

明 細 書

発明の名称：新規抗CCR8抗体

技術分野

[0001] 本発明は、新規抗CCR8抗体及び該抗体を含有する医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 腫瘍微小環境内の制御性T細胞（Treg細胞）が媒介する免疫抑制をはじめとする強力な負の調節機構は、腫瘍の治療にとって大きな障害である（非特許文献1）。

例えば、腫瘍に浸潤するCD4陽性Treg細胞は、抗腫瘍免疫応答を強力に阻害している可能性があり、効果的な癌治療の大きな障害となりうる。

CD4陽性FoxP3陽性Treg細胞が媒介する腫瘍免疫抑制は、動物腫瘍モデルで十分に立証されており、腫瘍内も含めた全身性のTreg細胞除去により抗腫瘍効果が得られるが、一方で50％程度の腫瘍内浸潤Treg細胞除去では効果が認められないことが報告されている（非特許文献2）。

[0003] ヒトにおいて全CD4陽性T細胞集団中のCD4陽性CD25陽性Treg細胞比（Treg細胞を含む細胞集団）の増大が、肺、乳房及び卵巣腫瘍をはじめとする、種々の癌患者の腫瘍内で検出され、存在比と患者生存率に負の相関があることが報告されている（非特許文献3～8）。

[0004] 抗CD25抗体によってCD4陽性CD25陽性Treg細胞を腫瘍内より除去することで、抗腫瘍効果を確認している。しかしCD25は、CD4陽性CD25陽性Treg細胞及び新たに活性化されたエフェクターT細胞の細胞表面にも発現するため、Treg細胞を特異的に除去しているとは言えない。またマウスにおいて抗CD25抗体投与による抗腫瘍効果は限定的であり、腫瘍移植前の抗体投与でのみ治療効果を示し、腫瘍をマウスに生着させた後に抗体を投与する場合は治療効果がほとんどないことが種々の腫瘍

モデルで証明されている。移植後 1 日目に抗 C D 2 5 抗体投与開始の場合、抗腫瘍効果は減弱し、移植後 2 日目以降の投与開始の場合、ほとんど抗腫瘍効果は認められていない（非特許文献 9）。

[0005] 現在まで T r e g 細胞除去を目的として抗 C D 2 5 抗体をマウスに投与する薬効試験が実施されているが、抗腫瘍効果を示す報告はほとんどなく、移植後の抗体投与による T r e g 細胞除去による抗腫瘍治療効果の確認は非常に困難である（非特許文献 1 0）。

[0006] C C R 8 は C Y 6、C K R－L 1 又は T E R 1 と呼ばれていた胸腺や脾臓等で発現している G 蛋白共役型 7 回膜貫通型の C C ケモカイン受容体タンパク質であり、その遺伝子はヒトクロモゾームでは 3 p 2 1 に存在する。ヒト C C R 8 は 3 5 5 アミノ酸からなる（非特許文献 1 1）。C C R 8 に対する内因性リガンドとしては C C L 1 が知られている（非特許文献 1 2）。ヒト C C R 8 c D N A は G e n b a n k A C C N o. N M _ 0 0 5 2 0 1 . 3 に示される塩基配列で構成され、マウス C C R 8 c D N A は G e n b a n k A C C N o. N M _ 0 0 7 7 2 0 . 2 に示される塩基配列で構成される。

[0007] C C R 8 は、腫瘍内浸潤 T r e g 細胞にも特異的に発現しており、C C R 8 欠損マウスと野生型マウスに乳癌細胞を移植したところ、C C R 8 欠損マウスにおける乳癌の増殖と転移が野生型マウスと比較して抑制されていたことが示されている（特許文献 1 及び非特許文献 1 3）。さらに、抗 C C R 8 抗体を癌モデル動物に投与することにより抗腫瘍効果を示したことが開示されている（特許文献 2 及び 3）。

[0008] 特許文献 4 には、アレルギー性疾患及び H I V 感染の治療に有用な抗 C C R 8 抗体が開示されている。本文献においては、4 1 4 B、4 1 4 C、4 1 4 E、4 3 3 H、4 5 9 M、4 6 4 A、4 6 4 B、4 3 3 B 及び 4 5 5 A L で示される抗 C C R 8 抗体が開示されている。これらのうち、4 3 3 H の抗 C C R 8 抗体については、B D バイオサイエンス社から販売されている。しかし、該抗体の C D R 配列は開示されていない。また、抗 C C R 8 抗体が抗

腫瘍活性を有し、癌治療に有用であることは示されていない。

非特許文献14には、3B10、2D10及び5B11で示される抗CCR8抗体が開示されている。また、BioLegend社から、品番L263G8の抗CCR8抗体が販売されている。R&D社から、品番191704の抗CCR8抗体が販売されている。しかし、該抗体のCDR配列は開示されていない。また、抗CCR8抗体が抗腫瘍活性を有し、癌治療に有用であることは示されていない。

特許文献5及び非特許文献15～19には、CCR8が癌の病態に関与していることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：米国特許第10087259号明細書
特許文献2：国際公開第2018/181425号
特許文献3：国際公開第2018/112032号
特許文献4：国際公開第2007/044756号
特許文献5：国際公開第2017/198631号

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Nat. Rev. Immunol.、2006年、第6巻、第4号、p.295-307
非特許文献2：Eur. J. Immunol.、2010年、第40巻、p.3325-3335
非特許文献3：J. Clin. Oncol.、2006年、第24巻、p.5373-5380
非特許文献4：Nat. Med.、2004年、第10巻、p.942-949
非特許文献5：J. Clin. Oncol.、2007年、第25巻、p.2586-2593
非特許文献6：Cancer、2006年、第107巻、p.2866-2872
非特許文献7：Eur. J. Cancer、2008年、第44巻、p.1875-1882
非特許文献8：Cell. Mol. Immunol.、2011年、第8巻、p.59-66
非特許文献9：Cancer Res.、1999年、第59巻、第13号、p.3128-33
非特許文献10：Cancer Res.、2010年、第70巻、第7号、p.2665-74

非特許文献11 : J. Immunol., 1996年、第157巻、第7号、p.2759-63

非特許文献12 : J. Biol. Chem., 1997年、第272巻、第28号、p.17251-4

非特許文献13 : Cancer Res., 2016年、第76巻、第4号、Suppl.1, P4-04-11

非特許文献14 : J. Exp. Med., 2004年、第200巻、第10号、p1231-1241

非特許文献15 : Immunity, 2016年、第45巻、p1122-1134

非特許文献16 : Immunity, 2016年、第45巻、p1135-1147

非特許文献17 : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2018年、第115巻、第45号、p10672-10681

非特許文献18 : Targeting of CCR8 induces antitumor activity as a monotherapy that is further enhanced in combination with a Listeria-based immunotherapy, ASCO 2018, Daniel O Villarreal, et al. <https://www.advaxis.com/wp-content/uploads/2018/04/KeystonePosterCCR8-combo-posterFINAL.pdf>

非特許文献19 : Cancer Res., 2018年、第78巻、第18号、p5340-5348

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の目的は、新規抗CCR8抗体又はその抗体断片を提供することである。さらには、癌の治療薬として利用可能な新規抗CCR8抗体又はその抗体断片を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、鋭意研究の結果、ヒトCCR8に特異的に結合し、CCR8とCCR8リガンドの結合を阻害するモノクローナル抗体を見出した。また、ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片を、CCR8とCCR8リガンドの結合を阻害す

るために用いることができることを見出した。さらに、本発明のモノクローナル抗体が、抗腫瘍活性を有し、癌の治療に有用であることを見出した。また、ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片が、抗腫瘍活性を有し、癌を治療するために用いることができることを見出した。すなわち、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、CCR8とCCR8リガンドの結合を阻害するために用いることができる。また、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、中和抗体として用いることができる。

[0013] 本発明は、以下に関する。

(1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識する、CCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(2) 中和抗体である、(1)記載の抗体又はその抗体断片。

(3) さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の94位から107位の中の1以上のアミノ酸を認識する、(1)又は(2)記載の抗体又はその抗体断片。

(4) さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の172位から202位の中の1以上のアミノ酸を認識する、(1)～(3)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。

(5) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の20位のイソロイシン、22位のセリン、35位のリジン、181位のロイシン、183位のシステイン及び188位のアスパラギンのうち、1以上のアミノ酸を認識する、(1)～(4)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。

(6) ヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片である、(1)～(5)のいずれかに記載の抗体又は抗体断片。

(7) 1) 配列番号2のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号3のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入

及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号5のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号6のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号7のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域；

2) 配列番号2のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号3のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号6のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号7のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域；

3) 配列番号2のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号9のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入

及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号10のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号6のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号11のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域；

（ここで、以下のいずれかの置換を1以上有していても良い、

- A) 配列番号2のアミノ酸配列の2番目のセリンがトレオニンに置換、
- B) 配列番号2のアミノ酸配列の3番目のセリンがトレオニンに置換、
- C) 配列番号2のアミノ酸配列の5番目のセリンがトレオニンに置換、
- D) 配列番号10のアミノ酸配列の2番目のグルタミンがアスパラギンに置換、
- E) 配列番号8のアミノ酸配列の1番目のトレオニンがセリンに置換、
- F) 配列番号6のアミノ酸配列の14番目のアラニンがバリンに置換、
- G) 配列番号6のアミノ酸配列の18番目のリジンがアルギニンに置換、
- H) 配列番号6のアミノ酸配列の19番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、
- I) 配列番号11のアミノ酸配列の5番目のアスパラギンがグルタミンに置換、
- J) 配列番号11のアミノ酸配列の12番目のチロシンがフェニルアラニンに置換）；

4) 配列番号2のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 3 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 1 0 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 1 2 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 6 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 1 3 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域；

5) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 1、

配列番号 1 5 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 1 7 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 1 8 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 1 9 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域；若しくは

6) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換

、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号21のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号22のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号23のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号24のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号25のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域

を含む、CCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(8) 1) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域

(ここで、以下のいずれかの置換を1以上有していても良い、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換

B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換

C) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換

D) 配列番号3のアミノ酸配列の5番目のロイシンがイソロイシンに置換

E) 配列番号4のアミノ酸配列の4番目のロイシンがイソロイシンに置換

F) 配列番号4のアミノ酸配列の6番目のチロシンがフェニルアラニンに置換

G) 配列番号6のアミノ酸配列の16番目のセリンがトレオニンに置換

H) 配列番号6のアミノ酸配列の19番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換) ;

2) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域 ;

3) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号9のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号10のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号11のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域 ;

4) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号10のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号12のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号13のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域 ;

5) 配列番号14のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号15のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号16のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号17のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号18のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号 19 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域；若しくは

6) 配列番号 20 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 21 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 22 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに
配列番号 23 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 24 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 25 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域
を含む、(7) 記載の抗体又はその抗体断片。

(9) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 3 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 4 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに
配列番号 5 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 6 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 7 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域を含み、
以下のいずれかの置換を 1 以上有する、

- A) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 10 番目のアスパラギンがリジンに置換；
- B) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 11 番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換；
- C) 配列番号 3 のアミノ酸配列の 4 番目のアスパラギンがグルタミンに置換；
- D) 配列番号 3 のアミノ酸配列の 5 番目のロイシンがイソロイシンに置換；
- E) 配列番号 4 のアミノ酸配列の 4 番目のロイシンがイソロイシンに置換；
- F) 配列番号 4 のアミノ酸配列の 6 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換
- G) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 16 番目のセリンがトレオニンに置換
- H) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 19 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

(8) 記載の抗体又はその抗体断片。

(10) 以下のいずれかの置換を1以上有する、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換

、

(9) 記載の抗体又はその抗体断片。

(11) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、

さらに、以下のいずれか一つの置換を有していても良い、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換、

(9) 又は(10) 記載の抗体又はその抗体断片。

(12) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、さらに、配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがアルギニンに置換されている、(11) 記載の抗体又はその抗体断片。

(13) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号9のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号10のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号11のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域を含み、

以下のいずれかの置換を1以上有する、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の2番目のセリンがトレオニンに置換；

B) 配列番号2のアミノ酸配列の3番目のセリンがトレオニンに置換；

C) 配列番号2のアミノ酸配列の5番目のセリンがトレオニンに置換；

D) 配列番号 10 のアミノ酸配列の 2 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；

E) 配列番号 8 のアミノ酸配列の 1 番目のトレオニンがセリンに置換；

F) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 14 番目のアラニンがバリンに置換；

G) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 18 番目のリジンがアルギニンに置換；

H) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 19 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 11 のアミノ酸配列の 5 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 11 のアミノ酸配列の 12 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換、

(8) 記載の抗体又はその抗体断片。

(14) ヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片である、(7)～(13)のいずれかに記載の抗体又は抗体断片。

(15) 配列番号 40、42、43、44、45 若しくは 47 のアミノ酸配列又は

配列番号 40、42、43、44、45 若しくは 47 のアミノ酸配列と 95 %以上の同一性のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域並びに

配列番号 41 若しくは 46 のアミノ酸配列又は

配列番号 41 若しくは 46 のアミノ酸配列と 95 %以上の同一性のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域；

を含む、(14) 記載のヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(16) 1) 配列番号 40 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

2) 配列番号 42 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

3) 配列番号 43 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

- 4) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 5) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 6) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 7) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 8) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 9) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 10) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 11) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；若しくは
- 12) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
を含み、
以下のいずれかの置換を 1 以上有していても良い、
- A) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 33
番目のアスパラギンがリジンに置換；
- B) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 34
番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又
はアルギニンに置換；
- C) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 58
番目のアスパラギンがグルタミンに置換；
- D) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 59

番目のロイシンがイソロイシンに置換；

E) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の97

番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の99

番目のチロシンがフェニルアラニンに置換；

G) 配列番号41又は46のアミノ酸配列の65番目のセリンがトレオニンに置換；

H) 配列番号41又は46のアミノ酸配列の68番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

(14)又は(15)記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(17)以下のいずれかの置換を1以上有する、

A) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の34番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換；

D) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の59番目のロイシンがイソロイシンに置換；

E) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の97番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の99番目のチロシンがフェニルアラニンに置換；

G) 配列番号41又は46のアミノ酸配列の65番目のセリンがトレオニンに置換；

H) 配列番号41又は46のアミノ酸配列の68番目のアスパラギン酸がグ

ルタミン酸に置換、

(16) 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(18) 配列番号40又は42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、

以下のいずれかの置換を1以上有する、

A) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換；

D) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の59番目のロイシンがイソロイシンに置換；

E) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の97番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の99番目のチロシンがフェニルアラニンに置換；

G) 配列番号41のアミノ酸配列の65番目のセリンがトレオニンに置換；

H) 配列番号41のアミノ酸配列の68番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

(17) 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(19) 以下のいずれかの置換を1以上有する、

配列番号40又は42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、

A) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがロイシン

又はアルギニンに置換；

C) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

(17)又は(18)記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(20) 配列番号40又は42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、

配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、

さらに、以下のいずれか一つの置換を有していても良い、

A) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換、

(17)～(19)のいずれかに記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(21) 配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、

配列番号42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、配列番号42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがアルギニンに置換されている、

(20) 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(22) 配列番号59のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有する、(20)記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(23) 配列番号54、55若しくは56のアミノ酸配列又は配列番号54、55若しくは56のアミノ酸配列と95%以上の同一性のア

ミノ酸配列からなる軽鎖可変領域並びに

配列番号 57 若しくは 58 のアミノ酸配列又は

配列番号 57 若しくは 58 のアミノ酸配列と 95 % 以上の同一性のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域；

を含む、(14) 記載のヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(24) 1) 配列番号 54 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 57 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

2) 配列番号 55 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 57 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

3) 配列番号 56 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 57 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

4) 配列番号 54 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 58 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

5) 配列番号 55 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 58 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

6) 配列番号 56 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 58 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい、

A) 配列番号 54、55 又は 56 のアミノ酸配列の 25 番目のセリンがトレオニンに置換；

B) 配列番号 54、55 又は 56 のアミノ酸配列の 26 番目のセリンがトレオニンに置換；

C) 配列番号 54、55 又は 56 のアミノ酸配列の 28 番目のセリンがトレオニンに置換；

D) 配列番号 54、55 又は 56 のアミノ酸配列の 95 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；

E) 配列番号 57 又は 58 のアミノ酸配列の 31 番目のトレオニンがセリンに置換；

F) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 3 番目のアラニンがバリンに置換；

G) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 7 番目のリジンがアルギニンに置換；

H) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 9 9 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 1 0 5 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換、

(1 4) 又は (2 3) 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(2 5) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい、

A) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 5 番目のセリンがトレオニンに置換；

B) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 6 番目のセリンがトレオニンに置換；

C) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 8 番目のセリンがトレオニンに置換；

D) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 9 5 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；

E) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 3 1 番目のトレオニンがセリンに置換；

F) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 3 番目のアラニンがバリンに置換；

G) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 7 番目のリジンがアルギニンに置換；

H) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 9 9 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 1 0 5 番目のチロシンがフェニルアラニ

ンに置換、

(24) 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(26) さらに、配列番号52のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域、及び、

配列番号53のアミノ酸配列を有する重鎖定常領域を有し、

配列番号53のC末端にリジンが付加していてもしていなくてもよい、(14)～(25)のいずれかに記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

(27) (1)～(26)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

(28) CCR8とCCR8リガンドのいずれかとの結合を阻害するために用いる、(1)～(26)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

(29) 中和抗体として用いる、(1)～(26)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

(30) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するために用いる、(1)～(26)のいずれかに記載のCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

(31) CCR8とCCR8リガンドのいずれかとの結合を阻害するために用いる、(30)記載の医薬組成物。

(32) 抗体がADCC活性を有するものである、(27)～(31)のいずれかに記載の医薬組成物。

(33) 抗体がIgG抗体である、(27)～(31)のいずれかに記載の医薬組成物。

(34) 癌を治療するために用いる、(27)～(33)のいずれかに記載の医薬組成物。

(35) (7)～(18)のいずれかに記載の抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

(36) (35) 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[0014] (51) (7) ~ (19) のいずれかに記載の抗体が認識する抗原上の部位を認識する、CCR8 に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(52) 中和抗体である、(51) 記載の抗体又はその抗体断片。

(53) ヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片である、(51) 又は(52) 記載の抗体又は抗体断片。

[0015] (54) ヒトCCR8 に対し中和活性を有し、ヒトCCR8 への結合に関して、(7) ~ (26) のいずれかに記載の抗体と競合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(55) ヒトCCR8 に対し中和活性を有し、ヒトCCR8 への結合に関して、配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体と競合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(56) 配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体のエピトープと完全に又は部分的に同じエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(57) ヒトCCR8 に対し中和活性を有し、ヒトCCR8 への結合に関して、配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、配列番号42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換され、配列番号42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがアルギニンに置換されている抗体と競合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

(58) 配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、配列番号42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換され、配列番号42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがアルギニンに置換されている抗体のエピトープと完全に又は部分的に同じエピトープを認識するモノクローナル抗

体又はその抗体断片。

(59) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識する抗体又はその抗体断片である、(54)～(58)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又は抗体断片。

(60) さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の94位から107位の中の1以上のアミノ酸を認識する、(59)記載の抗体又はその抗体断片。

(61) さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の172位から202位の中の1以上のアミノ酸を認識する、(59)又は(60)記載の抗体又はその抗体断片。

(62) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の20位のイソロイシン、22位のセリン、35位のリジン、181位のロイシン、183位のシステイン及び188位のアスパラギンのうち、1以上のアミノ酸を認識する、(59)～(61)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。

(63) ヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片である、(54)～(62)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又は抗体断片。

(64) 上記(54)～(63)のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

[0016] (71) ヒトCCR8遺伝子を抗原として作製した抗体産生ハイブリドーマが産生する、(1)～(5)又は(7)～(13)のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。

[0017] (81) ヒトCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片（以下の抗体を除く）であって、配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するモノクローナル抗体又は抗体断片。

a) WO2007/044756に記載された、414B、414C、414E、433H、459M、464A、464B、433B及び455ALで示される抗CCR8抗体。

b) Quらの論文(J. Exp. Med., (2004), 200(10), 1231-1241)に記載され

た、3 B 1 0、2 D 1 0及び5 B 1 1で示される抗CCR8抗体。

c) BioLegend社の品番L 2 6 3 G 8の抗CCR8抗体。

d) R & D社の品番1 9 1 7 0 4の抗CCR8抗体。

[0018] (91) (1) ~ (26) のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を用いることを特徴とする、CCR8とCCR8リガンドのいずれかとの結合を阻害する方法。

(92) (1) ~ (26) のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を投与することを特徴とする、癌の治療方法。

(93) (7) ~ (26) のいずれかに記載のCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を用いる、配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識する方法。

(94) CCR8とCCR8リガンドのいずれかとの結合を阻害する薬剤を製造するための、(1) ~ (26) のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片の使用。

(95) 癌の治療剤を製造するための、(1) ~ (26) のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片の使用。

(96) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識する薬剤を製造するための、(1) ~ (26) のいずれかに記載のCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片の使用。

(97) CCR8とCCR8リガンドのいずれかとの結合を阻害するために用いる、(1) ~ (26) のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。

(98) 癌を治療するために用いる、(1) ~ (26) のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。

(99) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するために用いる、(1) ~ (26) のいずれかに記載のCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

発明の効果

[0019] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、ヒトCCR8に特異的

に結合するので、生体試料においてヒトCCR8を検出するために使用することができる。さらに、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、ヒトCCR8を選択的に阻害する活性を有するので、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を含む医薬組成物は、医薬品、特に、ヒトCCR8関連疾患の治療又は予防のための医薬として非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]ヒトCCR8、ヒトCCR4及びヒトCCR8の細胞外ドメインに相当するN末領域、loop1領域、loop2領域又はloop3領域を、それぞれ対応するヒトCCR4のN末領域、loop1領域、loop2領域又はloop3領域に置換した各キメラ体のアミノ酸配列比較。

[図2]10A11、27G1、1H4、19D7、8F7及び2C7の軽鎖可変領域のKabat numbering及びアライメント結果。

[図3]10A11、27G1、1H4、19D7、8F7及び2C7の重鎖可変領域のKabat numbering及びアライメント結果。

[図4]10A11の軽鎖可変領域、IGKV4-1、IGKV3-20、IGKV1-39、IGKV2-40、IGKV2-28及びIGKV1-16のKabat numbering及びアライメント結果。

[図5]10A11の重鎖可変領域、IGHV3-15 T94R及びIGHV3-73のKabat numbering及びアライメント結果。

[図6]19D7の軽鎖可変領域、IGKV3-15、IGKV2-18及びIGKV3-20のKabat numbering及びアライメント結果。

[図7]19D7の重鎖可変領域、IGHV3-15 T94R及びIGHV3-73のKabat numbering及びアライメント結果。

[図8]大腸癌由来CT26細胞を移植したヒトCCR8ノックインマウスにおいて、抗ヒトCCR8抗体の抗腫瘍活性を移植後の腫瘍体積を測定することにより評価した。有意水準**はWelch's t testにより $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

発明を実施するための形態

[0021] 本明細書において使用される用語は、特に言及する場合を除いて、当該分野で通常用いられる意味で用いられる。

[0022] 本発明においては、当該分野で公知の抗体作製手法が利用可能である。例えば、Immunochemistry in Practice (Blackwell Scientific Publications) に記載された方法等が挙げられる。

また、当該分野で公知の遺伝子操作的手法が利用可能である。例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Forth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)、Current Protocols Essential Laboratory Techniques, Current Protocols (2012) に記載された方法等が挙げられる。

[0023] ヒトCCR8のアミノ酸配列は、UniProtKB/Swiss-Prot: P51685 に示されている（配列番号1）。ヒトCCR8の膜外ドメインは、1～35位アミノ酸からなるN末領域、94～107位アミノ酸からなるloop1領域、172～202位アミノ酸からなるloop2領域、264～280位アミノ酸からなるloop3領域が該当する。ヒトCCR8のアミノ酸配列における17位はチロシンであり、マウスCCR8のアミノ酸配列においては、17位は欠損している。本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、実施例3の表2に示すように、マウスCCR8には結合活性を有さない。

[0024] マウスCCR8に対するモノクローナル抗体として、BioLegend社から、抗体SA214G2が販売されている。当該抗体はマウスCCR8の中和活性を有している。本発明者らは、当該抗体がヒトCCR8には結合活性を示さず、ヒトCCR8のアミノ酸配列における17位のチロシンを認識しないことを確認した。また、当該抗体は、マウスCCR8のアミノ酸配列における27位のフェニルアラニンを認識しており、当該アミノ酸が、マウ

スCCR8に対する中和活性の発現に関する重要なアミノ酸であることを確認した。マウスCCR8のアミノ酸配列における27位のアミノ酸は、アライメント上、ヒトCCR8のアミノ酸配列における29位のアミノ酸に相当する。ヒトCCR8のアミノ酸配列における29位のアミノ酸はロイシンである。この違いにより、マウスCCR8に対する中和活性を有するモノクローナル抗体は、ヒトCCR8には結合活性を示さないと考えられる。

[0025] 本発明の抗CCR8抗体を産生するハイブリドーマは、ヒトCCR8タンパク質、ヒトCCR8の全長をコードする遺伝子、ヒトCCR8発現細胞等を免疫原として作製することができる。ヒトCCR8の全長をコードする遺伝子を免疫原とする場合は、例えば、該遺伝子を抗原としてDNA免疫したマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を融合させることにより、抗CCR8抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

[0026] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片の一つの態様としては、本明細書記載のCDR又は重鎖可変領域／軽鎖可変領域を有するモノクローナル抗体又は該抗体の断片が挙げられる。該抗体又は抗体断片は、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD若しくはIgA。好ましくは、IgG。）又はサブクラス由来であり得、例えば、マウス、ラット、サメ、ウサギ、ブタ、ハムスター、ラクダ、ラマ、ヤギ又はヒトを含む任意の種から取得されてもよい。該抗体又は抗体断片として、好ましくは、ヒト化モノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体の抗体断片である。

[0027] 本明細書中、エピトープは、その抗原を標的とする抗体によって結合される抗原の領域を意味し、抗原がタンパク質である場合、抗体に直接接触する特定のアミノ酸を含む。本発明には、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と完全に同じエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片のみならず、部分的に同じエピトープを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片も包含される。

[0028] 本発明のモノクローナル抗体又はその断片は、ヒトCCR8のアミノ酸配

列における17位のチロシンを認識する、ヒトCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片である。

さらに、上記のモノクローナル抗体又はその抗体断片のうち、以下のモノクローナル抗体又はその抗体断片が好ましい。

ヒトCCR8のloop1に該当する、該アミノ酸配列の94位から107位の中の一以上のアミノ酸を認識するヒトCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

ヒトCCR8のloop2に該当する、該アミノ酸配列の172位から202位の中の一以上のアミノ酸を認識するヒトCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

ヒトCCR8のアミノ酸配列の20位のイソロイシン、22位のセリン、35位のリジン、181位のロイシン、183位のシステイン及び188位のアスパラギンのうち、1以上のアミノ酸を認識するヒトCCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

ここで、上記の好ましい場合において、上記に示したエピトープのうち、任意に選択される複数のエピトープを認識していてもよい。また、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片が、ヒトCCR8のアミノ酸配列における上記アミノ酸以外のアミノ酸をさらに認識していてもよい。

[0029] 本発明のモノクローナル抗体は、ヒトCCR8のアミノ酸配列における17位のチロシンを認識するものであれば、特に限定されないが、一つの態様として、本発明のモノクローナル抗体のCDR配列は、好ましくは、以下の配列を有している。

- (1) 軽鎖CDR1：配列番号2、14又は20。
- (2) 軽鎖CDR2：配列番号3、9、15又は21。
- (3) 軽鎖CDR3：配列番号4、10、16又は22。
- (4) 重鎖CDR1：配列番号5、8、12、17又は23。
- (5) 重鎖CDR2：配列番号6、18又は24。
- (6) 重鎖CDR3：配列番号7、11、13、19又は25。

さらに好ましくは、以下の配列を有している。

- (1) 軽鎖CDR1：配列番号2。
- (2) 軽鎖CDR2：配列番号3又は9。
- (3) 軽鎖CDR3：配列番号4又は10。
- (4) 重鎖CDR1：配列番号5、8又は12。
- (5) 重鎖CDR2：配列番号6。
- (6) 重鎖CDR3：配列番号7、11又は13。

最も好ましくは、以下の配列を有している。

- (1) 軽鎖CDR1：配列番号2。
- (2) 軽鎖CDR2：配列番号3。
- (3) 軽鎖CDR3：配列番号4。
- (4) 重鎖CDR1：配列番号5。
- (5) 重鎖CDR2：配列番号6。
- (6) 重鎖CDR3：配列番号7。

また、上記の各アミノ酸配列（配列番号2～25）において、1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよい。

ここで、本発明のモノクローナル抗体におけるCDR配列中のアスパラギンはグルタミン又はリジンに、アスパラギン酸はグルタミン酸に、ロイシはソイソロイシンに、チロシンはフェニルアラニンに、セリンはトレオニンに、及び、グリシンはグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換されていてもよい。

好ましくは、以下のいずれかの置換を1以上有していても良い、

- A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換。
- B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換。
- C) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換。
- D) 配列番号3のアミノ酸配列の5番目のロイシンがイソロイシンに置換。

- E) 配列番号4のアミノ酸配列の4番目のロイシンがイソロイシンに置換。
- F) 配列番号4のアミノ酸配列の6番目のチロシンがフェニルアラニンに置換。
- G) 配列番号6のアミノ酸配列の16番目のセリンがトレオニンに置換。
- H) 配列番号6のアミノ酸配列の19番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換。

より好ましくは、以下のいずれかの置換を1以上有していても良い。

- A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換。
- B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換。
- C) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換。

さらに好ましくは、配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、

さらに、以下のいずれか一つの置換を有していても良い。

- A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換；
- B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換。

また、本発明のモノクローナル抗体が以下の配列を有している場合、

- (1) 軽鎖CDR1：配列番号2。
- (2) 軽鎖CDR2：配列番号9。
- (3) 軽鎖CDR3：配列番号10。
- (4) 重鎖CDR1：配列番号8。
- (5) 重鎖CDR2：配列番号6。
- (6) 重鎖CDR3：配列番号11。

以下のいずれかの置換を1以上有していてもよい、

- A) 配列番号2のアミノ酸配列の2番目のセリンがトレオニンに置換。
- B) 配列番号2のアミノ酸配列の3番目のセリンがトレオニンに置換。

- C) 配列番号2のアミノ酸配列の5番目のセリンがトレオニンに置換。
- D) 配列番号10のアミノ酸配列の2番目のグルタミンがアスパラギンに置換。
- E) 配列番号8のアミノ酸配列の1番目のトレオニンがセリンに置換。
- F) 配列番号6のアミノ酸配列の14番目のアラニンがバリンに置換。
- G) 配列番号6のアミノ酸配列の18番目のリジンがアルギニンに置換。
- H) 配列番号6のアミノ酸配列の19番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換。
- I) 配列番号11のアミノ酸配列の5番目のアスパラギンがグルタミンに置換。
- J) 配列番号11のアミノ酸配列の12番目のチロシンがフェニルアラニンに置換。

[0030] 本発明において「モノクローナル抗体の抗体断片」とは、本発明のモノクローナル抗体の一部であって、当該モノクローナル抗体と同様にヒトCCR8に特異的に結合し、ヒトCCR8を選択的に阻害する断片を意味する。本発明のモノクローナル抗体の抗体断片は、ヒトCCR8のアミノ酸配列における17位のチロシンを認識する。

[0031] 具体的には、ヒトCCR8に対して特異的に結合するFab (fragment of antigen binding)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (single chain Fv; 以下、scFvと表記する)、ジスルフィド安定化抗体 (disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと表記する)、2量体V領域断片 (以下、Diabodyと表記する)、CDRを含むペプチド等を挙げることができる (エキスパート・オピニオン・オン・テラピューティック・パテント、第6巻、第5号、第441～456頁、1996年)。

[0032] Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合 (S-S結合) の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られる、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成される、分子量約5万の

抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明で使用される F a b は、本発明のモノクローナル抗体をパパイン処理して得ることができる。また、本発明のモノクローナル抗体の F a b をコードする D N A を細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを細胞へ導入することにより発現させることによって F a b を製造することができる。

[0033] F a b' は、F (a b')₂ のヒンジ間の S - S 結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明で使用される F a b' は、本発明のモノクローナル抗体の F (a b')₂ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。また、本発明のモノクローナル抗体の F a b' をコードする D N A を細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを大腸菌、酵母又は動物細胞へ導入することにより発現させることによって F a b' を製造することができる。

[0034] F (a b')₂ は、I g G のヒンジ領域の 2 個の S - S 結合の下部を酵素ペプシンで分解して得られる、2 つの F a b' 領域がヒンジ部分で結合して構成される、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明で使用される F (a b')₂ は、本発明のモノクローナル抗体をペプシン処理して得ることができる。また、本発明のモノクローナル抗体の F (a b')₂ をコードする D N A を細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを大腸菌、酵母又は動物細胞へ導入することにより発現させることによって F (a b')₂ を製造することができる。

[0035] s c F v は、一本の V H と一本の V L とを適当なペプチドリンカー（以下、P と表記する）を用いて連結した、V H - P - V L 又は V L - P - V H ポリペプチドであり、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明で使用される s c F v に含まれる V H 及び V L は、本発明のモノクローナル抗体のものであればよい。本発明で使用される s c F v は、本発明のモノクローナル抗体の V H 及び V L をコードする c D N A を用いて、s c F v 発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母又は動物細胞へ導入することにより発現させることによって製造することができる。

- [0036] $d s F v$ は、 $V H$ 及び $V L$ 中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを $S-S$ 結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は $R e i t e r$ らにより示された方法 ($P r o t e i n E n g i n e e r i n g$ 、7、697 (1994)) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用される $d s F v$ に含まれる $V H$ 又は $V L$ は、本発明のモノクローナル抗体のものであればよい。本発明で使用される $d s F v$ は、本発明のモノクローナル抗体の $V H$ 及び $V L$ をコードする $c D N A$ を用いて、適当な発現ベクターに挿入して $d s F v$ 発現ベクターを構築し、該発現ベクターを大腸菌、酵母又は動物細胞へ導入し、発現させることによって製造することができる。
- [0037] $D i a b o d y$ は、抗原結合特異性が同じ又は異なる $s c F v$ が2量体を形成した抗体断片であり、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性又は異なる抗原に対する2種類の特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。例えば、本発明のモノクローナル抗体に特異的に反応する2価の $D i a b o d y$ は、本発明のモノクローナル抗体の $V H$ 及び $V L$ をコードする $c D N A$ を用いて、3～10残基のペプチドリンカーを有する $s c F v$ をコードする $D N A$ を構築し、該 $D N A$ を細胞用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母又は動物細胞へ導入することにより $D i a b o d y$ を発現させることによって製造することができる。
- [0038] $C D R$ を含むペプチドは、 $V H$ 又は $V L$ の $C D R$ の少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数の $C D R$ は、直接又は適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明で使用される $C D R$ を含むペプチドは、本発明のモノクローナル抗体の $V H$ 及び $V L$ をコードする $c D N A$ を用いて、 $C D R$ をコードする $D N A$ を構築し、該 $D N A$ を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを大腸菌、酵母又は動物細胞へ導入することにより発現させることにより、製造することができる。また、 $C D R$ を含むペプチドは、 $F m o c$ 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、 $t B o c$ 法（ t -ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造すること

もできる。

[0039] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、ヒトCCR8に結合することが特徴である。特に、特異的に結合するものが好ましい。

[0040] 特異的結合は、少なくとも約 1×10^{-6} M又はそれ未満の平衡解離定数（例えば、 K_d が小さいほど、より緊密な結合を表す）を特徴とすることができる。 K_d 値は、好ましくは 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、さらに好ましくは 1×10^{-9} M以下である。2つの分子が特異的に結合するかどうかを測定する方法は、当該技術分野で周知であり、競合ELISA法、表面プラズモン共鳴及び同様のものが挙げられる。

[0041] 本発明は、ヒトCCR8への結合に関して、本明細書中に記載されているモノクローナル抗体又はその抗体断片と競合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を含む。

「競合するモノクローナル抗体又はその抗体断片」は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片（好ましくは、本願明細書の実施例記載の抗体。特に好ましくは、10A11。例えば、配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、配列番号42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換され、配列番号42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがアルギニンに置換されている抗体。）のヒトCCR8への特異的結合を阻害する抗体又はその抗体断片を意味する。あるモノクローナル抗体又はその抗体断片が本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と競合するかどうかを決定する。Isotype control抗体の共存下、抗原（ヒトCCR8）との結合が確認できた抗体のうち、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片の共存下では結合シグナルが顕著に低下する抗体を、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と競合する抗体として同定することができる。該結合シグナルの低下は、好ましくは50%、より好ましくは70%である。また、本発明のモノクロ

ーナル抗体又はその抗体断片と競合する抗体の、該本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と抗原との結合に対する K_i 値は、好ましくは 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、さらに好ましくは 1×10^{-9} M以下である。

このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と競合する抗体のヒトCCR8の中和活性は、好ましくはIC50値が10nM以下である。

[0042] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、CCR8とCCR8リガンドのいずれかとの結合を阻害することが特徴である。「CCR8リガンド」とは、CCL1、CCL8、CCL18など、CCR8に結合する物質であれば特に限られないが、好ましくは、CCL1、CCL18であり、特に好ましくはCCL1である。

CCR8とCCR8リガンドの結合阻害能については、例えば、ヒトCCL1の場合、ヒトCCR8発現293細胞を用い、ヒトCCL1添加による Ca^{2+} 流入を測定し、ヒトCCL1非添加時のシグナルを阻害率100%、ヒトCCL1添加及び抗体非添加時のシグナルを阻害率0%として、IC50値を計算することにより決定することができる。他のCCR8リガンドの結合阻害能についても、上記ヒトCCL1の場合と同様に、決定することができる。

[0043] ヒトCCL1は、UniProtKB/Swiss-Prot No. P22362などに示されるアミノ酸配列を有する。ヒトCCL8は、GenBank No. AA126243.1などに示されるアミノ酸配列を有する。ヒトCCL18は、GenBank No. EAW80102.1などに示されるアミノ酸配列を有する。

[0044] 本発明のモノクローナル抗体は、本明細書記載のCDR又は重鎖可変領域／軽鎖可変領域を用いて当該技術分野の定法によって作製することができる。

[0045] 本発明のモノクローナル抗体は、キメラ、ヒト化、完全ヒト、抗体低分子

複合体（ADC）及び二重特異的抗体も含む。

ヒト化モノクローナル抗体はヒト体内における抗原性が低下しているため、治療目的等でヒトに投与する場合に有用である。ヒト化モノクローナル抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR； complementarity determining region）をヒト抗体のフレームワーク領域（FR； framework region）へ移植したものである。従って、ヒト化モノクローナル抗体のFRは、ヒト由来のものである。適当なFRは、Kabata E. A. らの文献を参照すれば選択できる。この場合のFRとしては、CDRが良好な抗原結合部位を形成することができるものが選択される。必要に応じ、再構成したヒト化モノクローナル抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域のFRのアミノ酸を置換してもよい（Sato、K. ら、Cancer Res. 1993年、第53巻、851ページ）。置換されるFRのアミノ酸の割合は、全FR領域の0～15%、好ましくは0～5%である。

[0046] 本発明のヒト化モノクローナル抗体は、好ましくは、配列番号40、42、43、44、45若しくは47のアミノ酸配列又は配列番号40、42、43、44、45若しくは47のアミノ酸配列と95%以上の同一性のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域並びに配列番号41若しくは46のアミノ酸配列又は配列番号41若しくは46のアミノ酸配列と95%以上の同一性のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む。

より好ましくは、

- 1) 配列番号40のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 2) 配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
- 3) 配列番号43のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

4) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

5) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

6) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

7) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

8) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

9) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

1 0) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

1 1) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；若しくは

1 2) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、

以下のいずれかの置換を 1 以上有していても良い。

A) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 3 3 番目のアスパラギンがリジンに置換。

B) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換。

C) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換。

D) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の59番目のロイシンがイソロイシンに置換。

E) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の97番目のロイシンがイソロイシンに置換。

F) 配列番号40、42、43、44、45又は47のアミノ酸配列の99番目のチロシンがフェニルアラニンに置換。

G) 配列番号41又は46のアミノ酸配列の65番目のセリンがトレオニンに置換。

H) 配列番号41又は46のアミノ酸配列の68番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換。

さらに好ましくは、

1) 配列番号40のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；若しくは

2) 配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、

以下のいずれかの置換を1以上有していてもよい。

A) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換。

B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換。

C) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換。

D) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の59番目のロイシンがイソロイシンに置換。

E) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の97番目のロイシンがイソロイシンに置換。

F) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の99番目のチロシンがフェニル

アラニンに置換。

G) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列の 6 5 番目のセリンがトレオニンに置換。

H) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換。

特に好ましくは、

1) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；若しくは

2) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、

以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい。

A) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 3 3 番目のアスパラギンがリジンに置換。

B) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換。

C) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換。

最も好ましくは、

1) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；若しくは

2) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、

配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、

さらに、以下のいずれか一つの置換を有していても良い。

A) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 3 3 番目のアスパラギンがリジンに置換。

B) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換。

配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、配列番号 4 2 のアミノ酸配列の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、配列番号 4 2 のアミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがアルギニンに置換されているヒト化モノクローナル抗体が最も好ましい。

[0047] 本発明のヒト化モノクローナル抗体における軽鎖可変領域及び重鎖可変領域の配列としては、例えば、表 1 の組合せが挙げられる。

[表1]

組合せ	軽鎖可変領域 配列番号	置換の種類	重鎖可変領域 配列番号	置換の種類
1	4 2	C	4 1	なし
2	4 2	C + A	4 1	なし
3	4 2	C + A	4 1	H
4	4 2	C + B 5	4 1	なし
5	4 2	C + B 5	4 1	H
6	4 2	C + B 6	4 1	なし
7	4 2	C + B 6	4 1	H
8	4 0	C	4 1	なし
9	4 0	C + A	4 1	なし
1 0	4 0	C + A	4 1	H
1 1	4 0	C + B 5	4 1	なし
1 2	4 0	C + B 5	4 1	H
1 3	4 0	C + B 6	4 1	なし
1 4	4 0	C + B 6	4 1	H
1 5	4 2	D	4 1	なし
1 6	4 2	E	4 1	なし
1 7	4 2	F	4 1	なし
1 8	4 2	B 1	4 1	なし
1 9	4 2	B 6	4 1	なし
2 0	4 2	B 2 + C	4 1	なし
2 1	4 2	B 3 + C + D	4 1	なし
2 2	4 2	なし	4 1	H
2 3	4 2	C	4 1	H
2 4	4 2	なし	4 1	G + H
2 5	4 2	A	4 1	G + H
2 6	4 0	D	4 1	なし
2 7	4 0	E	4 1	なし
2 8	4 0	F	4 1	なし
2 9	4 0	B 4	4 1	なし
3 0	4 0	B 5	4 1	なし
3 1	4 0	なし	4 1	H
3 2	4 0	A	4 1	H

ここで、上記表 1 の「置換の種類」における各記号は、それぞれ以下の置換を意味する。

(1) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

A) アミノ酸配列の 3 3 番目のアスパラギンがリジンに置換。

B 1) アミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがグルタミンに置換。

B 2) アミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがトレオニンに置換。

B 3) アミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがアラニンに置換。

B 4) アミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがリジンに置換。

B 5) アミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがロイシンに置換。

B 6) アミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがアルギニンに置換。

C) アミノ酸配列の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換。

D) アミノ酸配列の 5 9 番目のロイシンがイソロイシンに置換。

E) アミノ酸配列の 9 7 番目のロイシンがイソロイシンに置換。

F) アミノ酸配列の 9 9 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換。

(2) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

G) アミノ酸配列の 6 5 番目のセリンがトレオニンに置換。

H) アミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換。

[0048] 本発明のヒト化モノクローナル抗体の別の態様としては、

配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 若しくは 4 7 のアミノ酸配列又は
配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 若しくは 4 7 のアミノ酸配列と 9 5
%以上の同一性のアミノ酸配列からなり、当該アミノ酸配列の 2 6 番目はセ
リン、2 7 番目はリジン、3 0 番目はロイシン及び 9 8 番目はグルタミン酸
である軽鎖可変領域並びに

配列番号 4 1 若しくは 4 6 のアミノ酸配列又は

配列番号 4 1 若しくは 4 6 のアミノ酸配列と 9 5 %以上の同一性のアミノ酸
配列からなり、当該アミノ酸配列の 3 3 番目はアラニン、3 5 番目はチロシ
ン、5 2 番目はアルギニン、5 6 番目はアスパラギン、6 2 番目はチロシン
、1 0 2 番目はアルギニン、1 0 3 番目はフェニルアラニン、1 0 4 番目は
チロシン、1 0 9 番目はグリシン及び 1 1 3 番目はアスパラギン酸である重
鎖可変領域を含む。

より好ましくは、

配列番号 4 0 若しくは 4 2 のアミノ酸配列又は

配列番号 4 0 若しくは 4 2 のアミノ酸配列と 9 5 %以上の同一性のアミノ酸

配列からなり、当該アミノ酸配列の２６番目はセリン、２７番目はリジン、３０番目はロイシン及び９８番目はグルタミン酸である軽鎖可変領域並びに配列番号４１若しくは４６のアミノ酸配列又は配列番号４１若しくは４６のアミノ酸配列と９５％以上の同一性のアミノ酸配列からなり、当該アミノ酸配列の３３番目はアラニン、３５番目はチロシン、５２番目はアルギニン、５６番目はアスパラギン、６２番目はチロシン、１０２番目はアルギニン、１０３番目はフェニルアラニン、１０４番目はチロシン、１０９番目はグリシン及び１１３番目はアスパラギン酸である重鎖可変領域を含む。

さらに好ましくは、

配列番号４２のアミノ酸配列若しくは配列番号４２のアミノ酸配列と９５％以上の同一性のアミノ酸配列からなり、当該アミノ酸配列の２６番目はセリン、２７番目はリジン、３０番目はロイシン及び９８番目はグルタミン酸である軽鎖可変領域並びに配列番号４１若しくは４６のアミノ酸配列若しくは配列番号４１若しくは４６のアミノ酸配列と９５％以上の同一性のアミノ酸配列からなり、当該アミノ酸配列の３３番目はアラニン、３５番目はチロシン、５２番目はアルギニン、５６番目はアスパラギン、６２番目はチロシン、１０２番目はアルギニン、１０３番目はフェニルアラニン、１０４番目はチロシン、１０９番目はグリシン及び１１３番目はアスパラギン酸である重鎖可変領域を含む。

[0049] 本発明のヒト化モノクローナル抗体はまた、好ましくは、

配列番号５４、５５若しくは５６のアミノ酸配列又は配列番号５４、５５若しくは５６のアミノ酸配列と９５％以上の同一性のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域並びに配列番号５７若しくは５８のアミノ酸配列又は配列番号５７若しくは５８のアミノ酸配列と９５％以上の同一性のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む。

より好ましくは、

- 1) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
 - 2) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
 - 3) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
 - 4) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
 - 5) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
 - 6) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
- を含み、以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい、
- A) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 2 5 番目のセリンがトレオニンに置換；
 - B) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 2 6 番目のセリンがトレオニンに置換；
 - C) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 2 8 番目のセリンがトレオニンに置換；
 - D) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 9 5 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；
 - E) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 3 1 番目のトレオニンがセリンに置換；
 - F) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 3 番目のアラニンがバリンに置換；
 - G) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 7 番目のリジンがアルギニンに置換；

H) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 9 9 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 1 0 5 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換。

さらに好ましくは、

配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい、

A) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 5 番目のセリンがトレオニンに置換；

B) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 6 番目のセリンがトレオニンに置換；

C) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 8 番目のセリンがトレオニンに置換；

D) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 9 5 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；

E) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 3 1 番目のトレオニンがセリンに置換；

F) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 3 番目のアラニンがバリンに置換；

G) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 7 番目のリジンがアルギニンに置換；

H) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 9 9 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 1 0 5 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換。

[0050] なお、本発明のヒト化モノクローナル抗体には、ヒト抗体の定常領域が使用される。好ましいヒト抗体の定常領域としては、重鎖としては C γ が挙げられ、例えば、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4 を、軽鎖としては C κ 、C λ を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するた

めに、ヒト抗体のC領域を修飾してもよい。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等いかなるアイソタイプのヒト抗体でもよいが、本発明においてはIgGを用いることが好ましく、さらにIgG1又はIgG4が好ましい。

[0051] 本発明のヒト化モノクローナル抗体は、重鎖定常領域のC末端にリジンが付加していてもしていなくてもよい。好ましくは、配列番号52のアミノ酸配列の軽鎖定常領域及び配列番号53のアミノ酸配列の重鎖定常領域を有し、配列番号53のC末端にリジンが付加していてもしていなくてもよい。

[0052] ヒト化モノクローナル抗体は一般的な製造方法により作製することができる（例えば、WO95/14041号公報、WO96/02576号公報等参照）。具体的には、まずマウス抗体のCDRとヒト抗体のFRを連結するように設計した可変領域をコードするDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する（WO98/13388号公報参照）。得られたDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込む。又は、抗体の可変領域をコードするDNAを、抗体の定常領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。本発明で使用する抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー／プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

[0053] 上記の形質転換体の宿主細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞等の脊椎動物細胞、原核細胞、酵母等が挙げられる。形質転換体は、当業者に周知の方法に従って培養することができ、該培養により、形質転換体細胞内又は細胞外に本発明のモノクローナル抗体が産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、COS細胞の場合、RPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地（DMEM）等の培地に、必要に応じウシ胎児血清（FBS）等の血清成分を添加したものを使用できる。該形質転換体の

培養の際の培養温度は、細胞内のタンパク質合成能を著しく低下せしめない温度であればいずれでもよいが、好適には32～42℃、最も好適には37℃で培養することが好ましい。また必要に応じて、1～10%（v/v）の炭酸ガスを含む空气中で培養することができる。

[0054] 上記により形質転換体の細胞内又は細胞外に生産される本発明のモノクローナル抗体を含む画分は、該タンパク質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種公知の分離操作法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常のタンパク質沈澱剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種クロマトグラフィー、透析法、及びこれらの組み合わせ等を採用できる。該方法により、容易に高収率、高純度で本発明のモノクローナル抗体を製造できる。

[0055] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、さらに、ポリエチレングリコール（PEG）、放射性物質、トキシン等の各種分子により修飾されていてもよい。抗体の修飾方法はこの分野で公知の方法を利用することができる。

[0056] また本発明のモノクローナル抗体は、そのN末端あるいはC末端に他のタンパク質を融合してもよい（*Clinical Cancer Research*, 2004, 10, 1274-1281）。融合するタンパク質は当業者が適宜選択することができる。

[0057] 本発明のモノクローナル抗体には、抗体のFc領域にN-グリコシド結合糖鎖が結合している抗体が含まれる。なお、該N-グリコシド結合糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していなくてもよい。抗体のFc領域にN-グリコシド結合糖鎖が結合し、該N-グリコシド結合糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体としては、例えば $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞（国際公開第2005/035586号、国際公開第02/31140号

）を用いて作製される抗体が挙げられる。抗体のFc領域にN-グリコシド結合糖鎖が結合し、該N-グリコシド結合糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の抗体は、高いADCC活性を有する。

[0058] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、Treg細胞又はマクロファージ細胞を除去させる観点から、CCR8を発現する細胞に対してADCC (Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; 抗体依存性細胞介在性細胞傷害) 活性を有する抗体又はその抗体断片が好ましい。ADCC活性とは、生体内で、標的細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体のFc領域とエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、標的細胞等を傷害する活性を意味する。エフェクター細胞としては、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。なお、本発明においては、生体内で、Treg細胞又はマクロファージ細胞等の細胞表面抗原 (CCR8) に結合した抗体が、抗体のFc領域とエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、Treg細胞又はマクロファージ細胞等を傷害し、結果として腫瘍細胞等を傷害する場合も含む。

[0059] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、CCR8の中和抗体や中和抗体断片が好ましい。CCR8の中和抗体又は中和抗体断片とは、CCR8に対する中和活性を有する抗体又は抗体断片を意味する。CCR8に対する中和活性を有するか否かは、例えば、CCR8リガンドのいずれか (例えば、CCL1) のCCR8に対する生理作用を抑制するか否かを測定することにより判別できる。例としては、これらに限定されるものではないが、CCL1のCCR8への結合、あるいはCCL1によるCCR8発現細胞の遊走又は細胞内Ca²⁺増加又はCCL1刺激に感受性のある遺伝子の発現変動などを測定することが挙げられる。また、後述の実施例記載の方法にて測定することもできる。

本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片の、CCR8とCCL1の結合に対する中和活性は、あらかじめCa²⁺指示薬を取り込ませたヒトCCR8発現293細胞に対し、培地で希釈した抗体希釈液を添加して測定することができる。CCR8とCCR8リガンドの親和性は、CCL1が最も強く、CCL1に対して高い阻害活性を有する抗体が有用である。

本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片の中和活性は、IC50値が10nM以下であることが好ましい。中和活性は、より好ましくは、IC50値が5nM以下、さらに好ましくは2nM以下、特に好ましくは1nM以下、最も好ましくは0.5nM以下である。

[0060] ヒトCCR8を認識する抗CCR8抗体又はその抗体断片においては、ヒトCCR8を強く認識する抗体又はその抗体断片が好ましい。ヒトCCR8を強く認識する抗体又はその抗体断片を選択する際に、中和活性の強度を指標にして、抗体又はその抗体断片を選択することで、より強くヒトCCR8を認識する抗体又はその抗体断片を選択することができる。

[0061] ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンを認識する抗CCR8抗体又はその抗体断片は、CCR8とCCL1の結合を阻害し、中和活性を有する抗CCR8抗体又はその抗体断片として有用である。また、ヒトCCR8をより強く認識する抗体又はその抗体断片を選択するという点では、中和活性の高い抗体又はその抗体断片が好ましい。たとえば、以下のような抗体又はその抗体断片が好ましい。

ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンに加え、さらに、ヒトCCR8のloop1に該当する、該アミノ酸配列の94位から107位の中の一以上のアミノ酸及び／又はヒトCCR8のloop2に該当する、該アミノ酸配列の172位から202位の中の一以上のアミノ酸を認識する抗体又はその抗体断片がより好ましい。

また、ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンに加え、さらに、ヒトCCR8のアミノ酸配列の20位のイソロイシン、22位のセリン、35位のリジン、181位のロイシン、183位のシステイン及び188位の

アスパラギンのうち、1以上のアミノ酸を認識する抗CCR8抗体又はその抗体断片がより好ましい。

[0062] ヒトCCR8を認識する抗体として、以下の抗体が知られている。

a) WO2007/044756に記載された、414B、414C、414E、433H、459M、464A、464B、433B及び455ALで示される抗CCR8抗体。

b) Quらの論文 (J. Exp. Med., (2004), 200(10), 1231-1241) に記載された、3B10、2D10及び5B11で示される抗CCR8抗体。

c) BioLegend社の品番L263G8の抗CCR8抗体。

d) R&D社の品番191704の抗CCR8抗体。

a) の抗CCR8抗体については、WO2007/044756において、エピトープ解析によりヒトCCR8のアミノ酸配列の1位から39位と結合することが開示されている。しかし、詳細なエピトープ部位については全く解析も開示もされていない。

b) ~d) の抗CCR8抗体については、エピトープ部位については全く開示されていない。すなわち、ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片を、CCR8とCCR8リガンド（例えば、CCL1）の結合を阻害するために用いることができることは、いずれの文献にも開示も示唆もされていない。

[0063] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、腫瘍内浸潤Treg細胞除去作用を有するものが好ましい。本発明のモノクローナル抗体が腫瘍内浸潤Treg細胞除去作用を有しているか否かは、例えば、特許文献2の実施例記載の方法にて測定することができる。

[0064] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、腫瘍内浸潤マクロファージ細胞除去作用を有するものが好ましい。本発明の抗体又はその抗体断片が腫瘍内浸潤マクロファージ細胞除去作用を有しているか否かは、例えば、特許文献2の実施例記載の方法にて測定することができる。

[0065] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、医薬組成物として有用

である。特に、ヒトCCR8のアミノ酸配列の17位のチロシンを認識するモノクローナル抗体又はその抗体断片は、医薬組成物として非常に有用である。したがって本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物は、経口的又は非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。非経口的投与としては、例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、鼻腔内投与、吸入などを選択することができる。

[0066] 本発明の医薬組成物は、CCR8関連疾患の治療及び／又は予防のための医薬として非常に有用である。特に、CCR8発現Treg細胞の腫瘍内浸潤が生じている癌を治療及び／又は予防するための医薬として非常に有用である。例えば、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃（胃腺）癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、膀胱癌、メラノーマ、大腸癌、腎癌、非ホジキンリンパ腫、尿路上皮癌、肉腫、血球癌（白血病、リンパ腫等）、胆管癌、胆のう癌、甲状腺癌、精巣癌、胸腺癌、肝臓癌等の癌、好ましくは乳癌、子宮体癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、腎癌及び肉腫、より好ましくは乳癌、大腸癌、腎癌及び肉腫を治療及び／又は予防するための医薬として非常に有用である。

[0067] 本発明の「癌治療用医薬組成物」における「癌」には、すべての固形癌及び血液癌が含まれる。具体的には、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃（胃腺）癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、膀胱癌、メラノーマ、大腸癌、腎癌、非ホジキンリンパ腫、尿路上皮癌、肉腫、血球癌（白血病、リンパ腫等）、胆管癌、胆のう癌、甲状腺癌、精巣癌、胸腺癌、肝臓癌等が挙げられる。好ましくは乳癌、子宮体癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、腎癌、肉腫が挙げられ、より好ましくは乳癌、肺癌、大腸癌、腎癌、肉腫が挙げられる。

また、本発明の「癌治療用医薬組成物」における「癌」は、腫瘍特異抗原を発現する癌が好ましい。

[0068] なお、本明細書記載の「癌」は、卵巣癌、胃癌等の上皮性の悪性腫瘍のみならず、慢性リンパ性白血病やホジキンリンパ腫等の造血器がんを含む非上

皮性の悪性腫瘍も意味するものとし、本明細書において、「がん (cancer)」、「癌 (carcinoma)」、「腫瘍 (tumor)」、「新生物 (neoplasm)」等の用語は互いに区別されず、相互に交換可能である。

- [0069] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、
- (1) 本発明の医薬組成物の治療効果の補完及び／又は増強、
 - (2) 本発明の医薬組成物の動態、吸収改善、投与量の低減及び／又は、
 - (3) 本発明の医薬組成物の副作用の軽減、
- のために他の薬剤と組み合わせて、併用剤として投与してもよい。
- [0070] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と他の薬剤の併用剤は、1つの製剤中に両成分を配合した配合剤の形態で投与してもよく、また別々の製剤にして投与する形態をとってもよい。この別々の製剤にして投与する場合には、同時投与及び時間差による投与が含まれる。また、時間差による投与は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を先に投与し、他の薬剤を後に投与してもよいし、他の薬剤を先に投与し、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を後に投与してもかまわず、それぞれの投与方法は同じでも異なってもよい。
- [0071] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片と併用してもよい他の薬剤としては、例えば抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体又は抗CTLA-4抗体が挙げられる。抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体が好ましく、抗PD-1抗体がより好ましい。
- [0072] 本発明において、抗PD-1抗体としては、例えば、ニボルマブ (Nivolumab)、ペムブロリズマブ (Pembrolizumab) が挙げられる。
- [0073] 本発明において、抗PD-L1抗体としては、例えば、アテゾリズマブ (Atezolizumab)、アベルマブ (Avelumab)、デュルバルマブ (Durvalumab) が挙げられる。
- [0074] 本発明において、抗CTLA-4抗体としては、例えば、イピリムマブ (

l p i l i m u m a b) が挙げられる。

- [0075] 本発明の医薬組成物の対象患者は癌患者であるか又はその疑いがあることが想定される。本発明の医薬組成物の有効投与量は、一回につき体重1 k gあたり0.01 m gから100 m gの範囲から選ばれる。あるいは、患者あたり5～5000 m g、好ましくは10～500 m gの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を含む医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。本発明の医薬組成物は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、カゼイン、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、ヒト血清アルブミン（H S A）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。
- [0076] 本発明は、本発明のモノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを包含する。本発明は、さらに、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを包含する。
- [0077] 該ポリヌクレオチドは、本発明のモノクローナル抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸（D N A）又はリボ核酸（R N A）等のヌクレオチドからなる重合体である。天然以外の塩基を含んでよい。本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により製造するために使用することができる。また本発明のモノクローナル抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングするために、プローブとして用いることもできる。即ち本発明のモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド、又はその一部をプローブとして用い、ハ

イブリダイゼーション、遺伝子増幅技術（例えばPCR）等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明のモノクローナル抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

[0078] ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）は当業者によく知られた技術である。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度等複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

[0079] これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明のモノクローナル抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のモノクローナル抗体には、本発明のモノクローナル抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも75%以上の同一性、好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献（Wilbur

, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)
) 記載のアルゴリズムに従えばよい。

[0080] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、CCR8に特異的に結合するため、生体試料においてCCR8を検出するために使用することができる。生体試料としては、血液、血漿、血清、尿、臓器、組織、骨髓、リンパ節等が挙げられる。そのため、本発明のモノクローナル抗体を含有するキットはCCR8検出用キットとして利用可能である。該キットは、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を含み、さらに、標識二次抗体、標識の検出に必要な基質、担体、洗浄バッファー、試料希釈液、酵素基質、反応停止液、精製された標準物質としてのCCR8タンパク質、使用説明書等を含んでいてもよい。

[0081] 本発明には、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片が認識する抗原上の部位を認識する、CCR8に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片も含まれる。すなわち、CCR8への結合において、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片に競合するモノクローナル抗体又はその抗体断片も本発明に含まれる。たとえば、実施例3のclone No. 10A11などの抗体や、本願明細書記載のCDR配列を軽鎖及び長鎖可変領域に有する抗体を用いて、競合実験を行うことにより、上記抗体を選択することができる。

実施例

[0082] 以下に本発明の実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

[0083] 実施例1：抗ヒトCCR8抗体産生マウスハイブリドーマの作製

ヒトCCR8 (UniProtKB/Swiss-Prot: P51685) の全長をコードする遺伝子を抗原とし、A/J Jms Slc 雌性マウスにDNA免疫した。DNA免疫は、2週間隔で2回又は3回繰り返し、最終免疫1週間後にヒトCCR8発現Exp i 293細胞を腹腔内投与することでブーストした。その3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞とマウスミエロ

ーマ細胞（p3×6363-Ag8.、東京腫瘍研究所）をPEG法を用いて融合させ、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地で選択した。抗ヒトCCR8抗体及び抗ヒトCCR8中和抗体はこの培養上清を用い、下記の方法により選抜した。

抗ヒトCCR8抗体は、培養上清をヒトCCR8発現Exp293細胞及びヒトCCR4発現Exp293細胞とそれぞれ反応させ、Alexa488標識抗マウスIgG抗体（サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製）で検出することにより、ヒトCCR8に対してのみ特異的に結合するクローンを選抜した。

抗ヒトCCR8中和抗体は、あらかじめCa²⁺指示薬を取り込ませたヒトCCR8発現293細胞に対して培養上清を十分に反応させたのちに、FLIPRにより200nM hCCL1（バイオレジェンド社製）添加によるCa²⁺流入を測定し、hCCL1刺激によるCa²⁺流入を阻害するクローンを選抜した。

特に強い中和活性を示すクローン（% inhibition>80%）と、中和活性をもたないクローンをそれぞれクローニングし、ハイブリドーマを樹立した。

[0084] 実施例2：抗ヒトCCR8抗体産生ラットハイブリドーマの作製

免疫原であるヒトCCR8発現Rat-1細胞は、pQCXIP（クロンテック社）に

ヒトCCR8遺伝子をクローニングした発現ベクターをRat-1細胞にトランスフェクションしたのちに、ピューロマイシン（1ug/ml）で一ヶ月間薬剤選択することにより作製した。

ヒトCCR8発現Rat-1細胞をラットに一回免疫し、約2週間後にリンパ節を回収して常法によりハイブリドーマを作製した。

抗ヒトCCR8抗体は、ハイブリドーマ培養上清をヒトCCR8発現293細胞と293細胞にそれぞれ反応させ、Alexa647標識抗ラットIgG抗体（サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製）で検出すること

で、ヒトCCR8に特異的に結合可能なクローンを選抜した。

[0085] 実施例3：抗ヒトCCR8中和抗体及び非中和抗体のエピトープ解析

実施例1で樹立した抗ヒトCCR8抗体産生ハイブリドーマについて、無血清培地培養上清からProtein G精製及び、ゲル濾過精製により、40種類のクローンの精製抗体を得た。得られた40種類のクローンのうち、27種類の中和抗体及び13種類の非中和抗体の精製抗体を用い、下記の方法で抗原結合試験を実施することにより、中和活性に重要なエピトープを同定した。各クローンの中和活性は実施例1記載の方法で100 nM hCCL1（バイオレジェンド社製）添加によるCa²⁺流入に対する阻害活性をFLIPRにより測定した。各中和抗体は、100 nM hCCL1刺激によるCa²⁺流入阻害活性のIC50値が2 nM以下であった。

ヒトCCR8（UniProtKB/Swiss-Prot:P51685 配列番号1）の全長をコードする遺伝子及びヒトCCR4（UniProtKB/Swiss-Prot:P51679 配列番号48）の全長をコードする遺伝子、マウスCCR8（UniProtKB/Swiss-Prot:P56484 配列番号39）の全長をコードする遺伝子をそれぞれpcDNA3.4ベクターにクローニングした。これをトランスフェクションすることで一過性にヒトCCR8、ヒトCCR4、マウスCCR8を発現させたExp293細胞を作製した。この細胞に各クローンの精製抗体の希釈系列を反応させ、Alexa488標識抗マウスIgG抗体（サーモフィッシュサイエンティフィック社製）で検出することにより、その結合性を評価した。その結果、いずれの抗体もヒトCCR8には結合するが、ヒトCCR4、マウスCCR8には全く結合しなかった。

そこで、ヒトCCR8の細胞外ドメインに相当するN末領域（配列番号1の1-35位アミノ酸）、loop1領域（配列番号1の94-107位アミノ酸）、loop2領域（配列番号1の172-202位アミノ酸）、loop3領域（配列番号1の264-280位アミノ酸）をそれに対応するヒトCCR4のN末領域（配列番号48の1-39位アミノ酸）、loop

1 領域（配列番号 48 の 98－111 位アミノ酸）、loop 2 領域（配列番号 48 の 176－206 位アミノ酸）、loop 3 領域（配列番号 48 の 268－284 位アミノ酸）に置換したキメラ体（図 1）を作製し、上述の方法と同様の方法により、各抗体の結合性を評価した。

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での結合を評価し、野生型のヒト CCR8（hCCR8）と比較して、結合活性が顕著に低下しているものを Δ 、結合が検出限界以下まで低下しているものを $\times$ で示した。空欄は、野生型のヒト CCR8（hCCR8）と同程度の結合活性を示すことを意味する。

その結果、表 2 に示すとおり、中和活性を有する抗体はいずれも N 末領域をヒト CCR4（N-ter hCCR4-hCCR8）に置換することでその結合活性は検出限界以下となり、N 末領域が中和活性発揮に重要なエピトープであることが明らかになった。さらに、loop 1 ヒト CCR4 置換ヒト CCR8、及び loop 2 ヒト CCR4 置換ヒト CCR8 に対しても結合活性が低下した。以上のことから、強い中和活性を有する抗 CCR8 抗体は N 末領域を強く認識し、かつ loop 1 及び loop 2 にも結合するような立体構造認識をしていると考えられる。

なお、ヒト CCR8、ヒト CCR4 及びマウス CCR8 のいずれも認識しない抗体をコントロールとして使用したが、コントロール抗体は各抗原とは結合しなかった。また、各抗原の N 末にタグを付与し、抗タグ抗体により検出することで、変異により hCCR8 の発現が低下しないことを確認した。

さらに、強い中和を有するすべてのクローンについて共通するエピトープ領域である N 末領域についてより詳細に解析すべく、表 2 に示すヒト CCR8 8 点変異体を作製した。上述の方法と同様の方法で、この変異体に対する各クローンの結合活性を評価した結果、上記の 27 種類の中和抗体は、いずれもヒト CCR8 の 17 位の Y を A に置換した変異体（hCCR8（Y17A））に対する結合活性が著しく低下し検出限界以下となったことから、17 位の Y を認識していると考えられる。また、表 2 には clone No. 8F7 が示し

ていないが、ヒトCCR8の20位のIをAに置換した変異体（hCCR8（I20A））に対する結合活性が低下している中和抗体も複数存在し、20位のイソロイシンにも結合するようなような立体構造認識をしている中和抗体も存在すると考えられる。

一方、上記の13種類の非中和抗体は、hCCR8（Y17A）に対する結合活性が低下しなかったことから、同じN末領域を認識しているが、17位のYは認識していないと考えられる。このことから、17位のYが中和活性発揮に極めて重要なアミノ酸であると考えられる。代表的な中和抗体（clone No. 10A11, 27G1, 1H4, 8F7, 2C7）及び非中和抗体（clone No. 5B5）についての結果を表2に示す。

[0086]

[表2]

clone No.	10A11	27G1	1H4	8F7	2C7	5B5*
中和活性 IC50 (nM)	0.08	0.09	0.32	1.56	0.40	>1000
hCCR8						
hCCR4	x	x	x	x	x	x
mCCR8	x	x	x	x	x	x
N-ter hCCR4-hCCR8	x	x	x	x	x	△
loop1 hCCR4-hCCR8	△	△	△	x	x	
loop2 hCCR4-hCCR8	△	△	△	△	△	
loop3 hCCR4-hCCR8						
hCCR8 (L5A)			△		△	
hCCR8 (D6A)						
hCCR8 (L7A)						
hCCR8 (S8A)						
hCCR8 (T10A)					△	
hCCR8 (T11A)			△			
hCCR8 (V12A)						
hCCR8 (T13A)						
hCCR8 (Y15A)						
hCCR8 (Y16A)						
hCCR8 (Y17A)	x	x	x	x	x	
hCCR8 (I20A)				△		
hCCR8 (S22A)					△	
hCCR8 (S23A)						
hCCR8 (L29A)						
hCCR8 (I30A)				△		
hCCR8 (Q31A)						
hCCR8 (T32A)						
hCCR8 (N33A)						
hCCR8 (G34A)						
hCCR8 (K35A)			x	△		

*: 非中和抗体

[0087] 実施例4：抗体配列の決定

樹立したクローンのうち、表3に示すマウス抗体及び表4に示すラット抗体について、ハイブリドーマ細胞より、常法に従って抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のアミノ酸配列を決定した。

[0088]

[表3]

mAb		配列 番号		配列 番号		配列 番号		配列 番号
10A11	軽鎖	26	CDR1	2	重鎖	27	CDR1	5
			CDR2	3			CDR2	6
			CDR3	4			CDR3	7
27G1	軽鎖	26	CDR1	2	重鎖	28	CDR1	8
			CDR2	3			CDR2	6
			CDR3	4			CDR3	7
1H4	軽鎖	29	CDR1	2	重鎖	30	CDR1	8
			CDR2	3			CDR2	6
			CDR3	4			CDR3	7
19D7	軽鎖	31	CDR1	2	重鎖	32	CDR1	8
			CDR2	9			CDR2	6
			CDR3	10			CDR3	11
8F7	軽鎖	33	CDR1	2	重鎖	34	CDR1	12
			CDR2	3			CDR2	6
			CDR3	10			CDR3	13
2C7	軽鎖	35	CDR1	14	重鎖	36	CDR1	17
			CDR2	15			CDR2	18
			CDR3	16			CDR3	19

[0089] [表4]

mAb		配列 番号		配列 番号		配列 番号		配列 番号
2-7B	軽鎖	37	CDR1	20	重鎖	38	CDR1	23
			CDR2	21			CDR2	24
			CDR3	22			CDR3	25

[0090] 実施例5：抗体配列のアライメント

実施例4に記載したマウスハイブリドーマ由来、抗ヒトCCR8中和抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列について抗体配列解析ソフトウェア *abYsis* を用いた *Kabat numbering* と、アライメントを実施した(図2、図3)。その結果、10A11、27G1、1H4、19D7、8F7のアミノ酸配列は以下に述べる通りCDRに類似した配列を含むものであった。

軽鎖のCDR1は、配列番号2の16アミノ酸から構成されていた。

軽鎖のCDR2は、R-Xaa1-S-N-L-A-S(ここで、Xaa

1 は、M又はVである：配列番号49)の7アミノ酸から構成されていた（配列番号3又は9）。

軽鎖のCDR3は、M-Q-H-L-E-Y-P-X a a 1-T（ここで、X a a 1は、L又はFである：配列番号50)の9アミノ酸から構成されていた（配列番号4又は10）。

重鎖のCDR1は、X a a 1-Y-A-X a a 2-Y（ここで、X a a 1は、T又はPであり、X a a 2はL又はMである：配列番号51)の5アミノ酸から構成されていた（配列番号5、8又は12）。

重鎖のCDR2は、配列番号6の19アミノ酸から構成されていた。

重鎖のCDR3は10A11、27G1、1H4が共通した配列を有し、配列番号7の14アミノ酸から構成されていた。

[0091] 実施例6：中和活性評価

樹立したハイブリドーマを無血清培地で培養し、その培養上清をP r o t e i n Gアフィニティー精製及びゲル濾過精製を行うことで、精製抗体を得た。この精製抗体について下記の方法で中和活性を測定した。

あらかじめC a ²⁺指示薬を取り込ませたヒトCCR8発現293細胞に対して培地で希釈した抗体希釈液を添加し、F L I P Rにより200 nM h C C L 1（バイオレジェンド社製）添加によるC a ²⁺流入を測定した。h C C L 1非添加時のシグナルを阻害率100%、h C C L 1添加及び抗体非添加時のシグナルを阻害率0%として阻害率を計算し、50%の阻害率を示す抗体濃度をI C 50とした。少なくとも3回評価を行い、I C 50をA v e r a g e ± S Dとして表記した。（表5）

[0092] [表5]

クローン	IC50 (nM)
10A11	0.23±0.10
27G1	0.27±0.06
1H4	0.36±0.10
19D7	0.18±0.06
8F7	3.03±0.91
2C7	1.19±0.64
2-7B	0.23±0.10

[0093] 実施例7：抗体のヒト化（10A11、2C7）

10A11、2C7について、下記の方法でヒト化を実施した。

抗体配列解析ソフト *abYsis* を用いて *Kabat numbering* 及び *CDR* の定義を実施した。マウス抗体アミノ酸配列の重鎖及び軽鎖の *V* 遺伝子領域配列に類似したヒト生殖系アクセプター配列を配列解析ソフト *Abasis* で検索し、選択した。また *J* 鎖領域については、マウス抗体 *DNA* 配列と相同性の高い配列を *IMGT* (<http://www.imgt.org/>) で検索しヒトフレームワーク配列とした。このヒトフレームワーク配列に対し、*Kabat numbering* (Wu, T. T. and Kabat, E. A., *J Exp. Med.* Aug 1; 132 (2) : 211-50. (1970)) によって定義されたマウス抗体重鎖 *CDR1*、*CDR2*、*CDR3* 及びマウス抗体軽鎖 *CDR1*、*CDR2*、*CDR3* を移植することでヒト化モノクローナル抗体配列を設計した（軽鎖；図4、重鎖；図5）。実施例6に示す方法により中和活性を測定した結果、表6に示すヒト化モノクローナル抗体が、マウス抗体と同等以上の親和性を示した。

[0094]

[表6]

mAb	軽鎖 配列番号	重鎖 配列番号	IC50 (nM)
h10A11 (IGKV3-20/IGHV3-15 T94R)	40	41	0.16±0.08
h10A11 (IGKV4-1/IGHV3-15 T94R)	42	41	0.15±0.10
h10A11 (IGKV1-39/IGHV3-15 T94R)	43	41	0.20±0.08
h10A11 (IGKV2-40/IGHV3-15 T94R)	44	41	0.30±0.12
h10A11 (IGKV1-16/IGHV3-15 T94R)	45	41	0.70±0.36
h10A11 (IGKV3-20/IGHV3-73)	40	46	0.22±0.07
h10A11 (IGKV4-1/IGHV3-73)	42	46	0.17±0.09
h10A11 (IGKV1-39/IGHV3-73)	43	46	0.16±0.08
h10A11 (IGKV2-40/IGHV3-73)	44	46	0.21±0.06
h10A11 (IGKV2-28/IGHV3-73)	47	46	0.20±0.05
h10A11 (IGKV1-16/IGHV3-73)	45	46	0.31±0.08
m10A11	26	27	0.23±0.10

[0095] 実施例 7-2 : 抗体のヒト化 (19D7)

19D7について、実施例 7 と同様の方法でヒト化を実施した（軽鎖；図 6、重鎖；図 7）。実施例 6 に示す方法により中和活性を測定した結果、表 7 に示すヒト化モノクローナル抗体が、マウス抗体と同等以上の親和性を示した。

[0096]

[表7]

mAb	軽鎖 配列番号	重鎖 配列番号	IC50 (nM)
h19D7 (IGKV3-15/IGHV3-15 T94R)	54	57	0.18±0.04
h19D7 (IGKV2-18/IGHV3-15 T94R)	55	57	0.27±0.05
h19D7 (IGKV3-20/IGHV3-15 T94R)	56	57	0.24±0.04
h19D7 (IGKV3-15/IGHV3-73)	54	58	0.27±0.06
h19D7 (IGKV2-18/IGHV3-73)	55	58	0.46±0.12
h19D7 (IGKV3-20/IGHV3-73)	56	58	0.31±0.04
m19D7	31	32	0.18±0.06

[0097] 実施例8：ヒト化10A11の活性に重要なアミノ酸の特定

図4及び図5に示すヒト化10A11について、CDRに相当するアミノ酸に点変異を導入した変異体を作製し、実施例6に示した方法により、各変異体の中和活性を算出した。各変異体について複数回中和活性評価を行い、そのIC50値をWTのIC50値との比として、IC50 ratio (WT IC50 / 変異体 IC50) で表記した。

結果を表8及び表9に示す。n. d. (=not detectable) は、変異体のIC50値が測定系の限界値である10 nM以上であり、検出限界以下まで活性が低下していることを示す。中和活性評価の結果、軽鎖については、KabatのnumberingによるL26、L27、L27c、L93アミノ酸部位において変異を有するS26T、K27R、L27cI、E93Dの各変異体は10倍以上活性が低下した(表8)。また重鎖については、KabatのnumberingによるH33、H35、H52、H53、H59、H96、H97、H98、H100c、H101アミノ酸部位において変異を有するA33V、Y35F、R52K、N53Q、Y59F、R96K、F97L、Y98F、G100cA、D101Eの各変異体で10倍以上活性が低下した(表9)。これらのアミノ酸は活性に極めて重要なアミノ酸である。

[0098] [表8]

軽鎖フレーム	重鎖フレーム	軽鎖CDR 変異	IC50 ratio
IGKV4-1 mutant	IGHV3-15 T94R	R24K	0.16
		S26T	0.05
		K27R	n. d.
		L27cI	0.05
		H27dR	0.18
		N28Q	0.79
		G29A	0.18
		N30Q	0.19
		T31S	0.50
		L33I	0.70
		Y34F	0.25
		M51L	0.24
		N53Q	2.10
		L54I	1.18
		M89L	0.49
		H91R	0.15
		L92I	1.27
		E93D	n. d.
		Y94F	0.87
		P95G	0.20
		L96I	0.56
		wt	1.00

※アミノ酸部位はKabatのnumberingによる部位。

[0099]

[表9]

軽鎖フレーム	重鎖フレーム	重鎖CDR 変異	IC50 ratio
IGKV4-1	IGHV3-73 mutant	T31A	0.17
		Y32F	0.44
		A33V	n. d.
		L34I	0.43
		Y35F	n. d.
		R50K	0.12
		I51L	0.22
		R52K	n. d.
		S52aT	0.22
		K52bR	0.47
		S52cT	0.53
		N53Q	0.03
		Y55F	0.47
		A56V	0.55
		T57S	0.49
		Y58F	0.50
		Y59F	0.03
		A60V	0.67
		D61E	0.25
		S62T	1.60
		V63L	0.56
		K64R	0.54
		D65E	1.30
		R96K	n. d.
		F97L	n. d.
		Y98F	0.07
		Y99F	0.80
		S100T	0.64
		D100aE	0.30
		Y100bF	0.75
		G100cA	0.07
		Y100dF	0.55
		A100eV	0.49
		M100fL	0.72
		D101E	n. d.
		Y102F	0.99
		wt	1.00

※アミノ酸部位はKabatのnumberingによる部位。

[0100] 実施例8-2：ヒト化19D7の活性に重要なアミノ酸の特定

図6及び図7に示すヒト化19D7について、CDRに相当するアミノ酸に点変異を導入した変異体を作製し、実施例6に示した方法により、各変異体の中和活性を算出した。各変異体について複数回中和活性評価を行い、そのIC50値をWTのIC50値との比として、IC50 ratio (WT IC50 / 変異体 IC50) で表記した。

結果を表10及び表11に示す。n. d. (=not detectable) は、変異体のIC50値が測定系の限界値である10nM以上であり、検出限界以下まで活性が低下していることを示す。

[0101]

[表10]

軽鎖フレーム	重鎖フレーム	軽鎖CDR 変異	IC50 ratio
IGKV3-20 mutant	IGHV3-15 T94R	K24K	0.94
		S25T	0.63
		S26T	0.79
		K27R	0.77
		S27aT	1.01
		L27bI	0.26
		L27cI	0.68
		H27dR	n. d.
		S27eT	0.58
		N28Q	0.02
		C29A	0.75
		N30Q	0.64
		T31S	0.61
		Y32F	0.33
		L33I	0.20
		Y34F	0.78
		R50K	0.52
		V51L	0.67
		S52T	0.60
		N53Q	0.49
		L54I	0.85
		A55V	0.66
		S56T	0.69
		M89L	0.85
		Q90N	1.01
		H91R	0.05
		L92I	0.43
		E93D	0.58
		Y94F	0.69
		P95G	0.34
		P96L	0.10
		T97S	0.53
		N28A	0.05
		N28F	n. d.
		N28F	n. d.
		N28G	n. d.
		N28I	n. d.
		N28K	n. d.
		N28L	n. d.
		N28P	n. d.
		N28R	n. d.
		N28S	n. d.
		N28T	n. d.
		N28Y	n. d.
		N28V	0.14

※アミノ酸部位はKabatのnumberingによる部位。

[0102]

[表11]

軽鎖フレーム	重鎖フレーム	重鎖CDR 変異	IC50 ratio
IGKV3-20	IGHV3-15 T94R mutant	T31S	1. 22
		Y32F	0. 77
		A33V	0. 32
		M34L	0. 64
		Y35F	n. d.
		R50K	n. d.
		I51L	0. 79
		R52K	n. d.
		S52aT	0. 58
		K52bR	0. 69
		S52cT	0. 25
		N53Q	n. d.
		N54Q	0. 48
		Y55F	0. 98
		A56V	0. 60
		T57S	0. 61
		Y58F	0. 67
		Y59F	0. 50
		A60V	0. 74
		D61E	0. 65
		S62T	0. 74
		V63L	0. 73
		K64R	1. 45
		D65E	0. 88
		G95A	0. 53
		G96A	0. 02
		Y97F	0. 80
		G98A	0. 73
		N99Q	0. 85
		Y100F	0. 60
		R100aK	0. 11
		Y100bF	n. d.
		A100cV	n. d.
		M100dL	0. 60
		D101E	0. 19
		Y102F	0. 62

※アミノ酸部位はK a b a t の n u m b e r i n g による部位。

[0103] 実施例 9 : ヒト化 1 O A 1 1 の活性向上

実施例 7 により見出されたヒト化フレームワークに、実施例 8 により見出された活性向上変異と、脱アミド化リスク配列に相当する、K a b a t の n u m b e r i n g による L 2 8 アミノ酸部位の N と L 2 9 アミノ酸部位の G に対する変異を組み合わせることで、ヒト化 1 O A 1 1 の最適化を行った。

その結果、表 1 2 に示すヒト化 1 O A 1 1 変異体を見出した。

[0104] [表12]

軽鎖可変領域		重鎖可変領域	IC50 (nM)
フレーム	変異	フレーム	
IGKV4-1	N53Q	IGHV3-15 T94R	0.12±0.02
IGKV4-1	N53Q, N28K	IGHV3-15 T94R	0.29±0.04
IGKV4-1	N53Q, G29L	IGHV3-15 T94R	0.18±0.02
IGKV4-1	N53Q, G29R	IGHV3-15 T94R	0.12±0.04
IGKV4-1	G29R	IGHV3-15 T94R	0.20±0.05
IGKV3-20	N53Q	IGHV3-15 T94R	0.18±0.05
IGKV3-20	N53Q, N28K	IGHV3-15 T94R	0.29±0.06
IGKV3-20	N53Q, G29L	IGHV3-15 T94R	0.21±0.03
IGKV3-20	N53Q, G29R	IGHV3-15 T94R	0.19±0.02

※アミノ酸部位はK a b a t の n u m b e r i n g による部位。

[0105] 実施例 9 - 2 : ヒト化 1 9 D 7 の活性向上

実施例 7 - 2 により見出されたヒト化フレームワークに点変異を導入し、ヒト化 1 9 D 7 の最適化を行った。その結果、表 1 3 に示すヒト化 1 9 D 7 変異体を見出した。

[0106]

[表13]

軽鎖可変領域		重鎖可変領域		IC50 (nM)
フレーム	CDR変異	フレーム	CDR変異	
IGKV3-20	S25T	IGHV3-15 T94R	なし	0.31±0.04
	S26T		なし	0.20±0.01
	S27aT		なし	0.22±0.04
	Q90N		なし	0.30±0.17
	なし		T31S	0.26±0.04
	なし		A60V	0.27±0.04
	なし		K64R	0.24±0.05
	なし		D65E	0.27±0.04
	なし		N99Q	0.22±0.04
	なし		Y102F	0.31±0.06

[0107] 実施例10：腫瘍移植ヒトCCR8ノックインマウス（以下、hCCR8-KI（KI/KI）マウス）における抗ヒトCCR8抗体の抗腫瘍活性

（1）hCCR8-KI（KI/KI）マウスの作製

マウスCCR8遺伝子（Gene ID：12776）及びヒトCCR8遺伝子（Gene ID：1237）は、いずれも2つのエクソンから構成されており、第2番目のエクソン内にORF（オープンリーディングフレーム）全長が含まれている。マウスCCR8遺伝子のORF（CCDS ID：23621.1）全長を取り除くと同時にヒトCCR8遺伝子のORF（CCDS ID：2684.1）全長を挿入することで、発現するCCR8タンパク質を完全にヒト化したhCCR8-KI（KI/KI）マウスを作製した。

相同組換えアームとして使用するDNA断片は、マウスCCR8遺伝子のORFの上流下流それぞれ約2kb（キロベース）のマウスゲノム配列をPCR増幅することにより取得し、マウス由来のゲノム配列はORFのみが取り除かれるように設計した。先のヒトCCR8遺伝子のORF全長配列の前後に相同組換えアームをそれぞれ継ぎ目なく接続することでターゲティングベクターを作製し、相同組換えに供し、hCCR8-KI（KI/+）BaI

b/cマウスを作製した。作製したhCCR8-KI (KI/+) Balb/cマウスについては、マウスCCR8遺伝子のORF全長とヒトCCR8遺伝子のORF全長が正しく置き換わっており、かつ、余計な配列の挿入や欠失がないことをPCR及びDNA塩基配列解析により確認した。hCCR8-KI (KI/+) Balb/cマウスを通常交配で掛け合わせることでhCCR8-KI (KI/KI) マウスを作製した。

[0108] (2) hCCR8-KI (KI/KI) マウスにおける大腸癌CT26細胞株腫瘍内浸潤細胞のヒトCCR8発現確認

hCCR8-KI (KI/KI) マウス (6週齢、メス) の背部皮内に 3.5×10^5 個($50 \mu\text{L}$)のCT26細胞を移植し、移植17日目に、5例の個体より腫瘍を回収した(N=5)。CT26細胞の腫瘍塊を、ハサミで細かく切断し、市販キット (Tumor Dissociation Kit, mouse, Miltenyi社及びThe gentleMACS (TM) Dissociator, Miltenyi社)を用いて添付キットプロトコルに従い、腫瘍浸潤細胞を調製した。

調製された細胞は70 μm のセルストレイナーに通した後、2回10mM HEPES/HBSS/2%FBSで洗浄した。その後、赤血球溶解液 (BD Biosciences社)で5分間処理し、赤血球を除去し、さらに2%FBS/10mM HEPES/HBSSバッファーで2回洗浄した。腫瘍浸潤細胞は以下の方法及び抗体により染色した。

浸潤細胞をZombie NIR Fixable Viability Kit (BioLegend) 試薬を用いて、30分間水中で染色した。2%FBS/10mM HEPES/HBSSで1回洗浄後、BV510標識抗マウスCD45 (30-F11、BioLegend)、FITC標識抗マウスCD4 (RM4-4、BioLegend)、PE/Cy7標識抗マウスCD8 (53-6.7、BioLegend)、PerCP/Cy5.5標識抗マウスTCR β (H57-597、BioLegend)、PE標識抗マウスCD25 (PC61、BioLegend)、BV421標識抗ヒトCCR

8抗体(433H、BD Biosciences)(又はBV421標識アイソタイプコントロール抗体)で染色した。染色は30分間水中で実施した。2%FBS/HEPES/HBSSで2回洗浄後、フローサイトメーターを用いて細胞を解析した。

CD45+TCR β +CD4+CD25+T細胞中のヒトCCR8発現を解析した。アイソタイプコントロール抗体での染色により陰性細胞領域を決定し、抗ヒトCCR8抗体で陽性となる細胞をヒトCCR8+細胞として移植17日後に存在頻度を算出した。その結果、マウス腫瘍内のCD45+TCR β +CD4+CD25+細胞中の約47%にヒトCCR8が検出された。

[0109] (3) 大腸癌由来CT26細胞を用いた抗ヒトCCR8抗体投与による抗腫瘍効果の評価

hCCR8-KI(KI/KI)マウス(8週齢、メス)の背部皮内に 4×10^5 個の大腸癌由来CT26細胞(50 μ L)を移植した。腫瘍移植4日目及び11日目にヒト化10A11抗体(軽鎖可変領域:IGKV4-1 N53Q+G29R(配列番号59)/重鎖可変領域:IGHV3-15 T94R(配列番号41))を静脈内に100 μ g(100 μ L)又は200 μ g(100 μ L)投与した(N=10)。コントロールは媒体(りん酸緩衝生理食塩水)100 μ Lを投与した(N=10)。腫瘍移植4、7、10、11、14、16、18、21、24日後に腫瘍体積を測定した。腫瘍体積(mm³)は長径(mm)×短径(mm)×短径(mm)/2で計量した。

その結果、移植11日目、14日目、16日目、18日目、21日目、24日目においていずれの用量の抗ヒトCCR8抗体投与群の腫瘍体積が有意に小さかった(図8、有意水準はWelch's t testを用い、いずれの用量においても10日目が** ; $p < 0.01$ 、11日目以降が、*** ; $p < 0.001$)。また抗ヒトCCR8抗体投与群では、完全退縮を示す個体が出現し、24日目には100 μ g抗ヒトCCR8抗体投与群で10匹中5匹、200 μ g抗ヒトCCR8抗体投与群で10匹中6匹のマウスの腫瘍がほぼ完全に消失した。

[0110] 実施例 11 : 10A11 と競合する抗ヒトCCR8 抗体のスクリーニング

ヒト化10A11 抗体（軽鎖可変領域：IGKV4-1 / 重鎖可変領域：IGHV3-15 T94R）を用い、hCCR8 との結合において、これと競合する抗体のスクリーニングを実施した。

実施例1 に記載の方法と同様の方法で、ヒトCCR8（UniProtKB / Swiss-Prot : P51685）の全長をコードする遺伝子を抗原とし、A / J Jms Slc 雌性マウスにDNA免疫してハイブリドーマを作製した。作製したハイブリドーマを96well plate に播種し、9日間培養後得られた培養上清のうち176well について、ヒト化10A11 抗体との競合結合試験を実施した。競合試験は、実施例1の方法で作製したヒトCCR8 発現Exp i 293細胞に対し、培養上清を10nM のヒト化10A11 抗体もしくは、isotype control と混合して、室温で3時間反応させ、PBS で3回洗浄したのちにAlexa488 標識抗マウスIgG 抗体（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）で検出することにより行った。Isotype control の共存下、ハイブリドーマ由来抗体の結合が確認できたものを通常のヒトCCR8 結合抗体であると定義した。またヒトCCR8 結合抗体のうち、ヒト化10A11 抗体の共存下では結合シグナルが顕著に低下する抗体をヒト化10A11 抗体と競合する抗体として同定した。その結果、170well 中56well がヒトCCR8 結合抗体であった。一方この56well 中、7well がヒト化10A11 抗体と競合する抗体であった。

さらに、競合する抗体として同定したもののうち、代表して3クローンをクローン化し、クローン化後のハイブリドーマ培養上清より精製抗体を得た。この精製抗体についてヒトCCL1-ヒトCCR8 に対する中和活性を実施例1の方法により測定した。その結果いずれの抗体も中和活性を有しており（表14）、ヒト化10A11 抗体と競合する抗体が強い中和抗体であることが示された。

[0111]

[表14]

クローン	IC50 (nM)
19B10	4.5
6D11	3.3
7F4	6.4

[0112] 実施例12 ヒト化モノクローナル抗体のエピトープ解析

実施例3に記載の内容と同様、ヒト化10A11抗体、ヒト化19D7抗体について、エピトープ検証を実施した。実施例3で作製した、ヒトCCR4のキメラ体、ヒトCCR8N末領域の点変異体に加え、ヒトCCR8 I o o p 1、I o o p 2領域の点変異体についても結合評価を実施した。結合評価は各変異体をE x p i 2 9 3細胞に一過性発現させ、ヒト化10A11抗体（軽鎖可変領域：I G K V 4 - 1 / 重鎖可変領域：I G H V 3 - 1 5 T 9 4 R）又はヒト化19D7抗体（軽鎖可変領域：I G K V 3 - 2 0 / 重鎖可変領域：I G H V 3 - 1 5 T 9 4 R）を20 μ g / mLから3倍ずつ8段階希釈調製した抗体溶液を反応させることにより実施した。室温で3時間反応させたのちにA l e x a 4 8 8標識a n t i - h u m a n I g G抗体（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）と反応させ、フローサイトメトリー解析を実施した。また各変異体の発現量は各変異体のN末にタグを付与し、同様の方法で抗タグ抗体により検出することで、補正した。

結果を表15および16に示す。ヒトCCR8と比較して、その結合活性が70%以下になる変異体を△、20%以下になる変異体を×と示した。

[0113]

[表15]

変異体	h10A11	h19D7
hCCR8		
hCCR4	×	×
mCCR8	×	×
N-ter hCCR4-hCCR8	×	×
loop1 hCCR4-hCCR8	△	△
loop2 hCCR4-hCCR8	△	△
loop3 hCCR4-hCCR8		△
hCCR8 (L5A)	△	△
hCCR8 (D6A)		
hCCR8 (L7A)		
hCCR8 (S8A)		
hCCR8 (T10A)		△
hCCR8 (T11A)		△
hCCR8 (V12A)		
hCCR8 (T13A)		△
hCCR8 (Y15A)		△
hCCR8 (Y17A)	×	×
hCCR8 (I20A)	△	△
hCCR8 (S22A)	△	△
hCCR8 (S23A)		△
hCCR8 (L29A)		△
hCCR8 (I30A)		
hCCR8 (Q31A)		
hCCR8 (T32A)	△	
hCCR8 (N33A)		
hCCR8 (G34A)		
hCCR8 (K35A)	△	△
hCCR8 (Y94A)		
hCCR8 (L95A)		
hCCR8 (L96A)		
hCCR8 (D97A)	△	
hCCR8 (Q98A)		
hCCR8 (V100A)		
hCCR8 (T103A)		

[表16]

hCCR8 (V104A)		
hCCR8 (M105A)		
hCCR8 (K107A)		
hCCR8 (Y172A)		
hCCR8 (Q173A)		
hCCR8 (V174A)		
hCCR8 (A175G)		
hCCR8 (S176A)		
hCCR8 (E177A)		
hCCR8 (D178A)		
hCCR8 (G179A)		
hCCR8 (V180A)	△	
hCCR8 (L181A)	△	△
hCCR8 (Q182A)		
hCCR8 (C183A)	×	×
hCCR8 (Y184A)		
hCCR8 (S185A)		
hCCR8 (F186A)		
hCCR8 (Y187A)		
hCCR8 (N188A)	△	△
hCCR8 (Q189A)		
hCCR8 (Q190A)		
hCCR8 (T191A)		
hCCR8 (L192A)		
hCCR8 (K193A)		△
hCCR8 (W194A)		
hCCR8 (K195A)		
hCCR8 (I196A)		
hCCR8 (F197A)		
hCCR8 (T198A)		
hCCR8 (N199A)		
hCCR8 (F200A)		

産業上の利用可能性

[0114] 本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片は、生体試料においてC C

R 8を検出するために使用することができる。さらに、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を含む医薬組成物は、CCR8関連疾患の治療又は予防のための医薬として非常に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号1で示されるアミノ酸配列の17位のチロシンを認識する、CCR8に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片。
- [請求項2] 中和抗体である、請求項1記載の抗体又はその抗体断片。
- [請求項3] さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の94位から107位の中の1以上のアミノ酸を認識する、請求項1又は2記載の抗体又はその抗体断片。
- [請求項4] さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の172位から202位の中の1以上のアミノ酸を認識する、請求項1～3のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。
- [請求項5] 配列番号1で示されるアミノ酸配列の20位のイソロイシン、22位のセリン、35位のリジン、181位のロイシン、183位のシステイン及び188位のアスパラギンのうち、1以上のアミノ酸を認識する、請求項1～4のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片。
- [請求項6] ヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片である、請求項1～5のいずれかに記載の抗体又は抗体断片。
- [請求項7] 1) 配列番号2のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号3のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び
配列番号4のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに
配列番号5のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 6 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 7 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域；

2) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 3 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 6 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 7 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域；

3) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 9 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換

、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号10のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号11のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域；

4) 配列番号2のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号3のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR2及び

配列番号10のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号12のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号6のアミノ酸配列において1又は2のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなるC

CDR 2 及び

配列番号 13 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域；

5) 配列番号 14 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 15 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 16 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 17 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 18 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 19 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域；若しくは

6) 配列番号 20 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 21 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 22 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 23 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 24 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 25 のアミノ酸配列において 1 又は 2 のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域

を含む、CCR 8 に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項 8]

1) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 3 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 4 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 5 のアミノ酸配列からなる CDR 1、

配列番号 6 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び

配列番号 7 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域

(ここで、以下のいずれかの置換を 1 以上有していても良い、

A) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 10 番目のアスパラギンがリジンに置換

B) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 11 番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換

C) 配列番号 3 のアミノ酸配列の 4 番目のアスパラギンがグルタミンに置換

D) 配列番号 3 のアミノ酸配列の 5 番目のロイシンがイソロイシンに

置換

E) 配列番号4のアミノ酸配列の4番目のロイシンがイソロイシンに置換

F) 配列番号4のアミノ酸配列の6番目のチロシンがフェニルアラニンに置換

G) 配列番号6のアミノ酸配列の16番目のセリンがトレオニンに置換

H) 配列番号6のアミノ酸配列の19番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換) ;

2) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR2及び
配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び
配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域 ;

3) 配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号9のアミノ酸配列からなるCDR2及び
配列番号10のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR2及び
配列番号11のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域 ;

(ここで、以下のいずれかの置換を1以上有していても良い、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の2番目のセリンがトレオニンに置換、

B) 配列番号2のアミノ酸配列の3番目のセリンがトレオニンに置換、

- C) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 5 番目のセリンがトレオニンに置換、
- D) 配列番号 10 のアミノ酸配列の 2 番目のグルタミンがアスパラギンに置換、
- E) 配列番号 8 のアミノ酸配列の 1 番目のトレオニンがセリンに置換、
- F) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 14 番目のアラニンがバリンに置換、
- G) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 18 番目のリジンがアルギニンに置換、
- H) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 19 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、
- I) 配列番号 11 のアミノ酸配列の 5 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、
- J) 配列番号 11 のアミノ酸配列の 12 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換) ；
- 4) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 3 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 10 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに
配列番号 12 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 6 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 13 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域；
- 5) 配列番号 14 のアミノ酸配列からなる CDR 1、
配列番号 15 のアミノ酸配列からなる CDR 2 及び
配列番号 16 のアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 17 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 18 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 19 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域；
若しくは

6) 配列番号 20 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 21 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 22 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 23 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 24 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 25 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域
を含む、請求項 7 記載の抗体又はその抗体断片。

[請求項9]

配列番号 2 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 3 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 4 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域並びに

配列番号 5 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 6 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 7 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域を含み、

以下のいずれかの置換を 1 以上有する、

A) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 10 番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 11 番目のグリシンがグルタミン、
トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号 3 のアミノ酸配列の 4 番目のアスパラギンがグルタミンに置換；

D) 配列番号 3 のアミノ酸配列の 5 番目のロイシンがイソロイシンに

置換；

E) 配列番号4のアミノ酸配列の4番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号4のアミノ酸配列の6番目のチロシンがフェニルアラニンに置換

G) 配列番号6のアミノ酸配列の16番目のセリンがトレオニンに置換

H) 配列番号6のアミノ酸配列の19番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

請求項8記載の抗体又はその抗体断片。

[請求項10] 以下のいずれかの置換を1以上有する、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

請求項9記載の抗体又はその抗体断片。

[請求項11] 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、

さらに、以下のいずれか一つの置換を有していても良い、

A) 配列番号2のアミノ酸配列の10番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換、

請求項9又は10記載の抗体又はその抗体断片。

[請求項12] 配列番号3のアミノ酸配列の4番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、さらに、配列番号2のアミノ酸配列の11番目のグリ

シンがアルギニンに置換されている、請求項 11 記載の抗体又はその抗体断片。

- [請求項13] 配列番号 2 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 9 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 10 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域並びに
配列番号 8 のアミノ酸配列からなる C D R 1、
配列番号 6 のアミノ酸配列からなる C D R 2 及び
配列番号 11 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域を含み、
以下のいずれかの置換を 1 以上有する、
- A) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 2 番目のセリンがトレオニンに置換
；
 - B) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 3 番目のセリンがトレオニンに置換
；
 - C) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 5 番目のセリンがトレオニンに置換
；
 - D) 配列番号 10 のアミノ酸配列の 2 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；
 - E) 配列番号 8 のアミノ酸配列の 1 番目のトレオニンがセリンに置換
；
 - F) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 14 番目のアラニンがバリンに置換
；
 - G) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 18 番目のリジンがアルギニンに置換；
 - H) 配列番号 6 のアミノ酸配列の 19 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；
 - I) 配列番号 11 のアミノ酸配列の 5 番目のアスパラギンがグルタミ

ンに置換、

J) 配列番号 11 のアミノ酸配列の 12 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換、

請求項 8 記載の抗体又はその抗体断片。

[請求項 14] ヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片である、請求項 7～13 のいずれかに記載の抗体又は抗体断片。

[請求項 15] 配列番号 40、42、43、44、45 若しくは 47 のアミノ酸配列又は
配列番号 40、42、43、44、45 若しくは 47 のアミノ酸配列
と 95% 以上の同一性のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域並びに
配列番号 41 若しくは 46 のアミノ酸配列又は
配列番号 41 若しくは 46 のアミノ酸配列と 95% 以上の同一性のア
ミノ酸配列からなる重鎖可変領域；
を含む、請求項 14 記載のヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断
片。

[請求項 16] 1) 配列番号 40 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
2) 配列番号 42 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
3) 配列番号 43 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
4) 配列番号 44 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
5) 配列番号 45 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
6) 配列番号 47 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 41 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；
7) 配列番号 40 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、

配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

8) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

9) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

1 0) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

1 1) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；若しくは

1 2) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、
配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、

以下のいずれかの置換を 1 以上有していても良い、

A) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列
の 3 3 番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列
の 3 4 番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン
、ロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列
の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換；

D) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列
の 5 9 番目のロイシンがイソロイシンに置換；

E) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列
の 9 7 番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列
の 9 9 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換；

G) 配列番号 4 1 又は 4 6 のアミノ酸配列の 6 5 番目のセリンがトレ
オニンに置換；

H) 配列番号 4 1 又は 4 6 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

請求項 1 4 又は 1 5 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項17]

以下のいずれかの置換を 1 以上有する、

A) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 3 3 番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 3 4 番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 5 8 番目のアスパラギンがグルタミンに置換；

D) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 5 9 番目のロイシンがイソロイシンに置換；

E) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 9 7 番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号 4 0、4 2、4 3、4 4、4 5 又は 4 7 のアミノ酸配列の 9 9 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換；

G) 配列番号 4 1 又は 4 6 のアミノ酸配列の 6 5 番目のセリンがトレオニンに置換；

H) 配列番号 4 1 又は 4 6 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

請求項 1 6 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項18]

配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、

以下のいずれかの置換を 1 以上有する、

A) 配列番号 4 0 又は 4 2 のアミノ酸配列の 3 3 番目のアスパラギン

がリジンに置換；

B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがグルタミン、トレオニン、アラニン、リジン、ロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換；

D) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の59番目のロイシンがイソロイシンに置換；

E) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の97番目のロイシンがイソロイシンに置換；

F) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の99番目のチロシンがフェニルアラニンに置換；

G) 配列番号41のアミノ酸配列の65番目のセリンがトレオニンに置換；

H) 配列番号41のアミノ酸配列の68番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換、

請求項17記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項19]

配列番号40又は42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、

以下のいずれかの置換を1以上有する、

A) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換；

B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換；

C) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

請求項17又は18記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又は

その抗体断片。

- [請求項20] 配列番号40又は42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、配列番号40又は42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、さらに、以下のいずれか一つの置換を有していても良い、
A) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の33番目のアスパラギンがリジンに置換；
B) 配列番号40又は42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがロイシン又はアルギニンに置換、
請求項17～19のいずれかに記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。
- [請求項21] 配列番号42のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、配列番号42のアミノ酸配列の58番目のアスパラギンがグルタミンに置換されており、配列番号42のアミノ酸配列の34番目のグリシンがアルギニンに置換されている、
請求項20記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。
- [請求項22] 配列番号59のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号41のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有する、請求項20記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。
- [請求項23] 配列番号54、55若しくは56のアミノ酸配列又は配列番号54、55若しくは56のアミノ酸配列と95%以上の同一性のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域並びに配列番号57若しくは58のアミノ酸配列又は配列番号57若しくは58のアミノ酸配列と95%以上の同一性のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域；

を含む、請求項 1 4 記載のヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項24]

1) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

2) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

3) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

4) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

5) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；

6) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

を含み、以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい、

A) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 2 5 番目のセリンがトレオニンに置換；

B) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 2 6 番目のセリンがトレオニンに置換；

C) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 2 8 番目のセリンがトレオニンに置換；

D) 配列番号 5 4、5 5 又は 5 6 のアミノ酸配列の 9 5 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；

E) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 3 1 番目のトレオニンがセリンに置換；

F) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 3 番目のアラニンがバリンに置換；

G) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 7 番目のリジンがアル

ギニンに置換；

H) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 9 9 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 5 7 又は 5 8 のアミノ酸配列の 1 0 5 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換、

請求項 1 4 又は 2 3 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項 25] 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、以下のいずれかの置換を 1 以上有していてもよい、

A) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 5 番目のセリンがトレオニンに置換；

B) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 6 番目のセリンがトレオニンに置換；

C) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 2 8 番目のセリンがトレオニンに置換；

D) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列の 9 5 番目のグルタミンがアスパラギンに置換；

E) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 3 1 番目のトレオニンがセリンに置換；

F) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 3 番目のアラニンがバリンに置換；

G) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 7 番目のリジンがアルギニンに置換；

H) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列の 6 8 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換；

I) 配列番号 57 のアミノ酸配列の 99 番目のアスパラギンがグルタミンに置換、

J) 配列番号 57 のアミノ酸配列の 105 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換、

請求項 24 記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項26] さらに、配列番号 52 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域、及び、配列番号 53 のアミノ酸配列を有する重鎖定常領域を有し、配列番号 53 の C 末端にリジンが付加していてもしていなくてもよい、請求項 14 ～ 25 のいずれかに記載の抗体であるヒト化モノクローナル抗体又はその抗体断片。

[請求項27] 請求項 1 ～ 26 のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

[請求項28] CCR8 と CCR8 リガンドのいずれかとの結合を阻害するために用いる、請求項 1 ～ 26 のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

[請求項29] 中和抗体として用いる、請求項 1 ～ 26 のいずれかに記載の抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

[請求項30] 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 17 位のチロシンを認識するために用いる、請求項 1 ～ 26 のいずれかに記載の CCR8 に結合するモノクローナル抗体又はその抗体断片を含有する医薬組成物。

[請求項31] CCR8 と CCR8 リガンドのいずれかとの結合を阻害するために用いる、請求項 30 記載の医薬組成物。

[請求項32] 抗体が ADC 活性を有するものである、請求項 27 ～ 31 のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項33] 抗体が IgG 抗体である、請求項 27 ～ 31 のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項34] 癌を治療するために用いる、請求項 27 ～ 33 のいずれかに記載の医

葉組成物。

[請求項35] 請求項 7 ～ 2 4 のいずれかに記載の抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

[請求項36] 請求項 3 5 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。