCR4+神経細胞と比較して、細胞分裂しやすいCXCR4+腫瘍細胞においてずっと効率的であると推論され得る。したがって、ある実施形態において、CXCR4+細胞の細胞殺滅は本発明の抗体についてのさらなる作用機構であるが、そのような殺滅はアポトーシス以外の機構により好んで誘導される。

10

20

【0345】

別の実施形態において、治療されるCXCR4介在性健康状態は骨髄支持細胞の腫瘍部分への移動である。

【0346】

CTCE-9908（CXCR4シグナル伝達を妨害する二量体ペプチド）の経動脈的化学塞栓術との併用について調査する肝細胞性癌腫における第2相試験が開始されている。仮説は、転移過程を妨害することに加えて経動脈的化学塞栓法の後に腫瘍による骨髄由来支持細胞の補充をCTCE-9908が妨げるであろうというものである。

【0347】

別の実施形態において、治療されるCXCR4介在性健康状態はCXCR4+細胞の炎症部位への移動である。

30

【0348】

CXCR4は炎症における役割を果たすことが知られている。その他のサイトカインのように、SDF-1は免疫システムのCXCR4+細胞を炎症部位に誘引することで炎症に寄与する。その相互作用の妨害は様々な炎症性疾患、及び、自己免疫疾患、例えば、リウマチ性関節炎により可能性がある。CXCR4アンタゴニストである小分子薬剤候補AMD3465は、肺肉芽腫形成の住血吸虫性抗原誘引モデルにおけるTh2介在性炎症反応を抑制することが示されてきた（Hu et al, 2006）。

【0349】

さらに別の実施形態において、治療されるCXCR4介在性健康状態はウィルス感染、特に、HIV感染のようなレトロウィルス感染、又は、CXCR4を受容体として用いる任意のその他のウィルスの感染である。

40

【0350】

かなりの部分のHIV株は感染の間にCXCR4を共受容体として用いる（X4 HIV株）。CXCR4受容体を妨害することは感染を阻止するのに非常に効果的であることが示されてきた。AMD3100はヒトにおけるインビトロとインビボの両方の試験において非常に高い効力でX4 HIV株のCXCR4株への侵入を抑制することが示されてきた。この化合物の増大した生物学的利用能を有する誘導体であるAMD070は現在、HIVの治療のための第2相試験の段階にある。その他のいくつかのCXCR4に対する

50

アンタゴニストがこの目的について様々な開発段階にある。

【0351】

さらに別の実施形態において、治療されるCXCR4介在性健康状態は骨髄に保持される幹細胞を動員することが望ましい健康状態である。そのような幹細胞の動員はCXCR4/SDF-1相互作用を妨害することにより達成されることができ、これにより、例えば、免疫システムの回復、例えば、全身性放射線照射、骨髄移植、又は、非ホジキンリンパ腫、若しくは、多発性骨髄腫のような血液癌の後に必要とされる免疫システムの回復が可能になる。そのような方法はこれらの健康状態、及び、造血幹細胞の移植を必要とする、又は、それから利益を得ることができるであろうその他の任意の疾病を治療するのに有用である。

10

【0352】

2009年1月にジェンザイム(Genzyme)社は、造血幹細胞の移植を必要とする非ホジキンリンパ腫、又は、多発性骨髄腫の患者に注射可能な薬剤として小分子CXCR4阻害剤プレリキサフォル(plerixafor)(以前のAMD3100)をモゾビル(Mozobil™)の商標で販売するFDAの認可を得た。この製品はG-CSFと併用して自家幹細胞動員のために使用されることが意図される。骨髄間質より分泌されたSDF-1がこの場合幹細胞を活性型の状態で骨髄の中に留め置くことに寄与しているため、CXCR4とSDF-1の間の相互作用を妨害することにより末梢血中の白血球数とCD34+細胞数の両方がかなり増加することが示されてきた。この適応のため開発中のその他のいくつかのCXCR4アンタゴニストが存在する。

20

【0353】

さらに別の実施形態において、CXCR4に媒介されるシグナル伝達を妨害することにより腫瘍細胞がその他の治療化合物、例えば、化学療法薬剤での処理に敏感になる。したがって、化学療法薬剤との併用治療が特に好まれる。そのような実施形態は血液癌の治療に特に有用である。

【0354】

2009年12月に、ゲンザイム社は、化学療法との併用でモゾビル(登録商標)(プレリキサフォル注射液)が骨髄により保護される白血球細胞に治療上の効果を与えることができることを示唆する初期試験データが第1相/第2相試験によりもたらされたと発表した。その試験において、モゾビルは化学療法(MEC投与計画:ミトキサントロン、エトポシド、及び、シタラビン)の前の事前調整ストラテジーとして再発性、若しくは、難治性急性骨髄性白血病(AML)の患者に与えられた。試験参加者の多くは、前処置に続いて、前処置に無応答性であるか短期の寛解を有するかのどちらかであった。引き続いての評価に利用可能な患者のうち、50%の患者において完全な寛解(CR又はCRi)を研究者は観察した。同様の試験がその他の血液癌について開始された。

30

【0355】

上述される実施形態は様々な疾病の治療に使用され得る。

【0356】

CXCR4の発現上昇が示された腫瘍タイプの例は乳腺癌、前立腺癌、直腸結腸癌、膵臓癌、悪性、若しくは、転移性黒色腫、これらに限定されないが、口腔扁平上皮癌、及び、鼻咽頭癌を含む頭部頸部癌、食道癌、これらに限定されないが、神経膠腫、及び、髄膜腫を含む脳腫瘍、白血病、非ホジキンリンパ腫のようなリンパ腫、神経芽細胞腫、その他の小児癌、腎臓癌、血管芽腫、フォンヒッペル・リンドウ病、肺腫瘍(SCLCとNSCLCの両方)、肝臓癌、卵巣癌、子宮頸部癌、甲状腺乳頭癌、及び、骨肉腫である。転移性癌の治療、又は、癌細胞侵襲の抑制は特に好ましい。

40

【0357】

CXCR4介在性疾病、又は、疾患はまた、炎症、又は、自己免疫疾患に関連する疾病、又は、健康状態でもあり得る。好ましい疾病、又は健康状態には、(1)全身性アナフィラキシー、若しくは、過敏性応答、薬品アレルギー、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)、昆虫刺傷アレルギー、及び、食物アレルギーのようなアレルギー性

50

疾病、(2)クローン病、潰瘍性大腸炎、回腸炎、及び、腸炎のような炎症性腸疾患、(3)膣炎、(4)乾癬、並びに、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、及び、掻痒のような炎症性皮膚炎、(5)血管炎、(6)脊椎関節症、(7)強皮症、(8)喘息、及び、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、慢性閉塞性肺疾患、過敏性肺疾患などのようなアレルギー性呼吸器疾患、(9)(リウマチ性、及び、乾癬性)関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、I型糖尿病、糸球体腎炎などのような自己免疫疾患、(10)(同種移植片拒絶、移植片体宿主病を含む)移植片拒絶、並びに、(11)アテローム硬化症、筋炎、T細胞介在性神経変性疾患、多発性硬化症、脳炎、髄膜炎、肝炎、腎炎、敗血症、サルコイドーシス、アレルギー性結膜炎、耳炎、キャスルマン病、副鼻腔炎、LPS-誘導エンドトキシンショック、ベーチェット症、及び、痛風のような望ましくない炎症性反応が抑制されなくてはならないその他の疾病が含まれる。リウマチ性関節炎、及び、Th2介在性炎症は本発明の抗体で治療される特に好ましい疾病である。

10

【0358】

本明細書において使用されるように、「異常増殖」という用語は正常な、本来の、又は、予想される進行から逸脱する細胞増殖を意味する。例えば、異常な細胞増殖にはそのDNA、又は、その他の細胞性成分が損傷を受けた、又は、欠陥を持つようになった細胞の不適切な増殖が含まれることができる。

【0359】

異常な細胞増殖には、その特徴が不適切に高レベルの細胞分裂、不適切に低レベルのアポトーシス、又は、両方が原因となる、いずれかに媒介される、又は、いずれかが結果となる徴候に関連する細胞増殖が含まれ得る。そのような徴候は、例えば、癌性の、若しくは、非癌性の、良性の、若しくは、悪性の細胞、細胞集団、又は、組織の単発性局所増殖、若しくは、多発性局所増殖により特徴づけられ得る。

20

【0360】

本明細書における「腫瘍」へのどんな言及もまた「癌」、又は、「癌腫」を意味する。転移性癌はまた、原発腫瘍からの転移の低減が可能であるように、治療されることができる。外科手術後の患者に残るいわゆる微小残存病変(MRD)は抗CXCR4抗体を用いる免疫治療について受けることができる可能性がある。

【0361】

したがって、本発明は、そのような疾病を有する動物、又は、患者に治療上有効量の本発明の抗CXCR4抗体、又は、そのような抗CXCR4抗体の抗原結合断片、又は、免疫複合体を投与することを含む、上述した疾病を治療する方法及び使用をさらに提供する。

30

【0362】

本発明のそのうえにさらなる態様は本発明の抗体、又は、そのような抗体の抗原結合断片、又は、免疫複合体を治療、画像化、又は、診断において用いられる組成物、又は、薬品の製造において使用することを提供する。

【0363】

そのうえにさらなる態様は、治療、診断、又は、画像化において使用される本発明の抗体、又は、そのような抗体の抗原結合断片、又は、免疫複合体を提供する。

40

【0364】

さらに、本発明は本発明の抗体、又は、そのような抗体の抗原結合断片、又は、免疫複合体を1つ以上の薬剂的に許容できる賦形剤、担体、希釈剤、緩衝液、又は、安定化剤と共に含む組成物を提供する。

【0365】

本明細書において記載されるインビボの方法は一般的に哺乳類動物において行われる。任意の哺乳類、例えば、ヒトや任意の家畜、家畜動物、又は、実験動物が処置され得る。具体的な例には、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシ、及び、サルが含まれる。しかしながら、好ましくは、その哺乳類動物はヒトである。

50

【0366】

したがって、本明細書で使用される「動物」又は「患者」という用語には任意の哺乳類、例えば、ヒトや任意の家畜、家畜動物、又は、実験動物が含まれる。具体的な例には、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシ、及び、サルが含まれる。しかしながら、好ましくは、その哺乳類動物はヒトを対象としている。

【0367】

本発明は、先に定義された疾患を未結合の、又は、裸の抗体、及び、その断片を用いて治療する方法、並びに、本発明の抗体、又は、その抗原結合断片が治療薬、又は、診断薬と機能するように結合する免疫複合体を使用するCXCR4+細胞（好ましくは、CXCR4+腫瘍細胞、又は、CXCR4+免疫系細胞、例えば、HIVのCXCR4指向性株が感染することができる細胞）を標的とする方法の両方を関連付ける。特別に言及しない限り、又は、科学用語で明確にされない限り、本明細書において使用する「抗体、及び、その断片」という用語は、それ故、別の薬剤、特に、治療薬、又は、診断薬と結合していない「未結合の、又は、裸の」抗体、又は、断片を意味する。これらの定義は、例としてのみ挙げるが、抗体の生物学的半減期、親和性、結合活性、若しくは、その他の活性を改善するための修飾、又は、抗体のその他の作用因子との統合のような抗体の修飾を排除するものではない。

10

【0368】

本発明の治療法、及び、使用はまた、未結合の、又は、裸の抗体と免疫複合体の両方の使用を包含する。免疫複合体ベースの治療法において、本発明の抗体、又は、その抗原結合断片は、好ましくは、第2の治療薬（抗CXCR4抗体そのものは第1治療薬である）と機能するように結合する。

20

【0369】

適切な治療薬は、治療される疾患、若しくは、健康状態に応じて、及び/又は、望ましい治療作用機構に応じて選択されることができる。

【0370】

例えば、望ましい作用機構が拮抗的であり、例えば、標的CXCR4+細胞の細胞性シグナル伝達を調節する、例えば、標的細胞内部のシグナル伝達を調節する、又は、標的細胞から別の細胞へのシグナル伝達を調節する、又は、CXCR4+細胞、例えば、腫瘍細胞、若しくは、炎症性反応、若しくは、自己免疫性反応に関与する免疫系の細胞、若しくは、HIVのようなウイルスの感染に感受性の細胞の機能/シグナル伝達を下方制御する、若しくは、抑制するとき、適切な薬剤は、抗炎症薬剤、例えば、副腎皮質ステロイド類（好ましくはグルココルチコイド）、又は、COX-2阻害剤、スルホンアニリド類、リコフェロン及び、 ω -3脂肪酸のような非ステロイド性抗炎症薬剤（NSAID）、ステロイドアンタゴニスト、サイトカイン、若しくは、ケモカインアンタゴニスト、又は、サイトカイン発現、若しくは、ケモカイン発現の阻害剤のような免疫調節性治療薬であり得る。別の薬剤は、アンジオスタチン、エンドスタチン、アンジオポイエチン類のいずれか一つ、パスキュロスタチン、カンスタチン及びマスピンなどの血管新生の阻害剤であり得る。別の薬剤は、成長因子受容体、例えば、IGF-1受容体（IGF-1R）、IGF-2R、IGF結合タンパク質（IGFBP-3）、及び、FGFRのようなEGFR IGF受容体の阻害剤のような追加のシグナル伝達系の阻害剤であり得る。

30

40

【0371】

CXCR4+細胞の成長の抑制が（例えば、癌の治療において）望ましい作用機構である場合、成長抑制作用を有する適切な薬剤、例えば、ステロイド受容体（例えば、エストロゲン受容体）の阻害剤のような細胞増殖抑制性治療薬が選択されることができる。

【0372】

細胞殺滅が望みの作用機構であるとき、放射線治療薬、又は、ATP分解酵素阻害剤のような適切な細胞毒性薬剤が選択されることができる。

【0373】

癌の治療のために、適切な抗癌剤もまた使用されることができる。

50

【0374】

あるいは、抗ウイルス性適用、例えば、HIVの治療において、適切な抗ウイルス剤が追加の治療として使用されることができる。

【0375】

ある疾病、又は、疾病の段階について多数の作用機構が適切である可能性があり、そして、もしその通りならば、多数の追加の治療薬が用いられることができるということを特に言及することは重要である。多数の薬剤は多数の作用、又は、状況に応じて異なる作用を持つことを特に言及することもまた重要である。シグナル伝達系の妨害は腫瘍細胞の移動、並びに、腫瘍の成長の両方への作用を有することができる。多数の化学療法剤もまた1つより多い機能を有する。ケモカインとそのアンタゴニストは、抗炎症性適用と比較して癌との関係で様々な作用を持つことができる。しかしながら、疾病、疾病の段階、及び、望みの作用機構に応じて適切な追加の治療薬を選択することは十分に当業者の能力の範囲内であろう。

10

【0376】

追加の治療薬は免疫複合体の形態で提供されることができるが、もしこちらのほうがより適切であれば、例えば、様々な薬剤と一緒に（例えば、混合物として）、別々に、又は、順次投与される複合療法で代わりに提供されることができる。

【0377】

前述した治療法、及び、使用は、動物、又は、患者に経皮的注入、筋肉内注入、静脈内注入などによるように全身的に医薬的に効果がある組成物を投与することを一般的に含むであろう。しかしながら、治療薬が腫瘍部位、又は、炎症部位、又は、ウイルス感染部位のようなその他の適切な部位に局在することを可能にする任意の投与経路が許容できるであろう。それ故、その他の適切な送達経路には経口経路、経鼻経路、又は、経呼吸器経路、及び、経局所経路が含まれる。

20

【0378】

本明細書で使用される「投与」は、治療上の作用、例えば、抗腫瘍作用、抗炎症作用、又は、抗ウイルス作用を及ぼすのに効果的な量、及び、効果的な期間、抗CXCR4抗体治療薬を提供、又は、送達することを意味する。タンパク質性の治療薬の受動的投与は、部分的にはその単純さと再現性のため、一般に好まれる。

【0379】

しかしながら、「投与」という用語は本発明の抗CXCR4抗体が送達される、又は、そうでなければ標的部位に提供される一切の手段を意味するために本明細書において使用される。「投与」は、それ故、標的部位へ結果的に送達するのに効果的な方法で本発明の抗CXCR4抗体を生産する細胞を提供することを含む。そのような実施形態において、その細胞を選択的な透過性がある膜、構造、又は、移植可能な装置で、一般的に治療を止めるために取り外すことが可能であるものに製剤する、又は、詰めることが望ましい可能性がある。本発明の外來性抗CXCR4抗体は、用量がほぼモニターされ、制御されることを可能にする非侵襲性的の方法を意味するので、なお一般的に好まれるであろう。

30

【0380】

本発明の治療法及び使用はまた、腫瘍の近辺でそれらが発現することとなる、又は、標的部位へ局在することとなるのに効果的な方法で本発明の抗CXCR4抗体をコードする核酸が提供されることとまで及ぶ。裸DNA送達、組換え遺伝子とベクター、患者の細胞の生体外での操作を含む細胞ベースの送達などのような任意の遺伝子治療技術が用いられ得る。

40

【0381】

本発明の抗CXCR4抗体はまた、標的部位にその他の治療薬、又は、診断薬を送達するために使用されることができる。そのような実施形態において、その他の治療薬、又は、診断薬は一般に機能するように本発明の抗CXCR4抗体に結合される。

【0382】

本発明で使用される「治療上有効量」は、CXCR4リガンドのCXCR4への結合を

50

抑制するのに、CXCR4リガンドに対するCXCR4介在的細胞性反応を抑制するのに、好ましくはCXCR4リガンドに対する反応でカルシウムイオンを放出することを抑制するのに、若しくは、CXCR4+細胞の移動を抑制するのに、炎症を低減するのに、転移の形成を抑制するのに、癌細胞侵襲を抑制するのに、腫瘍成長を抑制するのに、腫瘍血管新生を抑制するのに、CXCR4+腫瘍を持つ動物、若しくは、患者への投与に基づく腫瘍退縮、若しくは、寛解を誘導するのに、CXCR4指向性HIV株の拡散を制限するのに、及び/又は、作用機構が細胞殺滅を含むとき標的CXCR4+細胞の少なくとも一部を特異的に殺滅するのに効果的な本発明の抗CXCR4抗体、若しくは、その免疫複合体の量である。そのような作用は、正常で健康な組織に含まれる細胞にほとんど、若しくは、全く結合せず、そのような細胞をほとんど、若しくは、全く殺さず、そして、動物、若しくは、患者の正常で健康な組織に無視できる、若しくは、制御できる有害な副作用をおよぼす間に達成されることが好ましい。

10

【0383】

「標的部位」は、疾患を媒介する、又は、異常に増殖して疾患の原因となる、若しくは、疾患を悪化させるCXCR4+細胞の位置を意味する。したがって、標的部位は、例えば、腫瘍、又は、CXCR4介在性炎症の部位であることができる。「標的細胞」は、疾患を媒介する、又は、異常に増殖して疾患の原因となる、若しくは、疾患を悪化させるCXCR4+細胞である。したがって、標的細胞は、例えば、CXCR4+腫瘍細胞、免疫系の細胞、例えば、(抗炎症性適用/抗自己免疫疾患性適用に関して)CXCR4+白血球、若しくは、CXCR4指向性HIV株により標的とされるCXCR4+免疫細胞を含むことができる。

20

【0384】

CXCR4+腫瘍細胞、(抗炎症性適用/抗自己免疫疾患性適用に関して)CXCR4+白血球のようなCXCR4+細胞の殺滅、又は、炎症の低減、又は、腫瘍退縮、若しくは、寛解の誘導との関係で本明細書において使用される「優先的に」及び「特異的に」という用語は、標的部位に実質的に限定され、動物、又は、患者の正常で健康な組織における破壊を引き起こすことには実質的に及ばないCXCR4+標的細胞の破壊、例えば、腫瘍細胞破壊を達成するために本発明の抗CXCR4抗体、又は、その免疫複合体が機能することをしたがって意味する。

【0385】

本発明の抗CXCR4抗体、又は、治療用複合体は1つ以上の放射線治療薬、化学療法薬剤、抗血管新生薬剤、アポトーシス誘導薬剤、抗チューブリン薬剤、抗細胞性、若しくは、細胞毒性薬剤、サイトカイン、若しくは、ケモカインアンタゴニスト、サイトカイン、若しくは、ケモカイン発現の阻害剤、ATP分解酵素阻害剤、抗炎症薬剤、(例えば、二特異性抗体のような)その他の抗体、又は、血液凝固薬(血液凝固因子)、又は、副腎皮質ステロイド類、好ましくはグルココルチコイド、若しくは、非ステロイド性抗炎症薬剤(NSAID)のような抗炎症薬剤と結合することが好ましい。

30

【0386】

したがって、本発明は、抗CXCR4抗体が少なくとも1つのその他の治療薬、又は、診断薬と機能するように結合する、ある範囲の結合済みの抗体、及び、その断片を提供する。「免疫複合体」という用語は、抗体の別の有効な薬剤との機能可能な会合を定義するために広く使用され、任意の機能可能な会合を単に意味することを意図されるのではなく、化学的な「結合」に特に限定されるのではない。組換え融合タンパク質が特に考慮される。送達薬剤、又は、標的薬剤が標的に結合することができ、治療薬、又は、診断薬が送達されたうえで十分に機能的である限り、結合の方式は適切であろう。

40

【0387】

薬剤の炭水化物部分を介した抗体への結合もまた考慮される。O結合型とN結合型の両方のグリコシル化が抗体において自然に起こる。組換え体の抗体は、望ましい場合、(Xがプロリンを除く任意のアミノ酸であるアスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-トレオニン、セリン、又は、トレオニンのような)適切なアミノ酸配列を操作することで

50

簡単に獲得される付加的なグリコシル化部位を抗体の1次配列に再形成する、又は、形成するために修飾されることができる。

【0388】

本発明の抗CXCR4抗体、又は、治療用結合体、及び、関連する方法と使用において現在使用するのに好ましい薬剤はその抗体の作用を補完し、又は、強化する薬剤、及び/又は、特定のタイプの疾患（例えば、腫瘍のタイプ）、若しくは、患者について選択される薬剤である。

【0389】

「抗体の作用を補完し、又は、強化する治療薬」は放射線治療薬、化学療法薬剤、抗血管新生薬剤、アポトーシス誘導薬剤、抗チューブリン薬剤、抗細胞性、若しくは、細胞毒性薬剤、血液凝固薬、サイトカイン、若しくは、ケモカインアンタゴニスト、サイトカイン、若しくは、ケモカイン発現の阻害剤、ATP分解酵素阻害剤、副腎皮質ステロイド類、好ましくはグルココルチコイド、若しくは、非ステロイド性抗炎症薬剤（NSAID）のような抗炎症薬剤、その他の抗体（例えば、二特異性抗体）、抗体との使用が好ましいこれらのうちのいずれか1つ以上を含む。

10

【0390】

現在好まれる抗癌剤、特に抗白血病薬剤にはダウノルビシン、ドキソルビシン、シタラビン、6-チオグアニン、ミトキサントロン、ブスルファン（マイレラン（登録商標））、ダサチニブ（スプリセル（商標））、プレドニゾン、ビンクリスチン硫酸塩（オンコピン（登録商標））、クロラムブシル、フルダラビン、ペントスタチン、及び、クラドリビンのようなアントラサイクリン系薬剤が含まれる。

20

【0391】

現在好まれる抗血管新生薬剤にはアンジオスタチン、エンドスタチン、アンジオポイエチン類のいずれか1つ、バスキュロスタチン、カンスタチン、及び、マスピンが含まれる。

【0392】

本明細書において使用される「抗チューブリン薬剤」は、好ましくは細胞の有糸分裂に必要なチューブリンの活性を、好ましくはチューブリンの重合、又は、脱重合を直接的に、又は、間接的に阻害することによって細胞の有糸分裂を抑制する任意の薬剤、薬品、前駆薬、又は、それらの組合せを意味する。現在好まれる抗チューブリン薬剤には、コルヒチン、タキソール、ピンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、及び、コンプレタスタチン類の1つ以上が含まれる。

30

【0393】

現在好まれるNSAIDにはCOX-2阻害剤、スルホンアニリド類、リコフェロン、及び、-3脂肪酸が含まれる。

【0394】

前記の好ましい薬剤の本発明の抗CXCR4抗体との結合、又は、会合は、例えば、抗腫瘍特性、若しくは、抗炎症特性のような強化された治療上の特性、及び、相乗的な治療上の特性さえをしばしば持つ「免疫複合体」を生じる。

40

【0395】

抗細胞性、若しくは、細胞毒性薬剤の使用は（適切な場合、）本発明の抗CXCR4抗体「免疫毒」となり、一方、血液凝固因子の使用は本発明の抗CXCR4抗体「コアグリガンド」となる。

【0396】

上記の薬剤の1つ以上の組合せのような少なくとも2つの治療薬の使用もまた考慮される。

【0397】

ある適用において、本発明の抗CXCR4抗体治療薬は、細胞を殺す、又は、細胞の成長、若しくは、細胞分裂を抑制する能力を持つ細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制薬剤、又は、そうでなければ抗細胞性薬剤に機能するように結合するであろう。適切な抗細胞性薬剤に

50

は化学療法薬剤、並びに、細胞毒物、及び、細胞増殖抑制薬剤が含まれる。細胞増殖抑制薬剤は一般的に標的細胞の自然な細胞周期を妨害し、その結果、好ましくは細胞を細胞周期から外す薬剤である。

【0398】

化学療法薬剤の例にはステロイド類のようなホルモン、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、若しくは、アミノプテリンのような抗代謝物、アントラサイクリン類、マイトマイシンC、ピンカアルカロイド類、抗生物質、デメコルシン、エトポシド、ミトラマイシン、及び、クロラムブシル、若しくは、メルファランのような抗腫瘍アルキル化剤が含まれる。ある好ましい抗細胞性薬剤にはダウノルビシン、ドキシソルビシン/アドリアマイシンなどのDNA合成阻害剤が含まれる。総合的に見て、タキソール/パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタピン、コンプレタスタチン、及び、ドキシソルビシン/アドリアマイシンは現在好まれる抗癌剤である。

10

【0399】

プシンペリン、ペデリン、イルシニアスタチンAのようなタンパク質合成阻害剤がそうであるようにサリシリハラミド、コンカナマイシン、又は、パフィロマイシンのようなV型ATP分解酵素阻害剤もまた現在好まれる。

【0400】

その他の潜在的な薬剤と比較して、ほとんどの毒素は細胞殺滅作用をもたらす能力がずっと大きいため、ある治療上の適用において毒素部分が好まれるであろう。それ故、本発明の抗CXCR4抗体コンストラクトについて好まれるある抗細胞性薬剤は植物由来の、真菌由来の、又は、細菌由来の毒素である。毒素の例にはエピポドフィロトキシン類、バクテリアエンドトキシン若しくはバクテリアエンドトキシンのリピッドA部分、サボリン若しくはゲロニンのようなリボソーム不活性化タンパク質、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、胎盤性リボヌクレアーゼのようリボヌクレアーゼ類、ジフテリア毒素、及び、シュードモナス外毒素が含まれる。現在好まれる例はリシン、ゲロニン、アプリン、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、及び、百日咳毒素である。

20

【0401】

ある好まれる毒素はリシンA鎖のようなA鎖毒素である。最も好まれる毒素部分はしばしば、炭水化物残基を修飾する、又は、除去するために処理されたリシンA鎖、いわゆる、脱グリコシル化A鎖(dgA)である。脱グリコシル化リシンA鎖は、その非常な効力、比較的長い半減期のため、そして、臨床グレードと臨床規模でそれを製造することが経済的に可能であるため好まれる。組換え体の、及び/又は、短縮型のリシンA鎖もまた使用されることができる。

30

【0402】

本発明の抗CXCR4抗体は血液凝固を促進することができる成分、すなわち、血液凝固薬を含むことができる。ここに、標的抗体は直接、又は、間接的に、例えば、別の抗体を介して、血液凝固を直接的に、又は、間接的に促進する因子に結合することができる。

【0403】

そのような使用に好まれる血液凝固因子は組織因子(TF)、並びに、短縮型TF(tTF)、二量体の、三量体の、重合体の/多量体のTF、及び、第VII因子を活性化する能力を欠く変異型TFのようなTF派生物である。その他の適切な血液凝固因子には第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子、及び、第X/Xa因子のようなビタミンK依存的血液凝固因子、Gla化修飾を欠くビタミンK依存的血液凝固因子、ラッセルクサリヘビ蛇毒第X因子活性化因子、トロンボキサンA₂、及び、トロンボキサンA₂合成酵素のような血小板活性化化合物、並びに、 α 2抗プラスミン因子のような繊維素溶解阻害剤が含まれる。総合的に見て、短縮型組織因子(tTF)が現在好まれる。

40

【0404】

免疫複合体と免疫毒素の調製は一般的に本分野において周知である(米国特許第4,340,535号を参照のこと。)免疫毒素の生成、精製、及び、使用に関する本教示をさ

50

らに補足する目的で次の特許、米国特許第 6, 004, 554 号、米国特許第 5, 855, 866 号、米国特許第 5, 965, 132 号、米国特許第 5, 776, 427 号、米国特許第 5, 863, 538 号、米国特許第 5, 660, 827 号、及び、米国特許第 6, 051, 230 号のそれぞれは参照により本明細書にさらに組み入れられる。

【0405】

様々な化学療法薬剤、及び、その他の医薬剤はまた、本発明の抗 CXCR4 抗体治療薬にうまく結合することができる。抗体に結合した抗新生物薬剤の例にはドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、及び、ビンブラスチンが含まれる。さらに、ネオカルジノスタチン、マクロマイシン、トレニモン、及び、 α -アマニチンのようなその他の薬剤の結合が記載されてきた（米国特許第 5, 660, 827 号、米国特許第 5, 855, 866 号、及び、米国特許第 5, 965, 132 号を参照のこと。各々は本明細書に組み入れられる。）。 10

【0406】

コアグリガンドの調製もまた容易に実行される。1つ以上の血液凝固因子の本発明の抗 CXCR4 抗体との機能可能な会合は免疫毒素について上述された結合のような直接的な結合である可能性がある。あるいは、機能可能な会合は、その抗体が第 2 の結合領域、好ましくはその血液凝固因子に結合する抗体、又は、抗体の抗原結合領域に機能するように結合するような間接的な結合である可能性がある。血液凝固因子はその機能性血液凝固部位とは異なる部位、特に、共有結合がその分子を結合させるために使用される部位において本発明の抗 CXCR4 抗体と結合されなくてはならない。 20

【0407】

二特異的抗体、又は、三特異的抗体はまた、本発明の方法において使用され得る。そのような抗体において、1本の腕が CXCR4 に結合し、それは本発明の抗体である。二特異的抗体を調製する方法は周知であり、本分野において記述されている。

【0408】

免疫複合体、免疫毒素、及び、コアグリガンドの調製において、組換え体の発現が用いられ得る。本発明の選択された抗 CXCR4 抗体、及び、治療薬、毒素、又は、血液凝固薬をコードする核酸配列が発現ベクターにインフレームで結合される。組換え体の発現により核酸が翻訳され、望みの免疫複合体を生じる。化学架橋剤、及び、アビジン：ビオチン架橋もまた治療薬を本発明の抗 CXCR4 抗体に結合させることができる。 30

【0409】

本発明の組成物及び方法はその他の治療法と診断法と併用されることができる。本発明に従って抗 CXCR4 抗体と「組み合わせる」用いられる生物学的薬剤、好ましくは診断薬、又は、治療薬について、「組み合わせる」という用語はある範囲の実施形態を包含するために簡潔に用いられる。「組み合わせる」という語法は、特別に言及されない限り、又は、科学用語で明確にされない限り、様々な形式の組み合わせられた組成物、医薬品、混合物、キット、方法、並びに、第 1 医薬用途、及び、第 2 医薬用途に当てはまる。

【0410】

本発明の「組み合わせられた」実施形態はしたがって、例えば、本発明の抗 CXCR4 抗体が裸の抗体であり、それに機能するように結合していない薬剤、又は、治療薬と併用される点を含む。そのような場合、その薬剤、又は、治療薬は非標的型形態、又は、標的型形態で使用されることができる。「非標的型形態」において、その薬剤、特に、治療薬は本分野におけるその標準的な使用にしたがって一般的に用いられるであろう。「標的型形態」において、その薬剤は、標的疾患部位にその薬剤、又は、治療薬を送達する別個の抗体、又は、標的領域に一般に機能するように結合されるであろう。そのような標的型形態の生物学的薬剤、診断薬と治療薬の両方の使用はまた本分野においてきわめて標準的である。 40

【0411】

本発明のその他の「組み合わせられた」実施形態において、本発明の抗 CXCR4 抗体は、抗体がそれ自体機能するように薬剤、又は、治療薬と会合する、又は、結合する免疫複 50

合体である。機能可能な結合には本明細書において記載され、そして、本分野において既知である直接的な結合、及び、間接的な結合のあらゆる形態が含まれる。

【0412】

「組合せ」利用、特に、前駆薬の形態である治療薬との組合せでの本発明の抗CXCR4抗体に関する「組合せ」利用にはまた、組み合わせられた組成物、医薬品、混合物、キット、方法、並びに、第1医薬用途、及び、第2医薬用途が含まれる。そのような実施形態において、前駆薬をその薬品の機能形態に変換することができる活性化成分は本発明の抗CXCR4抗体と再度、機能するように会合することができる。

【0413】

ある好ましい実施形態において、治療用組成物、配合剤、医薬品、混合物、キット、方法、並びに、第1医薬用途、及び、第2医薬用途は「前駆薬の組合せ」であるであろう。当業者により理解されるように、「前駆薬の組合せ」という用語は、別段に言及されない限り、前駆薬を活性がある薬品に変換することができる成分に本発明の抗体が機能するように結合することを意味し、その抗体が前駆薬それ自体に結合することを意味しない。しかしながら、本発明の前駆薬の実施形態は前駆薬の組合せとして使用される必要があるという必要条件は無い。したがって、前駆薬は、本分野においてそれらが使用される、ADEPTとその他の形態を含む任意の方法で使用されることができる。

10

【0414】

したがって、組み合わせられた組成物、医薬品、混合物、キット、方法、並びに、第1、及び、第2医薬用途が好ましくは診断薬の点で、より好ましくは、治療薬の点で記述される場合、その組合せには裸の抗体であり、免疫複合体である抗CXCR4抗体が含まれ、本発明のインビボの実施形態の実行には、ある複合体の、又は、非複合体の形状で、ある形態の抗体とある形態の生物学的、診断用、若しくは治療用薬剤の総合的な提供が達成される限り、裸の抗体、若しくは、免疫複合体と生物学的、診断用、若しくは、治療用の薬剤の前投与、同時投与、又は、後投与が含まれる。

20

【0415】

本発明の腫瘍への作用の前述の、及び、その他の説明は、組み合わせられた操作法、結合した薬剤のタイプなどを単に説明するためになされる。この記述的アプローチは本発明の抗CXCR4抗体の有益な特質についての控えめな表現、又は、過度の単純化のどちらかであると解釈されてはならない。それ故、そのような抗体それ自体が抗CXCR4特性を持つこと、及び、そのような抗体の免疫複合体はこれらの特性を保持し、結合した薬剤の特性とそれらを統合するであろうこと、そしてさらに、その抗体と任意の結合した薬剤の統合された作用は典型的には増強される、及び/又は、拡大されるであろうことが理解されるであろう。

30

【0416】

それ故、本発明は組成物、医薬組成物、少なくとも本発明の第1抗CXCR4抗体、若しくは、そのような抗CXCR4抗体の抗原結合断片、若しくは、免疫複合体の生物学的有効量と少なくとも第2生物学的薬剤、成分、若しくは、系の生物学的有効量を、任意選択によるが、少なくとも第1組成物、若しくは、容器に含む治療キット、及び、医療用混合物を提供する。

40

【0417】

「少なくとも第2生物学的薬剤、成分、又は、系」は、多くの場合、治療薬又は診断薬、成分又は系であろうが、しかし、必ずしもそうではない。例えば、少なくとも第2生物学的薬剤、成分、又は、系は抗体の修飾のための成分、及び/又は、抗体にその他の薬剤を結合するための成分を含むことができる。ある好ましい第2生物学的薬剤、成分、又は、系は前駆薬、又は、前駆薬それ自体を作成するための成分、及び、本発明の抗体をそのような前駆薬、若しくは、ADEPTの実施形態において機能するように適合させるための成分を含む、前駆薬を作成し使用するための成分である。

【0418】

治療薬、又は、診断薬が少なくとも第2生物学的薬剤、成分、又は、系として含まれる

50

場合、そのような治療薬、及び/又は、診断薬は典型的には先に定義された1つ以上の疾患の治療、又は、診断に関連して使用されるものである。

【0419】

したがって、ある実施形態において、「少なくとも第2治療薬」は治療キット、又は、治療用混合物に含まれるであろう。その用語は第1治療薬である本発明の抗CXCR4抗体と関連して選択される。本発明に従って「少なくとも第2治療薬」であることに適切である治療薬は免疫複合体との関連で先に議論されている。

【0420】

本発明の組成物、キット、及び/又は、医薬品に関して、組み合わせられた有効量の治療薬は単一の容器、若しくは、入れ物に含まれることができ、又は、別個の容器、若しくは、入れ物に含まれることができる。混合物は一般に併用のため一緒に混合されるであろう。静脈内投与のために製剤された薬剤は、多くの場合、好まれるであろう。画像化成分もまた含まれることができる。キットはまた、含まれる少なくとも第1抗体、及び、1つ以上のその他の生物学的薬剤の使用説明書を含むことができる。

10

【0421】

一般的に言って、少なくとも第2治療薬は動物、又は、患者に本発明の抗CXCR4抗体と実質的に同時に、例えば、単一の医薬組成物から、又は、ほぼ一緒に投与される2つの医薬組成物から投与されることができる。

【0422】

あるいは、少なくとも第2治療薬は動物、又は、患者に本発明の抗CXCR4抗体の投与に引き続いて投与されることができる。本明細書において使用される「引き続いて」は、少なくとも第2抗癌剤が動物、又は、患者に本発明の抗CXCR4抗体の投与とは別の時に投与されるように「ずらされる」ということを意味する。一般に、2つの薬剤がそれぞれのそれぞれの治療作用を及ぼすのを可能にするように効果的に時間間隔をあけてその2つの薬剤が投与される、すなわち、2つの薬剤は「生物学的に有効な時間間隔」で投与される。少なくとも第2治療薬は動物、又は、患者に本発明の抗CXCR4抗体の投与の前の生物学的に有効な時間で、又は、その治療薬の後の生物学的に有効な時間で投与されることができる。

20

【0423】

したがって、本発明は、
(a) 動物、又は、患者が腫瘍量を実質的に低減させる第1治療を受けるようにさせること、及び、
(b) その後、任意選択的に第2治療薬と機能するように会合する、少なくとも本発明の第1抗CXCR4抗体、又は、その抗原結合断片を投与することを含む、腫瘍を有する動物、又は、患者を治療する方法を提供する。

30

【0424】

好ましい第1治療には外科的切除、及び、化学療法的介入が含まれる。

【0425】

別の実施形態において、本発明は、
(a) 動物、又は、患者が炎症のようなCXCR4が介在する負荷を実質的に低減させる第1治療を受けるようにさせること、及び、
(b) その後、任意選択的に第2治療薬と機能するように会合する、少なくとも本発明の第1抗CXCR4抗体、又は、その抗原結合断片を投与することを含む、CXCR4介在性疾患を有する動物、又は、患者を治療する方法を提供する。

40

【0426】

ある別の実施形態において、本発明の抗体と免疫複合体は1つ以上の診断薬、典型的には、先に定義された疾患の診断に関して使用される診断薬と組み合わせることができる。ある範囲の診断用組成物、キット、及び、方法はしたがって本発明に含まれる。

【0427】

そのうえにさらなる態様は、適切な量の本明細書において定義される本発明の抗体、又

50

は、タンパク質を患者に投与することを含み、そして、その患者における本発明の抗体、若しくは、その他のタンパク質の存在、及び/又は、量、及び/又は、位置を検出する患者の診断法、又は、画像化法である。

【0428】

ある実施形態において、本発明は、ある動物において本発明の抗体とCXCR4の間に複合体を形成するのに有効な量のその抗体、又は、その免疫複合体をその動物に投与することを含み、それにより動物におけるCXCR4発現に関連する免疫抑制を低下させる方法を提供する。

【0429】

上述された使用と方法に従う画像化される、又は、診断される適切な疾病には本明細書のどこかに記載されるCXCR4関連疾病と好ましくは本明細書のどこかに記載される任意の癌が含まれる。

10

【0430】

ある実施形態において、本発明は、

(a) 動物から採取された試験サンプルを本発明の抗体、又は、その免疫複合体と接触させる工程を含む動物において疾病を診断する方法を提供する。

【0431】

さらなる実施形態において、本発明は、

(a) 動物から採取された試験サンプルを本発明の抗体、又は、その免疫複合体と接触させる工程、

20

(b) その試験サンプルにおいて抗体抗原複合体の存在、及び/又は、量、及び/又は、位置を測定する、又は、検出する工程、並びに、任意選択によるが、

(c) 試験サンプルにおける抗体抗原複合体の存在、及び/又は、量を対照と比較する工程を含む動物において疾病を診断する方法を提供する。

【0432】

上述の方法において、前記の接触させる工程は抗体抗原複合体の形成を可能にする条件で行われる。適切な条件は当業者により容易に決定されることができる。

【0433】

上述の方法において、任意の適切な試験サンプル、例えば、疾病に冒されているのではないかと考えられる生検の細胞、組織、若しくは、器官、又は、組織学的切片が使用されることができる。

30

【0434】

上述の方法のいくつかにおいては、試験サンプルにおける任意の量の抗体抗原複合体の存在は疾病の存在を示すであろう。好ましくは、実行される陽性の診断について、試験サンプルにおける抗体抗原複合体の量は適切な対照サンプルにおいて見つかる量よりも多い、好ましくは有意に多い。より好ましくは、有意に多いレベルとは統計学的に有意であり、好ましくは0.05より小さい確率値で統計学的に有意である。統計学的有意性を決定する適切な方法は周知であり、本分野において記述されており、これらのいずれかが用いられることができる。

【0435】

適切な対照サンプルは当業者によれば適切に選択されることができるであろう。例えば、ある特定の疾病の診断の場合なら、適切な対照はその疾病を持たない患者に由来するサンプルであろう。適切な対照「値」は、対照「サンプル」を試験ごとに処理することなく、例えば、本分野において既知の正常な対象についての範囲を参照することにより容易に決定されることができるであろう。

40

【0436】

診断への応用、又は、画像化への応用における使用のために、本発明の抗体は、放射線不透過物、若しくは、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I のような放射性同位体、放射線放出体（例えば、 α 線放出体、 β 線放出体、又は、 γ 線放出体）、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、若しくは、ルシフェリンのような蛍光化合物（フ

50

ルオロフォア)若しくは化学発光化合物(クロモフォア)、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼ、若しくは、ホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素、画像化剤、又は、金属イオン、又は、特定の同族の検出可能な部分、例えば、標識されたアビジン/ストレプトアビジンへの結合で検出されることができるビオチンのような化学部分のような検出可能なマーカーで標識されることができる。結合タンパク質、例えば抗体又は抗体断片に標識を付ける方法も当該分野で公知である。そのような検出可能なマーカーは、試験サンプルにおける結合タンパク質 - 抗原複合体の存在、量又は位置を調べることを可能にする。

【0437】

インビボでの使用に好ましい検出可能なマーカーにはビスマス(III)、金(III)、ランタン(III)、若しくは、鉛(II)のようなX線で検出可能な化合物、銅⁶⁷、ガリウム⁶⁷、ガリウム⁶⁸、インジウム¹¹¹、インジウム¹¹³、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、水銀¹⁹⁷、水銀²⁰³、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、ルビジウム⁹⁷、ルビジウム¹⁰³、テクニチウム^{99m}、若しくは、イットリウム⁹⁰のような放射性イオン、コバルト(II)、銅(II)、クロム(III)、ジスプロシウム(III)、エルビウム(III)、ガドリニウム(III)、ホルミウム(III)、鉄(II)、鉄(III)、マンガン(II)、ネオジム(III)、ニッケル(II)、サマリウム(III)、テルビウム(III)、バナジウム(II)、若しくは、イッテルビウム(III)のような核磁気スピン共鳴同位体、又は、ローダミン、若しくは、フルオレセインが含まれる。

10

【0438】

本発明にはまた、検出可能なシグナルを作り出す標識に直接的に、又は、間接的に結合する本発明の抗体を含む診断薬、又は、画像化剤が含まれる。適切な標識は本明細書のどこかに記載される。

20

【0439】

本発明には、本発明の抗体、免疫複合体、若しくは、組成物のうちの1つ以上、又は、本発明の抗体をコードする核酸分子のうちの1つ以上、又は、本発明の核酸配列を含む組換え発現ベクターの1つ以上、又は、本発明の組換え発現ベクター、若しくは、核酸配列を含む宿主細胞、若しくは、ウィルスの1つ以上がさらに含まれる。好ましくは、前記キットは本明細書において記載される方法と使用、例えば、本明細書において記載される治療法、診断法、若しくは、画像化法において用いられるものであり、又は、本明細書において記載されるインビトロアッセイ、若しくは、インビトロ方法において用いられるものである。そのようなキットに含まれる抗体は好ましくは本明細書のどこかに記載される抗体結合物であることができ、例えば、検出可能な部分に結合されることができ、又は、免疫複合体であり得る。好ましくは、前記キットは、例えば、診断におけるキットの構成物の使用説明書を含む。好ましくは、前記キットは本明細書のどこかに記載される疾病の診断用、又は、治療用であり、任意選択によるが、そのような疾病を診断する、又は、治療するキットの構成物の使用説明書を含む。

30

【0440】

本明細書において定義される本発明の抗体はまた、インビトロの、又は、インビボの適用とアッセイのための分子ツールとして用いられることができる。その抗体は抗原結合部位を持っているので、これらは特定の結合対の要素として機能することができ、そして、特定の結合対の要素が必要とされる任意のアッセイにおいてこれらの分子が使用されることができる。

40

【0441】

したがって、本発明のそのうえにさらなる態様は本明細書において定義される本発明の抗体を含む試薬、及び、例えば、インビトロ、又は、インビボのアッセイにおけるそのような抗体の分子ツールとしての使用を提供する。

【0442】

癌の治療はまた、

(a) 腫瘍を持つ動物、又は、患者に本発明の抗CXCR4抗体に機能するように結合

50

する診断薬を含み、検出できるように標識された少なくとも本発明の第1抗CXCR4抗体の診断的な量を投与し、それによって腫瘍の検出可能な画像を形成すること、並びに、

(b)その後、同じ動物、又は、患者に少なくとも本発明の第1の裸の抗CXCR4抗体、又は、そのような抗体を用いる治療薬-抗体構成物の治療上最適化された量を投与し、それにより抗腫瘍作用を引き起こすことにより実行されることができる。

【0443】

次に、本発明を表及び図を参照しながら、以下の非制限的な実施例により更に詳細に説明する。

表1は、C-9P21抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。

表2は、B-1M22抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。

表3は、C-1I24抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。

表4は、D-1K21抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。

表5は、9N10抗体に関して本明細書に記載した配列のいくつかを示す。

表6は、IgG型C-9P21抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。下線は可変領域を示す。

表7は、IgG型B-1M22抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。下線は可変領域を示す。

表8は、IgG型C-1I24抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。下線は可変領域を示す。

表9は、IgG型D-1K21抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。下線は可変領域を示す。

表10は、IgG型9N10抗体に関して本明細書に開示した配列のいくつかを示す。下線は可変領域を示す。

表11は、本発明の抗体に関して本明細書に開示した他の配列を示す。

【実施例】

【0444】

実施例1：新規抗体

CXCR4に特異的に結合できる5種のヒト抗体を同定した。一本鎖抗体をc-myc及び6xHisエピトープタグを有するpHOG21プラスミド(Kipriyanovら、1997)内にクローニングした。TG1細菌を形質転換し、scFvをIPTG誘導により発現させた。精製scFvの結合をEasyCyteで確認した。

【0445】

抗体の重鎖及び軽鎖を産生するクローンのヌクレオチド配列を配列決定した。抗体はC-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21及び9N10と命名した。C-9P21の軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を、図1に示す。C-9P21の軽鎖及び重鎖のCDR領域を表1に示す。B-1M22の軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を、図2に示す。B-1M22の軽鎖及び重鎖のCDR領域を表2に示す。C-1I24の軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を、図3に示す。C-1I24の軽鎖及び重鎖のCDR領域を表3に示す。D-1K21の軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を、図4に示す。D-1K21の軽鎖及び重鎖のCDR領域を表4に示す。9N10の軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を、図5に示す。9N10の軽鎖及び重鎖のCDR領域を表5に示す。

【0446】

更に、C-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21及び9N10抗体のIgG型を作製した。IgG型は、IgG1アイソタイプであり、2つの重鎖と2つの軽鎖とを有する。各重鎖は、V_Hドメイン(配列番号69：C-9P21、配列番号71：B-1M22、配列番号73：C-1I24、配列番号75：D-1K21、配列番号69：9N10)とヒトIgG1定常領域とを有する。各軽鎖は、V_Lドメイン(配列番号70：C-9P21、配列番号72：B-1M22、配列番号74：C-1I24、配列番号76：D-1K21、配列番号103：9N10)とヒト軽鎖定常領域(B-1M

10

20

30

40

50

22及びC-1I24)又はヒト 軽鎖定常領域(C-9P21、D-1K21及び9N10)とを有する。C-9P21、B-1M22、C-1I24、D-1K21及び9N10の全IgG配列を、それぞれ表6、7、8、9及び10に示す。

【0447】

細胞及び細胞培養

CCRF-CEM(急性リンパ芽球性白血病、ATCC番号CCL-119)、HEK293T/17(ヒト腎臓、ATCC番号CRL-11268)、Ramos(バーキットリンパ腫、ATCC番号CRL-1596)、Jurkat6E-1(ヒトT細胞白血病、ATCC番号EACC)及びDT40(ニワトリリンパ腫、ATCC番号CRL-2111)細胞株は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(the American Type Culture Collection(ATCC)、ロックビル、MD)から入手した。CCRF-CEM、Ramos、Jurkat及びDT40細胞はRPMI-1640培養培地中に維持し、HEK293T細胞はダルベッコ変性イーグル培地(DMEM)培養培地中に維持した。全ての細胞をウシ胎児血清とともに維持し、その濃度はDT40及びHEK293T細胞では10%、CCRF-CEM細胞、Jurkat及びRamosでは20%とした。全ての培地にペニシリン及びストレプトマイシンを添加した。

10

【0448】

Ramos及びJurkat細胞は、週に3回分割し、 3×10^5 細胞/mLとして48時間、週末にかけては 2×10^5 細胞/mLとして生育させる。

20

CCRF-CEM細胞は、週に3回分割し、 3×10^5 細胞/mLとして48時間、週末にかけては 2×10^5 細胞/mLとして生育させる。

【0449】

HEK293T/17細胞は、週に2、3回分割し、 3.2×10^5 細胞/mLとして48時間、週末にかけては 2.7×10^5 細胞/mLとして生育させる。

【0450】

一過性トランスフェクトとして、 2×10^6 個のHEK293T/17細胞をT75(Nunc)フラスコに播種する。播種から48時間後に、細胞をFugene(Roche)でトランスフェクトする。各T75について40 μ LのFugeneと16 μ gのDNAを使用する。細胞は、トランスフェクションの48時間後にアッセイに用いる。

30

【0451】

実施例2：CXCR4発現細胞に対する抗体クローンの結合の特異性

4種の抗体、B-1M22、C-9P21、C-1I24及びD-1K21のscFvレベルでのCXCR4に対する特異性を、CXCR4トランスフェクト細胞への結合能により試験した。トランスフェクト細胞と対応する非トランスフェクト細胞との相違点は、CXCR4の発現のみである。

【0452】

材料及び方法

DT40及びHEK293T/17細胞は上述のように維持した。

【0453】

DT40+CXCR4、HEK293+CXCR4、DT40、HEK293細胞を培養フラスコから採取し、PBS(400 \times g、5分、4 $^{\circ}$ C)で2回洗浄し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSに再懸濁した。1ウェル当たり 1×10^5 個の細胞をV型96-ウェルプレート(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)に分取した。細胞を遠心分離(400 \times g、5分、4 $^{\circ}$ C)し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBS中、50 μ LのscFv(10 μ g/mL)に再懸濁した。1時間インキュベーション(4 $^{\circ}$ C)後、細胞を0.2%BSA及び0.09%NaN₃含有PBS100 μ Lで3回洗浄し、自家製マウス抗cMy_c抗体(2.5 μ g/mL)で染色した。1時間インキュベーション(4 $^{\circ}$ C)した後、細胞を0.2%BSA及び0.09%NaN₃含有PBS100 μ Lで3回洗浄し、0.2

40

50

% BSA 及び 0.09% NaN₃ 含有 PBS で 5 µg/mL に希釈した RPE 結合ヤギ抗マウス IgG (F0479、Dako、Denmark) とともに 4 で 30 分間、インキュベートした。細胞を洗浄、0.2% BSA 及び 0.09% NaN₃ 含有 PBS 200 µL に再懸濁し、U 型 96 ウェルコスター (Corning, Schiphol-Rijk, The Netherlands) プレートに移し、EasyCyte 装置 (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) によるフローサイトメトリーに用いた。

【0454】

結果

形質転換した HEK 細胞上の B-1M22 を除く、4 つのクローン全てが、トランスフェクションされた細胞株に特異的な結合性を示す (図 6A 及び 6B を参照されたい) (しかし、B-1M22 抗体は DT40 トランスフェクト細胞に特異的な結合を示す)。CXCR4 は、以前から知られているように (Baribaudら、2001)、それを発現する細胞株に依存して多少異なる構造を取る傾向があることに留意すべきである。この事実が、異なる細胞株に異なる結果をもたらす原因のようである。これらの実験では、C-9P21 クローンが概して最も優れた結合物であった。

10

【0455】

更に、以下に記載のように、9N10、C-9P21 及び F7 クローンの IgG レベルでの、天然に CXCR4 (Ramos、CCRF-CEM) を発現する細胞に結合する能力を試験した。

20

【0456】

材料及び方法

Ramos 及び CCRF-CEM 細胞は上述のように維持した。

【0457】

細胞を培養フラスコから採取し、PBS (350 × g、5 分、4) で 2 回洗浄し、0.2% BSA 及び 0.09% NaN₃ を含有する PBS に再懸濁した。1 ウェル当たり 1 × 10⁵ 個の細胞を V 型 96 - ウェルプレート (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) に分取した。細胞を遠心分離 (350 × g、5 分、4) し、0.2% BSA 及び 0.09% NaN₃ を含有する PBS 中、50 µL の IgG (50 µg/mL) に再懸濁した。12 点滴定を行い、3 倍希釈した。1 時間インキュベーション (4) した後、細胞を 0.2% BSA 及び 0.09% NaN₃ 含有 PBS 150 µL で 3 回洗浄し、0.2% BSA 及び 0.09% NaN₃ 含有 PBS で 2.5 µg/mL に希釈した RPE 結合ヤギ抗ヒト IgG (AbD seroTec、#204009) とともに 4 で 30 分間、インキュベートした。細胞を洗浄、0.2% BSA 及び 0.09% NaN₃ 含有 PBS 200 µL に再懸濁し、U 型 96 ウェルコスター (Corning, Schiphol-Rijk, The Netherlands) プレートに移し、EasyCyte 装置 (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) によるフローサイトメトリーに用いた。

30

【0458】

結果

この実験では、用量依存的に 3 つのクローン全てが、細胞株を認識する (図 6C を参照されたい)。F7 の両細胞への結合は、9N10 及び C-9P21 に比べて、わずかに高いようである。

40

【0459】

実施例 3 : 抗 CXCR4 抗体のリガンド結合干渉

4 種の抗体、B-1M22、C-9P21、C-1I24 及び D-1K21 の scFv レベルでの CXCR4 に対する特異性を、CXCR4 に特異的に結合する 2 種の分子の存在下及び不存在下における CXCR4 トランスフェクト細胞及び CXCR4 を恒常的に発現するリンパ芽球様細胞への結合能により、試験した。2 種の分子の 1 つは CXCR4 の天然のリガンドである SDF-1 であり、もう一方は、CXCR4 への SDF-1 の結

50

合を高い特異性で競合的に阻害するペプチドであるAMD3100である。

【0460】

材料及び方法

Jurkat及びRamos細胞は上述のように維持した。

【0461】

s c F vクローンを大規模に発現させ、SEC分画によるモノマー画分として精製した。天然のCXCR4⁺発現細胞株であるJurkat及びRamosを培養フラスコから採取し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで2回洗浄し、1ウェル当たり1×10⁵個の細胞をV型96-ウェルプレート(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)に分取した。細胞を遠心分離(400×g、5分)によりペレット化し、SDF-1 (PeproTech EC, London, UK) 1μgと0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで10μg/mLに希釈したs c F v 50μLとを同時に細胞に添加し、4で60分間インキュベートした。リガンド不含の試料又は157μgのAMD3100をs c F vと共に細胞に添加した。AMD3100は単にこのレセプターに結合するのみであるので、CXCR4の特異性の対照として使用した。400×gで5分間遠心分離した後、上清を吸引し、細胞を0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBS 100μLでさらに2回洗浄し、遠心分離(400×g、5分)後、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで2.5μg/mLに希釈した自家製抗cMy c抗体50μLとともに4で1時間、インキュベートした。0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで3回洗浄後、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで5μg/mLに希釈したrPE-結合ヤギ抗マウスIgG(BD Biosciences)で染色し、4で30分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃含有PBS 200μLに再懸濁し、U型96ウェルプレート(Corning)に移し、EasyCyte装置(Guava Technologies, Hayward, CA, USA)によるフローサイトメトリーに用いた。

10

20

【0462】

結果

B-1M22を除く、4種のクローンの3つは両細胞株に特異的結合性を示す。これら3種の結合クローンの全てが、その競合の程度は異なるが、SDF-1及びAMD3100の両者により阻害される(図7A(Jurkat細胞)及び図7B(Ramos細胞)を参照されたい)。これにより、これらのクローンは天然のリガンドが結合する部位とほぼ同じ部位に結合すること、及び生物学的効果を有する可能性が示唆される。B-1M22は、その結合レベルが低く、結合又は競合の状態を維持できないが、以下の実施例に示されるように、CCRF-CEM細胞上のCXCR4との結合においては本明細書に記載の最も優れた結合物の1つである(実施例4及び図8Aを参照されたい)。この場合も、CXCR4がそれを発現する細胞株に依存して多少異なる構造を取る傾向があると思われる。これにより、B-1M22に関して得られたデータが説明される。C-9P21及びC1I24が試験に用いた細胞種の全てに優れた結合性を示すことは、これらが複数の形態でCXCR4に結合できることを示唆していると認められ、これは非常に有利である。

30

40

【0463】

更に他の実験において、以下に記載のように、3種の9N10、C-9P21及びF7抗体のIgGレベルでのCXCR4に対する特異性を、CXCR4に特異的に結合する分子であるSDF-1の存在下及び不存在下に、CXCR4を天然に発現するCCRF-CEM細胞への結合能により、試験した。

【0464】

材料及び方法

CCRF-CEMは上述のように維持した。

【0465】

天然のCXCR4⁺を発現する細胞株CCRF-CEM細胞を培養フラスコから採取し

50

、0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBSで2回洗浄し、1ウェル当たり1×10⁵個の細胞をV型96-ウェルプレート(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)に分取した。細胞を遠心分離(350×g、5分)によりペレット化し、4、1又は0.5µgのSDF-1 (Peprotech EC, London, UK)と0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBSで2µg/mLに希釈したIgG 50µLとを同時に細胞に添加し、4で60分間インキュベートした。リガンド不含の試料を対照とした。350×gで5分間遠心分離した後、上清を吸引し、細胞を0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBS 150µLでさらに2回洗浄し、遠心分離(350×g、5分)後、0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBSで2.5µg/mLに希釈したRPE結合ヤギ抗ヒトIgG (AbD serotec、#204009)で染色し、4で30分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBS 200µLに再懸濁し、U型96ウェルプレート(Corning)に移し、Easy Cyte装置(Guava Technologies, Hayward, CA, USA)によるフローサイトメトリーに使用した。

10

【0466】

結果

C-9P21及び9N10の両クローンがCCR4-CEM細胞株に特異的な結合性を示す。両クローンはまた、SDF-1により阻害される(図7Cを参照されたい)。本実験において、F7は、最も強い絶対シグナルにより判断されるように、細胞への最大の結合を示すことに留意すべきである。

20

【0467】

実施例4: 抗体候補のIgG型への変換

同定された抗CXCR4抗体の生物学的活性を比較するために、B-1M22、C-1I24、C-9P21及びD-1K21及び9N10を全長IgG1抗体型に変換した。対照として、F7抗体を生成した。F7抗体はCXCR4への結合により特徴付けされる(Medar exによるWO2008/060367参照)。F7抗体VH及びVL鎖の配列は、WO2008/060367の配列番号25及び配列番号29に規定されている。この抗体のIgG1型を作製するために、特許WO2008/060367(VH: 配列番号25、VL: 配列番号29)の記載に従って、最適のヌクレオチド配列をF7抗体のアミノ酸配列から演繹した。この配列を合成し、Norderhaugら(JIM、204: 27-87、1997)に記載されているようにヒトIgG1/ にクローン化し、HEK293細胞に発現させ、続いてタンパク質Aにより精製した。これらIgGがCXCR4陽性細胞への結合能を保持していることを確認するために、全てのIgGをCXCR4を天然に発現するCCR4-CEM細胞上で評価した。

30

【0468】

材料及び方法

対応する可変ドメインをコードする遺伝子を、ヒト定常ドメインに対する遺伝子を有する哺乳類の発現ベクターpLNO内にクローン化した(Norderhaugら、前述)。

40

【0469】

抗体を細胞工場内に発現させ、最初の採取物をタンパク質Aカラムで精製し、サイズ排除クロマトグラフィーによりモノマーに分画した。

【0470】

天然のCXCR4⁺を発現する細胞株CCR4-CEMを培養フラスコから採取し、0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBSで2回洗浄し、1ウェル当たり1×10⁵個の細胞をV型96-ウェルプレート(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)に分取した。細胞を遠心分離(400×g、5分)によりペレット化し、0.2% BSA及び0.09% NaN₃を含有するPBSで10µg/mLに希釈したIgG 50µLと4で60分間インキュベートした。400

50

×gで5分間遠心分離した後、上清を吸引し、細胞を0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBS100μLでさらに2回洗浄し、遠心分離(400×g、5分)した。その後、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで5μg/mLに希釈したrPE結合ヤギ抗ヒトIgG(AbD Serotec)50μLで4、30分間染色し、4で30分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃含有PBS200μLに再懸濁し、U型96ウェルプレート(Corning)に移し、EasyCyte装置(Guava Technologies, Hayward, CA, USA)によるフローサイトメトリーに用いた。

【0471】

結果

試験したクローンの全てが、CXCR4陽性細胞への結合能を保持した(図8A:C-1I24及びB-1M22、図8B:D-1K21及びC-9P21、9N10のデータは図示せず)。図8に示すEasyCyte曲線から、これらの実験では、本明細書に記載のクローンはCXCR4発現CCR4-CEM細胞への結合が、F7抗体よりも有意に優れていることも認められる(中央値が、PBS陰性対照の3.11に対して、48.11(F7)、179.03(D-1K21)、626.43(C-9P21)、910.58(C-1I24)及び1077.33(B-1H22))。

【0472】

実施例5:種間交差反応

抗体候補のサル及びマウスのCXCR4との交差反応性をscFvレベルで試験した。

【0473】

材料及び方法

HEK293T/17細胞は上述のように維持した。

FACS結合分析(EasyCyte)は、マウス(遺伝子バンク受け入れ番号BC031665)又はサル(アカゲザル)のCXCR4(NCBI受託番号NP_001036110)をコードするプラスミドで一過性にトランスフェクトしたHEK-293細胞を用いて行った。2つの実験を行った。1つは、検出に-cMyc及びPE標識ヤギ抗マウスIgG抗体を使用し、もう1つは、直接結合したRPE-c-Myc抗体を使用する。さらに、IgGレベルでの交差反応を分析した。後者では、抗体の結合はPE結合ヤギ抗ヒトIgG抗体で検出した。

【0474】

結果

D-1K21は、マウス及びサルCXCR4の両者に対して良好な交差反応性を示した。B-1M22、C-9P21及びC-1I24のscFv変異体もサル抗原に良好な交差反応性を示したが、マウスCXCR4に対しては、低(B-1M22)から中程度(C-1I24及びC-9P21)の反応性であった(図9参照)。9N10も試験したところ、C-9P21と同じ交差反応性パターンを示したが、結合の絶対値はわずかに高かった。

【0475】

実施例6: CXCR4を介するリガンド誘導シグナリングの阻害

抗CXCR4抗体である、B-1M22、C-1I24、C-9P21及びD-1K21のscFv及びIgGレベルでのSDF-1リガンド誘導Ca⁺⁺流への影響力を試験した。9N10はIgGレベルのみについて試験した。実験は、天然のCXCR4⁺陽性細胞株CCR4-CEMを用いて行った。

【0476】

最初の段階で、CCR4-CEM細胞上の抗体を滴定して最適の抗体濃度を決定した。

【0477】

材料及び方法

CCR4-CEM細胞は上述のように維持した。

【0478】

10

20

30

40

50

天然のCXCR4⁺を発現する細胞株CCRF-CEMを培養フラスコから採取し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで2回洗浄し、1ウェル当たり1×10⁵個の細胞をV型96-ウェルプレート(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)に分取した。細胞を遠心分離(400×g、5分)によりペレット化し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSでIgGを10μg/mLに希釈し、これを開始濃度として2倍希釈を11回繰り返しながら各50μLのIgG液と4で60分間インキュベートした。400×gで5分間遠心分離した後、上清を吸引し、細胞を0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBS100μLでさらに2回洗浄し、遠心分離(400×g、5分)した。その後、0.2%BSA及び0.09%NaN₃を含有するPBSで5μg/mLに希釈したrPE結合ヤギ抗ヒトIgG(AbD Serotec)50μLで4、30分間染色し、4で30分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、0.2%BSA及び0.09%NaN₃含有PBS200μLに再懸濁し、U型96ウェルプレート(Corning)に移し、EasyCyte装置(Guava Technologies, Hayward, CA, USA)によるフローサイトメトリーに使用した。

10

【0479】

結果

結果として、競合実験に使用する抗体の濃度を、IgGとして10μg/mL又は100μg/mLとし(ただし、9N10は1μg/mL又は10μg/mLとした)(データは表示せず)、scFvとして4μg/mLとした(図10参照)。

20

【0480】

正確な濃度を確認した後、実際の競合実験を行った。

【0481】

材料及び方法

CCRF-CEM標的細胞を遠心分離で採取し、RPMI-1640培養培地で2回洗浄した。2.5×10⁶個の細胞(IgG用)1mL又は2.5×10⁷個の細胞(scFv用)10mLをFluo-4-AM(アセトキシメチルエステル:Invitrogen)、プルロニックF-127(Invitrogen)及びプロベネシドと最終濃度がそれぞれ1μM、0.02%、1mMとなるように混合した。全ての細胞を垂直回転ホイール(7rpm)上で37 60分間インキュベートした。その後のステップは全て1mMのプロベネシド存在下に行った。細胞を10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-11640で2回洗浄し、アッセイ緩衝液(145mMNaCl、4mMKCl、1mMMNaH₂PO₄、0.8mMMgCl₂、25mMHepes、22mMグルコース)で1回洗浄後、最終濃度4×10⁶細胞/mLで再懸濁した。同量の細胞、抗体及びリガンド(SDF-1)含有又は不含アッセイ緩衝液を混合した。最初の2つの成分(細胞と抗体)をリガンドであるSDF-1(最終濃度:50ng/mL)の添加前に15分間、プレインキュベートした。抗体の最終濃度は、IgGでは10μg/mL又は100μg/mL、scFvでは4μg/mLとした。試料は直ちに515-545nmバンド通過フィルターを使用してFACSCantoII(BD Biosciences)上で分析した。曲線下の面積(AUC)をプリズムソフトウェア(GraphPad)を使用して積分して求め、SDF-1のみによる最大刺激でのAUCに対する百分率としてプロットした。

30

40

【0482】

結果

scFvレベルで、C-9P21及びD-1K21変異体により強い拮抗作用が見られた。C-1I24もある程度の拮抗作用を示した。B-1M22では活性は認められなかった(図11A)。

【0483】

IgGレベルでは、試験した5種の抗体のうち4種の抗体、B-1M22、C-1I24、C-9P21及び9N10により、SDF-1誘導シグナリングの抑制が見られた

50

(図11B、C、D及びE)。未知の理由により、D-1K21変異体では、IgG型の高濃度においてのみ、わずかに抑制的に働くようであった。

【0484】

また、いずれの抗体も単独ではシグナリングを誘導することはできなかった。すなわち、これらの抗体は作動的活性を示さなかった(データは表示せず)。

結論として、これらの抗体は全て、CXCR4に結合するSDF-1により誘導されたCa⁺⁺シグナリングに対して拮抗作用を示した。C-9P21及び9N10は最も顕著な効果を有していた。

【0485】

さらなる実験において、9N10をIgGレベルでのリガンド誘導カルシウム流の低減能について、C-9P21に比較して測定した。

【0486】

材料及び方法

100、20、4、0.8、0.16、0.032、0.064及び0.00128 µg/mL濃度の滴定系列で抗体を使用して、上述と同様に実験を行った。

【0487】

結果

結果は、9N10によるカルシウム流の抑制は、IC₅₀(nM)が3.85であり、C-9P21のIC₅₀(nM)29に比較しておよそ8倍効果的であることを示す(図12A及び12B参照)。

【0488】

実施例7：リガンド誘導細胞移動の抑制

s c F v C - 9 P 2 1によるリガンド誘導細胞移動の低減能をCXCR4⁺CCR4-CEM細胞株内で評価した。抗GFPS c F vフラグメントを陰性対照として使用し、抗cMy c抗体を両s c F vの架橋結合に使用してIgG型抗体の効果を模倣した。

【0489】

材料及び方法

CCR4-CEM細胞は上述のように維持した。

【0490】

CCR4-CEM標的細胞を遠心分離により沈殿させ、FCS不含のRPMI-1640培養培地で2回洗浄した。細胞濃度を1×10⁶個/mLに調整し、この懸濁液の60 mLを38 µLのBATDA [ビス(アセトキシメチル)2,2':6',2''-ターピリジン-6,6''-ジカルボキシレート](Perkin Elmer, Waltham, MA)と混合した。細胞は、BATDAと37で20分間、10分毎に静かに容器を転倒させて混合しながらインキュベートした。細胞を20%FCS含有RPMI-1640で3回洗浄し、最終濃度が2×10⁷個/mLとなるようにRPMI-1640/20%FCSに再懸濁した。標識細胞を同体積の10%FCS、抗c-My c抗体(9E10クローン)及びs c F v C - 9 P 2 1の2倍希釈系列を含有する培地と混合し、最終抗体濃度を20 µg/mLの抗cMy c IgG及び32 µg/mL~16 ng/mLのs c F v C - 9 P 2 1とした。抗GFPS c F vを32 µg/mLで、20 µg/mLの抗cMy c抗体と組み合わせて、陰性対照として使用した。並行して、0.15 nMのSDF-1リガンドを含有する30 µLのRPMIをケモタキシス96ウェルボイデンチャンプレート(Neuro Probe, Gaithersburg, MD)の下部区画に添加した。50 µLの抗体被覆BATDA標識細胞をケモタキシス96チャンプレートの上部区画に添加し、37で2.5時間インキュベートした。フィルター上部の細胞を除去し、フィルターをPBSで洗浄後、プレートを遠心分離に掛けてフィルターを取り除く前に下部チャンパー内の全細胞を回収した。プレートをV型プレートの上端に裏返し、遠心分離した。V型プレート中の細胞を100 µLのPBSで洗浄し、遠心分離により沈殿させ、1.3%のTriton X-100を含有するPBS 35 µLに再懸濁した。試料を黒い96ウェルマイクロタイタープレートに移し、200 µLのユーロピウム

10

20

30

40

50

液 (Perkin Elmer) と混合し、テカン社 M200 プレートリーダーを使用して蛍光 (励起: 340 nm、発光: 613 nm、遅滞時間: 0.4 ms、積分時間: 0.4 ms) を分析した。各抗体濃度について、s c F v の存在 / 不存在におけるシグナルの比及び移動阻害の百分率を計算した。データをプロットし、プリズムソフトウェア (Graph Pad) の「対数 (阻害剤) 対応答」モデルを使用して非線形回帰曲線適合により分析した。

【0491】

結果

データは、抗 CXCR4 s c F v C - 9 P 2 1 の存在下において、CCR F - C E M 細胞の S D F - 1 誘導走化性が阻害されることを示している (図 13 参照)。これらの条件下、 $I C_{50}$ 値 (細胞移動を 50% 阻害する抗体濃度) は $2.9 \mu\text{g} / \text{mL}$ と算出され、s c F v 濃度 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ で 100% 阻害に達した。抗 GFP s c F v フラグメント (陰性対照) は、細胞移動を阻害しなかった (データは表示せず)。

【0492】

したがって、s c F v 型の C - 9 P 2 1 抗体は、 $I C_{50}$ 値 $2.9 \mu\text{g} / \text{mL}$ (約 100 nM) で CXCR4⁺ CCR F - C E M 細胞のリガンド誘導性移動を阻害し、 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ($0.7 \mu\text{M}$) で 100% 阻害する。

【0493】

実施例 8 : 抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) の誘導

標的細胞を死滅させることが好ましい作用様式である場合には、抗体が治療的に有用であるためのモデル機構の 1 つは、CXCR4 発現標的細胞の ADCC を仲介する能力である。これについては T 細胞リンパ腫から誘導され、CXCR4 を恒常的に発現する CCR F - C E M 細胞を使用して試験した。選択された抗体は、抗 c M y c 抗体と交差結合した s c F v フラグメント及び全ヒト I g G 1 抗体として試験した。

【0494】

材料及び方法

CCR F - C E M 細胞は上述のように維持した。

【0495】

CCR F - C E M 標的細胞を遠心分離で沈殿させ、RPMI - 1640 培地で 2 回洗浄した。1 mL 当たり 2.5×10^6 個の細胞をカルセイン - AM (Invitrogen) と最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように混合し、37 °C で 30 分間インキュベートした。細胞を 10% FCS を含有する RPMI - 1640 培地で 3 回洗浄し、細胞濃度を 3×10^5 細胞 / mL に調整した。ヒト PBMC は、新鮮なドナー血液からリンホブレップ (Axis - Shield, Liverpool, UK) 密度勾配遠心法により調製し、10% FCS 含有 RPMI - 1640 で洗浄して、液体窒素中、 3×10^7 細胞 / mL の濃度で 10% FCS 及び 10% DMSO 含有 RPMI 中に凍結保存した。エフェクター細胞は、実験の日に融解し、10% FCS 含有 RPMI で洗浄、 6×10^6 細胞 / mL の濃度で再懸濁した。各標的及びエフェクター細胞の 50 μL を 96 ウェルマイクロタイタープレートの同じウェル内で混合し、エフェクター対標的 (E : T) 細胞比を 20 : 1 とした。I g G 1 型の抗体を同じウェルに 100 μL 添加し、0.8 ~ 1000 ng / mL の濃度範囲に調整した。したがって、s c F v フラグメントを 20 μL 添加し、最終濃度を $2.5 \sim 5 \times 10^4$ ng / mL として、抗 c M y c キメラ (マウス可変 / ヒト定常) I g G 1 抗体 (9E10 ハイブリドーマ由来) の過剰 ($20 \mu\text{g} / \text{mL}$) と予備混合した。マイクロタイタープレートを 37 °C で 4 時間インキュベートした。3 時間 45 分のインキュベート後に、20 μL の 0.9% Triton X 100 を対照ウェルに添加し、標的細胞を完全に溶解した (最大溶解)。各試料の上清 100 μL を黒いマイクロタイタープレートに移し、テカン社 M200 プレートリーダーを使用して蛍光 (励起: 488 nm、発光: 518 nm) を記録した。各実験は 4 重で行った。抗体不含の試料の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引き、抗体による試料の特異的溶解の百分率を算出した。用量 - 応答曲線は、非線形回帰分析及びプリズムソフトウェア (Graph Pad) を使用する 3 パラメ

ータ適合モデルにより計算した。

【0496】

結果

図14に示す結果は、試験した抗CXCR4抗体の全てが、ヒトPBMCの存在下、scFv及び全長IgGとしてADCCを誘導可能で、最大殺活性はほぼ100%であったことを示している。試験したscFv及びIgGは、その最大殺活性に従って次のように順位づけされる。すなわち、C-9P21>D-1K21(scFv)；及びB-1M22>C-1I24~C-9P21>D-1K21(IgG)(表Aも参照)。

【表A】

表A 試験した抗CXCR4抗体のADCC活性の比較

| 抗体 | 最大殺活性 (%) | | EC ₅₀ (ng/mL) | |
|--------|-----------|------|--------------------------|---------------------|
| | scFv | IgG | scFv | IgG |
| B-1M22 | ND | 100 | ND | 115.7 (0.8 nM) |
| C-1I24 | ND | 65 | ND | 49.2 (0.3 nM) |
| C-9P21 | 96.4 | 63.5 | 2.7 (0.09 nM) | 1852.0 (12.3 nM) |
| D-1K21 | 68.6 | 25.7 | 18.8 (0.7 nM) | 79.9 (0.5 nM) |

ND：試験せず

【0497】

したがって、試験した抗CXCR4抗体全てがCCR4-CEM細胞に対してADCC活性を示し、B-1M22及びC-9P21は最大の細胞殺活性を示した。

【0498】

実施例9：補体依存性細胞障害活性(CDC)の誘導

本明細書に記載の抗CXCR4IgGが補体依存性細胞障害を仲介できるかどうかを試験するために、CDC試験を、パーキットB細胞リンパ腫に由来し、CXCR4を恒常的に発現するRamos細胞を使用して行った。

【0499】

材料と方法

Ramos細胞は上述のように維持した。

【0500】

B-1M22、C-1I24、C-9P21及びD-1K21のIgGのCDC誘導活性は、天然CXCR4⁺Ramos細胞株上で評価した。Ramos細胞を遠心分離で沈殿させ、RPMI-1640培養培地で2回洗浄した。1mL当たり 2.5×10^6 個の細胞をカルセイン-AM(Invitrogen)と最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように混合し、37℃で30分間インキュベートした。細胞を10%FCS含有RPMI-1640で3回洗浄し、細胞濃度を 4×10^6 細胞/mLに調整した。標識標的細胞 $25 \mu\text{L}$ とヒト血清 $25 \mu\text{L}$ を96ウェルマイクロタイタープレートのウェル内で混合した。抗体(全てIgG型)の希釈液 $50 \mu\text{L}$ を同じウェルに添加し、最終抗体濃度を $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^4 \text{ ng/mL}$ とした。0.9%のTriton-X100 $20 \mu\text{L}$ を対照ウェルに添加し、標的細胞を完全に溶解した(100%と定義する最大溶解)。マイクロタイターを37℃で1時間インキュベートした。100 μL の10%FCS含有RPMI-1640を全てのウェルに添加し、遠心分離を行った。各試料の上清100 μL を黒いマイクロタイタープレートに移し、テカン社M200プレートリーダーを使用して蛍光(励起：488nm、発光：518nm)を記録した。各実験は4重で行った。抗体不含の試料の蛍光強度をバックグラウンドとして差し引き、抗体による試料の特異的溶解の百分率を算出

10

20

30

40

50

した。用量 - 応答曲線は、非線形回帰分析及びプリズムソフトウェア (Graph Pad) を使用する 3 パラメータ適合モデルにより計算した。

【0501】

結果

図 15 A 及び 15 B に示す結果は、ヒト血清の存在下、C - 1 I 2 4 抗体は CDC を誘導することができることを示している。C - 1 I 2 4 の EC_{50} 値は $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、最大殺活性は 100% であった。B - 1 M 2 2 変異体にもわずかに CDC 活性が認められたが、非常に高濃度 ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) においてのみであった。陽性対照抗体として F 7 を使用した。

【0502】

したがって、本明細書に記載した抗体のうち、2つの抗体、C - 1 I 2 4 及び M - 1 M 2 2 が Ramos 細胞に対する CDC 活性を示した。C - 1 I 2 4 は優れた CDC 活性を示した。

【0503】

実施例 10 : アポトーシス誘導

抗 CXCR 4 抗体のアポトーシス誘導活性を CXCR 4⁺ Ramos 細胞株上で評価した。

【0504】

材料及び方法

Ramos 細胞は上述のように培養した。

【0505】

Ramos 細胞を遠心分離で採取し、10% FCS 含有 RPMI - 1640 培養培地で 2 回洗浄し、 3×10^5 細胞 / ウェルの濃度で 10% FCS 含有 RPMI - 1640 培地に再懸濁した。細胞懸濁液 ($250 \mu\text{L}$) を同じ体積の希釈被試験抗体 (最終濃度: $0.08 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$) 又はスタウロスポリン (25 nM) と 24 ウェルプレートのウェル内で混合し、37 °C で 48 時間インキュベートした。細胞を遠心分離により回収し、アネキシン V 結合緩衝液 (10 mM HEPES 、 140 mM NaCl 、 2.5 mM CaCl_2 、 $0.2\% \text{ BSA}$ 、 $\text{pH } 7.4$) で洗浄した。細胞を再度回収し、 $300 \mu\text{L}$ のアネキシン V 結合緩衝液に再懸濁した。FITC 結合アネキシン V とヨウ化プロビジウム (PI) とを $240 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液に混合し、PI の最終濃度を $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。試料は、リガンドの添加後直ちに 515 - 545 nm 及び 610 / 20 nm バンド通過フィルターを使用して FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences) 上で分析した。アポトーシス性細胞は、アネキシン V 陽性 / PI 陰性として定義され、死亡細胞は PI 陽性として定義された。

【0506】

結果

図 16 A に示した結果 (B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、C - 9 P 2 1 及び D - 1 K 2 1) は、B - 1 M 2 2、C - 1 I 2 4、C - 9 P 2 1 及び D - 1 K 2 1 抗体の存在下において、図 16 A に 0 と記したバックグラウンドレベル (陰性対照レベル) 以上にはアポトーシスを誘導しないことを示した。対照的に、F 7 Ig G 対照は、アッセイに使用された濃度全てにおいてアポトーシスを誘導した。図 16 B に示した結果は、C - 9 P 2 1 及び 9 N 10 抗体は、有意なアポトーシスを誘導しないことを示している。

【0507】

したがって、これらの結果は、本明細書に記載の抗体が、CXCR 4 陽性細胞のアポトーシスを誘導しないことを示し、F 7 と比較して、優れた副作用プロファイルを示す可能性を提供する。

10

20

30

40

【表 1 - 1】
表 1

| | | |
|-----------|-----------------------------------|---|
| 配列 番号: | s c F v C - 9 P 2 1 | |
| 2 5 | 重鎖 F R 1 : | QVQLQESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFS |
| 1 | C D R 1 : | SYWMH |
| 2 6 | F R 2 | WVRQAPGKGLVWVS |
| 2 | C D R 2 : | RINSDGSSTSYADSVKG |
| 2 7 | F R 3 : | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| 3 | C D R 3 : | KILGVGARSRRYFDY |
| 2 8 | F R 4 : | WGQGMVTVSS |
| 2 9 | リンカー : | KLSGSASAPKLEEGEFSEARV |
| 3 0 | 軽鎖 F R 1 : | ETTLTQSPGTLSPGERATLSC |
| 4 | C D R 1 : | RASQSVVSNYLA |
| 3 1 | F R 2 | WYQQKPGQAPRLLIS |
| 5 | C D R 2 : | GASNRAT |
| 3 2 | F R 3 : | GISDRFSGSGSGADFTLTISRVEPEDSAVYYC |
| 6 | C D R 3 : | QQFDKSTWT |
| 3 3 | F R 4 : | FGQGTKVEIK |
| 3 4 | s c F v C - 9 P 2 1 n . a . | CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGG GTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGAT GGGAGTAGCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAAAATCTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGT CGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCTT TCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGC GTAGAAAACGACACTCAGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGTGTCAGCAACTATTTAGCC TGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCC AACAGGGCCACTGGCATCTCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGCAGAC TTCCTCTCACCATCAGCAGAGTCGAGCCTGAAGACTCAGCAGTGTATTACTGT CAACAGTTTGATAAGTCCACGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGAAATC AAA |
| 3 5 | s c F v C - 9 P 2 1 a . a . | QVQLQESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSD GSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSR RYFDYWGQGMVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVETTLTQSPGTLSPGE RATLSCRASQSVVSNYLAWYQQKPGQAPRLLISGASNRATGISDRFSGSGSGAD FTLTISRVEPEDSAVYYCQQFDKSTWTFGQGTKVEIK |
| 6 9 | V _{H(a a)} | QVQLQESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSD GSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSR RYFDYWGQGMVTVSS |
| 7 0 | V _{L(a a)} | ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVVSNYLAWYQQKPGQAPRLLISGASN RATGISDRFSGSGSGADFTLTISRVEPEDSAVYYCQQFDKSTWTFGQGTKVEIK |
| 7 7 | V H ドメ ン (n t) | CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGG GTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGAT GGGAGTAGCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAAAATCTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGT CGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCA |
| 7 8 | V L ドメ ン (n t) | GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGA GCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGTGTCAGCAACTATTTAGCCTGG TACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCCAAC |

10

20

30

40

【表 1 - 2】

| | | |
|--|--|---|
| | | AGGGCCACTGGCATCTCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGAGTCGAGCCTGAAGACTCAGCAGTGTATTACTGTCAA CAGTTGATAAGTCCACGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA |
|--|--|---|

【表 2 - 1】
表 2

| | | |
|-----------|-----------------------------------|--|
| 配列 番号： | s c F v B - 1 M 2 2 | |
| 3 6 | 重鎖 F R 1 : | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS |
| 7 | C D R 1 : | SYAIS |
| 3 7 | F R 2 | WVRQAPGQGLEWMG |
| 8 | C D R 2 : | GIIPIFGTANYAQKFQG |
| 3 8 | F R 3 : | RVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR |
| 9 | C D R 3 : | DRERWLQSAGDY |
| 3 9 | F R 4 : | WGQGTLVTVSS |
| 4 0 | リンカー : | KLSGSASAPKLEEGEFSEARV |
| 4 1 | 軽鎖 F R 1 : | QPVLTSQSPSVSVAPGQTARITC |
| 1 0 | C D R 1 : | GGNNIGSKSVH |
| 4 2 | F R 2 | WYQQKPGQAPVLVY |
| 1 1 | C D R 2 : | DDSDRPS |
| 4 3 | F R 3 : | GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC |
| 1 2 | C D R 3 : | QVWDSSTDHWV |
| 4 4 | F R 4 : | FGGGTKLTVL |
| 4 5 | s c F v B - 1 M 2 2 n . a . | CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTG AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGG GTGCGACAGGCCCTTGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATC TTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG GACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGAC ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGAGAGATGGCTACAATCCGCGGGC GACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGT GCATCCGCCCCAAAACCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTACAGCCT GTGCTGACTCAGTACCCTCGGTGTCACTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATT ACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAG CCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGG ATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCGGGAACACGGCCACCCTGACCATC AGCAGGGTCAAGCCGGGGATGAGGCCACTATTACTGTCAAGGTGTGGGATAGT AGTAGTGATCATTGGGTGTTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCA |
| 4 6 | s c F v B - 1 M 2 2 a . a . | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP IFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRERWLQSAG DYWGQGLVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVQPVLTSQSPSVSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDSSTDHWVFGGGTKLTVL |
| 7 1 | V _H (a a) | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP IFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRERWLQSAG DYWGQGLVTVSS |
| 7 2 | V _L (a a) | QPVLTSQSPSVSVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDR PSGIPERFSGSNSGNTATLTIISRVEAGDEADYYCQVWDSSTDHWVFGGGTKLTVL |
| 7 9 | V _H ドメ イン (n t) | CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTG AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGG GTGCGACAGGCCCTTGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATC TTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG GACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGAC ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGAGAGATGGCTACAATCCGCGGGC GACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA |
| 8 0 | V _L ドメ イン (n t) | CAGCCTGTGCTGACTCAGTACCCTCGGTGTCACTGGCCCCAGGACAGACGGCC AGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAGCGACCGGCC |

10

20

30

40

【表 2 - 2】

| | | |
|--|--|--|
| | | TCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTG ACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGG GATAGTAGTAGTGATCATTGGGTGTTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA |
|--|--|--|

【表 3 - 1】
表 3

| | | |
|-------|-----------------------------|--|
| 配列番号: | s c F v C - 1 I 2 4 | |
| 4 7 | 重鎖 F R 1 : | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS |
| 1 3 | C D R 1 : | SYGMH |
| 4 8 | F R 2 | WVRQAPGKGLEWVA |
| 1 4 | C D R 2 : | VISYDGSNKYYADSVKG |
| 4 9 | F R 3 : | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK |
| 1 5 | C D R 3 : | DLPITRGTGADY |
| 5 0 | F R 4 : | WGQGLVTVSS |
| 5 1 | リンカー : | KLSGSASAPKLEEGEFSEARV |
| 5 2 | 軽鎖 F R 1 : | QSVLIQPASVSGSPGQSITISC |
| 1 6 | C D R 1 : | TGTSSDVGGYNYVS |
| 5 3 | F R 2 | WYQQHPGKAPRLMIY |
| 1 7 | C D R 2 : | DVTSRPS |
| 5 4 | F R 3 : | GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC |
| 1 8 | C D R 3 : | SSYAGSYSVV |
| 5 5 | F R 4 : | FGGGTKVTVL |
| 5 6 | s c F v C - 1 I 2 4 n . a . | CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATCTTCCGATTACCCGCGGGACAGGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAAACCTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTACAGTCTGTCTGATTACAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTGCATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTATCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAGACTCATGATTTACGATGCACTAGTCGGCCCTCAGGGGTTTCGAATCGTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGTTCAATATGCAGGCAGCTACAGCGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGGTACCGTCCCTA |
| 5 7 | s c F v C - 1 I 2 4 a . a . | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPIRGTGADYWGQGLVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVQSVLIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPRLMIYDVTSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC |
| 7 3 | V _H (a a) | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPIRGTGADYWGQGLVTVSS |
| 7 4 | V _L (a a) | QSVLIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPRLMIYDVTSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC |
| 8 1 | V _H ドメイン (n t) | CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATCTTCCGATTACCCGCGGGACAGGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA |
| 8 2 | V _L ドメイン | CAGTCTGTCTGATTACAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTGCATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC |

10

20

30

40

【表 3 - 2】

| | | |
|--|-----------|--|
| | ∠ (n t) | TGGTATCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAGACTCATGATTTACGATGTCACT AGTCGGCCCTCAGGGGTTTCGAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACG GCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGC AGTTCATATGCAGGCAGCTACAGCGTGGTATTCTGGCGGAGGGACCAAGGTCACC GTCCTA |
|--|-----------|--|

【表 4 - 1】

表 4

| | | |
|-------|-----------------------------|--|
| 配列番号: | s c F v D - 1 K 2 1 | |
| 5 8 | 重鎖 F R 1 : | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT |
| 1 9 | C D R 1 : | GYMH |
| 5 9 | F R 2 | WVRQAPGQGLEWMG |
| 2 0 | C D R 2 : | RINPNSGGTNYAQKFQG |
| 6 0 | F R 3 : | RVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAR |
| 2 1 | C D R 3 : | RNLIAARPRNRGRDAFDI |
| 6 1 | F R 4 : | WGQGMVTVSS |
| 6 2 | リンカー : | KLSGSASAPKLEEGEFSEARV |
| 6 3 | 軽鎖 F R 1 : | DIQMTQSPSTLSASVGRVTITC |
| 2 2 | C D R 1 : | RASQSIGGSLA |
| 6 4 | F R 2 | WYQQKPGKPNLLIY |
| 2 3 | C D R 2 : | AASTLQS |
| 6 5 | F R 3 : | GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDSATYYC |
| 2 4 | C D R 3 : | QHYESYPLS |
| 6 6 | F R 4 : | FGGGTKLEIK |
| 6 7 | s c F v D - 1 K 2 1 n . a . | CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTCACC GGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACA AACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTGCGCGAGGCGTAACCTGATAGCAGCTCGTCCC CGGAATCGGGGCAGGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTAT TGGTGGCTCGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTCTGCAACTACTACTGCCAACACTATGAAAGTTATCCCTCTCTTTCCGGCGGCGGGACCAAGCTGGAGATCAA |
| 6 8 | s c F v D - 1 K 2 1 a . a | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARRNLIAARP RNRGRDAFDIWGQGMVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSIGGSLAWYQQKPGKPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDSATYYCQHYESYPLSFGGGTKLEIK |
| 7 5 | V _H (a a) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARRNLIAARP RNRGRDAFDIWGQGMVTVSS |
| 7 6 | V _L (a a) | DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSIGGSLAWYQQKPGKPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDSATYYCQHYESYPLSFGGGTKLEIK |
| 8 3 | V H ドメイン (n t) | CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTCACC GGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACA AACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTGCGCGAGGCGTAACCTGATAGCAGCTCGTCCC CGGAATCGGGGCAGGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC |

10

20

30

40

【表 4 - 2】

| | | |
|-----|---------------------|--|
| | | CGTCTCTTCA |
| 8 4 | V L ドメ ン (n t) | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTGGTGGCTCGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACT TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATC TGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTCTGCAA CTTACTACTGCCAACACTATGAAAGTTATCCCTCTCTTTCCGGCGGCGGGACC AAGCTGGAGATCAAA |

【表 5 - 1】

表 5

| | | |
|------------------|-------------------------------|--|
| 配列番号: | s c F v 9 N 1 0 | |
| 25、 又は、 91 | 重鎖 F R 1 : | QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFS |
| 1、又 は、8 5 | C D R 1 : | SYWMH |
| 26、 又は、 92 | F R 2 | WVRQAPGKGLVWVS |
| 2、又 は、8 6 | C D R 2 : | RINSDGSSTSYADSVKG |
| 27、 又は、 93 | F R 3 : | RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR |
| 3、又 は、8 7 | C D R 3 : | KILGVGARSRRYFDY |
| 28、 又は、 94 | F R 4 : | WGQGTMTVSS |
| 95 | リンカー : | KLGSASAPKLEEGEFSEARV |
| 96 | 軽鎖 F R 1 : | DIVLTQTPDSLAVSLGETTINC |
| 88 | C D R 1 : | KSSQSVLHSSNNKNYLA |
| 97 | F R 2 | WYQQKPGQPPKLLIY |
| 89 | C D R 2 : | WASTRES |
| 98 | F R 3 : | GVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLQPEDVAFYYC |
| 90 | C D R 3 : | LQYSTFPRT |
| 33、 又は、 99 | F R 4 : | FGQGTKVEIK |
| 100 | s c F v 9 N 1 0 n . a . | CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTTGATTACCTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGTCCGCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAAAATCTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGTCTGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGATATTGTGTGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGACGACCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTACACAGCTCCAACAATAAGAATACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAACCTGCAACCTGAAGATGTGGCTTTTACTACTGTCTGCAATATTCTACTTTTCTCGGACGTTCCGCAAGGGACCAAGTGGAGATCAA |
| 101 | s c F v 9 N 1 0 a . | QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGAR |

10

20

30

40

【表 5 - 2】

| | | |
|-------------------|------------------------------|--|
| | a . | SRRYFDYWGGTMTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIVLTQTPDSLAVS LGETTTINCKSSQSVLHSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFLTISNLQPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGGQTKVEIK |
| 69、 又は、 102 | V _{H(a a)} | QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINS DGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGAR SRRYFDYWGGTMTVSS |
| 103 | V _{L(a a)} | DIVLTQTPDSLAVSLGETTTINCKSSQSVLHSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISNLQPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGQ GTKVEIK |
| 77、 又は、 104 | V _H ドメイン (n t) | CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACT GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGT GATGGGAGTAGCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC CAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAGG TCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTC A |
| 105 | V _L ドメイン (n t) | GATATTGTGCTGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAC GACCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTACACAGCTCCAACAATA AGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTC ATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAG CGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATG TGGCTTTTTACTACTGTCTGCAATATTCTACTTTTCCTCGGACGTTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAGATCAAA |

10

20

配列番号：91は配列番号：25と同一である。
 配列番号：85は配列番号：1と同一である。
 配列番号：92は配列番号：26と同一である。
 配列番号：86は配列番号：2と同一である。
 配列番号：93は配列番号：27と同一である。
 配列番号：87は配列番号：3と同一である。
 配列番号：94は配列番号：28と同一である。
 配列番号：99は配列番号：33と同一である。
 配列番号：102は配列番号：69と同一である。
 配列番号：104は配列番号：77と同一である。

30

【表 6】

表 6 C-9P21 の I g G 配列

| | | | |
|--------------|-------------------------------|---|----|
| 配列番号： 106 | I g G 1 重鎖 (a) a) | <u>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCCCTGA</u> <u>GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGT</u> <u>CCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGG</u> <u>AGTAGCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA</u> <u>ACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGC</u> <u>TGTGTATTACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGTCGTTAC</u> <u>TTGACTACTGGGGCCAGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGG</u> <u>GCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC</u> <u>GGCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG</u> <u>AACTCAGGCGCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCCT</u> <u>CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC</u> <u>CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG</u> <u>AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCAC</u> <u>CTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACAC</u> <u>CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC</u> <u>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG</u> <u>CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCT</u> <u>CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTG</u> <u>TCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCAAAGCCAAAGGGC</u> <u>AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAA</u> <u>GAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC</u> <u>GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCG</u> <u>TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG</u> <u>CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC</u> <u>AACCACTACACGCAGAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGTAAA</u> | 10 |
| 配列番号： 107 | カッパ 軽鎖 (a) a) | <u>GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG</u> <u>CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGTCAGCAACTATTTAGCCTGGTA</u> <u>CCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCCAACAGG</u> <u>GCCACTGGCATCTCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGACTTCACTC</u> <u>TCACCATCAGCAGAGTCGAGCCTGAAGACTCAGCAGTGATTACTGTCAACAGTT</u> <u>TGATAAGTCCACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACT</u> <u>GTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG</u> <u>GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGT</u> <u>ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACA</u> <u>GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA</u> <u>AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCT</u> <u>GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u> | 30 |
| 配列番号： 108 | I g G 1 重鎖 (a) a) | <u>QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDG</u> <u>SSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRRY</u> <u>FDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSW</u> <u>NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK</u> <u>KVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH</u> <u>EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPGK</u> | 40 |
| 配列番号： 109 | カッパ 軽鎖 (a) a) | <u>ETTLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVVSNYLAWYQQKPGQAPRLLISGASNR</u> <u>ATGISDRFSGSGSGADFTLTISRVEPEDSAVYYCQQFDKSTWTFGQGTKVEIKRT</u> <u>VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT</u> <u>EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> | |

【表 7】

表 7 B-1M22 の I g G 配列

| | | | |
|-----------|------------------------|--|----|
| 配列番号: 110 | I g G 1 重鎖 (n t) | <u>CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGA</u> <u>AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGT</u> <u>CGGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTT</u> <u>GGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACG</u> <u>AATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGC</u> <u>CGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGAGAGATGGCTACAATCCGCGGGCGACTAC</u> <u>TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG</u> <u>TCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG</u> <u>CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC</u> <u>GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT</u> <u>ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA</u> <u>CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG</u> <u>CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC</u> <u>TGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT</u> <u>CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT</u> <u>GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA</u> <u>AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGT</u> <u>CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAA</u> <u>GCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG</u> <u>AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT</u> <u>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG</u> <u>GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT</u> <u>CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA</u> <u>GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC</u> <u>ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA</u> | 10 |
| 配列番号: 111 | ラムダ 軽鎖 (n t) | <u>CAGCCTGTGCTGACTCAGTCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCA</u> <u>GGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCA</u> <u>GAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCA</u> <u>GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCA</u> <u>TCAGCAGGGTCAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAG</u> <u>TAGTAGTGATCATTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTCAG</u> <u>CCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAG</u> <u>CCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGACTIONTACCCGGGAGCCGTGAC</u> <u>AGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGCGGGAGTGGAGACCACCACA</u> <u>CCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGC</u> <u>CTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG</u> <u>CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA</u> | 30 |
| 配列番号: 112 | I g G 1 重鎖 (a a) | <u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF</u> <u>GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRERWLSAGDY</u> <u>WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG</u> <u>ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE</u> <u>PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHY</u> <u>TQKLSLSLSPGK</u> | 40 |
| 配列番号: 113 | ラムダ 軽鎖 (a a) | <u>QPVLTSQSPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPS</u> <u>GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSTHWFVGGGKLTVLGQ</u> <u>PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT</u> <u>PSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u> | |

【表 8】

表 8 C-1 I 2 4 の I g G 配列

| | | | |
|----------|--------------------------|--|----|
| 配列番号：114 | I g G 1 重鎖 (n t) | <u>CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA</u> <u>CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGC</u> <u>CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAAT</u> <u>AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG</u> <u>AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTAC</u> <u>TGTGCGAAAGATCTTCCGATTACCCGCGGGACAGGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGA</u> <u>ACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA</u> <u>CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC</u> <u>TACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG</u> <u>CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG</u> <u>ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG</u> <u>CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCAC</u> <u>ACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC</u> <u>CCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTG</u> <u>GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC</u> <u>GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC</u> <u>CGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTAC</u> <u>AAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA</u> <u>GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG</u> <u>CTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC</u> <u>ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCT</u> <u>CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG</u> <u>AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC</u> <u>AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</u> | 10 |
| 配列番号：115 | ラムダ軽鎖 (a a) | <u>CAGTCTGTCTGATTACAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCTGGACAGTCGATCACC</u> <u>ATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTAT</u> <u>CAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAGACTCATGATTTACGATGTCAGTAGTCGGCCC</u> <u>TCAGGGGTTTTCGAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACC</u> <u>ATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGTTTCATATGCAGGC</u> <u>AGCTACAGCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCTAGGTCAGCCCAAG</u> <u>GCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAG</u> <u>GCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGG</u> <u>AAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAA</u> <u>AGCAACAACAAGTACGCGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAG</u> <u>TCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACA</u> <u>GTGGCCCTACAGAATGTTCA</u> | 30 |
| 配列番号：116 | I g G 1 重鎖 (n t) | <u>QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSN</u> <u>KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPIRGTGADYWGQG</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV</u> <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKDKVEPKSCDKTH</u> <u>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP</u> <u>PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</u> | 40 |
| 配列番号：117 | ラムダ軽鎖 (a a) | <u>QSVLIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYVSWYQQHPGKAPRLMIYDVTSRP</u> <u>SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYSVVFSGGKTQVTVLGGPK</u> <u>AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ</u> <u>SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u> | |

【表 9】

表 9 D-1K21のIgG配列

| | | | |
|-----------------|----------------------------------|---|----|
| <p>配列番号：118</p> | <p>IgG 1重鎖 (n t)</p> | <p><u>CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA</u> <u>GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCGGCTACTATATGCACTGGGTGC</u> <u>GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGT</u> <u>GGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTC</u> <u>CATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGCGCGAGGCGTAACCTGATAGCAGCTCGTCCCGGAATCGGGGCAGGGAT</u> <u>GCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAA</u> <u>GGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG</u> <u>CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG</u> <u>AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTC</u> <u>AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC</u> <u>AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA</u> <u>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA</u> <u>ACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCA</u> <u>TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC</u> <u>CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC</u> <u>AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCG</u> <u>TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA</u> <u>GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA</u> <u>ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA</u> <u>GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG</u> <u>AGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGA</u> <u>CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG</u> <u>GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG</u> <u>AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA</u></p> | 10 |
| <p>配列番号：119</p> | <p>カップ 軽鎖 (a a)</p> | <p><u>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT</u> <u>CACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTGGTGGCTCGTTGGCCTGGTATCAGC</u> <u>AGAAACCAGGGAAAGGCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGT</u> <u>GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAAT</u> <u>CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTCTGCAACTTACTACTGCCAACACTATGAAAGTT</u> <u>ATCCCCTCTCTTTTCGGCGGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCA</u> <u>CCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC</u> <u>TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAG</u> <u>TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC</u> <u>AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA</u> <u>GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA</u> <u>CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u></p> | 30 |
| <p>配列番号：120</p> | <p>IgG 1重鎖 (n t)</p> | <p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGRINPNSG</u> <u>GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARRNLIARPRNRGRD</u> <u>AFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSW</u> <u>NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u></p> | 40 |
| <p>配列番号：121</p> | <p>カップ 軽鎖 (a a)</p> | <p><u>DIQMTQSPSTLSASVGRVITCRASQSIGGSLAWYQQKPKGPNLLIYAASTLQS</u> <u>GVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDSATYYCQHYESYPLSFGGGTKLEIKRTVAA</u> <u>PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u></p> | |

【表 10】

表 10 9N10 の I g G 配列

| | | | |
|-----------------|--------------------------|--|----|
| 配列番号：106、又は、122 | I g G 1重鎖 (n t) | <u>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCCCTGAGA</u> <u>CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGC</u> <u>CAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGC</u> <u>ACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG</u> <u>AACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTAC</u> <u>TGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACAATGGTCACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC</u> <u>CCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG</u> <u>GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC</u> <u>AGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC</u> <u>AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG</u> <u>AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGAC</u> <u>AAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC</u> <u>TTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC</u> <u>ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC</u> <u>GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC</u> <u>AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC</u> <u>AAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACC</u> <u>ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC</u> <u>CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT</u> <u>CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAG</u> <u>ACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC</u> <u>GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG</u> <u>GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA</u> | 10 |
| 配列番号：123 | カッパ 軽鎖 (a a) | <u>GATATTGTGCTGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGACGACC</u> <u>ACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTACACAGCTCCAACAATAAGAACTAC</u> <u>TTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCA</u> <u>TCTACCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGAT</u> <u>TTCACTCTCACCATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATGTGGCTTTTTACTACTGTCTG</u> <u>CAATATTCTACTTTTCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA</u> <u>ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT</u> <u>GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA</u> <u>CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG</u> <u>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA</u> <u>GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG</u> <u>CCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</u> | 30 |
| 配列番号：108、又は、124 | I g G 1重鎖 (n t) | <u>QVQLQESGGGLVHPGGLRSLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDGSS</u> <u>TSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRRYFDYW</u> <u>GQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD</u> <u>KHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT</u> <u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> | 40 |
| 配列番号：125 | カッパ 軽鎖 (a a) | <u>DIVLTQTPDSLAVSLGETTTINCKSSQSVLHSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGQGTKVEIKR</u> <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u> <u>QDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> | |

【表 1 1】

表 1 1

| 配列番号: | 種類 | 配列 |
|-------|----------|--|
| 1 2 6 | VH CDR 1 | S / G Y X ₃ M / I H / S |
| 1 2 7 | VH CDR 1 | X ₁ Y X ₃ M H |
| 1 2 8 | VH CDR 1 | S Y X ₃ M H |
| 1 2 9 | VH CDR 2 | X ₁ I X ₃ X ₄ D G S X ₈ X ₉ X ₁₀ Y A D S V K G |
| 1 3 0 | VH CDR 2 | V / R I S / N Y / S D G S N / S K / T Y / S Y A D S V K G |
| 1 3 1 | VH CDR 2 | X ₁ I X ₃ P X ₅ X ₆ G X ₈ X ₉ N Y A Q K F Q G |
| 1 3 2 | VH CDR 2 | R / G I N / I P N / I S / F G G / T T / A N Y A Q K F Q G |

【 0 5 0 8 】

参考文献

以下の参考文献は、それらが、本明細書に記載された典型的な手順又は他の詳細な補足を提供する程度に、本明細書に参照により具体的に組み込まれる。

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402, 1997.

Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", *FEBS Lett.*, 414: 521-526, 1997.

Baeveryle 及び Gires, *BJC*, 96: 417-423, 2007.

Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in *Saccharomyces Cerevisiae*", *EMBO J.*, 6: 229-234, 1987

Baribaud, Edwards, Sharron, Brelot, Heveker, Price, Mortari, Alizon, Tsang, Doms: "Antigenically Distinct Conformations of CXCR4" *J. of Virology*, 75(19): 8957-8967, 2001

Beckman, Weiner 及び Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", *Cancer*, 109(2): 170-179, 2006.

Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13): 4438-4442, 1985.

Carillo 及び Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073, 1988.

Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Se

10

20

30

40

50

- cretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*", *BioTechnology*, 5:369, 1987.
- Davies 及び Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7-12, 1996.
- Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473, 1990.
- Davies 及び Riechmann, "Antibody VH domains as small recognition units", *Biotechnology (NY)*, 13:475-479, 1995. 10
- Devereux, Haeblerli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984.
- Di Paolo 等, "A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity", *Clin Cancer Res* 9: 2837-48, 2003. 20
- Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", *J. Pept. Sci.*, 2(4):212-22, 1996.
- Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990. 30
- Guleng, Tateishi, Ohta, Kanai, Jazag, Ijichi, Tanaka, Washida, Morikane, Fukushima, Yamori, Tsuruo, Kawabe, Miyagishi, Taira, Sata, Omatu. "Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner". *Cancer Res* 65:5864-71, 2005 40
- Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature*, 363(6428):446-448, 1993.
- Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palminter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature*, 315:680-683, 1985.
- Henikoff 及び Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992. 50

- Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929, 1978
- Holliger 及び Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136, 2005.
- Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", Trends in Biochemical Sciences, 20:478-480, 1995. 10
- Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", J. Mol. Biol., 233:123-38, 1993
- Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", Nucleic Acid Res., 26:316-9, 1998.
- Hu, Deng, Bian, Li, Tong, Li, Wang, Xin, He, Zhou, Xie, Wang, Cao. "The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma." Clin Cancer Res 11:4658-65, 2005 20
- Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", J. Bacteriol., 153:163-168, 1983.
- Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991. 30
- Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", EMBO J., 6:187-195, 1987.
- Kim, Lee, Midura, Yeung, Mendoza, Hong, Ren, Wong, Korz, Merzouk, Salaria, Zhang, Hwang, Khanna, Helman. "Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases." Clin Exp Metastasis 25:201-11, 2008 40
- Kipriyanov, Moldenhauer, Little, "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures." J Immunol Methods 200:69-77, 1997
- Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecká, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding 50

- loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.
- Kurjan 及び Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF): a Putative - Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature - Factor", *Cell*, 30:933-943, 1982.
- Kwong, Kulbe, Wong, Chakravarty, Balkwill. "An antagonist of the chemokine receptor CXCR4 induces mitotic catastrophe in ovarian cell cancer cells." *Mol Cancer Ther* 8(7), 1893-1905, 2009
- Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4):357-366, 2004.
- Liang, Wu, Reddy, Zhu, Wang, Blevins, Yoon, Zhang, Shim. "Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA." *Biochem Biophys Res Commun* 363: 542-6, 2007
- Luckow 及び Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170:31-39, 1989.
- Marhaba 等., "CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers" *Curr Mol Med* 8:784-804, 2008.
- Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154, 1964.
- Muller, Homey, Soto, Ge, Catron, Buchanan, McClanahan, Murphy, Yuan, Wagner, Barrera, Mohar, Verastegui, Zlotnik. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410:50-6, 2001
- Munz 等., "The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation", *Oncogene* 23:5748-58, 2004.
- Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS*, 4:11-17 1988.
- Needleman 及び Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Protein

s", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.

Neuberger 及び Milstein, "Somatic hypermutation", *Curr. Opin. Immunol.*, 7:248-254, 1995.

Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", *Protein Sci.*, 13:1882-1891, 2004.

O'Brien, "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice", *Nature* 445:106-110, 2007

10

Orimo, Gupta, Sgroi, Arenzana-Seisdedos, Delaunay, Naeem, Carey, Richardson, Weinberg. "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121:335-48, 2005

Palmiter 及び Brinster, "Transgenic Mice", *Cell*, 41:343-345, 1985.

20

Palmiter, Norstedt, Gelinias, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science*, 222:809-814, 1983.

Pearson 及び Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988.

Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990.

30

Prang, Preithner, Brischwein, Goster, Woppel, Muller, Steiger, Peters, Baeuerle, da Silva, "Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines", *Br J Cancer*, 92(2):342-349, 2005.

Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8):921-929, 2007.

40

Reff 及び Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 40:25-35, 2001.

Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee 及び Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnolog*

50

y, 14:1239-1245, 1996.

Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", Gene, 54:113-123, 1987.

Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", Nature, 329:840, 1987.

Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", J. Biosci (Bangalore), 11:47-58, 1987.

Smith及Waterman, "Comparison of Biosequences", Adv. Appl. Math., 2:482, 1981.

Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With Baculovirus Expression Vector", Mol. Cell Biol., 3:2156-2165, 1983.

Spizzo, "High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer", Breast Cancer Res Treat 86:207-13, 2004.

Spizzo, "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer", Gynecol Oncol 103:483-8, 2006.

Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", Nucleic Acids Res., 22:4673-4680, 1994.

van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", J. Mol. Biol., 310:591-601, 2001.

Varga, "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival", Clin Cancer Res 10:3131-6, 2004.

Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation", Nature, 376:732, 1995.

Ward, Gussow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia Coli", Nature, 341(6242):544-546, 1989.

10

20

30

40

50

Wentz, "Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers", *Br J Cancer* 94:128-35, 2006.

Xu, Duda, Di Tomaso, Ancukiewicz, Chung, Lauwers, Samuel, Shellito, Czito, Lin, Poleski, Bentley, Clark, Willett, Jain. "Direct Evidence that Bevacizumab, an Anti-VEGF Antibody, Up-regulates SDF1, CXCR4, CXCL6 and Neuropilin 1 in Tumors from Patients with Rectal Cancer." *Cancer Res* 69(20)7905-7910, 2009

10

Young, MacKenzie, Narang, Oomen及びBaenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995.

Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.

20

Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')₂ Fragments For Efficient Production in *Escherichia Coli* and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.

Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", *Science*, 303(5656):371-373, 2004.

30

【 図 1 】

図 1

s c F v C-9 P 2 1ヌクレオチド配列

CCATGGCC CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTACCCCTGGGGGGTCC
NeoI |-----V_n開始 (配列番号: 34 開始)
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGCAGCTGGGT
CCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCTGGTGTGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTA
GCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAAATGACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTTACTG
TGCAGAAAAAATCTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCTCGTCTACTTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACAATGGTACCCTCTCTCAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAACTT
V_n末端----|HindIII--| リンカー開始
GAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCAGCGGTAGAAACGACACTCACGAGTCTCCAGGCAC
リンカー末端----|MluI--|-----V_n開始
CCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAGAGCCACCTCTCTCGAGGGCCAGTCAAGTGTG
TCAGAACTATTTAGCTGGTACCAGCAGAAGCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATC
TCTGGTGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCTCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGG
GGCAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGATCGAGCTGAAGACTCAGCAGTGTATTACT
GTCACAGTTTGAATAAGTCCAGTGGAGTTCGGCCAGGGACCAAGGTGAAATCAA
(配列番号: 34 末端) V_n末端
CGCGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACTAAACTCACATCCCA
NotI cMyc-tag
TCACCATCAC
His₆-tag

s c F v C-9 P 2 1アミノ酸配列

QVQLQESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSYYMHWVRQAPGKLVVWVSRINS
|-----V_n開始 (配列番号: 35 開始)
GSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSR
RYFDYWGQGTMTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVETTLTQSPGTLISLSPGE
V_n末端----|-----| リンカー -----|-----V_n開始
RATLSCRASQSVVSNLYWYQKPKGQAPRLILISGASNRATGISDRFSGSGGAD
FTLITSRVEPEDSAVYVYQDFKSTWTFGGQTKVEIKAAAGSEQKLISEEDLNS
(: 配列番号: 35 末端) V_n末端 ----|
HHHHHH

【 図 3 】

図 3

s c F v C-1 1 2 4ヌクレオチド配列

CCATGGCC CAGGTCCAGCTGGTACAGCTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
NeoI |-----V_n開始 (配列番号: 56 開始)
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTATGGCATGCAGCTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA
ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAAG
AACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGATTTACTG
TGCAGAAAGATCTTCGATTACCCCGGGGACAGGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACTGTCTCCTCAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAACTTGAAGAAGGT
V_n末端----|HindIII--| リンカー開始
GAATTTTCAGAAGCAGCGGTACAGTCTGTCTCTGATTCAGCTGCTCCGCTCGTCTGGGTC
リンカー末端----|MluI--|-----V_n開始
TCTTGGACAGTGCATCACCATCTCCTGCATCTGGAACAGCAGTACAGTGTGGTGGTTATA
ACTATGTCTCCTGGTATCAACAACCCAGGCAAGCCCAAGACTCATGATTACGAT
GTCAGTAGTCCGCCCTCAGGGGTTTCGAAATCCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACAC
GGCTCCCTGACCATCTCTGGCTCCAGGCTGAGGACAGGCTGATTATTACTGCAGTT
CATATGCAGGAGCTACAGCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTACCGTCTCTAGCG
(配列番号: 56 末端) V_n末端 ----|NotI
GCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACTAAACTCACATCACCATCA
NotI cMyc-tag His₆-tag
CCATCAC

s c F v C-1124 アミノ酸配列

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYD
|-----V_n開始 (配列番号: 57 開始)
GSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAKDLPIRGTGA
DYWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVQSVLIQPASVSGSPGQSITI
V_n末端----|-----| リンカー -----|-----V_n開始
SCTGTSSDVGGINVYVSWYQHPKAPRLIMLYDVTSRPSGVSNRFSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYVCSYAGSYVVFVGGTQKTVLVAAGSEQKLISEEDLNSH
(配列番号: 57 末端) V_n末端 ----|
HHHHHH

【 図 2 】

図 2

s c F v B-1 M 2 2ヌクレオチド配列

CCATGGCC CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGTGAAGGAGCTGGTCTCTCC
NeoI |-----V_n開始 (配列番号: 45 開始)
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGTATGCTATCAGCTGGGT
GCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGGTGGATGGGAGGATCATCCCTATCTTTGGTA
CAGCAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTACAGATTACCAGCGCAATCCAGG
AGCACAGCTACATGGAGCTGAGGAGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTTACTG
TGCAGAGAGTCCGGAGAGATGGTACAATCCGGGGCGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGCTCACTGTCTCCTCAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAACTTGAAGAAGGT
V_n末端----|HindIII--| リンカー開始
GAATTTTCAGAAGCAGCGGTACAGCTGTGCTGACTCAGTCAACCTCGGTGTCAAGTGGC
リンカー末端----|MluI--|-----V_n開始
CCCAGGACAGAGCCAGGATTACCTGTGGGGAAAAACAATTTGAAGTAAAAGTGTGC
ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAGCGAC
CGGCCCTCAGGGATCCTGAGCGATTCTCTGGTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCTT
GACCATCAGCAGGTCGAAGCCGGGATGAGGCCACTATTACTGTCAGGTGTGGGATA
GTAGTAGTGATCATTTGGGTGTTCCGGCAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGCGGCCGCT
(配列番号: 45 末端) V_n末端 ----|NotI
GGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACTAAACTCACATCACCATCACCATCAC
cMyc-tag His₆-tag

s c F v B-1 M 2 2アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVVKPGSVKVSCKASGFTFSYIAISWVRQAPGQGLEWMGGIPI
|-----V_n開始 (配列番号: 46 開始)
FGTANYAQKFGQVRIIADESIITAYMELRSLRSDTAVYYCARDRENLQASG
DYWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVQVPLTQSPSPVSPVAPGQTARI
V_n末端----|-----| リンカー -----|-----V_n開始
TCGGNINIGSKSVHWYQKPKGQAPLVVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTALTI
SRVEAGDEADYVQVWSSSDHWVFGGQTKLTVLAAAGSEQKLISEEDLNSHHH
(配列番号: 46 末端) V_n末端 ----|
HHH

【 図 4 】

図 4

s c F v D-1K21ヌクレオチド配列

CCATGGCC CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGTGAAGGAGCTGGGGCCCTCA
NeoI |-----V_n開始 (配列番号: 67 開始)
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTACCAGGCTACTATGACTGGGT
GCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGGTGGATGGGACGGATCAACCTCAACAGTGGTG
GCACAACTATGCACAGAAGTTTCAAGGACAGGTCACCATGACAGGACACGCTCCATC
AGCACAGCTTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTG
CGCGAGGCGTAACTGATAGCAGCTCGTCCCGGAATCGGGCAGGATGCTTTTGATA
TCTGGGGCCAAGGACAATGGTCACTCTCTTCAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC
V_n末端----|HindIII--| リンカー開始
CCAAAACCTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCAGCGGTAGACATCCAGATGACCCAGTC
リンカー末端----|MluI--|-----V_n開始
TCTTCCACCCTGTCTGATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCAGGGCCAGTC
AGAGTATGGTGGCTCGTGGCTGTTATCAGCAGAAACAGGGAAGGCCCTAACCTC
CTGATCTATGCTGCATCCACTTGCAGAGTGGGTCACAGGTTCAAGGTTCAAGGCGAGTGG
ATCTGGGACAGAATTCATCTCACAATCAGCAGCTGACGCTGAAGATTCTGCAACTT
ACTACTGCCAACACTGAAAGTTATCCCTCTCTTTCGGCGGGGGACCAAGCTGGAG
(配列番号: 67 末端) V_n末端----
ATCAAAGGGCCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACTAAACTCACA
NotI cMyc-tag
TCACCATCACCATCAC
His₆-tag

s c F v D-1K21 アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVVKPGSVKVSCKASGFTTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPN
|-----V_n開始 (配列番号: 68 開始)
SGGTNYAQKFGQVRIIMRDTISITAYMELRSLRSDTAVYYCARRNLIARPRN
RGRDAFDIWGQGTMTVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIQMTQSPSTLSAS
V_n末端----|-----| リンカー -----|-----V_n開始
VGRVITICRASQISGSLAWYQKPKGKPNLIIYAASLTQSGVPSRFSRFSGSGS
TEFTLISLQPEDSATYVYQHYEYPLSFGGKLEIKAAAGSEQKLISEEDL
(配列番号: 68 末端) V_n末端 ----|
NSHHHHH

【 図 5 】

図 5

scFv 9N10 スクレオチド配列

```

CCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTCACCCCTGGGGGGTCC
NcoI |-----VH開始 (配列番号: 100 開始)

CTGAGACTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACCTGGGT

CCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTA

GCACAAGCTACCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG

AACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG

TGCAGAAAAATCTTGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGTCTACTTTGACTACTGGGGCC

AGGGAACAATGGTCACCGTCTCTCAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAACTT
VH末端----|HindIII--リンカー開始
GAAGAAGGTGAATTTTCAGAAAGCACCGCTAGATATTTGTGCTGACCCAGACTCCAGACTC
リンカー末端----|MluI--|-----VL開始
CCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGACGACCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTT

TACACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCT

CCTAAGTCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTACG

TGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATG

TGGCTTTTACTACTGTCTGCAATATTCTACTTTTCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACC
(配列番号: 100----
AAGTGGAGATCAAAGCGGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAGAAGACCT
----末端)VL末端----|NotI cMyc-tag
AAACTCACATCACCATCACCATCAC
His6-tag

```

scFv 9N10 アミノ酸配列

```

QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSD
|-----VH開始 (配列番号: 101 開始)
GSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSR

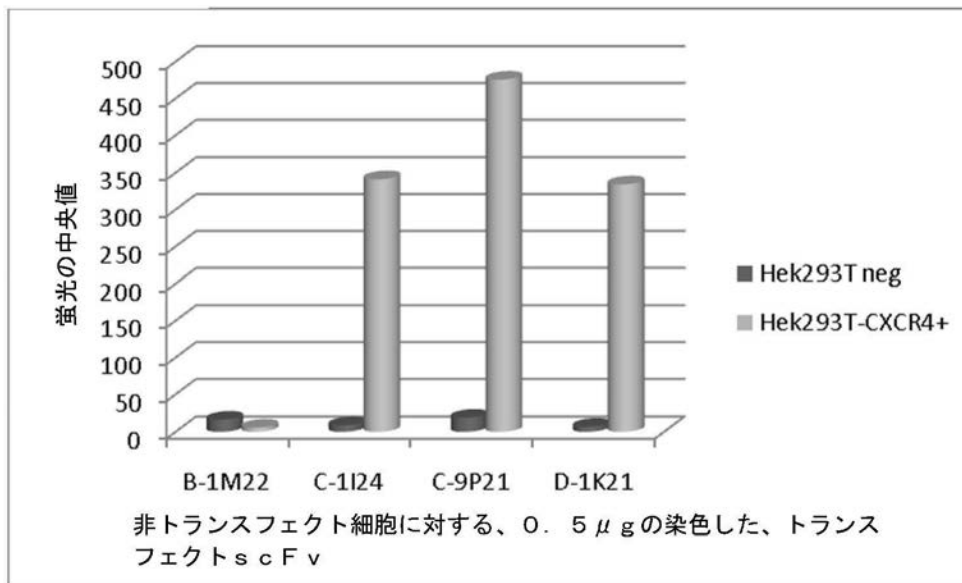
RYFDYWGQGTMTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIVLTQTPDSLAVSLGE
VH末端-|-----リンカー-----|-----VL開始
TTTINCKSSQSVLHSSNNKNYLAWYQQKPKQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS

GSGTDFTLTISNLQPEDVAFYCLQYSTFFRTFGQGTKVEIKAAAGSEQKLISE
(配列番号: 101 末端)VL末端----|
EDLNSHHHHHH

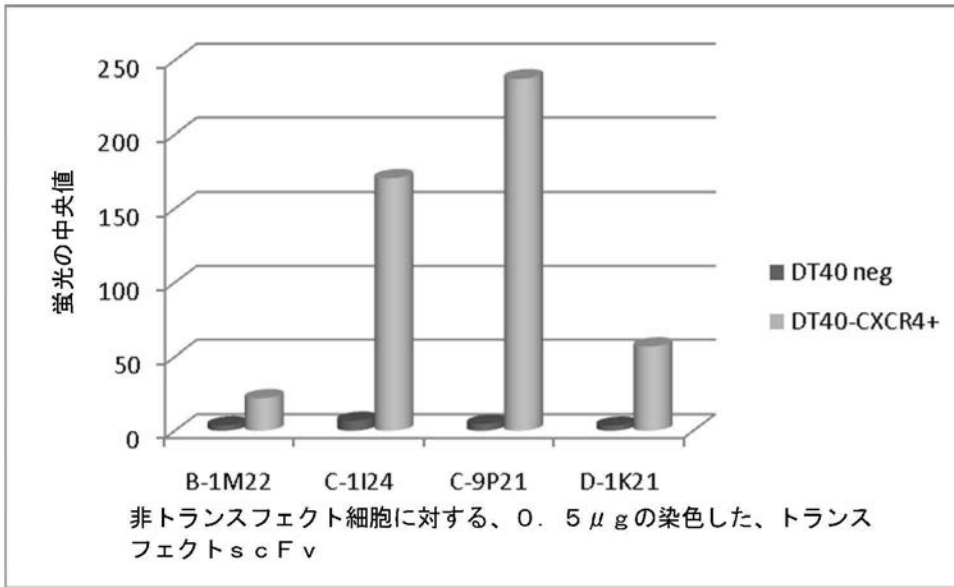
```

【 図 6 A 】

図 6 A

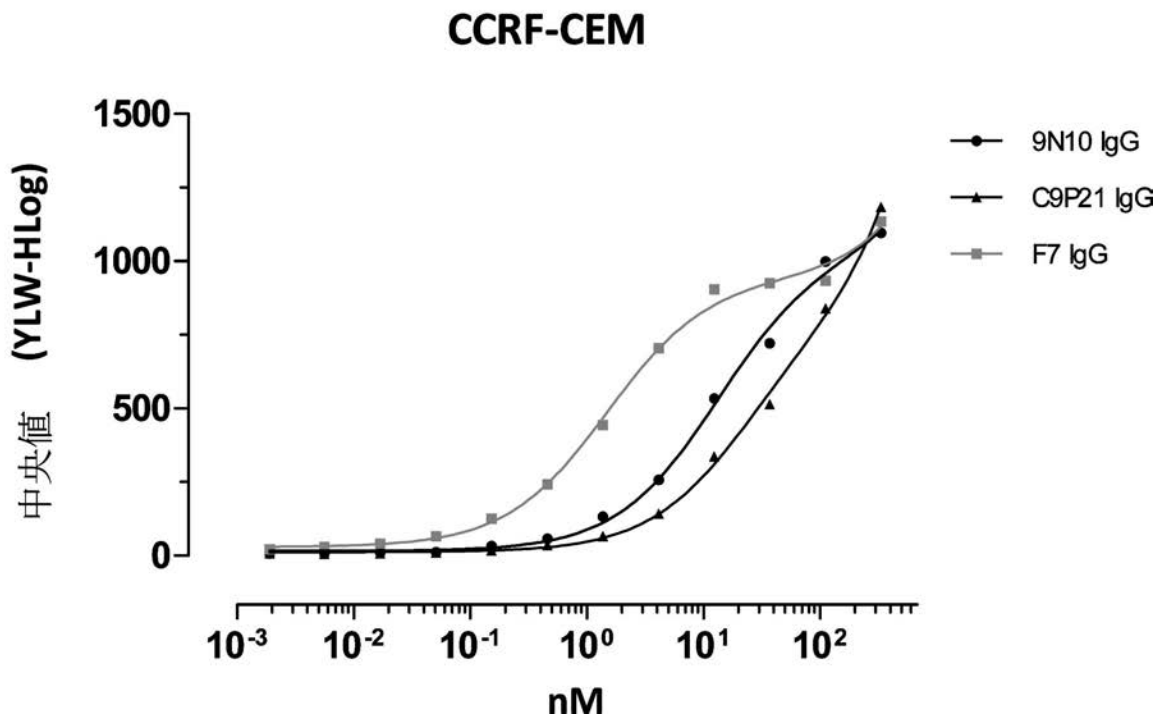
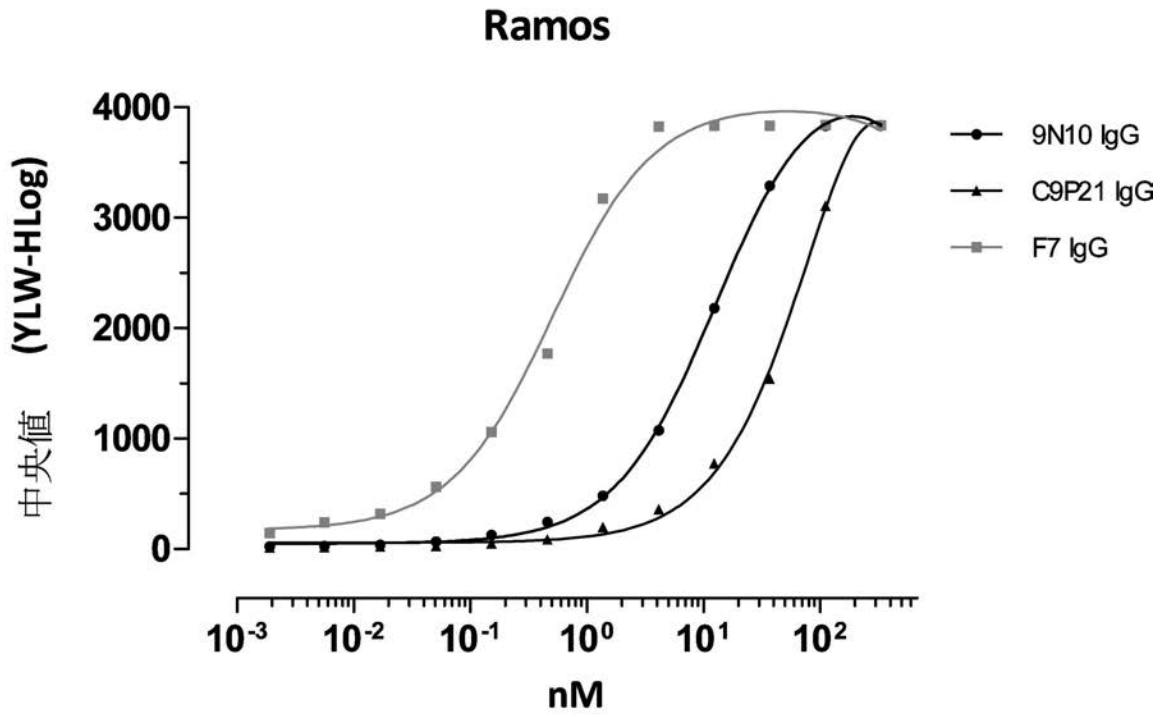


【図 6 B】
図 6 B

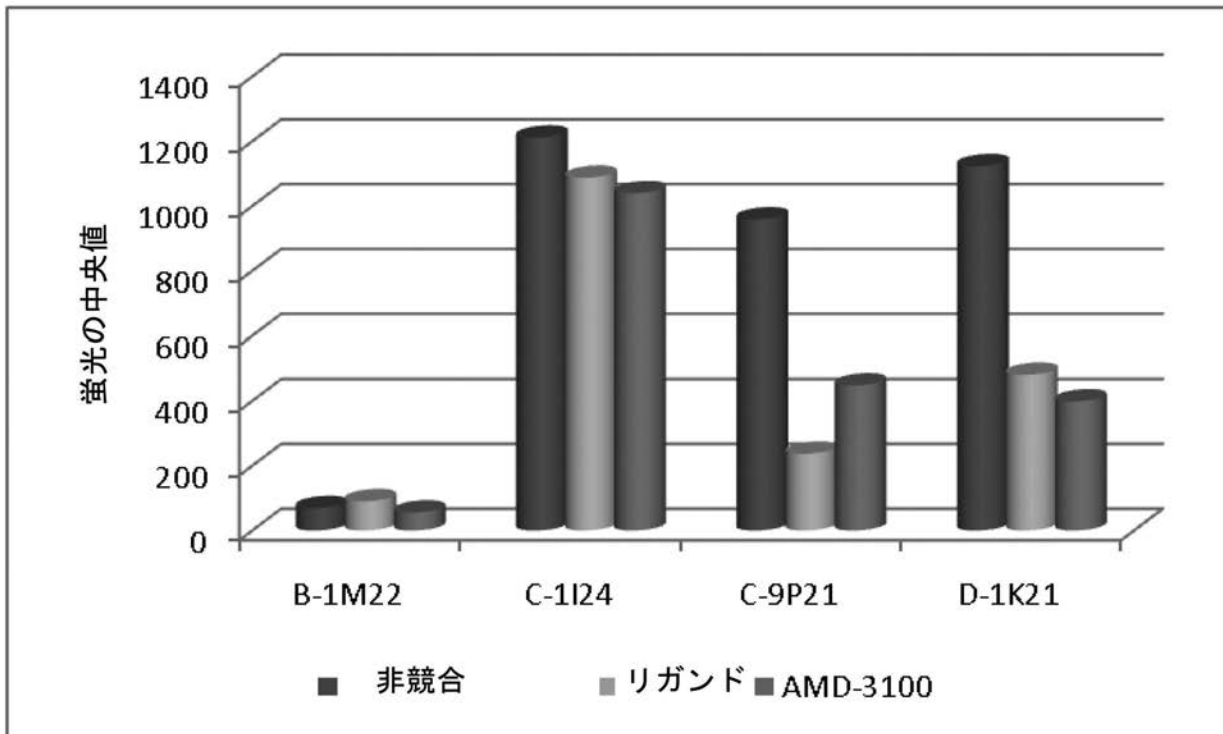


【 図 6 C 】

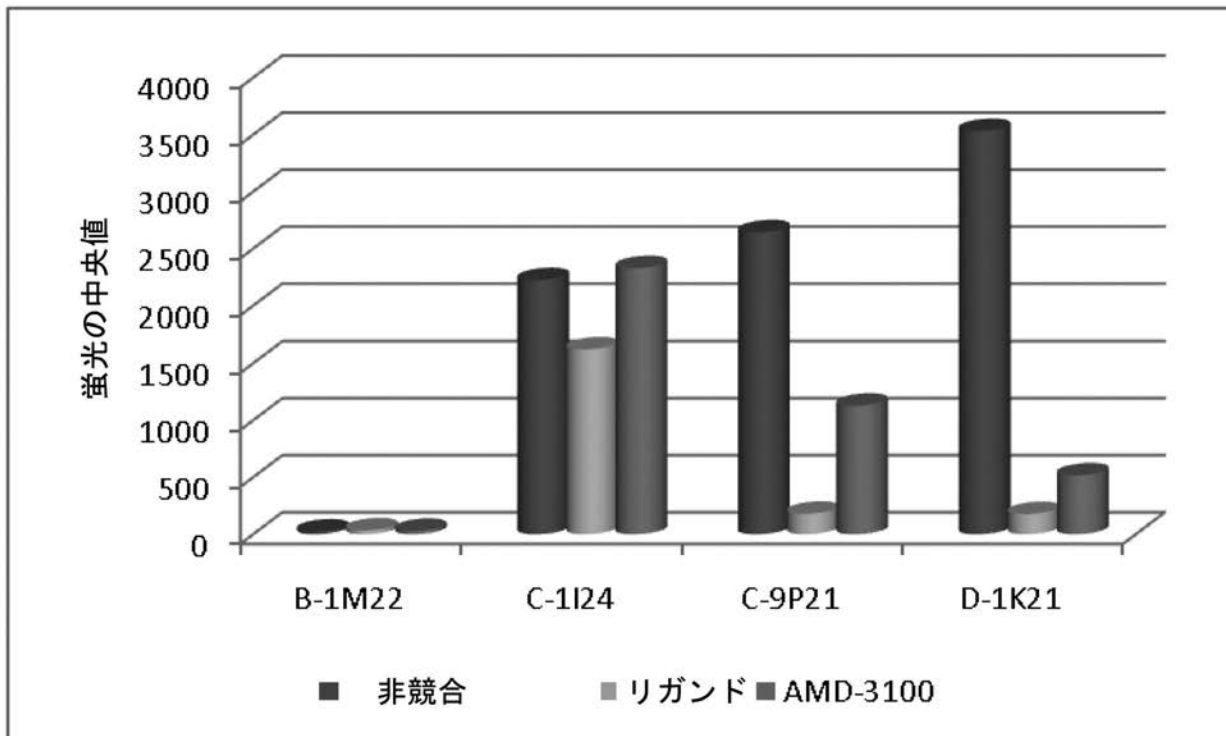
図 6 C



【図7A】
図7A

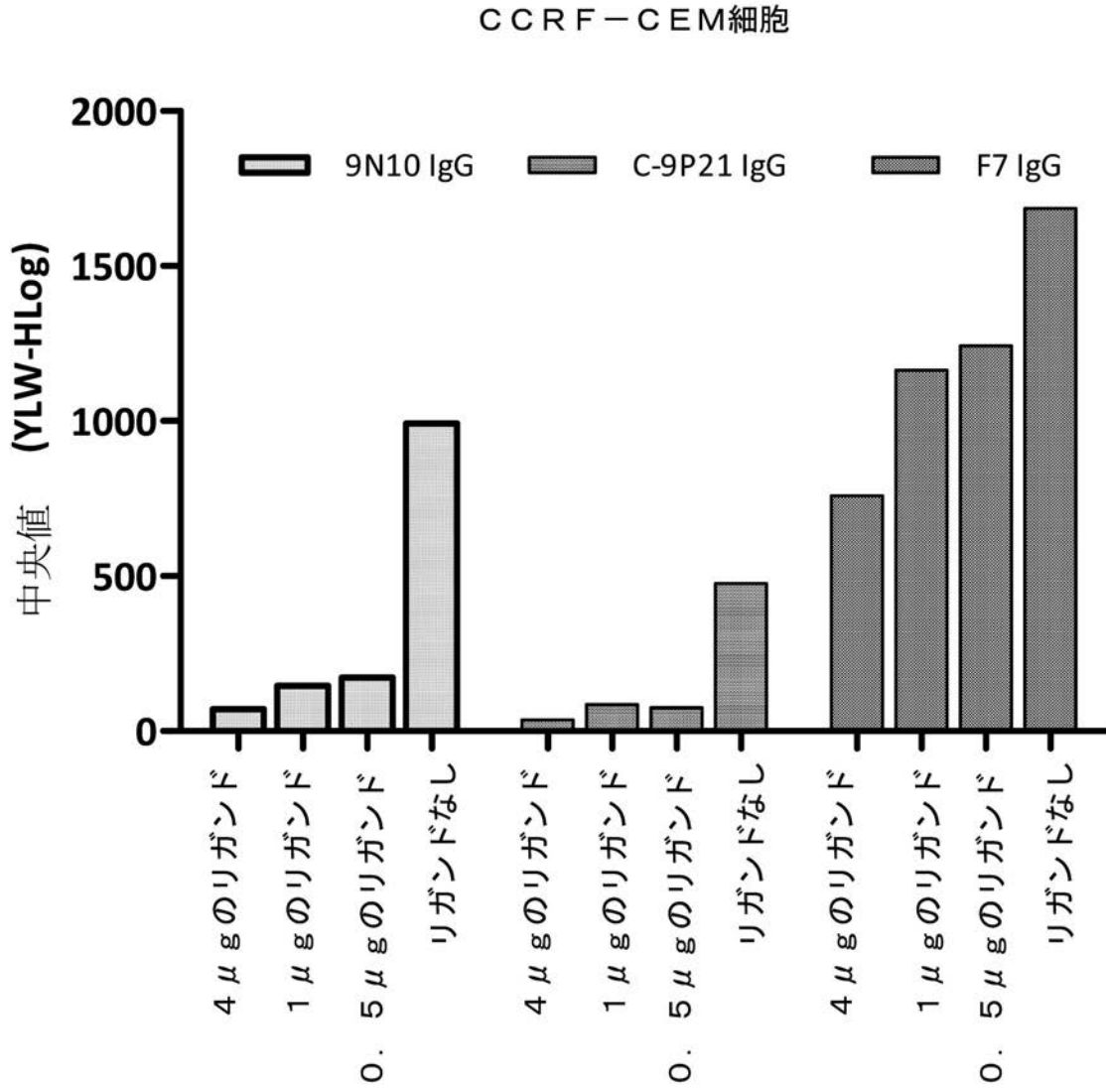


【図7B】
図7B



【図7C】

図7C



【 図 8 A 】

図 8

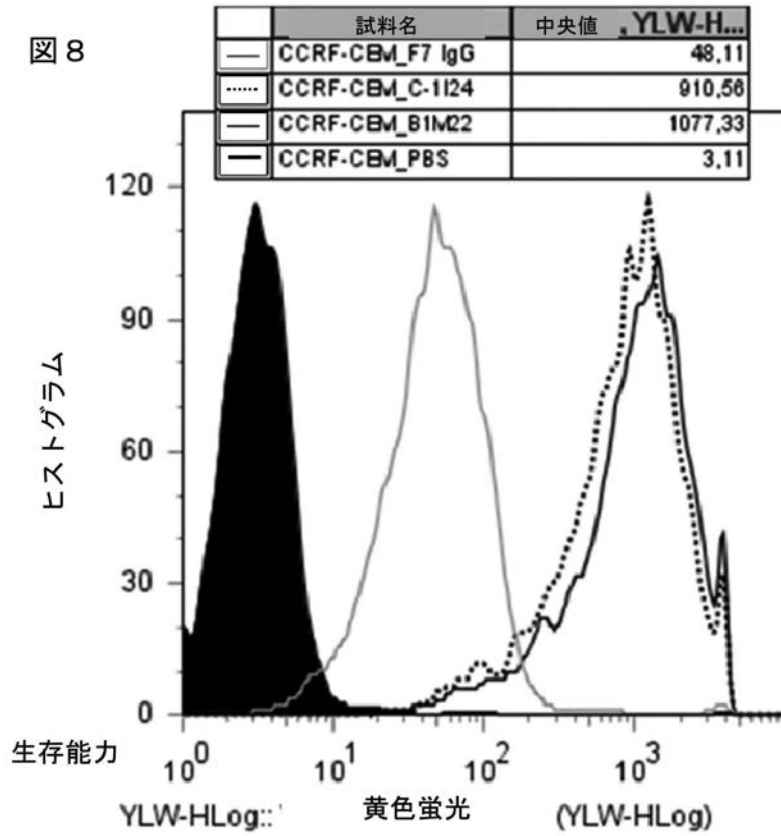


図 8 A

【 図 8 B 】

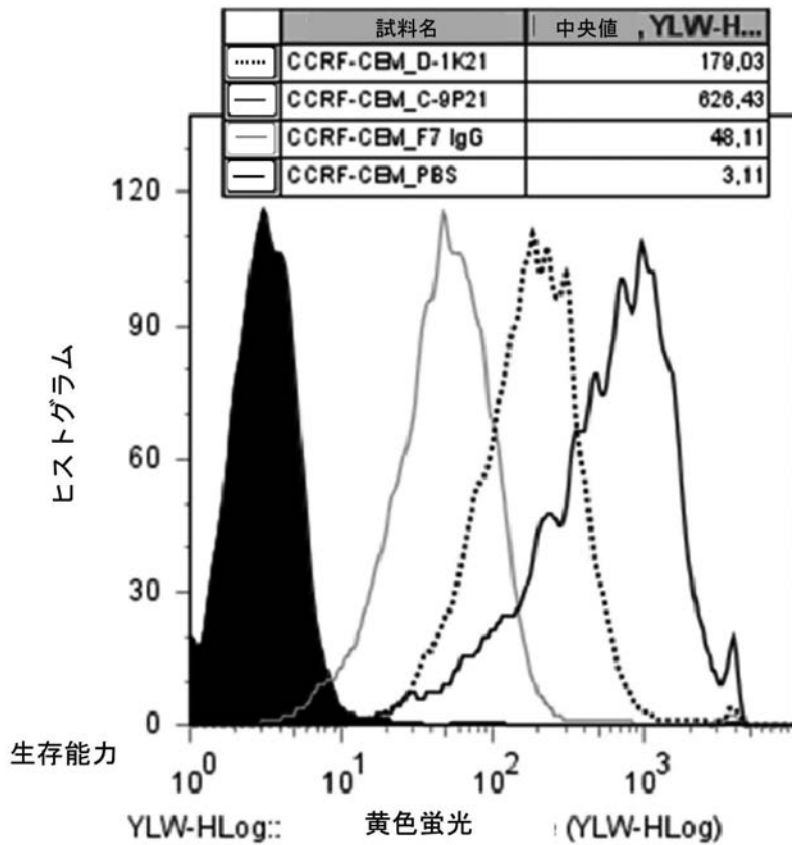
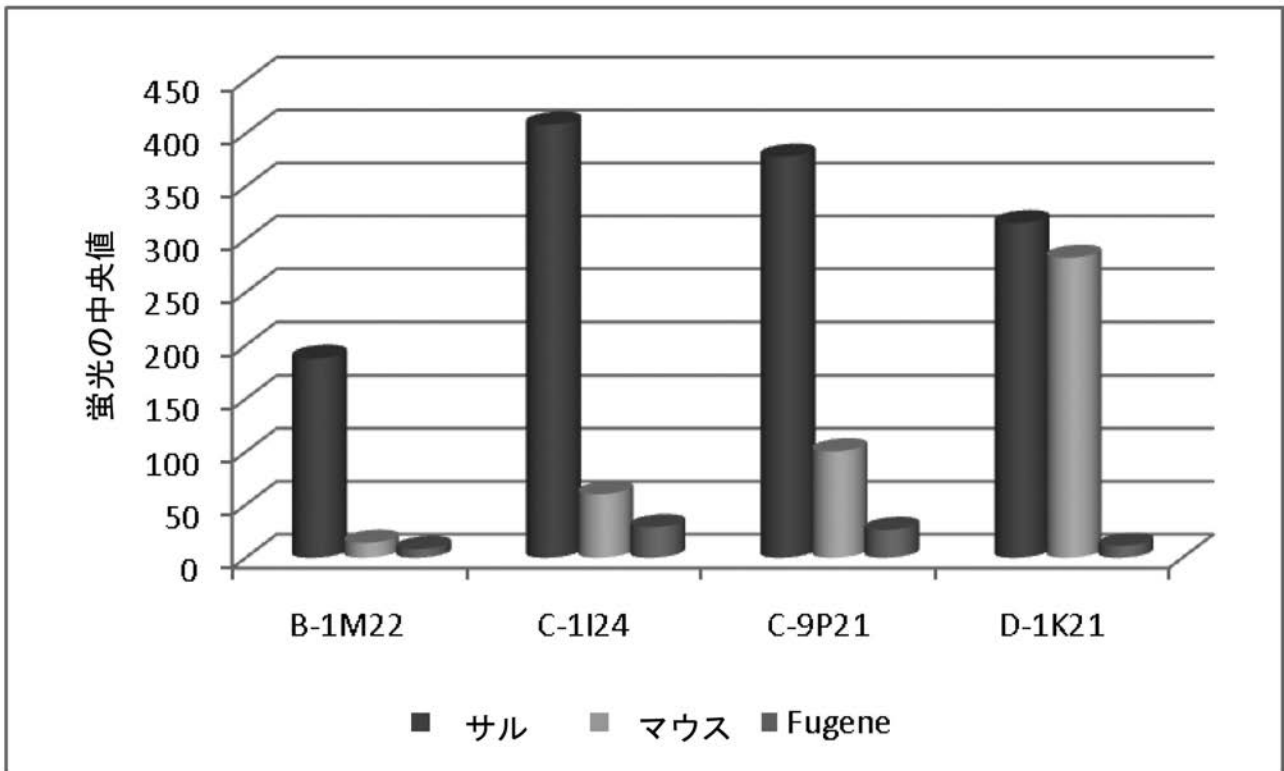


図 8 B

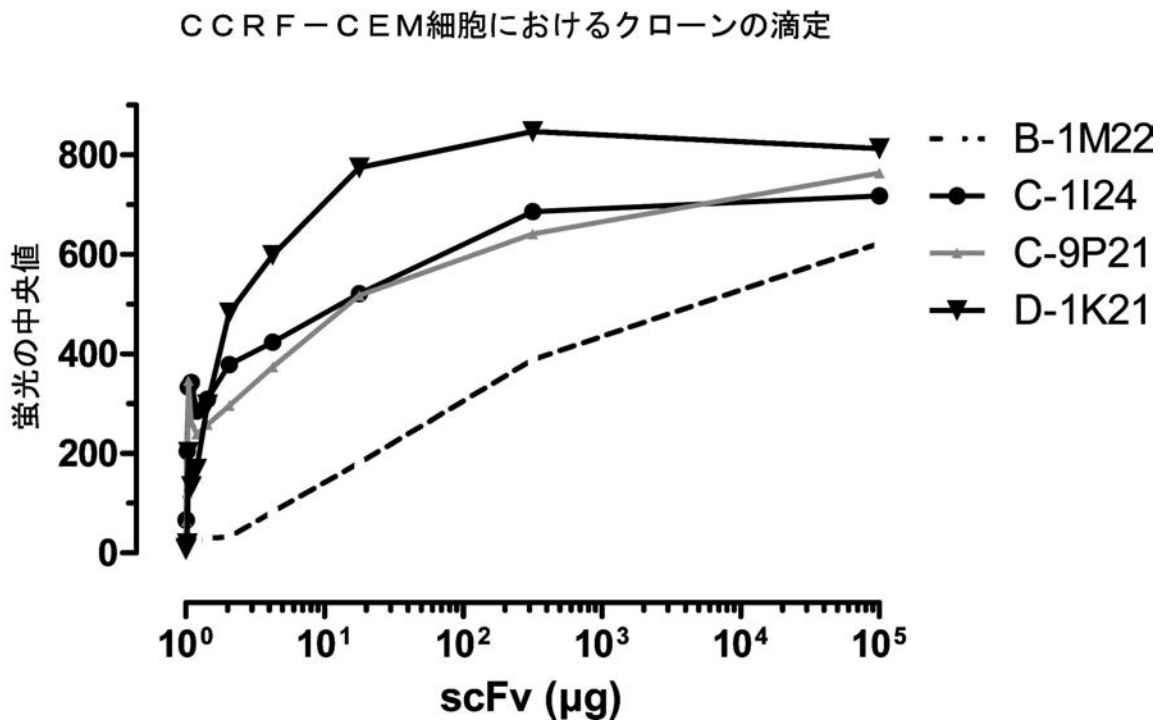
【図9】

図9



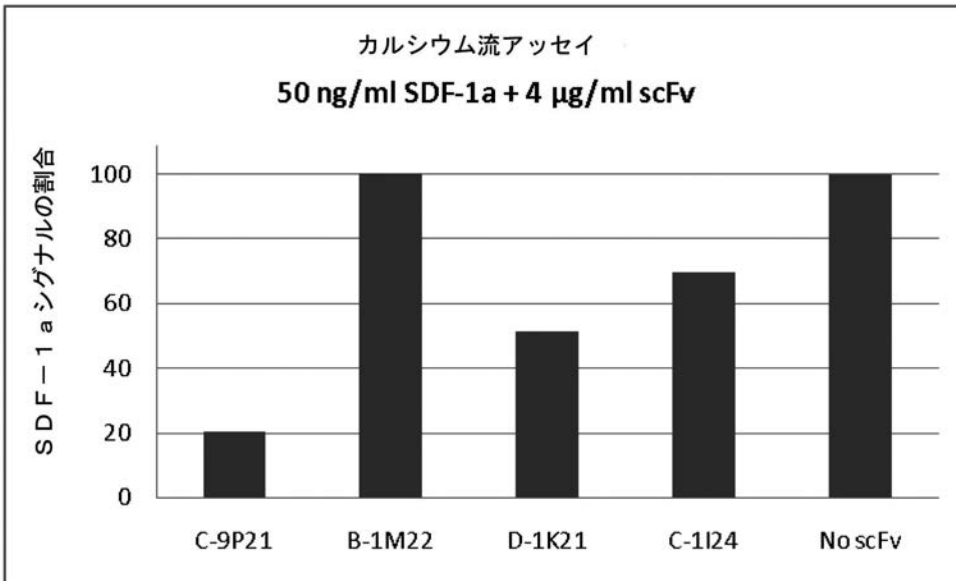
【図10】

図10



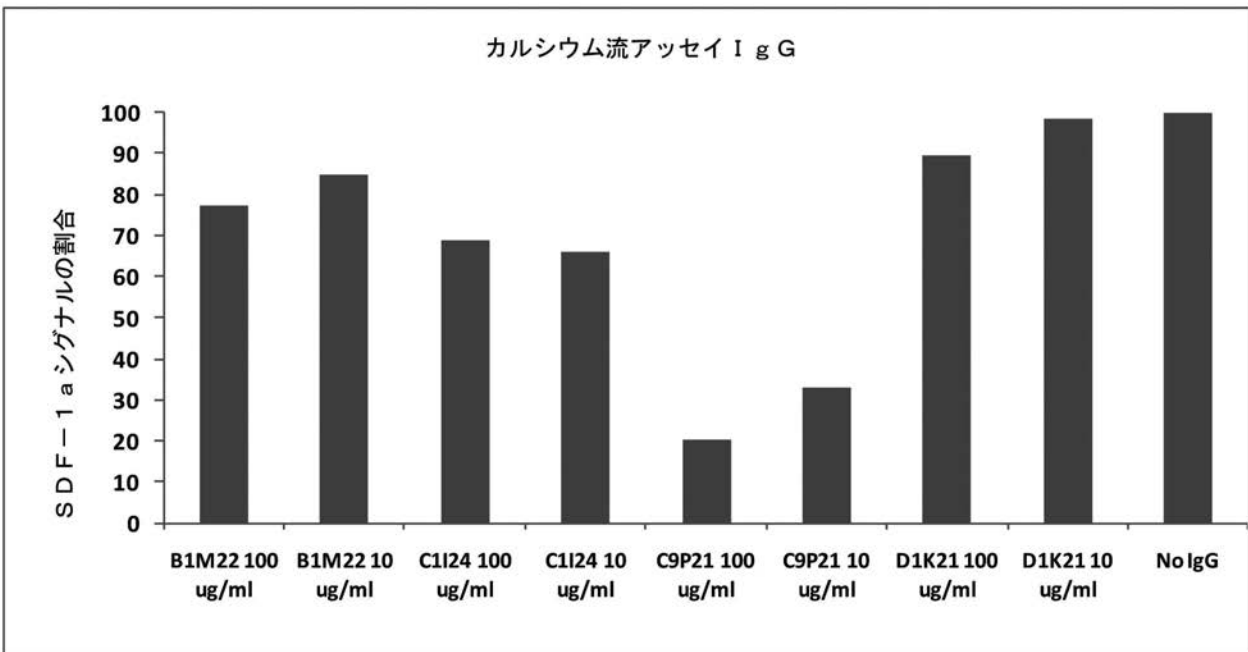
【図 1 1 A】

図 1 1 A

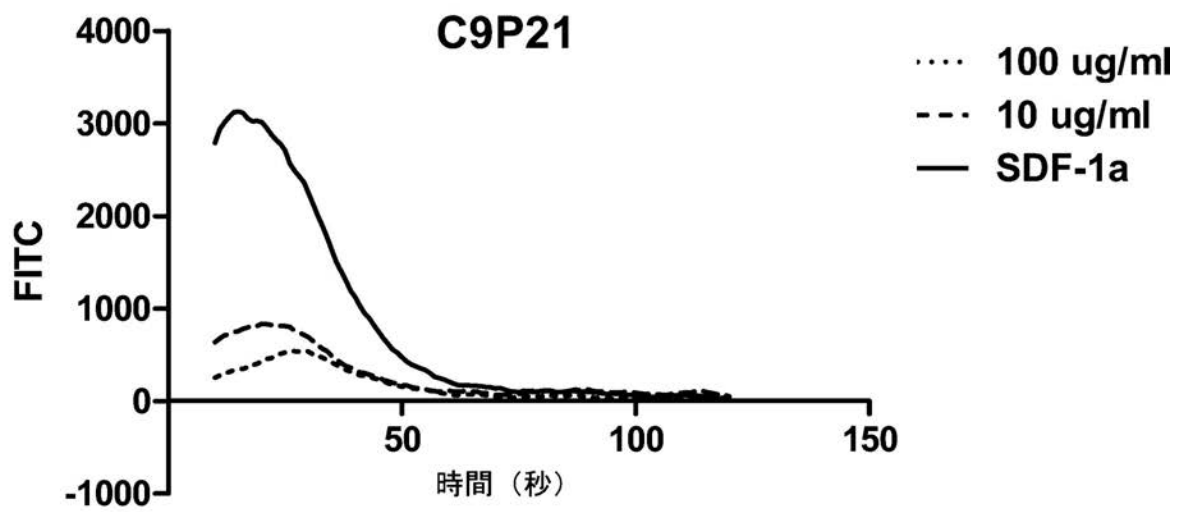
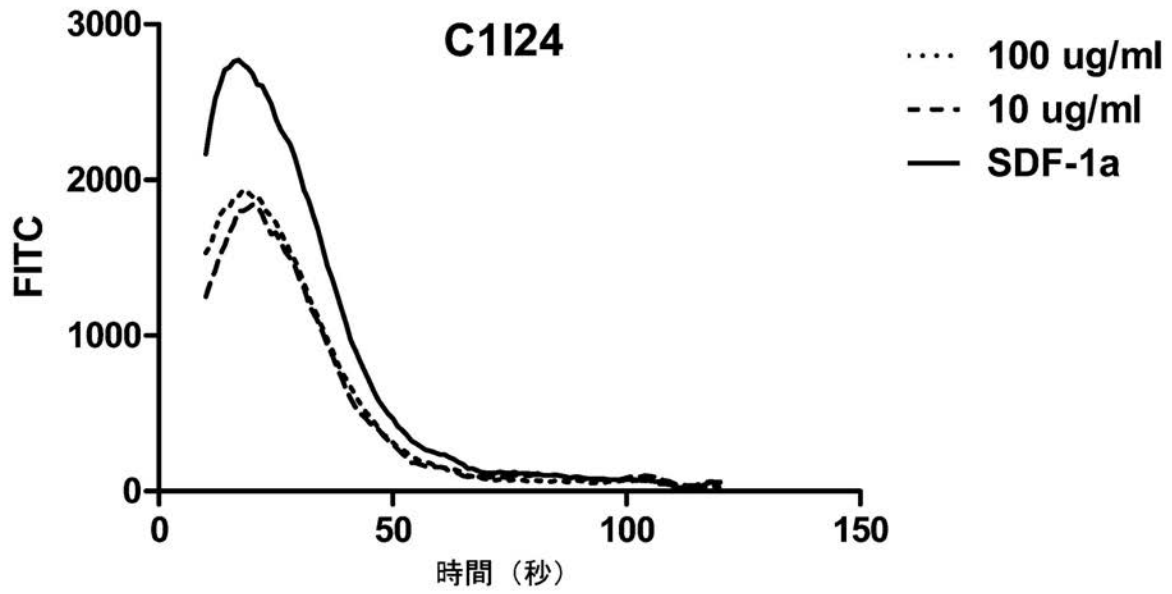


【図 1 1 B】

図 1 1 B

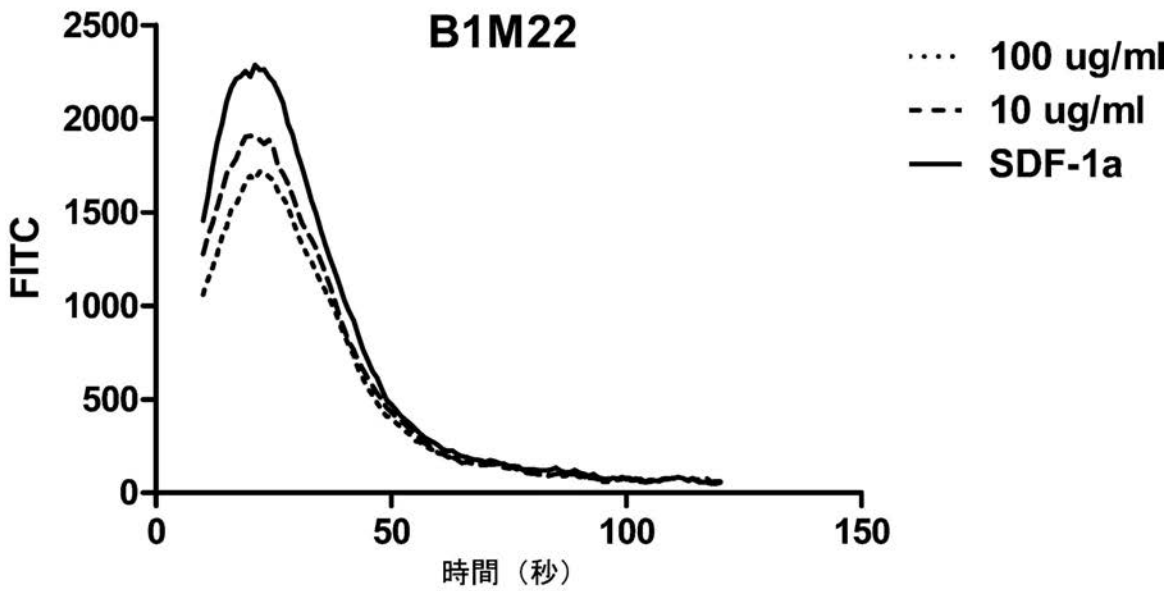
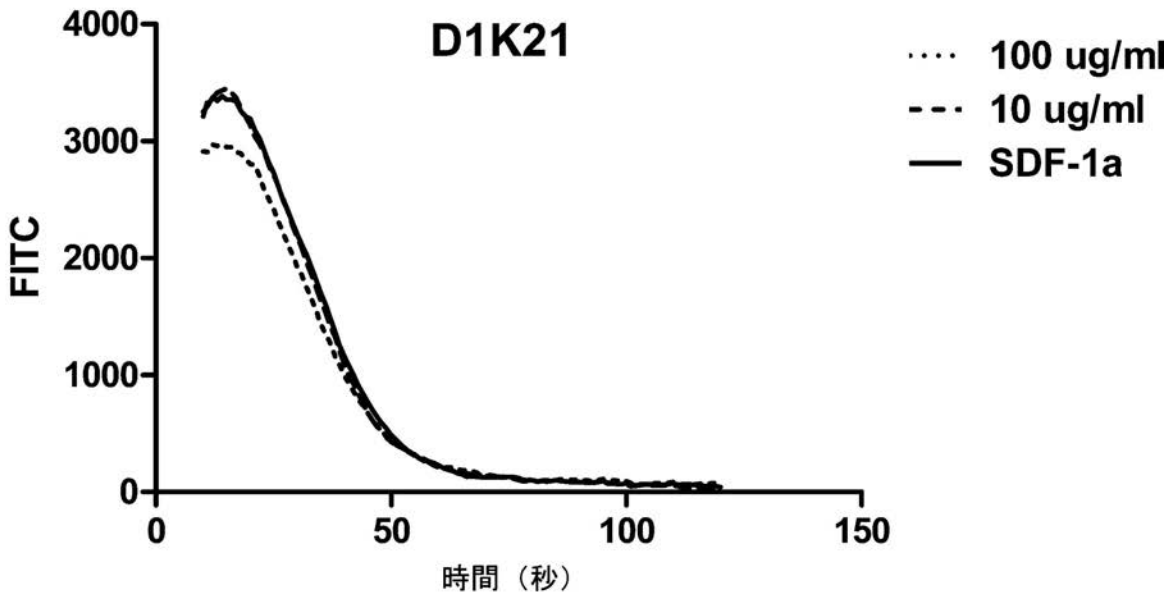


【 1 1 C】
 1 1 C



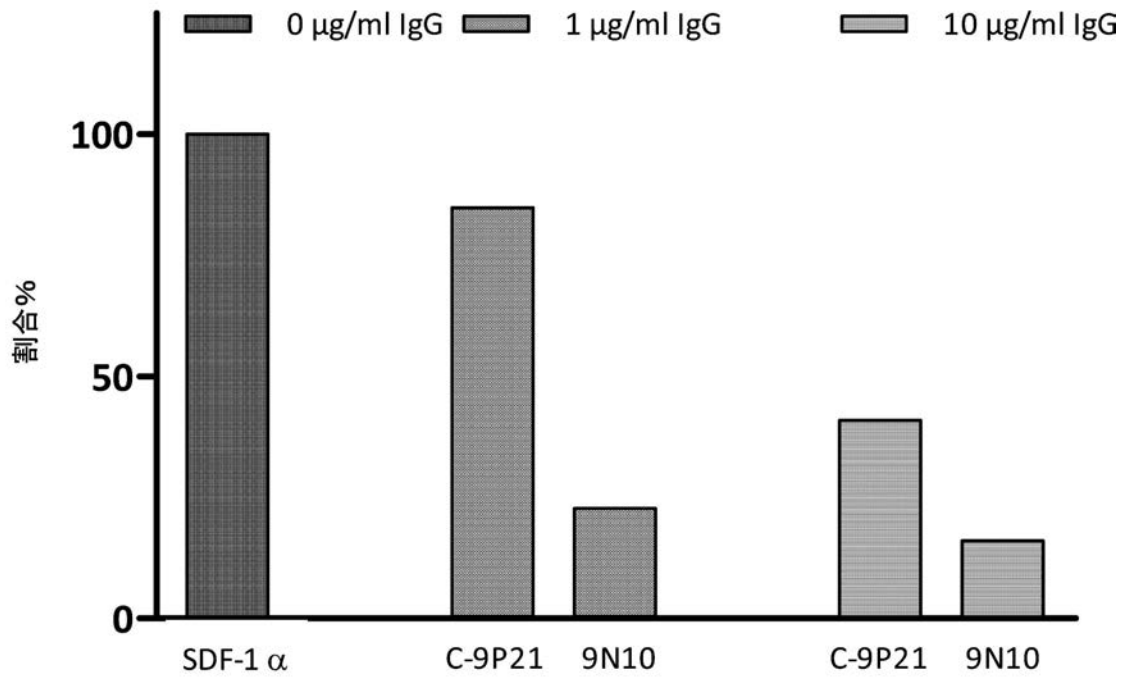
【 1 1 D】

1 1 D



【図 11E】
図 11E

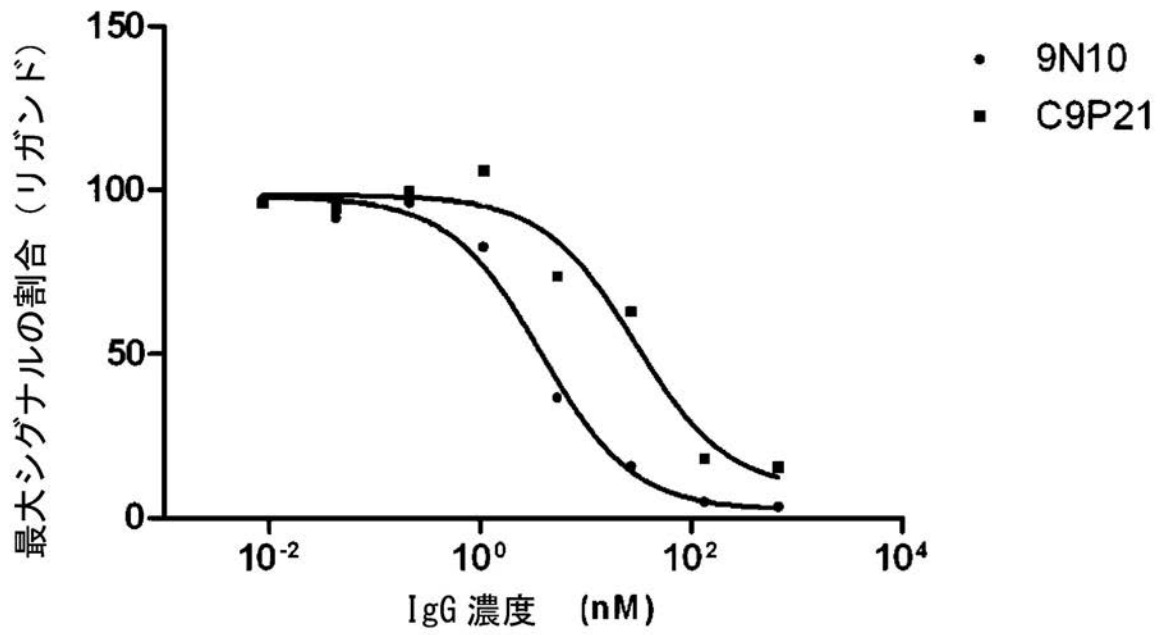
カルシウム流阻害



【図 1 2 A】

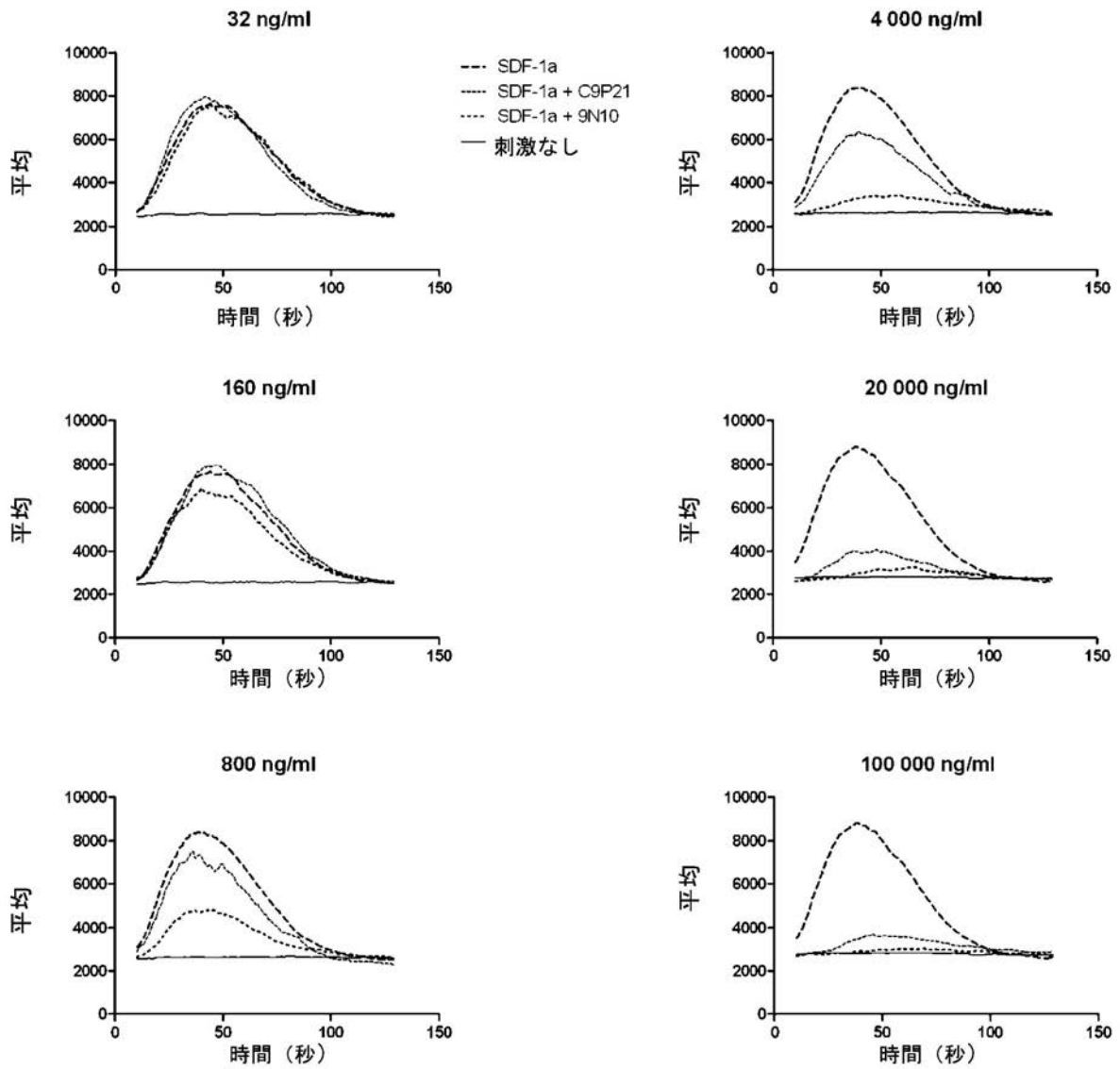
図 1 2 A

50 ng/mL の SDF-1 a を用いたカルシウム流アッセイ



【図 1 2 B】

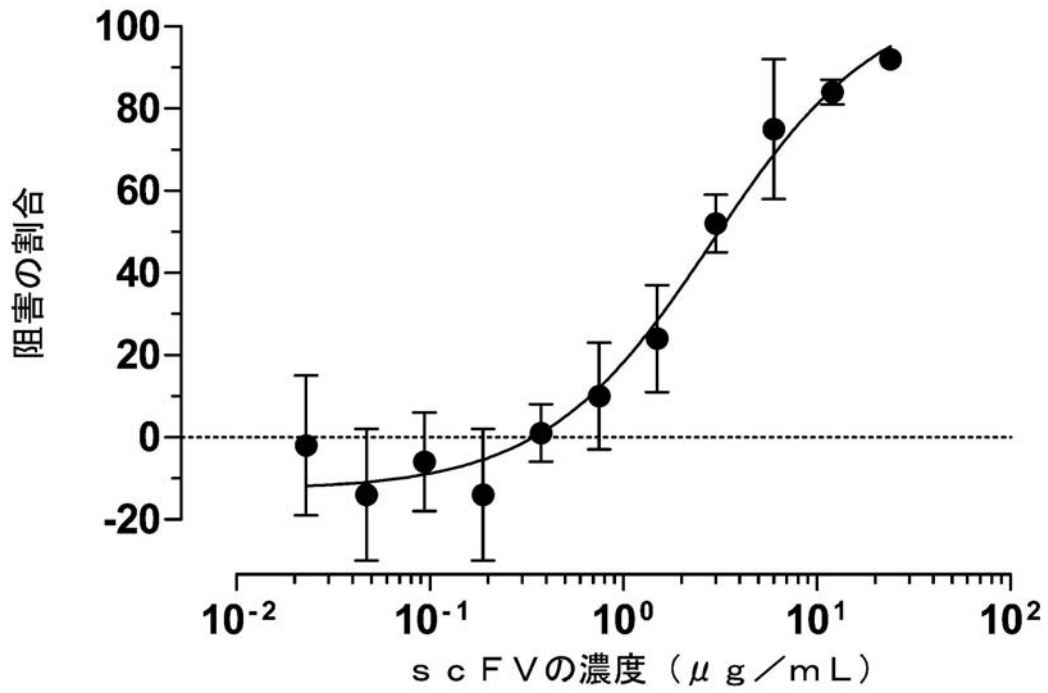
図 1 2 B



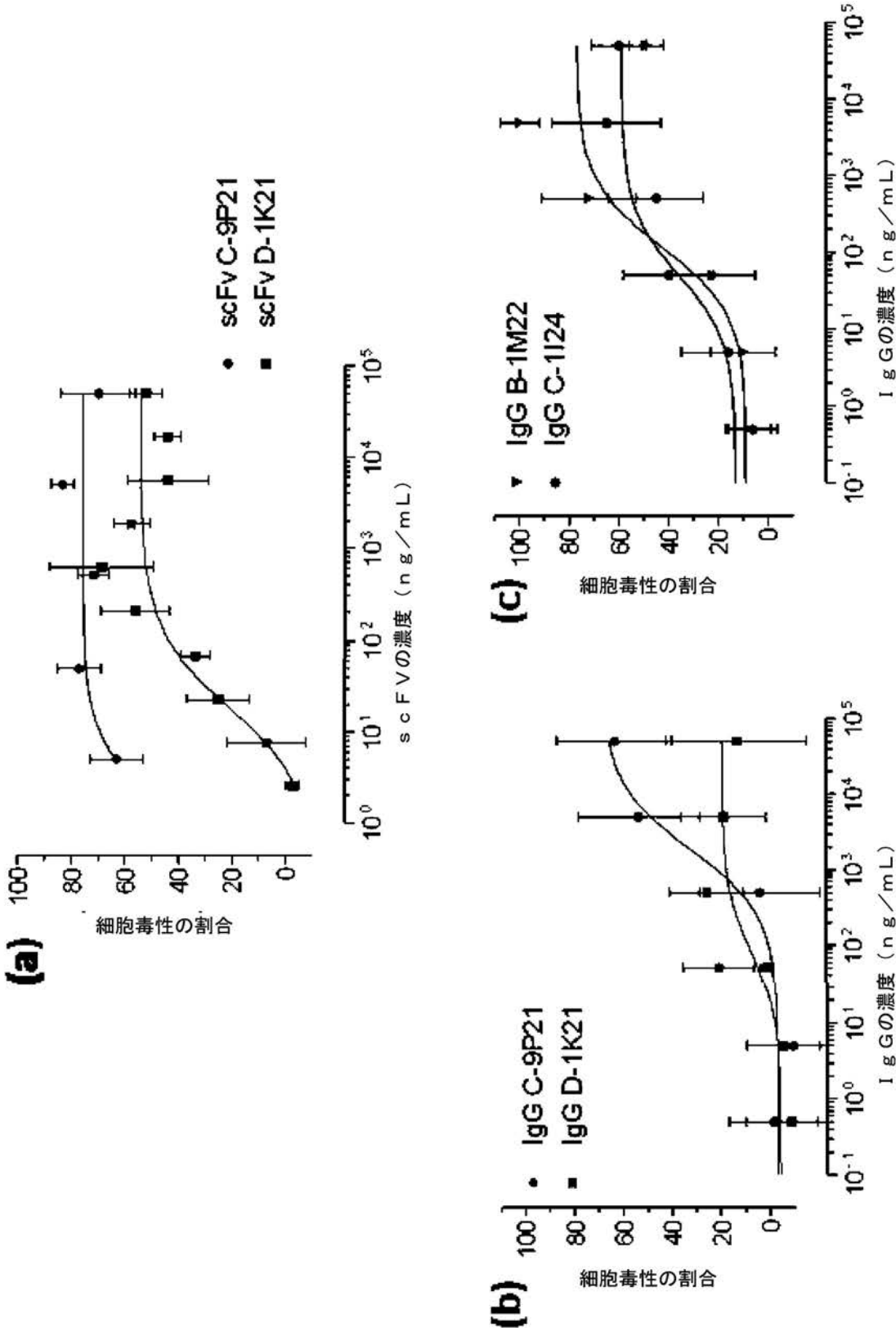
【図 13】

図 13

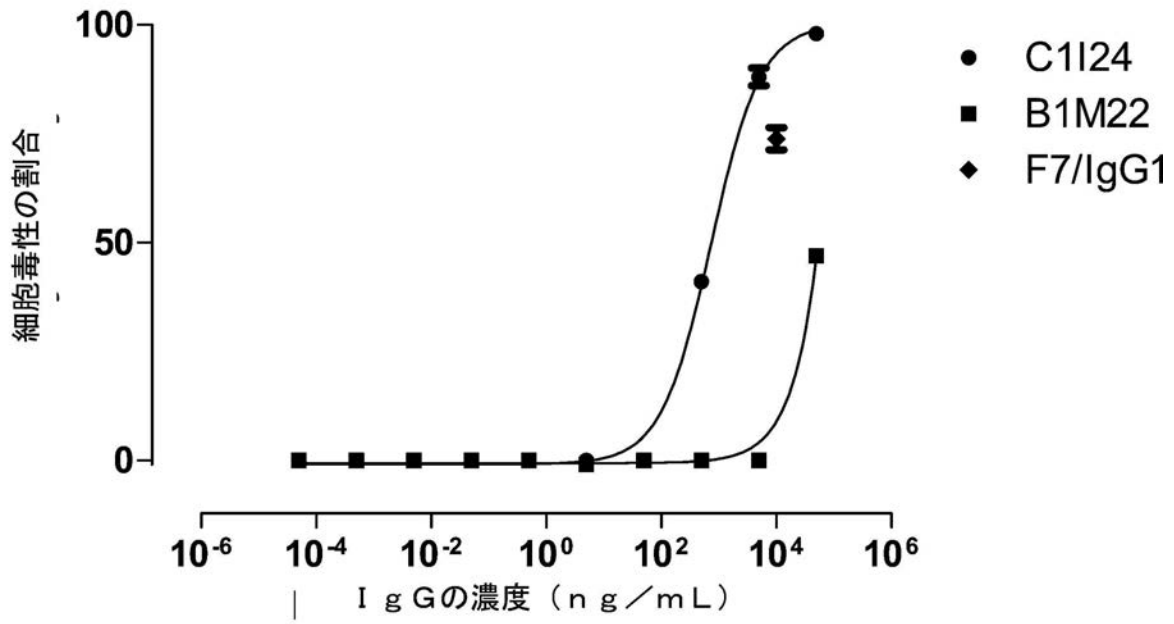
SDF-1が誘発する、CCR5-CEM細胞の移動



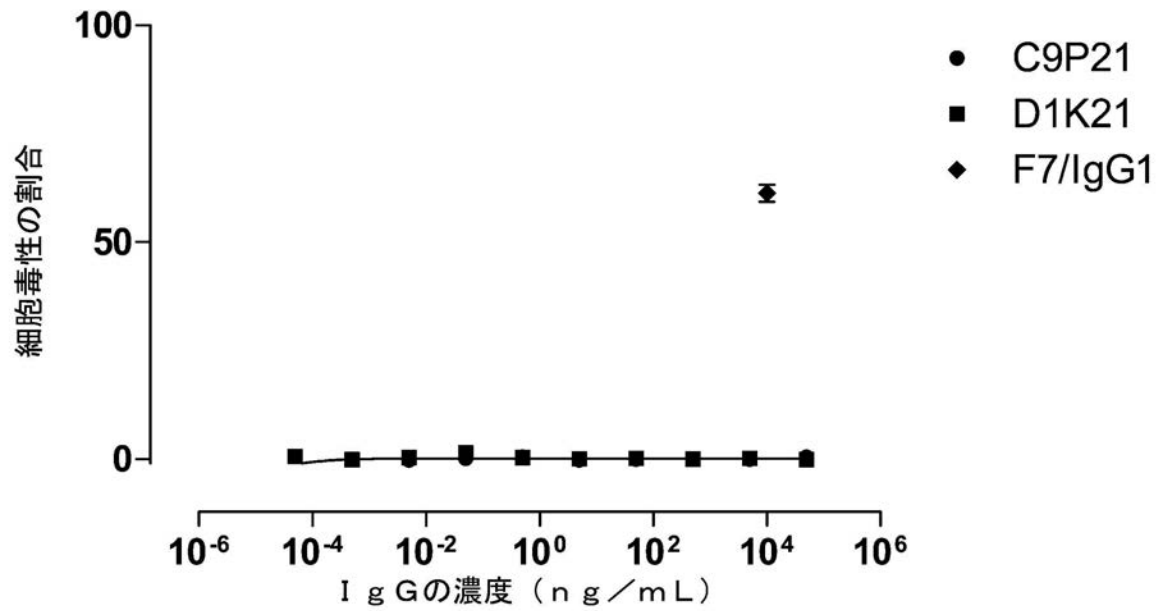
【 図 1 4 】
図 1 4



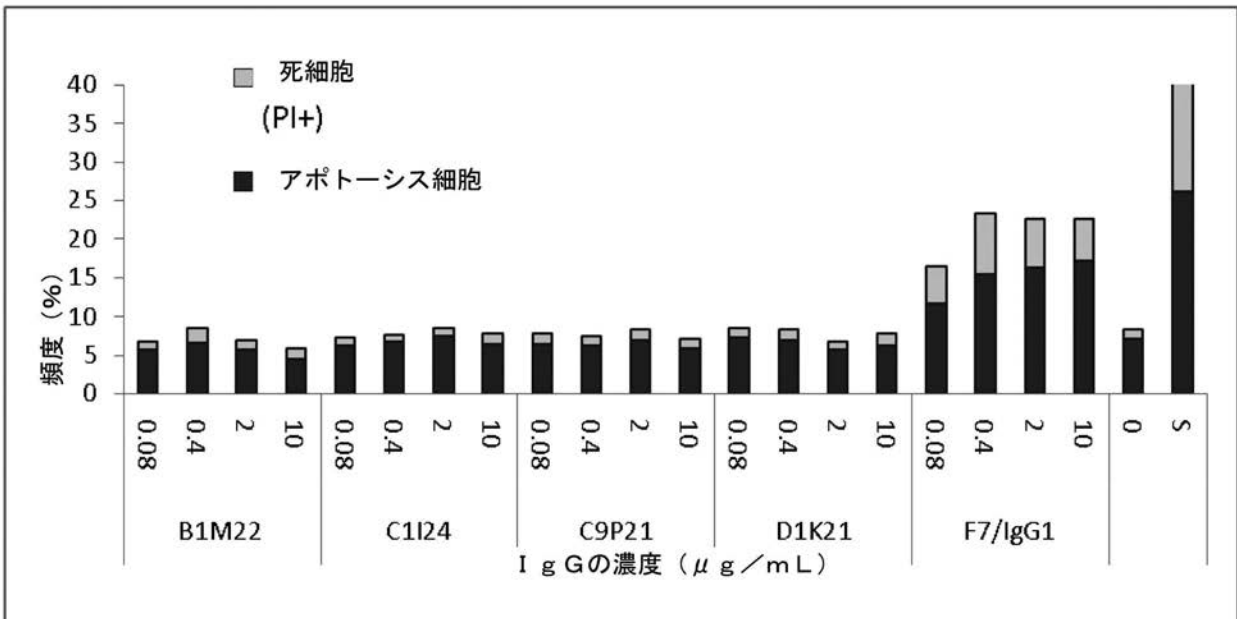
【図 15 A】
図 15 A



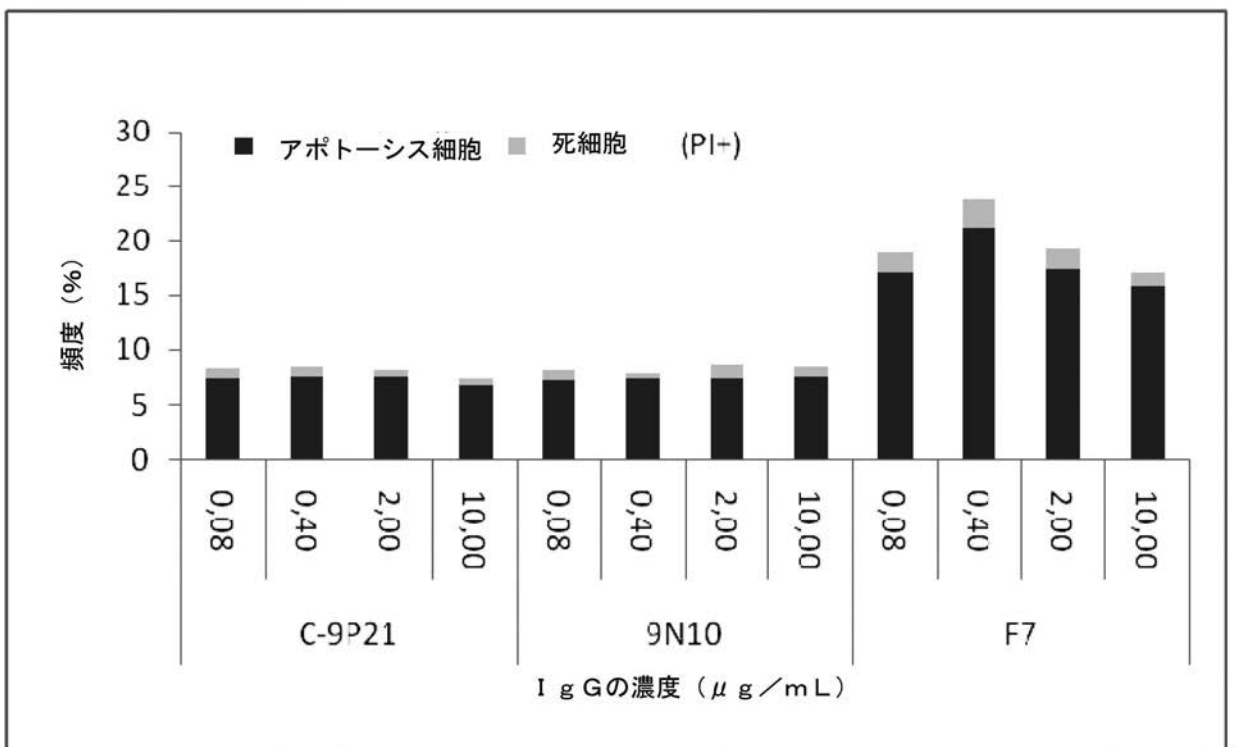
【図 15 B】
図 15 B



【図 16 A】
図 16 A



【図 16 B】
図 16 B



【配列表】

2013519367000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/GB2011/000175 |
|---|

| | | |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| INV. C07K16/28 | A61K39/395 | C12N15/13 |
| A61P31/12 | A61P29/00 | A61P37/00 |
| G01N33/53 A61P35/00 | | |
| ADD. | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | HUANG MING-BO ET AL: "Characterization of Nef-CXCR4 interactions important for apoptosis induction", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 20, October 2004 (2004-10), pages 11084-11096, XP000002657871, ISSN: 0022-538X figures 3B,7B | 1-56 |
| A | WO 2008/060367 A2 (MEDAREX INC [US]; KUHNE MICHELLE [US]; BRAMS PETER [US]; TANAMACHI DAW) 22 May 2008 (2008-05-22) cited in the application claims 1,2,4-7 | 1-56 |
| A | WO 2004/024178 A1 (BURGER JAN ANDREAS [DE]) 25 March 2004 (2004-03-25) the whole document | 1-56 |
| | ----- -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 10 November 2011 | | Date of mailing of the international search report 05/12/2011 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Weigl, Martina |

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2011/000175**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2011/000175

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 5, 11, 20(completely); 1-4, 10, 16-19, 25-56(partially)

Claims relating to CXCR4 antibody C-9P21 and uses thereof

2. claims: 6, 12, 21(completely); 1-4, 10, 16-19, 25-56(partially)

Claims relating to CXCR4 antibody B-1M22 and uses thereof

3. claims: 7, 13, 22(completely); 1-4, 10, 16-19, 25-56(partially)

Claims relating to CXCR4 antibody C-1I24 and uses thereof

4. claims: 8, 14, 23(completely); 1-4, 10, 16-19, 25-56(partially)

Claims relating to CXCR4 antibody D-1K21 and uses thereof

5. claims: 9, 15, 24(completely); 1-4, 10, 16-19, 25-56(partially)

Claims relating to CXCR4 antibody 9N10 and uses thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000175

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>16 October 2008 (2008-10-16), "Human 13M57 antibody VH region, h-germline.", XP000002657974, retrieved from EBI accession no. GSP:ATD32841 Database accession no. ATD32841 abstract; sequence -----</p> | 11,15, 20,24,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>9 March 2006 (2006-03-09), "Human clone 124-152 antibody Vkappa region.", XP000002657975, retrieved from EBI accession no. GSP:AEF11056 Database accession no. AEF11056 abstract; sequence -----</p> | 11,20,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>20 November 2003 (2003-11-20), "Human antibody 1D7 heavy chain amino acid sequence SEQ ID NO:26.", XP002663182, retrieved from EBI accession no. GSP:ADA89182 Database accession no. ADA89182 abstract; sequence -----</p> | 12,21,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>25 June 2009 (2009-06-25), "Human RANTES monoclonal antibody 1D9 VL protein, SEQ 4.", XP002663183, retrieved from EBI accession no. GSP:AWV33860 Database accession no. AWV33860 abstract; sequence -----</p> | 12,21,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>5 March 2009 (2009-03-05), "Human anti-PAR-2 antibody VH protein, SEQ ID 27.", XP002663184, retrieved from EBI accession no. GSP:AUP72289 Database accession no. AUP72289 abstract; sequence -----</p> | 13,22,33 |
| | ----- -/-- | |

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000175

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>7 February 2008 (2008-02-07), "Anti-staphylococci human IgG1 light chain protein sequence, SEQ ID 219.", XP002663185, retrieved from EBI accession no. GSP:AOD34885 Database accession no. AOD34885 abstract; sequence -----</p> | 13,22,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>20 March 2008 (2008-03-20), "Human CLqR specific antibody VH SEQ ID NO:451.", XP002663186, retrieved from EBI accession no. GSP:AQF29829 Database accession no. AQF29829 abstract; sequence -----</p> | 14,23,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>7 September 2006 (2006-09-07), "WNV specific scFv SC04-283 protein.", XP002663187, retrieved from EBI accession no. GSP:AEI92363 Database accession no. AEI92363 abstract; sequence -----</p> | 14,23,33 |
| A | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>29 October 2009 (2009-10-29), "PCSK9-specific antagonist antibody 1B20 VL protein SEQ ID:27.", XP002663188, retrieved from EBI accession no. GSP:AXQ60251 Database accession no. AXQ60251 abstract; sequence -----</p> | 15,24,33 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/000175

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2008060367 A2 | 22-05-2008 | AR 063086 A1 | 23-12-2008 |
| | | AU 2007320024 A1 | 22-05-2008 |
| | | CA 2665239 A1 | 22-05-2008 |
| | | CL 28352007 A1 | 30-05-2008 |
| | | CN 101528259 A | 09-09-2009 |
| | | EA 200900424 A1 | 28-08-2009 |
| | | EP 2066351 A2 | 10-06-2009 |
| | | JP 2010505830 A | 25-02-2010 |
| | | KR 20090064589 A | 19-06-2009 |
| | | TW 200831535 A | 01-08-2008 |
| | | US 2010104508 A1 | 29-04-2010 |
| | | WO 2008060367 A2 | 22-05-2008 |
| | | WO 2004024178 A1 | 25-03-2004 |
| DE 10240064 A1 | 11-03-2004 | | |
| WO 2004024178 A1 | 25-03-2004 | | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------------------|------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 0 1 | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 N 7/00 (2006.01) | C 1 2 N 7/00 | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | C 0 7 K 16/46 | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 D | |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | G 0 1 N 33/574 A | |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 0 5 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01) | A 6 1 P 29/00 | |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01) | A 6 1 P 37/02 | |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01) | A 6 1 P 29/00 1 0 1 | |
| A 6 1 P 31/18 (2006.01) | A 6 1 P 19/02 | |
| A 6 1 P 31/12 (2006.01) | A 6 1 P 31/18 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 P 31/12 | |
| | A 6 1 K 39/395 N | |
| | A 6 1 K 39/395 L | |
| | A 6 1 P 43/00 1 2 1 | |

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA02 DA05 EA04 FA02 GA11 HA03
 HA11
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 BA01 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA19 AA25 MA02 NA10 NA14 ZA961 ZB071 ZB081 ZB111 ZB151
 ZB211 ZB261 ZB331 ZC551 ZC751
 4C085 AA14 AA21 BB17 CC23 EE01 EE03
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2013519367A5 | 公开(公告)日 | 2014-03-27 |
| 申请号 | JP2012552459 | 申请日 | 2011-02-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | AFFITECH | | |
| 申请(专利权)人(译) | 阿菲技术研究Eiesu | | |
| [标]发明人 | カヴライアニータ キプリヤノフセルゲイミハイロヴィック | | |
| 发明人 | カヴライ, アニータ キプリヤノフ, セルゲイ, ミハイロヴィック | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/53 G01N33/574 A61K45/00 A61P43/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P19/02 A61P31/18 A61P31/12 A61K39/395 | | |
| CPC分类号 | A61P19/02 A61P29/00 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/76 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K2317/14 C07K2317 /565 C07K2317/567 C07K2317/92 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N7/00 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/53.D G01N33/574.A A61K45/00 A61P43/00.105 A61P35/00 A61P29/00 A61P37 /02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P31/18 A61P31/12 A61K39/395.N A61K39/395.L A61P43/00.121 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024 /FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/AA25 4C084/MA02 4C084 /NA10 4C084/NA14 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB151 4C084 /ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZC551 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085 /BB17 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 61/303060 2010-02-10 US 2010002238 2010-02-10 GB | | |
| 其他公开文献 | JP6045914B2 JP2013519367A | | |

摘要(译)

本发明提供了与CXCR4趋化因子受体4 (CXCR4) 结合并且不诱导CXCR4表达细胞显著凋亡的抗体。还提供了免疫缀合物和包含此类抗体的组合物，以及涉及此类抗体的方法和用途，特别是在医学和诊断领域。