

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5723594号
(P5723594)

(45) 発行日 平成27年5月27日(2015.5.27)

(24) 登録日 平成27年4月3日(2015.4.3)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K	16/42	(2006.01)	C 0 7 K 16/42
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K 67/027
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08

請求項の数 55 (全 137 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-501123 (P2010-501123)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成20年3月21日 (2008.3.21)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2010-521989 (P2010-521989A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(43) 公表日	平成22年7月1日 (2010.7.1)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/057819		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02008/116149	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成20年9月25日 (2008.9.25)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成23年3月16日 (2011.3.16)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/896, 339		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成19年3月22日 (2007.3.22)	(72) 発明者	ウ, ローレン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
微生物の受託番号	ATCC PTA-8260		04, フォスター シティ, ペンサコ
微生物の受託番号	ATCC PTA-8261		ラ ストリート 1051
微生物の受託番号	ATCC PTA-8262		
微生物の受託番号	ATCC PTA-8263		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシス性抗 I g E 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1の残基317から351で定義される I g E の M 1'セグメント中のエピトープと特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1'抗体。

【請求項 2】

ヒト、アカゲザルおよびカニクイザルの起源である I g E を結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

治療上有効量が哺乳動物にインピボ投与されると、配列番号：1の残基317から351で定義される I g E の M 1'セグメント中のエピトープと特異的に結合し、I g E 産生 B 細胞を特異的に枯渇させる抗 I g E / M 1'抗体。

【請求項 4】

総血清 I g E を減少させる、請求項 3 の抗体。

【請求項 5】

無血清 I g E を減少させる、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

I g E がアレルギー特異的である、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 7】

キメラである、請求項 3 に記載の抗体。

10

20

【請求項 8】

ヒト化されている、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 9】

ヒト抗体である、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 10】

エピトープがペプチド 4 (配列番号：8) に対応する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

配列番号：38 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：29 に定義される可変軽鎖 (VL) を含むマウス抗 IgE / M1' 抗体 47H4 のスキャッチャード結合親和性と同等であるスキャッチャード結合親和性で配列番号：1 の残基 317 から 351 で定義される IgE の M1' セグメント中のエピトープに特異的に結合する抗 IgE / M1' 抗体。

10

【請求項 12】

親和性が 0.30 と 0.83 nM の間である、請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 13】

配列番号：41 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：31 に定義される可変軽鎖 (VL) を含むヒト化抗 IgE / M1' 抗体 47H4 v5 のスキャッチャード結合親和性と同等であるスキャッチャード結合親和性で配列番号：1 の残基 317 から 351 で定義される IgE の M1' セグメント中のエピトープに特異的に結合する抗 IgE / M1' 抗体。

【請求項 14】

親和性がおよそ 1.5 nM である、請求項 13 に記載の抗体。

20

【請求項 15】

配列番号：33 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：21 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11；

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：22 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.1；

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：23 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.2；

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：24 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.3；

30

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：22 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.4；

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：23 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.5；

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：24 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.6；

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：25 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.13；

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：26 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.14；

40

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：25 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.15；

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：26 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 26A11 v.16；

配列番号：36 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：27 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 7A6；

配列番号：37 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：28 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 7A6 v.1；

配列番号：38 に定義される可変重鎖 (VH) 及び配列番号：29 に定義される可変軽鎖 (VL) を含む 47H4；

50

配列番号：39に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：30に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.1；

配列番号：39に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：31に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.2；

配列番号：40に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：30に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.3；

配列番号：40に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：31に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.4；

配列番号：41に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：31に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.5；

配列番号：42に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：31に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.6；

からなる群から選択される抗体の重鎖及び軽鎖のHVR（高頻度可変領域）を含んでなる、配列番号：1の残基317から351で定義されるIgEのM1'セグメント中のエピトープに特異的に結合する抗IgE/M1'抗体ないしこれらの抗原結合断片。

【請求項16】

26A11、26A11v.1-16、7A6、7A6v1、47H4、47H4v1-6からなる群から選択される抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる、請求項15に記載の抗体ないしこれらの抗原結合断片。

【請求項17】

47H4v1-6の抗体の重鎖および軽鎖のHVR（高頻度可変領域）を含んでなる、請求項15に記載の抗体ないしこれらの抗原結合断片。

【請求項18】

無フコシル化された、請求項15に記載の抗体ないしこれらの抗原結合断片。

【請求項19】

少なくとも一の製薬的に許容される担体と組み合わせて請求項1から18のいずれか一の抗体ないしこれらの抗原結合断片を含んでなる組成物。

【請求項20】

抗IgE抗体、抗ヒスタミン剤、気管支拡張薬、糖質コルチコイド、NSAID、TNF-アンタゴニスト、インテグリンアンタゴニスト、免疫抑制剤、IL-4アンタゴニスト、IL-13アンタゴニスト、二重IL-4/IL-13アンタゴニスト、DMARD、B細胞表面マーカーに結合する抗体およびBAFFアンタゴニストからなる群から選択される一又は複数の薬剤と少なくとも一の製薬的に許容される担体とを組み合わせ、請求項1から18のいずれか一の抗体ないしこれらの抗原結合断片を含んでなる組成物。

【請求項21】

配列番号：33に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：21に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：22に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.1；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：23に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.2；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：24に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.3；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：22に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.4；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：23に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.5；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：24に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.6；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：25に定義される可変軽鎖

10

20

30

40

50

- (V L)を含む26A11v.13;
配列番号:34に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:26に定義される可変軽鎖(V L)を含む26A11v.14;
配列番号:35に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:25に定義される可変軽鎖(V L)を含む26A11v.15;
配列番号:35に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:26に定義される可変軽鎖(V L)を含む26A11v.16;
配列番号:36に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:27に定義される可変軽鎖(V L)を含む、7A6;
配列番号:37に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:28に定義される可変軽鎖(V L)を含む、7A6v1;
配列番号:38に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:29に定義される可変軽鎖(V L)を含む、47H4;
配列番号:39に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:30に定義される可変軽鎖(V L)を含む、47H4v.1;
配列番号:39に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:31に定義される可変軽鎖(V L)を含む、47H4v.2;
配列番号:40に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:30に定義される可変軽鎖(V L)を含む、47H4v.3;
配列番号:40に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:31に定義される可変軽鎖(V L)を含む47H4v.4;
配列番号:41に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:31に定義される可変軽鎖(V L)を含む47H4v.5;
配列番号:42に定義される可変重鎖(V H)及び配列番号:31に定義される可変軽鎖(V L)を含む47H4v.6;
からなる群から選択されるアポトーシス性抗I g E / M 1'抗体の重鎖及び軽鎖のH V R (高頻度可変領域)を含んでなる、抗体ないしこれらの抗原結合断片をコードする単離された核酸。
- 【請求項22】
26A11、26A11v1-16、7A6、7A6v1、47H4、47H4v1-6
からなる群から選択される抗体配列の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする核酸をさらに含む、請求項21に記載の核酸。 30
- 【請求項23】
コードされた抗体が無フコシル化されている、請求項22に記載の核酸。
- 【請求項24】
請求項22に記載の核酸が作用可能に結合しているベクター。
- 【請求項25】
請求項24に記載のベクターを含む宿主細胞。
- 【請求項26】
哺乳類である、請求項25に記載の宿主細胞。 40
- 【請求項27】
チャニーズハムスター卵巣である、請求項26に記載の宿主細胞。
- 【請求項28】
抗体ないし断片の発現に適切な条件下で請求項25に記載の宿主細胞を培養し、抗体ないし断片を回収することを含む、アポトーシス性抗I g E / M 1'抗体ないし機能的断片の製造方法。
- 【請求項29】
請求項19に記載の組成物と、I g Eが媒介する疾患の治療のための使用を示すパッケージ挿入物とを具備する製造品。
- 【請求項30】 50

バイアルである、請求項 29 に記載の製造品。

【請求項 31】

予め満たしてあるシリンジである、請求項 29 に記載の製造品。

【請求項 32】

注入用デバイスをさらに含む、請求項 31 に記載の製造品。

【請求項 33】

自動注入器である、請求項 32 に記載の製造品。

【請求項 34】

配列番号：1 の残基 317 から 351 で定義される I g E の M 1 'セグメント中のエピトープに特異的に結合し、I g E 発現 B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 ' 抗体の治療上有効量を含有してなる、I g E 産生 B 細胞を特異的に枯渇するための薬剤。

10

【請求項 35】

抗体が、配列番号：33 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：21 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 ;

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：22 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 1 ;

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：23 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 2 ;

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：24 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 3 ;

20

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：22 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 4 ;

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：23 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 5 ;

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：24 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 6 ;

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：25 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 1 3 ;

配列番号：34 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：26 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 1 4 ;

30

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：25 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 1 5 ;

配列番号：35 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：26 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 26 A 1 1 v . 1 6 ;

配列番号：36 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：27 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、7 A 6 ;

配列番号：37 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：28 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、7 A 6 v 1 ;

配列番号：38 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：29 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、4 7 H 4 ;

40

配列番号：39 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：30 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、4 7 H 4 v . 1 ;

配列番号：39 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：31 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、4 7 H 4 v . 2 ;

配列番号：40 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：30 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、4 7 H 4 v . 3 ;

配列番号：40 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：31 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 4 7 H 4 v . 4 ;

配列番号：41 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号：31 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 4 7 H 4 v . 5 ;

50

配列番号：42に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：31に定義される可変軽鎖（VL）を含む47H4v.6；

からなる群から選択される抗体の重鎖及び軽鎖のHVR（高頻度可変領域）を含む、請求項34に記載の薬剤。

【請求項36】

総血清IgEの減少を更に含む、請求項35に記載の薬剤。

【請求項37】

無血清IgEの減少を更に含む、請求項36に記載の薬剤。

【請求項38】

IgEがアレルギー特異的である、請求項36に記載の薬剤。

10

【請求項39】

抗体がADCC活性を有する、請求項35に記載の薬剤。

【請求項40】

配列番号：1の残基317から351で定義されるIgEのM1'セグメント中のエピトープに特異的に結合し、IgE発現B細胞のアポトーシスを誘導する抗IgE/M1'抗体の治療上の有効量を含有してなる、IgEが媒介する疾患の治療のための医薬。

【請求項41】

抗体がIgEを発現するB細胞を特異的に枯渇させる、請求項40に記載の医薬。

【請求項42】

抗体が総血清IgEを減少させる、請求項40に記載の医薬。

20

【請求項43】

抗体が無血清IgEを減少させる、請求項42に記載の医薬。

【請求項44】

IgEがアレルギー特異的である、請求項42に記載の医薬。

【請求項45】

抗体が、配列番号：33に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：21に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：22に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.1；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：23に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.2；

30

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：24に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.3；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：22に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.4；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：23に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.5；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：24に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.6；

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：25に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.13；

40

配列番号：34に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：26に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.14；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：25に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.15；

配列番号：35に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：26に定義される可変軽鎖（VL）を含む26A11v.16；

配列番号：36に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：27に定義される可変軽鎖（VL）を含む、7A6；

配列番号：37に定義される可変重鎖（VH）及び配列番号：28に定義される可変軽鎖

50

(V L) を含む、 7 A 6 v 1 ;

配列番号： 3 8 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 2 9 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、 4 7 H 4 ;

配列番号： 3 9 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 3 0 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、 4 7 H 4 v . 1 ;

配列番号： 3 9 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 3 1 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、 4 7 H 4 v . 2 ;

配列番号： 4 0 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 3 0 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む、 4 7 H 4 v . 3 ;

配列番号： 4 0 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 3 1 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 4 7 H 4 v . 4 ;

配列番号： 4 1 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 3 1 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 4 7 H 4 v . 5 ;

配列番号： 4 2 に定義される可変重鎖 (V H) 及び配列番号： 3 1 に定義される可変軽鎖 (V L) を含む 4 7 H 4 v . 6 ;

からなる群から選択される抗体の重鎖及び軽鎖の H V R (高頻度可変領域) を含む、 請求項 4 0 に記載の医薬。

【請求項 4 6】

I g E が媒介する疾患が、アレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、非アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性胃腸疾患、アナフィラキシー、蕁麻疹、食物アレルギー、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、寄生虫病、間質性膀胱炎、高 I g E 症候群、毛細管拡張性運動失調症、ウスコット アルドリッチ症候群、胸腺欠損リンパ異常、I g E 骨髄腫、移植片対宿主反応およびアレルギー性紫斑病からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の医薬。

【請求項 4 7】

I g E が媒介する疾患を治療するための医薬であって、抗 I g E 抗体、抗ヒスタミン剤、気管支拡張剤、糖質コルチコイド、NSAID、鬱血除去剤、咳抑制剤、鎮痛剤、TNF-アンタゴニスト、インテグリンアンタゴニスト、免疫抑制剤、IL-4 アンタゴニスト、IL-13 アンタゴニスト、二重 IL-4 / IL-13 アンタゴニスト、DMARD、B 細胞表面マーカーに結合する抗体および B A F F アンタゴニストからなる群から選択される少なくとも一の薬剤の治療上の有効量と組み合わせて、配列番号： 1 の残基 3 1 7 から 3 5 1 で定義される I g E の M 1 'セグメント中のエピトープに特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 '抗体の治療上の有効量を含む医薬。

【請求項 4 8】

I g E が媒介する疾患を治療するための医薬であって、アレルギー性疾患を治療するための公知の薬剤の投与の前、投与と同時に、又は投与の後に投与される、配列番号： 1 の残基 3 1 7 から 3 5 1 で定義される I g E の M 1 'セグメント中のエピトープに特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞のアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 '抗体の治療上有効量を含む医薬。

【請求項 4 9】

アレルギー性疾患のための公知の薬剤には、抗 I g E 抗体、抗ヒスタミン剤、気管支拡張剤、糖質コルチコイド、非ステロイド系抗炎症剤、免疫抑制剤、IL-4 アンタゴニスト、IL-13 アンタゴニスト、二重 IL-4 / IL-13 アンタゴニスト、鬱血除去剤、咳抑制剤又は鎮痛剤が含まれる、請求項 4 8 に記載の医薬。

【請求項 5 0】

アレルギー性疾患のための公知の薬剤にはアレルギー脱感作が含まれる、請求項 4 8 に記載の医薬。

【請求項 5 1】

配列番号： 1 の残基 3 1 7 から 3 5 1 で定義される I g E の M 1 'セグメント中のエピ

10

20

30

40

50

トープに特異的に結合し、I g Eを発現するB細胞のアポトーシスを誘導する抗I g E / M 1'抗体の治療上有効量を含有してなる、アレルギー誘導性のI g E産生を阻害するための薬剤。

【請求項52】

配列番号：1の残基317から351で定義されるI g EのM 1'セグメント中のエピトープに特異的に結合し、I g Eを発現するB細胞のアポトーシスを誘導する抗I g E / M 1'抗体の治療上有効量を含有してなる、アレルギー誘導性のI g E産生を減少させるための薬剤。

【請求項53】

P T A - 8 2 6 0、P T A - 8 2 6 1、P T A - 8 2 6 2、P T A - 8 2 6 3、P T A - 8 2 6 4、P T A - 8 2 6 5、P T A - 8 2 6 6、P T A - 8 2 6 7、P T A - 8 2 6 8、P T A - 8 2 6 9、P T A - 8 2 7 0からなる群から選択される、2007年3月21日にA T C Cに寄託されたマウスハイブリドーマ。

10

【請求項54】

請求項53に記載のハイブリドーマによって分泌される抗体。

【請求項55】

I g EのヒトM 1'セグメントを発現する(ヒトを除く)トランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

(関連出願)

本発明は、米国特許法119(e)に基づき、2007年3月22日に出願の米国特許第60/896339号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

(発明の分野)

本発明は、アポトーシス性抗I g E抗体、これをコードする核酸、その治療的組成物、およびI g Eが媒介する疾患の治療におけるそれらの使用に関連する。

【0003】

(関連技術の説明)

30

アレルギーは、環境抗原に対する免疫応答により組織炎症および臓器機能不全が引き起こされる特定の疾患を指す。各々のアレルギー性疾患の臨床特徴は、関与する器官又は組織の免疫学的に誘導された炎症反応を反映する。これらの特徴は一般的に、抗原の化学的又は物理的性質とは無関係である。アレルギー性応答の多様性は異なる免疫学的エフェクター経路の関与により生じ、これら経路の各々は炎症の固有のパターンを生じさせる。

アレルギーは全世界に共通である。しかしながら、特定の疾患についての偏向は年齢層、性別および人種間で異なる。特定の抗原に対する感度の罹患率は、遺伝子の偏向と、抗原への曝露の原因となる地理的及び文化的な因子の両方によって測定される。アレルギーの臨床状態は、各々の抗原に遭遇する個体だけに作用する。抗原への曝露によるアレルギー性疾患の発症には、前「感作」だけでなく、特定の臓器への

40

【0004】

抗原曝露によりアレルギーの疾患に先行する生物学的過程は、「感作」又は感作段階として知られる免疫応答を誘導する。いったん感作が起こると、次の抗原への曝露があるまで個体は症状を起こさない。感作の効果は免疫記憶としても知られている。

炎症が誘導されるいくつかの一次経路のうち一つが、免疫グロブリンE(I g E)によるものである。I g Eは、マスト細胞および好塩基球の表面上のアレルギーレセプターとしての役割によってアレルギーの中心的役割を担う。I g E抗体は、F c_γRIと称される高親和性細胞表面レセプターに分子のF c部分で、マスト細胞と好塩基球の表面に固定されている。多価のアレルギー分子がレセプターを占領している抗体に結合すると、アレルギー

50

ギー反応が起こる。その結果、Fc γ RIのブリッジングが起こり、ヒスタミン、ロイコトリエン、化学走性因子、血小板活性化因子およびプロテイナーゼといった炎症のメディエーターの放出と活性化を細胞内に生じさせるシグナルが次々と伝達される。これらの活性化されたメディエーターは局所的に作用し、血管透過、血管拡張、平滑筋収縮および粘液腺分泌の増加を引き起こす。これらの事象は臨床的に即時相又は初期段階と称され、アレルギー曝露の始めの15～30分以内に生じる。その後12時間にわたって、完全に明らかにされていないが他の化学的メディエーターに反応して、好中球から好酸球、単核細胞に広がる、炎症細胞の進行性の組織浸潤が生じる。アレルギー曝露後の6～12時間の期間は遅発相と称され、細胞性炎症の臨床症状を特徴とする。即時相反応がない場合に特に肺に遅発相反応が生じることを考えると、遅発相反応が必ずIgEに媒介されていると完全には理解できない。

10

【0005】

IgEは膜結合型及び分泌型で存在する。これらの異なった形態は、スプライス変異体であるようである。第一に分泌型をターゲティングするIgE(例えば、XOLAIR(登録商標)、オマリズマブ)を下方制御することによって治療効果を達成しようとする従来の試みにより、免疫系の更なる「アミング」が予防されるかまたは和らげられる。IgEの分泌型は短い形態で、基本的にFc領域がCH4ドメインで終わっている(図1)のに対して、これより長い形態には、M1/M1'及びM2として知られるエキソンによってコードされるペプチドを含む付加的C末端残基が含まれる。M1'として知られる52アミノ酸セグメントがあるもの及びないものの、膜結合IgEの2つの異なる形態が報告されているものもあるが[Batista et al., J. Exp. Med. 184: 2197-2205 (1996)]、出願人は、何れの膜結合型がこのM1'セグメントを欠いているかを確認することができなかった。IgEの分泌型に結合する抗IgE抗体による従来の治療法は、総血清IgEでなく、無血清を減少させる。Casale et al., J. Allergy Clin. Immunol. 100 (1): 110-121 (1997)。

20

さらに、抗原シグナルがない場合には、交差結合しているB細胞レセプター(すなわち、免疫グロブリン)はアポトーシスの傾向があることが述べられている。驚くべきことに、出願人は、抗IgE抗体によってIgEのM1'セグメントをターゲティングすると、B細胞のアポトーシスが誘導されうることを発見した。活性化されたB細胞のプロジェクターはIgEの分泌型を作製し分泌するプラズマ細胞となるので、アポトーシスを介したIgE産生B細胞の枯渇により、アレルギーの治療への新規の治療上のアプローチを提供するものである。

30

【発明の概要】

【0006】

本発明は、アポトーシス性の抗IgE抗体ないしはその機能的な断片、及びIgEが媒介する疾患の治療におけるそれらの用途を提供する。本発明は、さらに、IgE産生およびB細胞からの分泌を阻害する方法及び組成物を提供する。本発明は、さらに、IgEを生産するB細胞を特異的に枯渇させ、総血清IgEを低下させる方法及び組成物を提供する。

一実施態様では、本発明は、IgEのM1'セグメントを特異的に結合し、IgEを発現するB細胞にアポトーシスを誘導する抗IgE/M1'抗体を提供する。特定の態様では、抗体はIgEを生産するB細胞を特異的に枯渇させる。他の特定の態様では、抗体は総血清IgEを減少させる。さらに他の特定の態様では、抗体は総血清および無血清のIgEを減少させる。さらに特定の態様では、血清IgEはアレルギー特異的である。なお更なる特定の態様では、抗体は、ヒト、アカゲザルおよびカニクイザルが起源であるIgEに結合する。なお更なる特定の態様では、抗体はキメラである。なお更なる特定の態様では、抗体はヒト化される。なお更なる態様では、抗体はヒトである。

40

【0007】

他の実施態様では、本発明は、図5に示すペプチドに対応するM1'エピトープの何れか一に特異的に結合する抗IgE/M1'抗体を提供する。特定の態様では、抗体は、4

50

7H4、7A6、26A11、47H4v5、7A6v1および26A11v6からなる群から選択される抗体が結合するエピトープと同じエピトープに特異的に結合する。他の特定の態様では、抗体は、ペプチド4(配列番号:8)、ペプチド5(配列番号:9)、ペプチド7(配列番号:11)又はペプチド8(配列番号:12)からなる群から選択されるペプチドに対応するエピトープに結合する。さらに他の特定の態様では、抗体はペプチド4(配列番号:8)に結合する。

さらに他の実施態様では、本発明は、ペプチド4(配列番号:8)、ペプチド5(配列番号:9)、ペプチド7(配列番号:11)又はペプチド8(配列番号:12)からなる群から選択されるIgEのM1'エピトープを提供する。特定の態様では、M1'ペプチドはペプチド4(配列番号:8)である。

10

【0008】

さらなる実施態様では、本発明は、マウス抗IgE/M1'抗体47H4又はこのヒト化変異体のスキャッチャード結合親和性と同等である、ヒトIgEに対するスキャッチャード結合親和性でIgEのM1'セグメントに特異的に結合する抗IgE抗体を提供する。特定の態様では、親和性は47H5の結合親和性と同等である。他の特定の態様では、親和性は0.30と0.83nmとの間である。さらに他の特定の態様では、親和性は47H4v5の結合親和性と同等である。さらに特定の態様では、親和性はおよそ1.5nmである。

なお更なる実施態様では、本発明は、図6A-6F及び図20-25の何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖HVRを含む抗IgE/M1'抗体を提供する。特定の態様では、抗体は、さらに、図6A-6F及び図20-25の何れかに示す抗体配列の重鎖および軽鎖の可変領域を含む。他の特定の態様では、抗体は、図6A-6Fの何れかに示す抗体の完全長重鎖及び軽鎖を含む。さらに他の特定の態様では、抗体配列の重鎖および軽鎖は図6A-6Fの何れかに示す。さらに特定の態様では、抗体は、26A11、26A11v1-16、7A6、7A6v1、47H4、47H4v1-6からなる群から選択される。なお更なる特定の態様では、抗体は47H4v5である。なお更なる特定の態様では、抗体は無フコシル化されている。

20

【0009】

なお更なる実施態様では、本発明は、少なくとも一の製薬的に許容される担体と組み合わせて、図6A-6Fの何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖HNRを含む抗IgE/M1'抗体を含有してなる組成物を提供する。特定の態様では、抗体は、26A11、26A11v1-16、7A6、7A6v1、47H4、47H4v1-6からなる群から選択される。他の特定の態様では、抗体は47H4v5である。さらに他の特定の態様では、抗体は無フコシル化されている。

30

なお更なる実施態様では、本発明は、抗IgE抗体、抗ヒスタミン剤、気管支拡張剤、糖質コルチコイド、NSAID、TNF-アンタゴニスト、インテグリンアンタゴニスト、免疫抑制剤、IL-4アンタゴニスト、IL-13アンタゴニスト、二重IL-4/IL-13アンタゴニスト、DMARD、B細胞表面マーカーに結合する抗体およびBAFFアンタゴニストからなる群から選択される一又は複数の薬剤と組み合わせて、図8-13の何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖HVRを含む抗IgE/M1'抗体を含んでなる組成物を提供する。特定の態様では、組成物は、少なくとも一の薬学的に許容可能な担体を更に含む。

40

【0010】

なお更なる実施態様では、本発明は、図6A-6Fの何れかに示す抗IgE/M1'抗体の重鎖HVRをコードする単離された核酸を提供する。特定の態様では、単離された核酸は、図6A-6Fの何れかに示す抗体の軽鎖HVRをコードする核酸をさらに含む。他の特定の態様では、抗体はキメラである。さらに他の特定の態様では、抗体はヒト化である。更なる態様では、抗体はヒトである。なお更なる特定の態様では、抗体は、26A11、26A11v1-16、7A6、7A6v1、47H4、47H4v1-6からなる群から選択される。なお更なる特定の態様では、抗体は47H4v5である。なお更なる

50

特定の態様では、抗体は無フコシル化されている。なお更なる態様では、核酸は、核酸の発現に適切なベクターを更に含む。なお更なる特定の態様では、ベクターは、核酸の発現に適切な宿主細胞を更に含む。なお更なる特定の態様では、宿主細胞は真核細胞又は原核細胞である。なお更なる特定の態様では、真核細胞はチャイニーズハムスター卵巣(C H O)等の哺乳動物細胞である。

なお更なる実施態様では、本発明は、I g EのM 1'セグメントに特異的に結合する抗I g E / M 1'抗体ないしはその機能的な断片の製造方法であって、該抗体ないし断片を製造するのに適した条件下で、発現に適した形態の該抗体ないし断片をコードする核酸を含む宿主細胞を培養し、抗体ないし断片を回収することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

なお更なる実施態様では、本発明は、本明細書中に開示した組成物を包含する容器と、I g Eが媒介する疾患の治療のための用途を示したパッケージ挿入物とを具備する製造品を提供する。特定の態様では、製造品はバイアルである。他の特定の態様では、製造品は予め充填してある注射器である。さらに他の特定の態様では、予め充填してある注射器はさらに注入用デバイス内に内包されている。さらに特定の態様では、注入用デバイスは自動注入機である。

なお更なる実施態様では、本発明は、I g EのM 1'セグメントに特異的に結合し、I g Eを発現するB細胞にアポトーシスを誘導する抗I g E / M 1'抗体の治療上の有効量を投与することを含む、I g Eを産生するB細胞を特異的に枯渇させる方法を提供する。特定の態様では、抗体は図6 A - 6 Fの何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖H V Rを含む。他の特定の態様では、方法は総血清I g Eを減少させる。さらに他の特定の態様では、方法は無血清および総血清I g Eを減少させる。さらに特定の態様では、血清I g Eはアレルギー特異的である。なお更なる特定の態様では、抗体は、2 6 A 1 1、2 6 A 1 1 v 1 - 1 6、7 A 6、7 A 6 v 1、4 7 H 4、4 7 H 4 v 1 - 6からなる群から選択される。なお更なる特定の態様では、抗体は4 7 H 4 v 5である。なお更なる特定の態様では、抗体はA D C C活性を有する。

【 0 0 1 2 】

なお更なる実施態様では、本発明は、I g EのM 1'セグメントに特異的に結合し、I g Eを発現するB細胞にアポトーシスを誘導する抗I g E / M 1'抗体の治療上の有効量を投与することを含む、I g Eが媒介する疾患の治療方法を提供する。特定の態様では、抗体は、I g Eを産生するB細胞を特異的に枯渇させる。他の特定の態様では、抗体、総血清I g Eを減少させる。さらに他の特定の態様では、抗体は総及び無I g Eを減少させる。さらに特定の態様では、血清I g Eはアレルギー特異的である。なお更なる特定の態様では、抗体は図6 A - 6 Fの何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖H V Rを含む。なお更なる特定の態様では、抗体は、2 6 A 1 1、2 6 A 1 1 v 1 - 1 6、7 A 6、7 A 6 v 1、4 7 H 4、4 7 H 4 v 1 - 6からなる群から選択される。さらに特定の態様では、抗体は4 7 H 4 v 5である。なお更なる特定の態様では、抗体はA D C C活性を有する。なお更なる特定の態様では、I g Eが媒介する疾患は、アレルギー性鼻炎、喘息(例えばアレルギー性喘息及び非アレルギー性喘息)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性胃腸疾患、過敏症(例えばアナフィラキシー、蕁麻疹、食物アレルギーなど)、アレルギー性気管支肺アス

【 0 0 1 3 】

なお更なる実施態様では、本発明は、I g Eが媒介する疾患の治療方法であって、高I g E抗体、抗ヒスタミン剤、気管支拡張剤、糖質コルチコイド、N S A I D、鬱血除去剤、咳抑制剤、鎮痛剤、T N F - アンタゴニスト、インテグリンアンタゴニスト、免疫抑制剤、I L - 4 アンタゴニスト、I L - 1 3 アンタゴニスト、二重I L - 4 / I L - 1 3 アンタゴニスト、D M A R D、B細胞表面マーカーに結合する抗体およびB A F Fアンタゴ

10

20

30

40

50

ニストからなる群から選択される少なくとも一の薬剤の治療上の有効量と組み合わせて、I g E の M 1 'セグメントに特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 '抗体の治療上の有効量を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。特定の態様では、抗体は、I g E を産生する B 細胞を特異的に枯渇させる。他の特定の態様では、抗体は総血清 I g E を減少させる。さらに他の特定の態様では、抗体は、総及び無 I g E を減少させる。さらに特定の態様では、血清 I g E はアレルゲン特異的である。なお更なる特定の態様では、抗体は図 6 A - 6 F の何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖 H V R を含む。なお更なる特定の態様では、抗体は、2 6 A 1 1、2 6 A 1 1 v 1 - 1 6、7 A 6、7 A 6 v 1、4 7 H 4、4 7 H 4 v 1 - 6 からなる群から選択される。なお更なる特定の態様では、抗体は 4 7 H 4 v 5 である。なお更なる特定の態様では、抗体は A D C C 活性を有する。

10

【 0 0 1 4 】

なお更なる実施態様では、本発明は、I g E が媒介する疾患の治療方法であって、アレルギー性疾患の治療の公知の方法の投与の前、投与と同時に、又は投与の後に、I g E の M 1 'セグメントに特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 '抗体の治療上有効量を投与する併用治療投与計画を含む方法を提供する。特定の態様では、併用には、抗 I g E 抗体、抗ヒスタミン剤、気管支拡張剤、糖質コルチコイド、非ステロイド系抗炎症剤、免疫抑制剤、I L - 4 アンタゴニスト、I L - 1 3 アンタゴニスト、二重 I L - 4 / I L - 1 3 アンタゴニスト、鬱血除去剤、咳抑制剤又は鎮痛剤の投与が含まれる。他の特定の態様では、抗 I g E / M 1 '抗体は、アレルゲン感

20

【 0 0 1 5 】

なお更なる実施態様では、本発明は、I g E の M 1 'セグメントに特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 '抗体の治療上有効量を投与することを含む、アレルゲン誘導性の I g E 産生を阻害する方法を提供する。特定の態様では、抗体は、図 6 A - 6 F の何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖 H V R を含む。他の特定の態様では、方法は、I g E を産生する B 細胞を特異的に枯渇させる。さらに他の特定の態様では、方法は、総血清 I g E を減少させる。更なる他の特定の態様では、方法は、無血清および総血清 I g E を減少させる。なお更なる特定の態様では、血清 I g E はアレルゲン特異的である。なお更なる特定の態様では、抗体は、2 6 A 1 1、2 6 A 1 1 v 1 - 1 6、7 A 6、7 A 6 v 1、4 7 H 4、4 7 H 4 v 1 - 6 からなる群から選択される。なお更なる特定の態様では、抗体は 4 7 H 4 v 5 である。なお更なる特定の態様では、抗体は A D C C 活性を有する。

30

40

なお更なる実施態様では、本発明は、I g E の M 1 'セグメントに特異的に結合し、I g E を発現する B 細胞にアポトーシスを誘導する抗 I g E / M 1 '抗体の治療上の有効量を投与することを含む、アレルゲン誘導性の I g E 産生を減少する方法を提供する。特定の態様では、抗体は、図 6 A - 6 F の何れかに示す抗体の重鎖及び軽鎖 H V R を含む。他の特定の態様では、方法は、I g E を産生する B 細胞を特異的に枯渇させる。さらに他の特定の態様では、方法は、総血清 I g E を減少させる。さらに特定の態様では、方法は、無血清および総血清 I g E を減少させる。なお更なる特定の態様では、血清 I g E はアレルゲン特異的である。なお更なる特定の態様では、抗体は、2 6 A 1 1、2 6 A 1 1 v 1 - 1 6、7 A 6、7 A 6 v 1、4 7 H 4、4 7 H 4 v 1 - 6 からなる群から選択される。

50

なお更なる特定の態様では、抗体は47H4v5である。なお更なる特定の態様では、抗体はADCC活性を有する。

【0016】

なお更なる実施態様では、本発明は、先に記載した何れかの方法に有用な組成物を提供する。

なお更なる実施態様では、本発明は、先に記載した何れかの方法のための組成物の用途を提供する。

なお更なる実施態様では、本発明は、7A6.18、1C11.10.20、47G4.6.2、47H4.12.10、42H4.6.9、42A5.20.11、26A11.6.5、51D2.22.15、45C1.6.14、26B11.3.12、28E9.12.9からなる群から選択される標識で、2007年3月21日にATCCに寄託されたマウスハイブリドーマを提供する。特定の態様では、本発明は、寄託されたハイブリドーマによって分泌される抗体を提供する。

なお更なる実施態様では、本発明は、IgEのヒトM1'セグメントを発現するトランスジェニック動物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】ヒト(配列番号:1)、アカゲザル(配列番号:2)およびカニクイザル(配列番号:3)のIgEの選択した定常鎖領域のアラインメントである。CH2、CH3、CH4、M1'、膜貫通および細胞内ドメインのおよその位置を示す。

【図1B】ヒト(配列番号:1、アカゲザル(配列番号:2)およびカニクイザル(配列番号:3)のIgEの選択した定常鎖領域のアラインメントである。CH2、CH3、CH4、M1'、膜貫通および細胞内ドメインのおよその位置を示す。

【図2A-C】図2A-2Cは、様々な抗M1'抗体の特異性を示すFACSスキャッチャードプロットである。図2A-1から2A-6はIgEの短形(M1'なし)に対する結合を示すのに対して、図2B-1から2B-6は長形(M1'あり)に対する結合を示す。図2C-1から2C-6はU266細胞株によって発現されるIgEに対する結合を示す。影を付けた曲線はコントロールAbの蛍光強度を示し、影を付けていない曲線は試験した抗体の相対的な蛍光を示す。

【図2D】図2D-Fは、マウスの抗IgE/M1'抗体47H4、26A11および7A6の結合特異性を示す。図2Dは、47H4はヒト(Human、hu)、アカゲザル(Rhesus、Rh)およびカニクイザル(Cyno)のIgE/M1'に結合するが、M1'を欠くIgEには結合しないことを示す。

【図2E】図2Eは、47H4はU266に結合したが、26A11および7A6は結合しないことを示す。

【図2F】図2Fは、47H4及び7A6はアカゲザル及びカニクイザルのM1'を結合するのに対して、26A11はアカゲザルのみを結合することを示す。

【図2G】図2G-Iは、ヒト化抗IgE/M1'抗体47H5 v.5、26A11 v.6および7A6 v.1の結合特異性を示す。図2Gは、3つすべてのヒト化変異体47H4 v.5、26A11 v.6および7A6 v.1がIgE-M1'に特異的であるが、M1'を欠くIgEには特異的でないことを示す。

【図2H】図2Hは、変異体47H4 v.5および26A11 v.6(しかし、7A6 v.1ではない)がU266を結合することを示す。

【図2I】図2Iは、47H4 v.5及び7A6 v.1はアカゲザル及びカニクイザルのM1'を結合するのに対して、26A11 v.6はアカゲザルM1'のみを結合することを示す。

【図3A-L】図3A-Lは、図3Mに示す段階希釈物を用いた、様々な抗M1'抗体の相対的な結合能親和性を示すFACSプロット線である。図3Nは、各抗体の相対的な親和性を示す。図3Oは、ヒト、アカゲザル及びカニクイザルのM1'に対するスキャッチャード分析によって測定される、マウス抗体47H4、26A11及び7A6の親和性をまとめる。他に示さない限り、示した数は平均値である。図3Pは、ヒト、アカゲザル及

10

20

30

40

50

びカニクイザルのM1'に対するスキッチャード分析によって測定される、抗体のヒト化変異体47H4及び26A11の親和性をまとめる。

【図4A】図4A-Dは、抗M1'抗体の相対的な結合/ブロック研究を示す。図4A-1から4A-20は、結合をブロックしたか又は部分的にブロックした抗体を示すFACSプロットである。

【図4B】図4Bは、他の抗体の相対的な結合ブロック能を示す二次元プロットである(1:1モル比を用いた部分的又は完全なもの)。

【図4C】図4Cは、特に示した抗体に注目した二次元プロットであり、ブロック研究は10:1のモル比で繰り返した。

【図4D】図4Dは、エピトープ結合/ブロック研究から得たグループ化を示す概略図である。

【図5】図5A-Cは、47H4、7A6及び26A11を用いて行ったエピトープ結合研究を示す。図5Aは、エピトープ結合を決定するために用いた、隣接したN-及びC-末端残基(配列番号:3)、及びM1'ペプチド1-5(配列番号:5-19)をそれぞれ含むM1'セグメントを示す。図5B及び5Dは、親マウス抗体47H4がペプチド4を結合し、7A6がペプチド4及び5を結合し、26A11がペプチド7及び8を結合することを示す。図5C及び5Eは、ヒト化変異体47H4v5がペプチド4を結合するのに対して、7A6v1がペプチド4及び5を結合し、26A11v6がペプチド7及び8を結合し、それによって親マウス抗体のエピトープ特異性を保持することを示す。

【図6A-F】マウス抗体26A11、7A6および47H4及びこれらの様々なヒト化変異体の可変軽鎖および重鎖の配列を示す。位置はカバットに従って番号付けを行い、可変のコンセンサスネットワークに移植した高頻度可変領域(軽鎖のI、重鎖のサブグループIII)を囲みで表す。

【図6A】ヒトI軽鎖(配列番号:20)と比較して、26A11(配列番号:21)およびヒト化変異体1、4(配列番号:22)、変異体2、5(配列番号:23)、変異体3、6(配列番号:24)、変異体13、15(配列番号:25)及び変異体14、16(配列番号:26)の可変軽鎖を示す。

【図6B】ヒトI軽鎖(配列番号:20)と比較して、7A6(配列番号:27)及びヒト化変異体1(配列番号:28)の可変軽鎖を示す。

【図6C】ヒトI軽鎖(配列番号:20)と比較して、47H4(配列番号:29)およびヒト化変異体1、3(配列番号:30)及び変異体2、4-6(配列番号:31)の可変軽鎖を示す。

【図6D】ヒトIII重鎖(配列番号:32)と比較して、26A11(配列番号:33)及びヒト化変異体1-3、13、14(配列番号:34)および変異体4-6、15、16(配列番号:35)の可変重鎖を示す。

【図6E】ヒトの重鎖(配列番号:34)と比較して、7A6(配列番号:36)及びヒト化変異体1(配列番号:37)の可変重鎖を示す。

【図6F】ヒトIII重鎖(配列番号:32)と比較して、47H4(配列番号:38)、及びヒト化変異体1、2(配列番号:39)、変異体3-4(配列番号:40)、変異体5(配列番号:41)および変異体6(配列番号:42)の可変重鎖を示す。

【図7A】図7A-Gは、IgE-M1'形質移入Dauidi細胞における親抗M1'抗体のアポトーシス活性を示す。IgMがIgEより高いレベルで発現されることを基本的に示すFACSプロット線である。

【図7B】図7A-Gは、IgE-M1'形質移入Dauidi細胞における親抗M1'抗体のアポトーシス活性を示す。それぞれ、アポトーシスを誘導する際の、架橋抗IgM[F(ab')₂]抗体とカンプトセシンの適用の効果を示す。アネキシンについてポジティブであるが、PIについてネガティブに染色する細胞は死にかけているのに対して、アネキシン及びPIの両方についてポジティブに染色する細胞は死んでいる。

【図7C】図7A-Gは、IgE-M1'形質移入Dauidi細胞における親抗M1'抗体のアポトーシス活性を示す。すべての観察されたアポトーシスをグラフで表す。ここで、

10

20

30

40

50

明るい棒はアネキシン - (+) 及び P I - (-) の細胞を示し、暗い棒はアネキシン - (+) 及び P I - (+) を示す。図 7 D - 7 G は、25、10、1、0.1、0.01 および 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度での抗 M 1' 誘導性アポトーシスをグラフで表す。

【図 7 D】図 7 A - G は、I g E - M 1' 形質移入 D a u d i 細胞における親抗 M 1' 抗体のアポトーシス活性を示す。架橋なしの、エピトープグループ A 1 の M 1' 抗体、例えば 7 A 6、4 7 H 4、4 7 G 4、4 2 A 5、4 2 H 4 (コントロール M A E - 1 1 および G P 1 2 0 とともに) の適用の結果を示す。

【図 7 E】図 7 A - G は、I g E - M 1' 形質移入 D a u d i 細胞における親抗 M 1' 抗体のアポトーシス活性を示す。架橋なしの、エピトープグループ A 2 の M 1' 抗体、例えば 1 C 1 1、2 6 A 1 1、5 1 D 2、4 5 C 1、及び、エピトープグループ B / C の M 1' 抗体、例えば 2 6 B 1 1 および 2 8 E 9 の適用の結果を示す。

【図 7 F】図 7 A - G は、I g E - M 1' 形質移入 D a u d i 細胞における親抗 M 1' 抗体のアポトーシス活性を示す。架橋を有するエピトープグループ A 1 を示す。

【図 7 G】図 7 A - G は、I g E - M 1' 形質移入 D a u d i 細胞における親抗 M 1' 抗体のアポトーシス活性を示す。架橋を有するエピトープグループ A 2 および B / C を示す。

【図 8 A - C】図 8 A - B は、25、10、1、0.1、0.01 および 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で様々なヒト化抗 M 1' 抗体変異体にて処理した I g E - M 1' を形質移入したダウディ細胞におけるヒト化抗 M 1' 変異体のアポトーシス活性を示す。図 8 A は、ヒト化変異体 4 7 H 4 v 5、2 6 A 1 1 v 6 および 7 A 6 v 1 がより高い濃度レベル(すなわち 10 - 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 4 7 H 4 および 2 6 A 1 1 変異体、1、10 および 25 μg の 7 A 6 変異体)で 30 - 40 % の範囲のアポトーシスを誘導することを示す。図 8 B は、ヤギ抗ヒト I g G F (a b ')₂ 架橋結合抗体の存在下で処理される I g E - M 1' 形質移入ダウディ細胞に対する同じ抗体のアポトーシス活性を示す。抗体はすべて、70 - 90 % の最大のアポトーシスレベルを誘導し、いくつかは高濃度でアポトーシス活性を低減した(例えば 4 7 H 4 - v 1、- v 2、2 6 A 1 1 - v 1、- v 1 4)。図 8 C は、野生型および無フコシル化された 4 7 H 4 v 5 が類似のレベルでアポトーシスを誘導することが可能であったことを示す。

【図 9 A - B】ダウディ - I g E / M 1' 細胞においてカルシウム流量を誘導するマウス抗 M 1' 抗体の能力を示す。図 9 A は、抗 I g M および M A E 1 1 の作用を示すコントロールであるのに対して、図 9 B 1 - B 2 は、示したマウス抗 M 1' 抗体の適用の効果を示す。

【図 10】ヒト化抗 I g E / M 1' 抗体 4 7 H 4 v 5 w t および無フコシル化された変異体の A D C C 誘導能を示す。w t と無フコシル化された変異体は同等の最大の細胞毒性を引き起こすが、無フコシル化された変異体(「A F」)は野生型よりも効果が強い(E C 50 A F 0.83 nM、E C 50 w t 6.6 nM)。

【図 11 A】図 11 A - F は、マウス抗 I g E / M 1' 抗体の重鎖および軽鎖の完全長配列である。可変領域を斜体で表し、H V R (高頻度可変領域) を下線で表す。マウス抗体 7 A 6 (配列番号: 43 および 44) の重鎖および軽鎖をそれぞれ示す。

【図 11 B】図 11 A - F は、マウス抗 I g E / M 1' 抗体の重鎖および軽鎖の完全長配列である。可変領域を斜体で表し、H V R (高頻度可変領域) を下線で表す。マウス抗体 4 7 H 4 (配列番号: 45 および 46) の重鎖および軽鎖をそれぞれ示す。

【図 11 C】図 11 A - F は、マウス抗 I g E / M 1' 抗体の重鎖および軽鎖の完全長配列である。可変領域を斜体で表し、H V R (高頻度可変領域) を下線で表す。マウス抗体 2 6 A 1 1 (配列番号: 47 および 48) の重鎖および軽鎖をそれぞれ示す。

【図 11 D】図 11 A - F は、マウス抗 I g E / M 1' 抗体の重鎖および軽鎖の完全長配列である。可変領域を斜体で表し、H V R (高頻度可変領域) を下線で表す。マウス抗体 4 5 C 1 (配列番号: 49 および 50) の重鎖および軽鎖をそれぞれ示す。

【図 11 E】図 11 A - F は、マウス抗 I g E / M 1' 抗体の重鎖および軽鎖の完全長配列である。可変領域を斜体で表し、H V R (高頻度可変領域) を下線で表す。マウス抗体 2 8 E 9 (配列番号: 51 および 52) の重鎖および軽鎖をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

【図11F】図11A-Fは、マウス抗IgE/M1'抗体の重鎖および軽鎖の完全長配列である。可変領域を斜体で表し、HVR(高頻度可変領域)を下線で表す。マウス抗体1C11(配列番号:53および54)の重鎖および軽鎖をそれぞれ示す。

【図12A-I】マウス抗IgE/M1'抗体の有するアトピーhu-SCIDモデルにおける血清IgEおよびIgEを産生するプラズマ細胞の産生を阻害する能力を示す。図12Aは、実験の設定をグラフで表す。図12B-Cは、マウス抗IgE/M1'抗体による処理によって、IgEレベルが65-84%減少したことを示す。図12D-Eは、インビボでIgEを産生する細胞の減少が19-69%であったことを示す。図12F-Gは、他の免疫グロブリン(例えば、IgG1-4、IgA、IgM)のレベルが相対的に影響を受けなかったことを示す。図12H-Iは、脾臓のプラズマ細胞の合計数の減少は観察されなかったことを示す。

10

【図13A-H】アトピーhu-SCIDモデルにおける免疫グロブリンレベルに対するヒト化変異体47H4v5の効果を示す。図13Aは、実験の設定をグラフで表す。図13B-Dは、血清IgEが79%減少し、IgEを産生するプラズマ細胞が75%減少したことを示す。図13E-Fは、他の血清免疫グロブリンレベルの減少はないことを示す。図13G-Hは、総プラズマ細胞レベルの減少はなかったことから、47H4はIgEを産生するプラズマ細胞を特に減少させるが、それは総プラズマ細胞の中で非常に割合が小さいことを示す。

【図14A】図14A-DはhuM1'ノックインマウスの作製を示す。マウスIgE遺伝子座上のM1'エキソンの位置を示す。

20

【図14B】図14A-DはhuM1'ノックインマウスの作製を示す。標的対立遺伝子が生じるマウスIgE遺伝子座の組換えの概略図を示す。

【図14C】図14A-DはhuM1'ノックインマウスの作製を示す。wtマウスの668bpバンドとM1'ノックインの457bpバンドのPCR遺伝子タイピングを示す。

【図14D】図14A-DはhuM1'ノックインマウスの作製を示す。wtマウスでの7.4kBのHindIII断片がhu-M1'ノックインでは3kBの断片になっており、14.1kBのBamHI断片がhu-M1'ノックイン対立遺伝子では18.1の断片になっている、サザンブロットを示す。野生型およびヘテロ接合のマウスの両方を示す。

【図15A-I】抗IgE/M1'抗体が有する一次免疫応答でのIgEの生成を予防する能力を示す。図15Aは、TNP/OVA及び抗IgE/M1'抗体の投与を含む、実験計画のスケジュールを示す図式である。図15Bは、経時的な抗原特異的IgEレベルのグラフであり、コントロール動物(すなわちgp120)抗原特異的IgEレベルは8日目と14日目の間でピークレベルに達したのに対して、抗IgE/M1'は一切の増加を防ぎ、測定された抗原特異的IgEレベルは免疫化していないマウスとは有意に異なっていたことを示す。図15C-Dは、抗IgE/M1'処置は8日目と14日目のそれぞれで抗原特異的血清IgEの増加を防ぎ、免疫化していないマウスと統計学的な違いがなかったことを示す(図15E)。図15F-Iは抗原特異的IgG1のレベルは、28日の実験期間では抗IgE/M1'の影響を有意に受けなかったことを示す。

30

【図16A-K】抗IgE/M1'抗体が有する、記憶又は二次の免疫応答での抗原特異的IgEの生成を防ぐ能力を示す。図16Aは、TNP-OVAの二次的追加免疫と抗IgE/M1'抗体の投与のスケジュールを示す図式であり、28日目に最初の投与を行った。図16Bは、経時的な抗原特異的IgEレベルのグラフであり、28日目のTNP-OVA追加免疫に対する二次的IgE応答は急速なものであり、一次応答の8-9日と比べ、4日後にピークとなることを示す。図16C-Dは、抗IgE/M1'処置動物における抗原特異的IgEレベルは、アイソタイプコントロールと比べて有意に減少しており、32日目までに59-65%、35日目までに90-93%であることを示す。図16Eは、42日目(抗IgEの12日初期投与)までに、抗原特異的IgEレベルが、ナイーブコントロールマウスと統計学的に異なるレベルまでに減少されたことを示す。図16F-Hは、28日目と49日目の間に、抗IgE/M1'の投与により血清IgEレベ

40

50

ルが74 - 84%減少し、抗原特異的IgEレベルの平均日当たりのレベルも74 - 83%減少したことを示す。図16I - Kは、抗原特異的IgG1のレベルは抗IgE/M1'の影響を有意に受けなかった。

【図17A - D】抗IgE/M1'抗体が有する、ブラジル鉤虫(「NB」)感染に应答したIgEの産生を予防的に減少させる能力を示す。図17Aは、実験の設定を示す図式である。動物は、0日目から開始し21日目まで週3回処置した。図17Bは、抗IgE/M1'及びコントロール抗体によるNB感染に应答した経時的なIgEレベルを示す。図17C - Dは、15日目に抗IgE/M1'処置動物が血清IgEレベルを減少しており、未感染マウスと統計学的な有意差がないことを示す。

【図18A - I】抗IgE/M1'抗体が有する、ブラジル鉤虫(「NB」)感染に対するピークのIgE応答を治療的に処置する能力を示す。図18Aは、実験の設定を示す図式である。動物は、11日目と21日目の間週3回処置した。図18Bは、抗IgE/M1'及びコントロール抗体によるNB感染に应答した経時的なIgEレベルを示す。図18C - Dは、抗IgE/M1'により4日間の処置で82 - 89%の血清IgEレベルが減少したことを示す。図18Eは、21日目までに、抗IgE/M1'処置動物のIgEレベルが97 - 98%減少し、未感染コントロール群とは統計学的に有意に異なるレベルに達したことを示す。図18F - Gは、リンパ節及び脾臓のIgE産生プラズマ細胞(エリスポットによって定量される)がそれぞれ88 - 94%及び57 - 66%減少したことを示す。図18H - Iは、リンパ節及び脾臓の総プラズマ細胞(CD138+)は未感染マウスと比較してすべての処置群で増加したこと、抗IgE/M1'による処置はいずれの臓器のプラズマ細胞の総数を有意に変化させなかったことを示す。これらの結果は、抗IgE/M1'抗体が有する、生体内のIgE産生細胞を枯渇させることによる血清IgEレベルの低減能を示す。

【図19A - G】抗IgE/M1'抗体が有する、ブラジル鉤虫(「NB」)感染への感染サイクルの遅延を生じさせるIgE応答を治療的に処置する能力を示す。図19Aは、実験の設定を示す図式であり、ここで動物は40日目に週3回の処置を開始した。図19Bは、ピークIgE産生が15日目辺りに生じたこと、すべての抗IgE/M1'抗体が血清IgEを減少させたことを示す。図19C - Dは、処置の開始時と比較して、抗IgE/M1'抗体が、無条件及び正規化した両IgEレベルをそれぞれ有意に減少させたことを示す。図19E - Gは、抗IgE/M1'処置により、48日目と55日目の間に抗gp120mIgG1アイソタイプコントロールと比較して、血清IgEレベルが有意に減少したことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

本明細書中で示すすべての文献は出典明記によって特別に援用される。

一般的な技術

本発明の実施は、特に明記しない限り、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を使用するものであり、これらは当分野の技術の範囲内である。このような技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds 1987, and periodic updates); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., ed., 1994); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988); Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas et al., 2001)等の文献において十分に説明されている。

【0019】

リンパ球発達と活性化

ヒトのリンパ球の2つの主なタイプは、T(胸腺由来)とB(骨髄由来)である。これらの

細胞は、リンパ系の発達経路に専従していた胎児肝臓と骨髄の造血性幹細胞から得られる。これらの幹細胞の後代(プロジェニー)は分岐経路を経て、B又はTリンパ球に成熟する。ヒトBリンパ球発達は骨髄内で完全に起こる。一方では、T細胞は、髄を離れる未成熟な前駆体から発達し、血流を介して胸腺に移動し、そこで増殖して成熟したTリンパ球に分化する。

胸腺又は骨髄から現れる成熟したリンパ球は静止であるか、「静止」状態にある、すなわち、これらは有糸分裂的に不活性である。血流に分散されると、これらの「ナイーブ」又は「バージン」リンパ球は、様々な二次ないしは末梢リンパ系の器官、例えば脾臓、リンパ節又は扁桃腺に移動する。ほとんどのバージンリンパ球は本質的に寿命が短く、髄又は胸腺を離れて2、3日もせず死ぬ。しかしながら、このような細胞が抗原の存在を示すシグナルを受け取ると、活性化し、連続した期間の細胞分裂を経る。その後、結果として生じる後代細胞には、休止状態に戻り、基本的には刺激するアレルゲンと次に遭遇するときに備える記憶リンパ球BおよびT細胞になるものがある。活性化されたバージンリンパ球の他の後代細胞はエフェクター細胞であり、2、3日しか生存しないが、特定の防御活性を発揮する。

【0020】

リンパ球活性化は、刺激を受けて分化し後代細胞を製造し、その後代細胞のいくつかはエフェクター細胞になるような、静止リンパ球が経る順に連続した事象を指す。完全な応答には、細胞増殖(マイトジェネシス)の誘導および免疫学的機能の発現が含まれる。特定のリガンドがそれらの表面上のレセプターに結合すると、リンパ球は活性化される。リガンドはT細胞およびB細胞で異なるが、結果として生じる細胞内生理学的メカニズムは類似している。

外来の抗原自体がリンパ球活性化を誘導しうるが、特に大きな多量体抗原はB細胞上の表面免疫グロブリン、又はT細胞上の他の糖たんぱく質を架橋する。しかしながら、ほとんどの抗原は多量体でなく、多くの数のB細胞に直接結合する場合であっても活性化を起こさない。B細胞は近くで活性化されたヘルパーTリンパ球と同時に刺激されると、これらのより共通した抗原によって活性化される。このような刺激はT細胞によって分泌されたリンホカインから生じてよいが、あるB細胞表面レセプターと相互作用して二次的シグナルを生成する、T細胞表面タンパク質とB細胞との直接接触により効果的に伝達される。

【0021】

B細胞

B細胞の決定的な特徴は免疫グロブリンの合成能である。免疫グロブリン(Ig)は、重鎖及び軽鎖と呼ばれる関連した種類のポリペプチドからなる極めて多様なタンパク質のファミリーである。それぞれのIgは各々の特定の抗原に高い親和性で特異的に結合する。成熟B細胞は2つの異なる形態の免疫グロブリンを発現し、それぞれは固有の機能を有している。静止Bリンパ球(バージン又はメモリー)では、免疫グロブリンは細胞表面だけに発現され、ここで、基本的に特定の抗原のための膜結合型レセプターとして作用する。対照的に、B細胞エフェクター細胞(プラズマ細胞)は、周囲の環境に免疫グロブリンを分泌する。このような分泌された免疫グロブリンは、認識して、結合する能力を保持し(静止B細胞上の膜結合型と比べて)、一般的に抗体と称される。

活性化されたBリンパ球が分化すると、その後代細胞のいくつかはメモリーB細胞となり、残りはプラズマ細胞に分化する。プラズマ細胞は比較的生存期間が短いので、新しいプラズマ細胞が製造されない限り、細胞集団はすぐに死に絶え、もはや免疫グロブリンが分泌されなくなる。結果として、B細胞の活性化は典型的に増殖の過渡的な波を引き起こし、その後数日又は数週間にわたって増加した後に弱まる爆発的な抗体の分泌が起こる。B細胞は、液性免疫か又は組織液を介して媒介される保護効果に關与する主要な細胞種である。本発明の抗IgE/M1'抗体は実際にはメモリーB細胞を含むB細胞を枯渇させるので、記憶を「リセットする」ために用いられうる。したがってこの効果は、個体のアレルギー応答を制御しているB細胞構成成分が取り除かれなかった場合に減弱されるも

10

20

30

40

50

のでありうる。

【 0 0 2 2 】

T 細胞

Tリンパ球は免疫グロブリンを発現しないが、その代わりに、T細胞レセプターと呼ばれる表面タンパク質を介して外来物質の存在を検出する。これらのレセプターは、直接接触によるか、または他の免疫細胞の活性に影響することで抗原を認識する。マクロファージと共に、T細胞は、細胞媒介性免疫に関与する主な細胞種である。

B細胞とは異なり、T細胞は、特定の関係においてのみ外来物質を検出する。特にTリンパ球は初めに小ペプチドに切断された場合にのみ外来性タンパク質を認識し、その後抗原提示細胞(APC)と呼ばれる、二次宿主細胞の表面上に提示される。宿主細胞の多くはある条件下で抗原を表すが、ある種の宿主細胞は本目的に特に適用し、T細胞活性の制御に特に重要で、マクロファージおよび他のB細胞を含む。抗原提示は、提示細胞の表面上の、主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質と呼ばれる特定のタンパク質にある程度依存する。ゆえに、細胞性免疫を刺激するために、外来ペプチドはMHCペプチドと組み合わせさせてT細胞に提示されなければならない、この組合せはT細胞レセプターによって認識されなければならない。

【 0 0 2 3 】

細胞障害性リンパ球(Tc細胞又はCTL)とヘルパーT細胞(TH)細胞の2つの有意なT細胞サブセットがある。これらはマーカーCD8とCD4の細胞表面発現を基におおよそ識別される。Tc細胞はウイルス防衛において重要であり、ウイルスペプチドが発現した特定の細胞表面を認識することによって、直接ウイルスを殺すことができる。TH細胞は、他の細胞型の増殖、成熟および免疫学的機能、例えばB細胞、マクロファージおよび細胞障害性T細胞の活性を制御するリンホカイン分泌を促す。パーズンおよびメモリーTリンパ球は通常休止状態のままであり、この状態でそれらは有意なヘルパー又は細胞毒性活性を表さない。活性化されると、これらの細胞は娘細胞を生産するために数ラウンドの有糸分裂を経る。これらの娘細胞のいくつかはメモリー細胞として休止状態に戻るが、他は活発に細胞毒性活性を促すエフェクター細胞になる。これらの娘細胞はそれらの親に似ており、CD4+細胞はCD4+プロジェニーのみを生産するが、CD8+細胞はCD8+プロジェニーのみを産出する。エフェクターT細胞は、休止T細胞に発現されない細胞表面マーカー、例えばCD25、CD28、CD29、CD40L、トランスフェリンレセプターおよびクラスII MHCタンパク質を発現する。活性化刺激がなくなると、エフェクター細胞が死ぬか休止状態に戻るに連れて、細胞障害性又はヘルパー活性は数日の期間にわたって徐々に鎮静する。

B細胞活性化と同様に、ほとんどの抗原に対するTリンパ球応答も2つのタイプの同時刺激を必要とする。第一は、抗原提供細胞上のMHCタンパク質によって適切に表出される抗原であり、認識され、T細胞レセプターに結合される。この抗原-MHC複合体が細胞内部にシグナルを送る一方、それは通常、T細胞を活性化させるには不十分である。ヘルパーT細胞に伴うような完全な活性化には、抗原提示細胞の表面上に発現される同時刺激因子と称される他の特定のリガンドとの同時刺激が必要である。一方では、細胞障害性T細胞の活性化は一般に、活性化されたヘルパーT細胞によって分泌されるサイトカインであるIL-2を必要とする。

【 0 0 2 4 】

免疫応答

他の体の防衛能力とは区別される哺乳類の免疫系の3つの主な機能的特性には以下のものがある。(1)特異性 - 膨大な数の標的分子の中から個別に認識して応答するか否かの能力、(2)識別 - 無数のタンパク質と他の有機成分のすべてと平和に共存するために自己と非自己を決定し、なおかつ体内に導入される外来性成分に対して積極的に応答する能力、(3)記憶 - 特定の外来性病原体と次に遭遇したときに、初めて遭遇した時よりもより迅速かつ積極的に応答できるように、経験によって養われる能力。本発明のIgEアンタゴニストがIgEを持つB細胞のアポトーシスを誘導するので、それらは特定の抗原に対する

免疫メモリー減弱するか又は消すと思われる。これは、アトピー性疾患の場合のように、一般的なアレルゲンに対する活発な免疫応答が病理学的である場合に特に利点があると思われる。

バージンリンパ球は末梢に一次リンパ系器官から絶えず放出され、各々が抗原結合を可能にする表面レセプターを持っている。B細胞での抗原結合は表面結合免疫グロブリンが介しているのに対して、T細胞での抗原結合はT細胞レセプターに介されている。バージンリンパ球が活性化されないと、それらは末梢に入った後に数日間で死ぬ。活性化されたものは生き延び、増殖し、その後活性化と増殖のサイクルを経る娘細胞を産出する。ある抗原への応答の速さと強さは主にクローン選別によって決定される。特定の抗原に特異的な娘細胞やクローンの集団が多ければ多いほど、認識し、免疫応答に關与しうる細胞の数が多くなる。すべての免疫応答は複雑で、数種の細胞を伴う連続的な事象を複雑に制御する。免疫原が体内に入り、抗原提示細胞（APC）と呼ばれる特異化された細胞クラスに出会うと、誘発される。これらAPCはごく微量の免疫原を捕捉し、抗原特異的ヘルパーTリンパ球によって認識されうる形態でそれを表出する。次いでヘルパーT細胞が活性化し、次に、B細胞や細胞傷害性T細胞などの他のクラスのリンパ球の活性化を促す。その後、活性化されたリンパ球は増殖し、その特異なエフェクター機能を実行する。この工程の各段階では、リンパ球とAPCは、直接接触して又は制御サイトカインを分泌することによって互いに連絡している。

【0025】

APCによって捕獲される外来性抗原は抗原プロセッシングと称される連続した変更を受ける。このプロセッシング、特にタンパク質性の免疫原は、変性と部分的なタンパク質分解を伴い、免疫原は短いペプチドに切断される。次いで、結果として生じたペプチドの限られた数がクラスII MHCタンパク質と非共有結合的に結合し、APC表面に移動する。これは抗原提示と呼ばれる工程である。APCと直接接触するCD4+ヘルパーT細胞は活性化されるが、APCによって提示される特定のペプチド-MHC複合体を認識して、結合することができるT細胞レセプタータンパク質を発現した場合にのみそうなる。

ヘルパーT（ T_H ）細胞は、細胞傷害性T（ T_c ）細胞と抗体分泌プラズマ細胞の2つの他のリンパ系エフェクター細胞の活性化に必要なので、免疫応答の主要な編成体である。 T_H 活性化は免疫応答の初期に生じ、少なくとも2つのシグナルを必要とする。CD3タンパク質複合体により伝達される、APC表面上の抗原ペプチド-MHC複合体へT細胞抗原レセプターが結合することにより、シグナルが一つ生じ、APCによる2つ目の共刺激シグナルは、APC上の特定のリガンドとのT細胞表面上の異なるシグナル伝達タンパク質の結合によるものだと思われる。ある知られた相互作用は、T細胞タンパク質CD28とB7として知られるAPC表面タンパク質のファミリーである。他の表面タンパク質対も共刺激を媒介するかもしれない。

まとめると、2つのシグナルは、ヘルパーT細胞を誘導し、インターロイキン-2（IL-2）として知られるサイトカインを分泌させ始めると共に、その表面上の特定の高親和性IL-2レセプターを発現させ始める。IL-2は、Tリンパ球のための極めて強力なマイトジェン因子であり、活性化したT細胞の増殖応答に必須である。分泌する細胞上のIL-2の効果、これは自己分泌作用として知られる事象である。さらに、T細胞は両シグナルを受け取った場合であっても、自身の表面IL-2レセプターが遮断されていれば増殖しないことが知られている。また、IL-2はすぐ近傍の細胞に働く。これはパラ分泌作用と呼ばれる。この作用は、 T_c 細胞を活性化するために特に重要であり、一般に、その増殖を刺激するために十分なIL-2を産生しない。IL-2に加え、活性化した T_H 細胞は他のサイトカインを分泌し、B細胞、マクロファージ及び他の細胞種の増殖、分化及び機能を促す。

APCと抗原特異的 T_H 細胞との接触はAPCへの作用も有しており、その重要なものの一つがIL-1の放出である。このサイトカインは、自己分泌様式で働き、クラスII MHCタンパク質とさまざまな接着分子の表面発現を増加させ、これによって T_H 細胞の結合を強くさせ、抗原提示を亢進させると考えられている。同時に、IL-1はパラ分

10

20

30

40

50

泌様式で T_H 細胞上で機能し、 $IL-2$ 分泌及び $IL-2$ レセプター発現を促す。

【0026】

前述の様式で T_H 細胞が活性化される間、B細胞の中には抗原レセプターを介して免疫原を結合するものもあり、これは後に分泌する抗体の膜結合型である。T細胞とは異なり、B細胞はフリーでプロセッシングされない形態で免疫原を認識する。特定の抗原結合によりB細胞活性化を引き起こしうるある種のシグナルが生じる。活性化された T_H 細胞により2つ目のタイプが生じる。表面上の非免疫グロブリンレセプターへ結合することによりB細胞の活性化を促すタンパク質を発現する。これら、その抗原特異性に関わらずいずれかのB細胞に働く T_H 作動性シグナルは、ヘルパー因子といわれる。これらヘルパー因子には $IL-2$ 、 $IL-4$ 及び $IL-6$ が含まれる。しかしながら、これは細胞-細胞接触により効率良く促され、T細胞表面上のタンパク質がB細胞上のタンパク質と直接接触できる。 T_H 細胞が活性化された後にのみ T_H 細胞上に発現される $CD40$ リガンド ($CD40L$) と称されるタンパク質が、B細胞上の $CD40$ と称されるタンパク質に結合すると、接触媒介性促進の最も効果的な形態が生じる。バースタンダー活性化といわれる工程では、活性化B細胞との接触は、たとえその表面免疫グロブリンが抗原と係合していない場合であっても、休止B細胞を活性化するために十分である。

10

T 細胞リンパ球は、ウイルス感染宿主細胞などの表面上の外来抗原を発現する細胞を除去するように機能する。ほとんどの T 細胞は、 $CD40$ よりも $CD8$ を発現するので、クラスIIよりもクラスIのMHCタンパク質と関連して抗原を認識する。体細胞がウイルスに感染すると、いくつかの免疫原性ウイルスタンパク質は細胞内でプロセッシングを受け、結果として生じるペプチドがクラスI MHC分子との表面複合体として現れうる。次いで、これらペプチド-MHC複合体は、抗原特異的クローンのT細胞レセプターによって認識され、 T 細胞活性化に必須な2つのうちの1つのシグナルを生じる。この第一シグナルは単独で、 T 細胞上の高親和性 $IL-2$ レセプターを誘導する。第二シグナルは、近傍の活性化 T_H リンパ球から分泌される $IL-2$ によって生じる。両シグナルを受けると、活性化 T 細胞は細胞障害活性を獲得し、結合した細胞、並びに同じペプチド-MHCクラスI複合体を持つ任意の他の細胞を殺すことができる。ある場合では、 T 細胞は標的細胞へ特定の毒素を放出するので、殺傷が生じ、また他の場合では、 T 細胞はアポトーシスにより標的細胞を自殺させる。また、活性化 T 細胞は増殖し、同じ抗原特異性を有する他の T 細胞を生じさせる。

20

30

【0027】

IgE / マスト細胞 / 仲裁経路

IgE 抗体は、 $Fc\gamma R1$ と称される高親和性の細胞表面レセプターへの分子の Fc 部分で、マスト細胞と好塩基球の表面に固定される。多価のアレルゲン分子がこれらレセプターを占めている抗体に結合すると、アレルギー応答が始まる。結果として $Fc\gamma R1$ の架橋が生じ、次に、ヒスタミン、ロイコトリエン、化学走性因子、血小板活性化因子およびプロテイナーゼ等の、炎症のメディエーターの放出および活性化が細胞内に生じるシグナルが伝達される。これらの活性化されたメディエーターは局所的に作用し、血管透過の増加、血管拡張、平滑筋収縮および粘液腺分泌を引き起こす。このような現象は、臨床的に即時性又は早期段階と呼ばれ、アレルギー曝露後、始めの15 - 30分以内に起こる。その後12時間にわたって、完全に解明されていないが他の化学的メディエーターに応答して、炎症性細胞の進行性の組織浸潤があり、好中球から単核細胞に対する好酸球まで進展する。このアレルギー曝露後6 - 12時間の期間は後期と称し、細胞の炎症の臨床上の兆候を特徴とする。特に肺の後期応答は初期応答がなく生じるので、後期応答が必然的に IgE に媒介されるか否かは、依然として完全には解明されていない。

40

このメカニズムは、主にアナフィラキシー、蕁麻疹およびアトピー性疾患、例えばアレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎およびアレルギー性胃腸疾患の原因となる。

【0028】

エフェクター T リンパ球 / リンホカイン経路

50

特定のアレルギー性疾患は、前回の曝露により特定の抗原に対する感作を受けたエフェクターTリンパ球との抗原応答によって媒介される。抗原と遭遇すると、CD4+T細胞は活性化されてリンホカインを生成するようになり、この結果、数日の期間にわたって単核細胞の浸潤が堆積する。

【0029】

I. 定義

「抗原」又は「免疫原」は免疫応答を誘発しうる任意の分子である。ここで使用しているように、この用語は、抗原性分子自体又はその供与源、例えば花粉粒、動物の鱗屑、昆虫毒物又は食品を包含する。これに対して、抗原なる用語は、免疫グロブリン又はT細胞レセプターによって特異的に認識される分子を指す。免疫応答を誘導することが可能な任意の外来物質も抗原となりうる。天然及び合成の起源の多くの異なる化学物質は抗原性であることが知られている。複雑な天然有機化学物質、特にタンパク質は抗体が媒介するアレルギーを引き起こしうるのに対して、単純な有機化合物、無機化合物及び金属はT細胞が媒介するアレルギーをより選択的に引き起こす。場合によって、同じ抗原は、複数の種類のアレルギーの原因となりうる。抗原への曝露は、吸入、注射、注入又は皮膚接触によるものであってもよい。

【0030】

「抗体」なる用語は、例えば、モノクローナル抗体(免疫グロブリンFc領域を有する完全長抗体を含む)、多エピトープ特異性を有する抗体成分、多特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、ダイアボディ及び一本鎖分子、並びに抗体断片(例えば、Fab、Fab')₂及びFv)を含む。「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである。IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、IgA抗体は重合してJ鎖と組み合わせさせて多価集合を形成することができる、基本的4-鎖ユニットのうちの2~5つを含む。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、及び鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、μ及びアイソタイプに対しては4つのC_Hドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。V_LはV_Hと整列し、C_Lは重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。V_LとV_Hは共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ、及びμと呼ばれる重鎖を有する。さらに及びのクラスは、C_H配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

【0031】

「単離された」抗体は、その生成環境の成分から(例えば天然に又は組み換えて)同定され分離及び/又は回収されたものである。好ましくは、単離されたポリペプチドはその

10

20

30

40

50

生成環境からの他のすべての成分と結合していない。組換え形質転換細胞から生じたものなどの、その生成環境の汚染成分とは、その抗体の研究、診断又は治療への使用を典型的に妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)例えばローリー法で測定した場合95%を越える抗体、ある実施態様では99重量%を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチド又は抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

10

【0032】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。重鎖の可変ドメインは「VH」と称されうる。軽鎖の可変ドメインは「VL」と称されうる。これらのドメインは(同じクラスの他の抗体と比較して)一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。Vドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。代わりに、軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな-シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、-シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)における抗体の寄与を示す。

20

【0033】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量存在するであろう自然発生し得る突然変異及び/又は翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化)を別にすれば同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に認識する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基を認識する。それらの特性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培地で合成され、他のイムノグロブリンと混ざらないという点で有利である。「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al.: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132

30

40

50

(2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の一部又は全部、或るいはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術(例えば、国際公開第98/24893号;国際公開第96/34096号;国際公開第96/33735号;国際公開第91/10741号;Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); 米国特許第5545807号;同第5545806号;同第5569825号;同第5625126号;同第5633425号;同第5661016号; Marks et al., Bio. Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)及びLonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。

【0034】

「ネイキッド抗体」なる用語は、細胞障害性部分又は放射性標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。

「完全長抗体」、「インタクト抗体」又は「全抗体」なる用語は交換可能に用いられ、抗体断片とは対照的に、実質的にインタクトな形態の抗体を指す。特に全抗体には、Fc領域を含む重鎖および軽鎖を有するものが含まれる。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えばヒトの天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であってもよい。場合によって、インタクトな抗体は一又は複数のエフェクター機能を有してもよい。

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片;ダイアボディ(diabodies);直鎖状抗体(米国特許第5641870号、実施例2; Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]);単鎖抗体分子;及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0035】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)からなる。各Fab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きなF(ab')₂断片が生じ、これは異なる抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むC_H1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。F(ab')₂抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

Fc断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のH鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるFcレセプター(FcR)によって認識される部位である。

【0036】

「Fv」は、完全な抗原-認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内

に結合した V_H 及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、 sFv ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それは sFv が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。 sFv の概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

【0037】

本発明の抗体の「機能的断片」は、一般に、FcR結合能を保持する抗体のFc領域又は抗体の抗原結合領域ないし可変領域を含む、インタクト抗体の一部を含む。抗体断片の例には、線形抗体、単鎖抗体分子、及び抗体断片から形成される多特異性抗体が含まれる。

10

「ダイアボディ」なる用語は、 V_H と V_L ドメインとの間に、短いリンカー(約5~10残基)を持つ sFv 断片(前の段落を参照)を構築することにより調製され、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるようになった、小さい抗体断片を指す。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」 sFv 断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体の V_H 及び V_L ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号; 国際公開93/11161号; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に詳細に記載されている。

【0038】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それは重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び/又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体並びに該抗体の断片において、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第4816567号; 及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、抗体の抗原結合領域が例えば対象の抗原をマカクザルに免疫投与することによって作製される抗体に由来している、PRIMATIZED(登録商標)抗体が含まれる。ここで用いられる「ヒト化抗体」は「キメラ抗体」のサブセットとして用いられる。

20

30

【0039】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び/又は能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は結合親和性などの抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろうが、FR領域は、結合親和性、異性化、免疫原性などの抗体の性能を改善する個々のFR残基置換を一又は複数含んでよい。FR内のこれらアミノ酸置換の数は、典型的にH鎖内で6を超えず、L鎖内で3を超えない。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと。また、例えばVaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035

40

50

-1038 (1995) ; Hurle及びGross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) ; 及び米国特許第 6 9 8 2 3 2 1 号及び同第 7 0 8 7 4 0 9 号を参照のこと。

【 0 0 4 0 】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を有するもの、及びノ又は本明細書中に開示したヒト抗体をつくるためのいずれかの技術を使用して、つくられたものである。この定義におけるヒト抗体は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特別に除く。また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む、当分野で公知の様々な技術を用いて製造することができる。Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991) ; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。また、Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) ; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)に記載の方法もヒトモノクローナル抗体の調整のために有用である。また、van Dijk and van de Winkel, *Curr. Op in. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)も参照のこと。抗原刺激に应答して抗体を産生するように修飾されているが、その内在性遺伝子座が無効になっているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウスに抗原を投与することによってヒト抗体を調製することができる(例として、XENOMOUSE^{T M}技術に関する米国特許第 6 0 7 5 1 8 1 号及び同第 6 1 5 0 5 8 4 号を参照)。また、例えば、ヒトのB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体に関するLi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)も参照のこと。

【 0 0 4 1 】

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及びノ又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み；VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。天然の抗体では、H3及びL3は6つの高頻度可変領域のうちで最も高い多様性を示す、特にH3は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすように思われる。Xu等 (2000) *Immunity* 13:37-45 ; *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)のJohnson and Wu (2003)。実際、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が無い状態で安定である。Hamers-Casterman等 (1993) *Nature* 363:446-448 ; Sheriff等 (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736。

多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、カバットCDRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat Numbering)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia Numbering)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

【 0 0 4 2 】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、V Lの24 - 36又は24 - 34(L1)、46 - 56又は50 - 56(L2)及び89 - 97又は89 - 96(L3)と、V Hの26 - 35(H1)、50 - 65又は47 - 65(好適な実施態様)(H2)及び93 - 102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々の拡大高頻度可変領域を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82b及び82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

【0043】

本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られるV L又はV Hフレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含有してもよい。ある実施態様では、既存のアミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下又は2以下である。

【0044】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV L又はV Hフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンV L又はV H配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、V Lについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループIである。一実施態様では、V Hについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループIIIである。

「V HサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、上掲のKabat等の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。一実施態様では、V HサブグループIIIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

EVQLVESGGGLVQPGLSRRLSAAAS (H1)(配列番号:55), WVRQAPGKGLEWVA (配列番号:56)(H2), RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAR (配列番号:57)(H3), WQQGTLTVSS (配列番号:58)(H4)

「V LサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変軽鎖サブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。一実施態様では、V HサブグループIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (配列番号:59)(L1), WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号:60)(L2), GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC (配列番号:61)(L3), FGQGTKVEIKR (配列番号:62)(L4)

【0045】

特定位置、例えば、Fc領域「におけるアミノ酸修飾」とは、特定されたアミノ酸残基の置換もしくは欠失、または特定されたアミノ酸残基の隣接位置に少なくとも一つのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸を挿入することを指す。特定されたアミノ酸残基の「隣接位置」への挿入とは、1または2残基以内の挿入を意味する。その挿入は、特定された残基のN末端側、もしくはC末端側の場合があり得る。ここで好ましいアミノ酸修飾は置換である。

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のHVRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。一実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャプリングによる親和成熟を開示している。HVRおよび/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0046】

「特異的に結合する」抗体、又は特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ「特異的な」抗体とは、他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープとは実質的に結合せずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するものである。例えば、本発明のM1'特異的抗体は、B細胞上の結合したIgEに見られるIgEのM1'細胞外セグメントに特異的である。

「ブロック(ブロック)抗体」又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか、減弱するものである。ある実施態様では、ブロック抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にないしは完全に阻害する。本発明のアポトーシス性抗IgE抗体は、無血清及び総血清のIgEを減らすような様式で免疫応答を媒介する際にIgEの活性を遮断する。

「アポトーシスを誘発する」又は「アポトーシス性」である抗体とは、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞の縮み、小胞体の拡張、細胞断片化、及び/又は膜小胞の形成(アポトーシス性本体と呼ばれる)のような標準的なアポトーシスアッセイにより決定される、プログラムされた細胞死を誘発するものである。例えば、本発明の抗IgE抗体のアポトーシス活性は、アネキシンVと表面結合したIgEを有する細胞を染色することによって示される。

【0047】

「総血清IgE」なる用語は、結合パートナー(例えば、抗IgE抗体、IgE保持B細胞)と複合体化しているIgEと、無ないしは結合していないIgEを含む、試料中に存在するIgEの総量を指す。「無血清IgE」は結合パートナーに結合していないIgEを指す。

「アレルギー特異的IgE」なる用語は、アレルギー感作として知られる過程でアレルギーに始めに曝露されることによって生じる、特定の抗原に特異的であるIgEを指し、マスト細胞及び好塩基球の表面を結合し、その結果、同アレルギーに後に曝露したときにマスト細胞及び好塩基球が活性化されるものある。ウイルス(例えばサイトメガロウイルス-CMV)、細菌(例えばブドウ球菌)、ぜん虫(例えばカイチュウ属、シストゾーマ属)および空気汚染中のアジュバント因子(例えばタバコの煙およびディーゼル排気)のいくつかのミトジェン因子は、何れかのアレルギー特異的IgE-感作を起こすことなくIgE分子の産生を刺激する。ゆえに、IgEレベルは亢進するが、これによって常に宿主がIgEが媒介する疾患に罹りやすくなるわけではないので、アレルギー特異的IgEレベルは臨床評価に用いられることもある。

「IgEを産生するB細胞を特異的に枯渇する」なる用語は、IgEを特異的に分泌するB細胞(すなわちプラズマ細胞)の数又は効果を特異的に減少させるが、他の免疫グロブリン、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgMを分泌するB細胞の数又は効果には有意に影響しない能力を意味する。

【0048】

10

20

30

40

50

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

【0049】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcR)と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞傷害性細胞に「向かって」おり、このメカニズムによる標的細胞の殺傷に必要とされる。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【0050】

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明記によって本明細書中に特別に援用されるKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のEUインデックスのものである。「KabatのEUインデックス」はヒトIgG1 EU抗体の残基番号を指す。

「Fc領域」なる用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226の位置又はPro230からの位置のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてのK447残基が除去された抗体群、K447残基が除去されていない抗体群、及びK447残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含みうる。本発明の抗体に使用するために好適な天然配列Fc領域にはヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が含まれる。

【0051】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好ましいFcRは天然配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRはIgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選

10

20

30

40

50

拮的にスプライシングされた形態のものも含まれる。Fc R I I レセプターには、Fc R I I A (「活性型レセプター」)及びFc R I I B (「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFc R I I Aは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; I T A M)を含んでいる。阻害型レセプターFc R I I Bは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ; I T I M)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。Fc R に関しては、Ravetch and Kinetic, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFc Rはここでの「Fc R」という言葉によって包含される。

10

また、「Fcレセプター」又は「Fc R」なる用語には、母性Ig Gの胎児への移送を担う新生児性レセプターFc R nも含まれる。Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol.24:249 (1994)。Fc R nへの結合の測定方法は公知である(例としてGhetie and Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); 国際公開2004/92219 (Hinton et al.))。

インビボでのヒトFc R nへの結合とヒトFc R n高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFc R nを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又はFc変異形ポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。国際公開公報00/42072 (Presta)にFc Rへの結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。例としてShields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

20

【0052】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFc R sを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともFc R IIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれ、PBMC及びMNC細胞が好ましい。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

30

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラス)の抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米特許第6194551号B1及び国際公開公報99/51642に記述される。それらの特許文献の内容は、出典明記によって、特別に本願明細書に組み込まれるものとする。またIdusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

40

【0053】

Ig G中のNグリコシル化部位はCH2ドメインのAsn297にある。本発明は、Fc領域を有するCD20結合ヒト化抗体の組成物を含み、ここで組成物中の抗体の約80~100%(好ましくは約90~99%)は糖タンパク質のFc領域に結合したフコースを欠く成熟コア糖鎖構造を含む。そのような組成物は、Fc R IIIA (F158)への結合に驚くべき改善を示すことがここで実証されており、これは、ヒトIg Gとの相互作用においてFc R IIIA (V158)ほど効果的ではない。ゆえに、ここでの組成物は、特にFc R IIIA (F158)を発現するヒト患者の治療のために、前記の抗CD20抗体組成物より優れていることが見込まれる。Fc R IIIA (F158)は、正常で健全なアフリカ系アメリカ人及び白人においてはFc R IIIA (V158)より一般的で

50

ある。Lehrnbecher et al. Blood 94:4220 (1999)を参照。本出願は、さらに、糖タンパク質のFc領域内にアミノ酸配列の修飾（一又は複数）とここに記載のグリコシル化変異体を組み合わせることによって生じるFcRIII結合及び/又はADCC機能の相乗的増加を記載する。

【0054】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(K_d)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的实施態様を記載する。

【0055】

一実施態様では、本発明の「K_d」又は「K_d値」は、以下のアッセイで示されるような、所望の抗体のFab型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(RIA)で測定される。段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(¹²⁵I)-標識抗原にてFabを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する(例としてChen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)を参照)。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート(Dynex)を5 µg/mlの捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)を含む50 mM炭酸ナトリウム(pH 9.6)にて一晚コートして、その後2%(w/v)のウシ血清アルブミンを含むPBSにて室温(およそ23 °C)で2~5時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、100 pM又は26 pMの[¹²⁵I]抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する)。ついで所望のFabを一晚インキュベートする;しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間(例えばおよそ65時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを0.1%のTween 20を含むPBSにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µl/ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount 計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結合の20%か又はそれ以下濃度のFabを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

他の実施態様によると、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25 °CのBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってK_d又はK_d値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10 mM酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(~0.2 µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5 µl/分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78 nMから500 nM)を25 °C、およそ25 µl/分の流速で0.05% Tween 20(PBST)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(K_d)をk_{off}/k_{on}比として算出した。例として、Chen, Y.,等, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が10⁶ M⁻¹ S⁻¹

10

20

30

40

50

¹を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH 7.2)、25 の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起 = 295 nm; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 k_{on} 」は、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25 のBIAcore(登録商標)-2000又はBIAcore(登録商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。

【0056】

ここで用いる「実質的に減少」又は「実質的に異なる」という句は、当業者が2つの数値(一般に、本発明の抗体に関連するもの、及び参照/比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、2つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較抗体の値の、例えば約10%より大きく、約20%より大きく、約30%より大きく、約40%より大きく、約50%より大きい。

ここで用いる「実質的に類似」又は「実質的に同じ」という句は、当業者が2つの数値(例えば、本発明の抗体に関連するもの、及び参照/比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び/又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が有意に類似していることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較抗体の値、例えば約50%以下、約40%以下、約30%以下、約20%以下、及び/又は約10%以下である。

【0057】

ペプチド又はポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」及び「相同性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定のペプチド又はポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を測定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2はジェネンテック社によって作製され、ALIGN-2のソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0058】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラ

10

20

30

40

50

インメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は、本明細書中に示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

【0059】

ここに示す抗体をコードする「単離された」核酸分子は、同定され、生成された環境に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸はその生成環境に関連するすべての他の成分を含まない。ここに示すポリペプチド及び抗体をコードする単離された核酸分子は、天然に見出される形態或いは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するポリペプチド及び抗体をコードする核酸とは区別される。

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列或いは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター或いはリンカーが使用される。

【0060】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したここに示すポリペプチド又は抗体を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようになりかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～約50のアミノ酸残基(好ましくは約10～約20の残基)を有する。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてここに示すポリペプチド又は抗体ドメインの置換を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

例えば、ここでの併用療法に有用な第二医薬として有益なイムノアドヘシンには、B R 3、T A C I又はB C M Aの膜貫通領域がないB L y SレセプターのB L y S結合部分を含み、免疫グロブリン配列の定常ドメインに融合しているポリペプチドが含まれる。

【0061】

「融合タンパク質」および「融合ポリペプチド」は、共有結合で互いに結合した2つの部分を持つポリペプチドを指し、各部分は異なる特性を有するポリペプチドである。この特性は、例えばインビトロまたはインビボ活性などの生物学的性質でよい。この特性はまた、単一の化学的または物理的性質、例えば対象抗原との結合、反応の触媒などかもしれない。この2つの部分は単一のペプチド結合によって直接、またはペプチドリンカーを通して結合していてもよい。通常、この2つの部分とリンカーは同じ読み枠に存在する。

「安定な」製剤とは、その中に含まれるタンパク質がその物理的、化学的安定性及び保存に対する完全性を本質的に保持するものことである。タンパク質の安定性を測定するための種々の分析的技術は、当該技術分野において利用可能であり、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs.(1991)及びJones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90(1993)中に概説されている。安定性は選択された温度及び選択された期間測定することができる。迅速なスクリーニングを行うために、製剤を2週間から1ヶ月間、40℃にて保存し、時間安定性を測定してもよい。製剤が2 - 8℃にて保存される場合、一般に、製剤は30℃又は40℃で少なくとも1ヶ月間安定、及び/又は2 - 8℃で少なくとも2年間安定である必要がある。製剤が30℃にて保存される場合、一般に、製剤は30℃で少なくとも2年間安定で、及び/又は40℃で少なくとも6ヶ月間安定である必要がある。例えば、保存後の凝集の程度は、タンパク質安定の指標として用いることができる。従って、「安定な」製剤は、該タンパク質の約10%未満及び好ましくは約5%未満が製剤中に凝集体として存在してもよい。他の実施態様において、製剤の保存中の凝集体形成の如何なる増大も定量することができる。

【0062】

「再構成された」製剤は、凍結乾燥タンパク質又は抗体製剤を希釈液中に溶解させ、タンパク質が全体に分散されることによって調製されるものである。再構成された製剤は、目的のタンパク質で治療される患者に投与（例えば、非経口投与）するのに適するもの、本発明のある実施態様においては、皮下投与に適するものであってもよい。

「等張な」製剤は、ヒトの血液と本質的に同じ浸透圧を持つものである。等張な（アイソトニック）製剤は、一般に約250から350mOsmの浸透圧を持つ。「低張な」なる用語は、ヒトの血液の浸透圧より低い浸透圧を持つ製剤を表す。同様に、「高張な」なる用語は、ヒトの血液の浸透圧より高い浸透圧を持つ製剤を表す。等張性は、例えば、蒸気圧又は氷 - 凍結（ice-freezing）型浸透圧計を用いて測定することができる。本発明の製剤は、塩及び/又はバッファの添加の結果、高張となる。

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファ；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又は祖ルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEENTM、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICSTMを含む。

「パッケージ挿入物」という用語は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌及び/又はその治療薬の用途に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【 0 0 6 3 】

「薬学的に許容される酸」は、それらが製剤化される濃度及び方法において無毒性である無機及び有機酸を含む。例えば、適切な無機酸には、塩酸、過塩素酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸、スルホン酸、スルフィン酸、スルファニル酸、リン酸、炭酸などが含まれる。適切な有機酸には、直鎖及び分岐鎖アルキル、芳香族、環状、環状脂肪族、アリール脂肪族、複素環式、飽和、不飽和、モノ -、ジ -、及びトリ - カルボン酸で、例えば、蟻酸、酢酸、2 - ヒドロキシ酢酸、トリフルオロ酢酸、フェニル酢酸、トリメチル酢酸、t - ブチル酢酸、アントラニル酸、プロパン酸、2 - ヒドロキシプロパン酸、2 - オキソプロパン酸、プロパンジオイン酸 (propandioic)、シクロペンタンプロピオン酸、シクロペンタンプロピオン酸、3 - フェニルプロピオン酸、ブタン酸、ブタンジオイン酸 (butandioic)、安息香酸、3 - (4 - ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、2 - アセトキシ安息香酸、アスコルビン酸、ケイ皮酸、ラウリル硫酸、ステアリン酸、ムコン酸、マンデル酸、コハク酸、エンボン酸、フマル酸、リンゴ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、マロン酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、グリコール酸、グライコン酸、グルコン酸、ピルビン酸、グリオキサール酸、シュウ酸、メシリン酸 (mesylic)、コハク酸、サリチル酸、フタル酸、パルモイン酸 (palmoic)、パルメイン酸 (palmeic)、チオシアン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1, 2 - エタンジスルホン酸、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4 - コロベンゼンスルホン酸 (chorobenzesulfonic)、ナフタレン - 2 - スルホン酸、p - トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、4 - メチルバイシクロ[2.2.2] - オクト - 2 - エン - 1 - カルボキシル酸、グルコヘプトン酸、4, 4' - メチレンビス - 3 - (ヒドロキシ - 2 - エン - 1 - カルボキシル酸)、ヒドロキシナフトイン酸 (hydroxynapthoic) を含む。

10

20

【 0 0 6 4 】

「薬学的に許容な塩基」には、それらが製剤化される濃度及び方法において無毒性である無機及び有機塩基を含む。例えば、適切な塩基には、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アンモニウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム、N - メチルグルカミン、モルホリン、ピペリジンなどの無機塩基形成金属、及び第一級、第二級、第三級アミン、置換アミン、環状アミンを含む有機無毒性塩基、及び塩基性イオン交換レジン、[例えば、 $N(R')_4^+$ (ここで R' は別個に H 又は C_{1-4} アルキル基、例えばアンモニウム、トリス)]、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2 - ジエチルアミノエタノール、トリメタミン、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン (hydrabamine)、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N - エチルピペリジン、ポリアミンレジン及び類似物から形成されるものが含まれる。特に、好ましい有機無毒性塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメタミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン及びカフェインである。

30

本発明に使用可能な、さらなる薬学的に許容可能な酸及び塩基には、アミノ酸、例えば、ヒスチジン、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アスパラギンに由来するものが含まれる。

40

「薬学的に許容可能な」バッファー及び塩には、前記された酸及び塩基の塩を付加された酸及び塩基に由来するものが含まれる。具体的なバッファー及び又は塩には、ヒスチジン、コハク酸及び酢酸が含まれる。

【 0 0 6 5 】

「薬学的に許容される糖」は、目的のタンパク質と結合したときに保存に対してタンパク質の化学的及び/又は物理学的不安定性を著しく予防又は減少する分子である。製剤が凍結乾燥して再構成することを意図したものであるとき、「薬学的に許容される糖」もまた「リオプロテクタント」として周知のものである。例示的糖及びそれらに同一の糖アルコールには：グルタミン酸 1 ナトリウム又はヒスチジンなどのアミノ酸；ベタインなどの

50

メチルアミン；硫酸マグネシウムなどの溶媒変性塩；三価アルコール又はそれより大きな分子量の糖アルコールなどの多価アルコール、例えば、グリセリン、デキストラン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；ピューロニクス（登録商標）；及びそれらの組み合わせが含まれる。更なる例示的リオプロテクタントには、グリセリン及びゼラチン、及び糖、メリビオース、メレチトース、ラフィノース、マンノトリオース及びスタキオースが含まれる。還元糖の例には、グルコース、マルトース、ラクトース、マルツロース、イソマルツロース及びラクツロースが含まれる。非還元糖の例には、糖アルコール及び他の直鎖ポリアルコールから選択されたポリヒドロキシ化合物の非還元グリコシドが含まれる。好ましい糖アルコールは、モノグリコシド、特にラクトース、マルトース、ラクツロース及びマルツロースなどのジサッカライドの還元によって得られる化合物である。グリコシド側鎖はグルコシド又はガラクトシドのいずれかであり得る。糖アルコールの更なる例は、グルシトール、マルチトール、ラクチトール及びイソ - マルツロースである。好ましい薬学的に受容される糖には非還元糖トレハロース又はスクロースである。薬学的に許容される糖は、タンパク質が保存の間（例えば、再構成及び保存の後）その物理学的及び化学的安定性と完全性を本質的に保つような「保護量」（例えば、凍結乾燥前）で製剤に添加する。

【0066】

ここでの目的における「希釈液」は、薬学的に許容な（ヒトへの投与に関し安全で無毒性）もので、凍結乾燥後に再構成される製剤などの、液性製剤の調製に有用である。典型的な希釈液には、滅菌水、注射のための静菌水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸バッファー生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー溶液又はデキストロース溶液が含まれる。これに代わる実施態様において、希釈液は塩及び/又はバッファーの水溶液を含み得る。

「保存剤」は、バクテリアの作用を減少させるために、ここにおける製剤に添加され得る化合物である。保存剤の添加は、例えば、複数回使用（複数回投与）製剤の生産を促進する。潜在的保存剤の例には、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム（アルキル基が長鎖化合物である塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウムの混合物）、及び塩化ベンゼトニウムが含まれる。保存剤の他のタイプには、フェノールなどの芳香族アルコール、ブチル及びベンジルアルコール、メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3 - ペンタノール、及びm - クレゾールが含まれる。ここで最も好ましい保存剤は、ベンジルアルコールである。

【0067】

本明細書中で用いる「治療」は、治療される個体又は細胞の自然な経過を変更するための臨床的介入を指し、予防のため又は臨床病理の経過の間のいずれかの時期に実施されうる。治療の所望の効果には、疾患の発症又は再発の予防、転移の予防、疾患進行の割合の低減、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解ないしは予後の改善が含まれる。いくつかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患又は障害の発達を遅延させるために用いる。I g E 媒介疾患と関連する一又は複数の症状が軽減する場合、例えば、本発明のアポトーシス性抗 I g E 抗体を用いて被検体は成功裏に「治療され」る。

「有効量」とは、治療的又は予防的な結果を含め、所望される又は示される効果を達成するのに必要な期間、必要な用量での少なくとも有効量を意味する。

「治療的有效量」は、特定の疾患の計測可能な改善又は予防に作用するために必要な少なくとも最小限の濃度である。ここでの治療的有效量は、病状、年齢、性別、個体の体重、及び個体での所望の応答を引き起こす抗体の能力等の要因に応じて変わり得る。また、治療的有效量とは、抗体の任意の毒性又は有害な影響を治療的に有益な効果が上回る量である。「予防的有效量」は、所望する予防的結果を達成するのに必要な期間、用量で有効な量を意味する。必ずではないが、典型的には、予防的用量は、疾病の前又は初期の段階に被検体に使用されるので、予防的有效量は治療的有效量よりも少ない。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間にわたって維持するようにするために、急性態様とは異なり連続的な態様での薬剤の投与を意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

治療のための「哺乳動物」は、哺乳類として分類される任意の動物、例えばヒト、家庭および畜産動物、および動物園、スポーツ用、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、スナネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどを指す。哺乳動物はヒトであることが望ましい。

「薬学的製剤」なる用語は、活性材料の生物学的活性が有効になるような形態であり、及び製剤が投与されうる被検体に許容不可能な毒性を示す付加的成分を含まない調製物を指す。このような製剤は無菌である。

「無菌の」製剤は防腐処理をしているか、すべての生きている微生物およびそれらの孢子を含んでいない。

本明細書中で用いる「およそ」なる用語は、この技術分野の熟練した人に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。

【 0 0 6 9 】

ここで用いられる「抗ヒスタミン剤」は、ヒスタミンの生理的効果に拮抗する薬剤である。そのレセプター、 H_1 及び H_2 にヒスタミンが結合すると、特徴的なアレルギー症状及び、かゆみ、赤み、はれあがりなどが起こる。多くの抗ヒスタミン剤は、そのレセプター、 H_1 及び H_2 にヒスタミンが結合するのを阻害することによって作用する；しかしながら、他は、ヒスタミンの放出を抑制することによって作用すると考えられている。抗ヒスタミン剤の例として、クロルフェニラミン、ジフェンヒドラミン、プロメタジン、クロモリンナトリウム、アステミゾール、アザタジンマレイン酸塩、プロフェニラミンマレイン酸塩、カルピノキサミンマレイン酸塩、塩酸セチレジン (cetirizine hydrochloride)、クレマスチンフマル酸塩、シプロヘプタジン塩酸塩、d-マレイン酸プロムフェニラミン、d-マレイン酸クロルフェニラミン、ジメンヒドリナート、塩酸ジフェンヒドラミン、ドキシラミン琥珀酸塩、塩酸ヘキサフェンダジン (fexofendadine hydrochloride)、塩酸テルフェナジン (terphenadine hydrochloride)、塩酸ヒドロキシジン、ロラチジン (loratidine)、塩酸メクリジン、クエン酸トリペレナミン、塩酸トリペレナミン、塩酸トリプロリジンがある。

【 0 0 7 0 】

ここで用いられる「気管支拡張剤」は、結果として肺気量の減少や呼吸の短縮になる一般的には初期の喘息反応を起こす気管支収縮、生理学的症状に拮抗する又は無効にする薬剤を指す。気管支拡張薬の例には、エピネフリン、広域作用性 及び アドレナリン作動性、及び アドレナリン作動性アルブテロール、ピルブテロール、メタプロテレノール、サルメテロール、及びイソエタリンを含む。また、気管支拡張は、アミノフィリン及びテオフィリンを含むキサンチンの投与によって達成することもできる。

【 0 0 7 1 】

ここで用いられる「糖質コルチコイド」は抗炎症性活性を有するステロイドベースの薬剤を指す。糖質コルチコイドは、一般的に後期喘息反応を減弱させるために用いられる。糖質コルチコイドの例には、プレドニゾン、ベクロメタゾンニプロピオン酸塩、トリアムシノロンアセトニド、フルニソリド、ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、トリアムシノロンデキサメサゾン (desamehasone tramcinolone)、酢酸フルドロコルチゾン、フルニゾリド (flunisolide)、フルチカゾン (fluticasone) プロピオン酸塩、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン (メチルプレドニゾン (例えば SOLU-MEDROL (登録商標) メチルプレドニゾン琥珀酸ナトリウム)、及びトリアムシノロンが含まれる。

【 0 0 7 2 】

ここで用いられる「非ステロイド性抗炎症剤」または「NSAID」は、ステロイドベースでない抗炎症性活性を有する薬剤を指す。NSAIDの例には、アセメタシン (acemetacin)、アセトアミノフェン、アスピリン、アザプロバゾン、ベノリレート

10

20

30

40

50

、ブロムフェナクナトリウム、シクロオキシゲナーゼ(COX)-2インヒビター、例えばGR253035、MK966、セレコキシブ(CELEBREX(登録商標))；4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフロロメチル)-1H-ピラゾル-1-イル)ベンゼン-スルホンアミド)、及び、パルデコキシブ(BEXTRA(登録商標))、ジクロフェナク、ジクロフェナク遅延剤、ジクロフェナクナトリウム、ジフルニサル、エトドラク、フェンブフェン、フェノプロフェンカルシウム、フルルビプロフェン、イブプロフェン、イブプロフェン遅延剤、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナム酸ナトリウム、メフェナム酸、メロキシカム(MOBIC(登録商標))、ナブメトン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、テノキシカム、チアプロフェン酸、トルメチン、トルメチンナトリウム、およびこれらの塩類及び誘導体を含むもの、などが含まれる。

10

【0073】

「I g Eが媒介する疾患」なる用語には、多くの共通して天然に生じる吸入及び摂取した抗原に免疫学的に応答する全身性遺伝性性質とI g E抗体の継続的な産生と特徴とする、アトピー性疾患が含まれる。具体的なアトピー性疾患には、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎(結膜炎)、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、アナフィラキシー、接触皮膚炎、アレルギー性胃腸疾患、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症およびアレルギー性紫斑病(ヘノッホ-シェーンライン)が含まれる。アトピー性患者は複数のアレルギーを有することが多く、季節性、通年性及び職業性のアレルゲンを含む多くの環境アレルゲンに対するI g E抗体及びそれらによる症状を有する。季節性アレルゲンの例には花粉(例えば草、木、ライ麦、オオアワガエリ、ブタクサ)が含まれ、一方、通年性アレルゲンには真菌類(例えば糸状菌、糸状菌胞子)、羽毛、動物(例えばペット又は他の動物の鱗屑)および昆虫(例えば粉塵ダニ)細片が含まれる。職業性のアレルゲンの例には、動物(例えばマウス)および植物の抗原、並びに薬剤、界面活性剤、金属およびイソシアネート等の免疫促進剤も含まれる。I g Eが媒介する反応を生じさせる抗原以外の特定の刺激には、感染、煙等の刺激物、燃焼臭気、ディーゼル排気分子および二酸化硫黄、運動、寒さおよび感情的なストレスが含まれる。ある遺伝的バックグラウンドを有するアトピー性及び非アトピー性の個体の具体的な過敏性反応は、食物(例えば豆類、ピーナッツ)中のタンパク質、毒物(例えば昆虫、ヘビ)、ワクチン、ホルモン類、抗血清、酵素、ラテックス、抗生物質、筋弛緩物質、ビタミン、細胞毒素、アヘン剤および多糖類、例えばデキストリン、鉄デキストランおよびポリゲリンへの曝露により生じうる。

20

30

I g Eが媒介していると思われ、本発明の製剤により治療可能である、亢進したI g Eレベルに関連する他の疾患には、毛細血管拡張性運動失調、チャージ-ストラウス症候群、湿疹、腸炎、胃腸疾患、移植片対宿主反応、高I g E(ジョブ)症候群、過敏症(例えばアナフィラキシー型過敏症、カンジダ症、血管炎)、I g E骨髄腫、炎症性腸疾患(例えばクローン病、潰瘍性大腸炎、未確定の大腸炎および感染性大腸炎)、粘膜炎(例えば口内粘膜炎、胃腸粘膜炎、鼻粘膜炎および直腸炎)、壊死性全腸炎および食道炎、寄生虫病(例えばトリパノソーマ症)、過敏性血管炎、蕁麻疹およびウイスコット アルドリッヒ症候群が含まれる。

【0074】

40

さらに、疾患自体が亢進したI g Eに関連しているか否かにかかわらず、I g Eレベルを下げることによって治療可能であるので、「I g Eが媒介する疾患」の範囲内であるとみなす疾患には、アジソン病(慢性副腎皮質不全)、脱毛症、遺伝性血管性浮腫、血管性浮腫(バニスター病、血管神経性浮腫)、強直性脊椎炎、再生不良性貧血、動脈炎、アミロイドーシス、免疫不全、例として、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、自己免疫性多内分泌不全症、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性血球減少症、自己免疫性糸球体腎炎、ベーチェット病、気管支炎、パージャー病、類天疱瘡、カプラン症候群(リウマチ様塵肺)、心臓炎、脂肪便症、チェディアック-ヒガシ症候群、慢性閉塞性肺病(COPD)、コーガン-リーゼ症候群(虹彩角膜の内皮症候群)、CREST症候群、疱疹状皮膚炎(デューリング病)、真正糖尿病、好酸性筋膜炎、好酸性腎炎、上強膜炎、外因性ア

50

アレルギー性肺炎、家族性発作性漿膜炎、フェルティール症候群、線維性肺炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、顆粒球減少症、肉芽腫、肉芽腫症、肉芽腫筋炎、グレーブス病、ギランバレー症候群(多発性神経炎)、橋本甲状腺炎(リンパ腫性甲状腺腫)、ヘモクロマトーシス、組織球増殖症、高好酸球症候群、過敏性大腸症候群、若年性関節炎、角膜炎、ハンセン病、紅班性狼瘡、ライエル病、ライム病、混合性結合組織病、単発神経炎、多発性単発神経炎、マックル-ウェルズ症候群、皮膚粘膜リンパ系症候群(川崎病)、多中心性網状組織球増殖症、多発性硬化症、重症筋無力症、菌状息肉腫、脂肪組織炎、類天疱瘡、ペンフィグス、心外膜炎、多発性神経炎、結節性多発動脈炎、乾癬、乾癬の関節炎、肺関節炎、肺腺腫症、肺線維形成、再発性多発軟骨炎、リウマチ熱、関節リウマチ、鼻副鼻腔炎(副鼻腔炎)、サルコイドーシス、強膜炎、硬化性胆管炎、血清病、セザリー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス-ジョンソン症候群、全身性肥満細胞症、移植拒絶反応、血小板減少性紫斑病、胸腺リンパ形成不全症、ブドウ膜炎、白斑、ヴェゲナー肉芽腫症が含まれる。

10

【0075】

本明細書中の「自己免疫性疾患」は、個体の自己組織ないしは臓器又は同時分離したものに對する及びそれらから生じる疾患又は症状、又はその徴候又は結果として生じるその症状である。これら多くの自己免疫性及び炎症性疾患において、多くの臨床用及び研究用のマーカーが存在してもよく、限定するものではないが、高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原抗体複合体蓄積、副腎皮質ステロイド又は免疫抑制性治療の利点、及び、罹患組織中のリンパ系細胞の凝集塊が含まれる。B細胞が媒介する自己免疫性疾患に関して何か一つの理論に限定されるものではないが、B細胞は、自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状及びT細胞活性化、サイトカイン合成、ケモカインの直接放出、及び病巣への異所性新リンパ形成を含む、多くの機構的な経路によりヒト自己免疫性疾患において病原性効果を示すことが考えられる。各々のこれらの経路は、自己免疫性疾患の病状の程度の違いに寄与しうる。

20

「自己免疫性疾患」は、臓器特異的疾患(すなわち、免疫応答が、内分泌系、造血系、皮膚、循環器系、胃腸及び肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などといった臓器系に對して特異的である)又は、複数の臓器系に影響しうる全身性疾患(例えば全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)、多発性筋炎など)でありうる。好適な前記疾患には、自己免疫性リウマチ性疾患(例えばRA、シェーグレン症候群、強皮症、狼瘡、例えばSLEおよびループス腎炎、多発性筋炎-皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群および乾癬の関節炎)、自己免疫性胃腸及び肝疾患(例として、例えば炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病)、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎および小児脂肪便病)、血管炎(例として、例えばANCAネガティブ血管炎およびANCA関連血管炎、例えばチャグ-シュトラウス血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症および顕微鏡的多発性血管炎)、自己免疫性神経学的疾患(例として、例えば多発性硬化症、眼球クローヌス筋硬直症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病および自己免疫性多発性神経炎)、腎臓疾患(例として、例えば糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、及びベルジェ病)、自己免疫性皮膚疾患(例として、例えば乾癬、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、類天疱瘡および皮膚紅班性狼瘡)、血液学的な疾患(例として、例えば血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病および自己免疫溶血性貧血)、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患(例として、例えば内耳疾患および聴力障害)、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植および自己免疫性内分泌性疾患(例として、例えば糖尿病関連の自己免疫性疾患、例えばインシュリン依存性真正糖尿病(IDDM)、アジソン病および自己免疫性甲状腺病(例えばグレーブス病および甲状腺炎))が含まれる。より好ましくは前記疾患には、例えば、RA、潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎および糸球体腎炎が含まれる。

30

40

【0076】

50

ここで用いられる「細胞障害性剤」は、細胞の機能を阻害又は抑制し、および/又は細胞破壊を起こす物質を意味する。この用語は、放射性同位元素(例えば、 $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及びLuの放射性同位体)、および細菌、真菌、植物又は動物由来の小分子毒素又は酵素活性毒素などの毒素、又はその断片を意味する。

【0077】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロスホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins) (特にプラタシン(bullatacin)及びプラタシノン(bullatacinone))；9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)(HYCAMTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトセシン(acetylcamptothecin)、スコポレクチン(scopolactin)、及び9-アミノカンプトセシン(9-aminocamptothecin)を含む)；プリオスタチン；ペメトレキセド；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；ポドフィリン；ポドフィリン酸；テニボシド；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin) (合成類似体、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エレクトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；TLK-286；経口4インテグリンインヒビターであるCDP323；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チヨロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediynes) 抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシガンマ1I及びカリケアマイシンオメガI1、例えば、Nicolaou et al., Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediynes) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標))、モルフォリノ-ドキシソルピシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、ドキシソルピシンHC1リポソーム注射(DOXIL(登録商標))及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン(esorubicin)、イダルピシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン(mitomycins)、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、スト

10

20

30

40

50

レプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；メトトレキセート、ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標))、テガフル(UFTORAL(登録商標))、カペシタピン(XELODA(登録商標))、エボチロン、及び5-フルオロウラシル(5-FU)などの抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)及びイマチニブ(a 2-フェニルアミノピリミジン誘導体)のようなピリミジン類似体、並びに他の c - K i t イ ン ヒ ビ タ ー ； ア ミ ノ グ ル テ チ ミ ド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダニン(lonidainine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguanosine)；ミトキサントロン；モピダンモール(mopidanmol)；ニトラエリン(nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ロソキサントロン(losoxantrone)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K (登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニューアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；ピンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピボプロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール(登録商標)パクリタキセル、アルブミン設計のナノ粒子形状のパクリタキセル(ABRAXANE™)及びタキソテア(登録商標)ドキシタキセル；クロランブシル；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ピンプラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボリン；NAV ELBINE(登録商標)ピノレルピン；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼインヒビターRFS2000；ジフルオロメチロールニチン(DMFO)；レチノイン酸などのレチノイド類；上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並びに、上記のうち2以上の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ドキシゾルピシン、ピンクリスチン及びプレドニソロンの併用治療の略記号であるCHOP、及び5-FUとロイコボリン(leucovorin)と組み合わせられるオキサリプラチン(ELOXATIN™)による治療投薬計画の略記号であるFOLFOXが含まれる。

【0078】

また、癌の成長を促進しうるホルモンの影響を調節、低減、阻止(ブロック)又は阻害するように作用し、たびたび全身性、又は全身治療の形態にある抗ホルモン剤もこの定義に含まれる。これらはホルモン類自体でもよい。例として、抗卵胞ホルモン類及び、選択的なエストロゲンレセプターモジュレーター類(SERM)、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェン)、EVISTA(登録商標)ラロキシフェン、ドロロキシフェン(droloxifene)、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフ

10

20

30

40

50

エン(keoxifene)、LY117018、オナプリストン及びFARESTON(登録商標)トレミフェン、抗プロゲステロン類、エストロゲンレセプター下方制御因子(ERD);エストロゲンレセプターアンタゴニスト、例えばフルベストラント(FASLODEX(登録商標))、卵巣を抑制するか又は一時停止させるように機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば、LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標)酢酸ロイプロリド、ゴセレリンアセテート、ブセレリンアセテート及びトリプトレリン(tripterelin)、抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド、及び、副腎のエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害薬、例として、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メゲストロールアセテート、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタン、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ポロゾール、FEMARA(登録商標)レトロゾール及びARIMIDEX(登録商標)アナストロゾールなどがある。加えて、化学療法剤のこのような定義には、ビスホスホネート、例えばクロドロン酸(例えば、BONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、DIDROCAL(登録商標)エチドロン酸、NE-58095、ゾレドロン酸/ゾレドロンネート、FOSAMAX(登録商標)アレンドロンネート、AREDIA(登録商標)パミドロン酸、SKELID(登録商標)チルドロン酸又はACTONEL(登録商標)、リセドロン酸、並びにトロキサチタピン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に係るシグナル伝達経路の遺伝子の発現を阻害するもの、例として、例えばPKC-、Raf、H-Ras及び上皮性成長因子レセプター(EGFR)、ワクチン、例えばTHERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン及びVAXID(登録商標)ワクチン;トポイソメラーゼ1インヒビター(例えば、LURTOTECAN(登録商標));抗卵胞ホルモン、例えばフルベストラント;aKitインヒビター、例えばイマチニブ又はEXEL-0862(チロシンキナーゼインヒビター);EGFRインヒビター、例えばエルロチニブ又はセツキシマブ;抗VEGFインヒビター、例えばベバシズマブ;イリノテカン;rmrh(例えばABARELIX(登録商標));ラパチニブ及びラパチニブジトシラート(ErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子インヒビター、GW572016とも称される);17AAG(ヒートショックプロテイン(Hsp)90毒素であるゲルダナマイシン誘導体)、及び、上記の何れかの薬学的に受容可能な塩類、酸又は誘導体が含まれる。

【0079】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞の増殖をインビトロおよび/又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期で細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス(ピンクリスチンおよびピンプラスチン)、タキソール(登録商標)、およびトポII阻害剤、例えばドキソルピシン、エビルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、およびブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、およびアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, MendelsohnおよびIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン(パクリタキセルおよびドセタキセル)は、共にイチイの木から得られる抗癌薬である。ヨーロッパイチイ由来のドセタキセル (TAXOTERE(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer)はパクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb)の半合成類似体である。

【0080】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン;PROLEUKIN(登録商標)rIL-2

10

20

30

40

50

を含む I L - 1、 I L - 1、 I L - 2、 I L - 3、 I L - 4、 I L - 5、 I L - 6、 I L - 7、 I L - 8、 I L - 9、 I L - 11、 I L - 12、 I L - 13、 I L - 15 等のインターロイキン (I L)；腫瘍壊死因子、例えば T N F - 又は T N F - ；及び L I F 及び K i t リガンド (K L) を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用されるように、サイトカインなる用語は、天然源由来あるいは組換え細胞培養物由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物、例えば合成して産生された小分子構成要素及び製薬的に受容可能な誘導体及びその塩類を含む。

【 0 0 8 1 】

「ホルモン」なる用語は通常管を有する腺性器官によって分泌されるポリペプチドホルモンを表す。そのようなホルモンには、例えば、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；エストラジオール；ホルモン補充療法；アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオナート、エピチオスタノール、メピチオスタン又はテストラクトン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン (F S H)、副甲状腺刺激ホルモン (T S H)、及び黄体形成ホルモン (L H) のような糖タンパク質ホルモン；プロラクチン、胎盤ラクトゲン、マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド性腺刺激ホルモン放出ホルモン；インヒピン；アクチピン；ミューラー阻害物質；及びトロンボポエチンなどがある。本明細中で用いるように、ホルモンなる用語は、天然源由来又は組み換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列ホルモンの生物学的活性な相当物、例えば合成して産生した小分子成分及び製薬的に許容可能な誘導体及びその塩類が含まれる。

【 0 0 8 2 】

「増殖因子」なる用語は増殖を促進するタンパク質を表し、例えば、肝増殖因子；線維芽細胞増殖因子；血管内皮増殖因子；神経成長因子、例えば N G F - ；血小板由来増殖因子；トランスフォーミング成長因子 (T G F)、例えば T G F - 及び T G F - ；インスリン様成長因子-I及び-II；エリトロポエチン (E P O)；骨誘導因子；インターフェロン、例えばインターフェロン-、-、及び-；及び、コロニー刺激因子 (C S F)、例えばマクロファージ-C S F (M - C S F)、顆粒球-マクロファージ-C S F (G M - C S F) 及び顆粒球-C S F (G - C S F) などがある。本明細書中で用いられる、増殖因子なる用語には、天然源由来あるいは組換え細胞培養物由来のタンパク質及び天然配列増殖因子の生物学的に活性な等価物、例えば合成して産生された小分子構成要素及び製薬的に受容可能な誘導体及びその塩類を含む。

「インテグリン」なる用語は、細胞の細胞外基質への結合と応答の両方をさせるレセプタータンパク質であり、創傷治癒、細胞分化、腫瘍細胞のホーミング及びアポトーシスなどの様々な細胞性機能に関与するものを表す。これらは細胞-細胞外基質及び細胞間相互作用に関与する細胞接着レセプターの大きなファミリーの一部である。機能的なインテグリンは、及びと称する2つの膜貫通性グリコプロテインサブユニットから成り、非共有的に結合している。サブユニットのように、サブユニットはすべて互いにくらかの相同性がある。レセプターは常に1の鎖及び1の鎖を含有する。例えば、6 1、3 1、7 1、L F A - 1 などがある。本明細書中で用いられる、インテグリンなる用語には、天然源由来あるいは組換え細胞培養物由来のタンパク質及び天然配列インテグリンの生物学的に活性な等価物、例えば合成して産生された小分子構成要素及び製薬的に受容可能な誘導体及びその塩類を含む。

【 0 0 8 3 】

「T N F アンタゴニスト」は、本明細書中では、インビトロ、インサイツ、及び/又は好ましくはインビボでの T N F 活性を低減する、ブロックする、阻害する、無効にする、又は干渉する分子として定義される。また、好適な T N F アンタゴニストは、T N F の R N A、D N A ないしはタンパク質合成、T N F 放出、T N F レセプターシグナル伝達、膜 T N F 切断、T N F 活性、及び T N F 産生及び/又は合成を低減、ブロック、無効、干渉、阻止、及び/又は阻害することができる。このような T N F アンタゴニストには、限定するものではないが、抗 T N F 抗体、その抗原結合断片、T N F への結

10

20

30

40

50

合時に、哺乳動物のTNFを発現する細胞を破壊するか枯渇する、及び/又はこれら細胞の一又は複数の機能を干渉する、TNFに特異的に結合する特定の変異体ないしドメイン、可溶性TNFレセプター(例えばp55、p70又はp85)ないしは断片、その融合ポリペプチド、小分子TNFアンタゴニスト、例えばTNF結合プロテインI又はII(TBP-I又はTBP-II)、nerelimonmab、CDP-571、インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))、アダリムマブ(HUMIRATM)、CDP-571、CDP-870、アフェリモマブ、レネルセプトなど)、その抗原結合断片、及びTNFに特異的に結合するレセプター分子、TNF合成、TNF放出又は標的細胞に対する作用を阻止及び/又は阻害する化合物、例えばサリドマイド、テニダップ、ホスホジエステラーゼインヒビター(例えば、ペントキシフィリンおよびロリプラム)、A2bアデノシンレセプターアゴニスト、およびA2bアデノシンレセプターエンハンサー、TNFレセプターシグナル伝達を阻止及び/又は阻害する化合物、例としてマイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼインヒビター、膜TNF切断をブロック及び/又は阻害する化合物、例えばメタロプロテイナーゼインヒビター、TNF活性をブロック及び/又は阻害する化合物、例えばアンジオテンシン転換酵素(ACE)インヒビター(例えばカプトプリル)、及びTNF産生及び/又は合成をブロック及び/又は阻害する化合物、例えばMAPキナーゼインヒビターが含まれる。好適なアンタゴニストには抗体又はイムノアドヘシンが含まれる。本明細書中に具体的に包含されるTNFアンタゴニストの例は、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))、インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))、及びアダリムマブ(HUMIRATM)である。

10

20

「腫瘍壊死因子」、「TNF」又は「TNFアルファ」は、Pennica等、Nature, 312:721(1984)又はAggarwal等、JBC, 260:2345(1985)に記載のアミノ酸配列を含有するヒトTNF分子を意味する。本明細書中の「TNFインヒビター」は、一般的にはTNFへの結合とその活性を中和することを介してTNFの生物学的活性をある程度阻害する薬剤である。本明細書中のTNFインヒビターの例には、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))、インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))及びアダリムマブ(HUMIRATM)が含まれる。

【0084】

「インテグリンアンタゴニスト」は、例えばインテグリンに対する抗体を含む、任意のメカニズムによってインテグリンを阻害するか又は拮抗する分子である。本明細書中の「インテグリンアンタゴニスト又は抗体」の例として、LFA-1抗体、例としてGenentechから市販のエファリズマブ(RAPTIVA(登録商標))、又は4インテグリン抗体、例としてBiogenから入手可能なナタリズマブ(ANTEGREN(登録商標))、又は、ジアザサイクリックフェニルアラニン誘導体(国際公開第2003/89410号)、フェニルアラニン誘導体(国際公開第2003/70709号、国際公開第2002/28830号、国際公開第2002/16329号及び国際公開第2003/53926号)、フェニルプロピオン酸誘導体(国際公開第2003/10135号)、エナミン誘導体(国際公開第2001/79173号)、プロパン酸誘導体(国際公開第2000/37444号)、アルカノン酸誘導体(国際公開第2000/32575号)、置換型フェニール誘導体(米国特許第6677339号及び同第6348463号)、芳香族アミン誘導体(米国特許第6369229号)、ADAMディスインテグリンドメインポリペプチド(米国公開公報2002/0042368号)、 α 3インテグリンに対する抗体(欧州特許第633945号)、アザ架橋された二環式アミノ酸誘導体(国際公開第2002/02556号)などが含まれる。

30

40

【0085】

ここで補助治療として用いる「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書中で治療される哺乳動物の免疫系を抑制する又は遮断するように働く物質を表す。これは、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原の発現を下方制御又は抑制する、あるいはMHC抗原を遮断する物質を含む。そのような薬剤の例として、2-アミノ-6-アリル-5-代替ピリミジン(米国特許第4665077号参照)；非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)；ガンシクロビル；タクロリムス、糖質ステロイド、例としてコルチゾール又はアルドステロン、抗炎症剤、

50

例としてシクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リポキシゲナーゼインヒビター又はロイコトリエンレセプターアンタゴニスト；プリンアンタゴニスト、例えばアザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル(MMF)；trocade(Ro 32-355)；末梢シグマレセプターアンタゴニスト、例えばISR-31747；アルキル化剤、例えばシクロホスファミド；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド（米国特許第4120649号に記載のように、MHC抗原を遮断する）；MHC抗原及びMHCフラグメントに対する抗イデオタイプ抗体；シクロスポリンA；副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質ステロイド類似体などのステロイド、例としてプレドニゾン、メチルプレドニゾン、例えばSOLU-MEDROL(登録商標)メチルプレドニゾンコハク酸ナトリウム、リメキシロン及びデキサメタゾン；ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター、例としてメトトレキサート(経口又は皮下)；クロロキン及びヒドロキシクロロキンなどの抗マラリア剤；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカイン放出インヒビター、例えばSB-210396及びSB-217969モノクローナル抗体及びMHC IIアンタゴニスト、例えばZD2315；PG1レセプターアンタゴニスト、例えばZD4953；VLA4接着ブロッカー、例えばZD7349；抗サイトカイン又は抗サイトカインレセプター抗体、例として抗インターフェロン-、-、又は-抗体、抗腫瘍壊死因子抗体(インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))又はアダリムマブ)、抗TNFイムノアドヘシン(エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子抗体、インターロイキン-1(IL-1)ブロッカー、例えば組み換えHuIL-1Ra及びIL-1Bインヒビター、抗インターロイキン2(IL-2)抗体及び抗IL-2レセプター抗体；IL-2融合毒素；抗L3T4抗体；レフルノミド；異種性抗リンパ球グロブリン；OPC-14597；NISV(免疫応答モディファイヤー)；必須脂肪酸、例えばリノレン酸又はエイコサペンタイン酸；CD-4ブロッカー及びパンT抗体、好ましくは抗CD3ないしは抗CD4/CD4a抗体；同時刺激モディファイヤー(例えばCTLA4-Fc融合、ABATACEPT™としても知られる)；抗インターロイキン6(IL-6)レセプター抗体及びアンタゴニスト；抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(国際公開第90/08187号)；ストレプトキナーゼ；IL-10；トランスフォーミング成長因子-(TGF-)；ストレプトドルナーゼ(streptodornase)；宿主由来のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；enlimomab；CDP-855；PNPインヒビター；CH-3298；GW353430；4162W94、クロランブシル；デオキシスペルグアニン(deoxyspergualin)；ラパマイシン；T細胞レセプター(Cohen等、米国特許第5114721号)；T細胞レセプターフラグメント(Offner等、Science 251:430-432(1991)；国際公開第90/11294号；laneway, Nature, 341: 482(1989)；及び国際公開第91/01133号)；BAFF抗体及びBR3抗体などのBAFFアンタゴニスト；zTNF4アンタゴニスト(Mackay及びMackay, Trends Immunol., 23:113-5(2002))；T細胞ヘルパーシグナルを阻害する生物学的な薬剤、例として抗CD40レセプター又は抗CD40リガンド(CD154)、例えばCD40-CD40リガンドに対する阻止抗体(例えば、Durie等、Science, 261: 1328-30(1993)；Mohan等、J. Immunol., 154: 1470-80(1995))及びCTLA4-Ig(Finck等、Science, 265: 1225-7(1994))；及びT10B9などのT細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)を含む。本明細書中に記載のいくつかの好適な免疫抑制剤には、シクロホスファミド、クロランブシル、アザチオプリン、レフルノミド、MMF又はメトトレキサート(MTX)が含まれる。

【0086】

「疾患変更性抗リウマチ剤」又は「DMARD」の例には、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、myocrisin、オーラノフィン、スルファサラジン、メトトレキサート、レフルノミド、エタネルセプト、インフリキシマブ(プラス経口及び皮下用メトトレキサート)、アザチオプリン、D-ペニシラミン、ゴールド塩類(経口)、ゴールド塩類(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリンA及び局所性シクロスポリンを含むシクロスポリン、ブドウ球菌プロテインA(Goodyear及びSilverman, J. Exp. Med., 197, (9), p1125-39(2003))、これらの塩類及び誘導体を含むものなどがある。

【 0 0 8 7 】

「B細胞」は骨髄内で成熟するリンパ球であり、ナイーブB細胞、メモリーB細胞、又はエフェクターB細胞(プラズマ細胞)などがある。本明細書中のB細胞は正常又は非悪性のB細胞でもよい。

本明細書中の「B細胞表面マーカー」又は「B細胞表面抗原」は、それに対して結合するアンタゴニストによって標的とされうるB細胞の表面上に発現される抗原である。例示的なB細胞表面マーカーには、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及びCD86白血球表面マーカーが含まれる(解説について、The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition, 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New Yorkを参照のこと)。他のB細胞表面マーカーには、RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Bti_g、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、及び239287が含まれる。好適なB細胞表面マーカーは、哺乳動物の他の非B細胞組織と比較してB細胞上に優先して発現されており、前駆体および成熟B細胞上に発現されてもよい。最も好適な前記マーカーはCD20およびCD22である。

10

【 0 0 8 8 】

「CD20」抗原又は「CD20」は、末梢血又はリンパ系器官に由来するB細胞の90%以上の表面にみられるおよそ35kDaの非グルコシル化リタンパク質である。CD20は正常B細胞だけでなく悪性のB細胞上にも存在し、幹細胞には発現しない。CD20を意味する文献中での他の名称には、「Bリンパ球限定抗原(B-lymphocyte-restricted antigen)」及び「Bp35」などがある。CD20抗原は、例としてClark等 PNAS (USA) 82:1766 (1985)に記載されている。

20

BL-CAM又はLyb8としても知られる「CD22」抗原又は「CD22」は、およそ130kD(還元型)から140kD(非還元型)の分子量を有するタイプ1完全膜糖タンパク質である。それはBリンパ球の細胞質及び細胞膜に発現される。CD22抗原は、B細胞リンパ球分化の初めにCD19抗原とおよそ同じ段階で現れる。他のB細胞マーカーと異なり、CD22膜発現は成熟B細胞(CD22+)とプラズマ細胞(CD22-)の間の後期分化段階に限定される。CD22抗原は、例えば、Wilson等 J. Exp. Med. 173:137 (1991)及びWilson等 J. Immunol. 150:5013 (1993)において記述されている。

30

【 0 0 8 9 】

「B細胞表面マーカーに結合する抗体」とは、B細胞表面マーカーに結合し、例えば、B細胞に誘導される体液性反応を低減又は阻害することによって、哺乳動物のB細胞を破壊又は枯渇させる、及び/又は一以上のB細胞機能を妨げる抗体である。好ましくは、アンタゴニストは、それによって治療される哺乳動物のB細胞を枯渇する(すなわち、循環中のB細胞レベルを下げる)ことができる。そのような枯渇は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)、B細胞増殖の阻害及び/又はB細胞死の誘導(例えば、アポトーシスを介する)等の多様な機能を介して達成されるであろう。

40

CD20抗体の例には以下のものが含まれる:現在では「リツキシマブ」(「リツキサン(登録商標)」)と呼称される「C2B8」(米国特許第5,736,137号);「Y2B8」又は「Ibritumomab Tiuxetan」ゼパリン(登録商標)と命名されるイットリウム-[90]-標識2B8マウス抗体、IDEC Pharmaceuticals, Inc.から市販(米国特許第5,736,137号;1993年6月22日に受託番号HB11388としてATCCに寄託された2B8);場合によっては「¹³¹I-B1」またはCorixaから市販の「ヨードI131 Tositumomab」抗体(BEXXARTM)を生成するために¹³¹Iで標識した「Tositumomab」とも呼称されるマウスIgG2a「B1」(米国特許第5,595,721号も参照のこと);

50

マウスモノクローナル抗体「1F5」(Press等 Blood 69(2):584-591 (1987)及びそれらの変異体、例として「フレームワークパッチ」又はヒト化1F5(国際公報03/002607, Leung, S; ATCC寄託番号HB-96450); マウス2H7及びキメラ2H7抗体(米国特許第5,677,180号); ヒト化2H7(国際公報2004/056312 (Lowman等)及び以下に挙げるもの); B細胞の細胞膜のCD20分子を標的としたh u M a x - C D 2 0 ^{T M} 完全ヒト、高親和性抗体(Genmab, Denmark; 例としてGlennie及びvan de Winkel, Drug Discovery Today 8: 503-510 (2003)とCragg等, Blood 101: 1045-1052 (2003)を参照); 国際公報2004/035607(Teeling等)に記載のヒトモノクローナル抗体; A M E - 1 3 3 ^{T M} 抗体(Applied Molecular Evolution); キメラ又はヒト化A20抗体(それぞれc A 2 0、h A 2 0)などのA20抗体又はその変異形(米国公開番号2003/0219433、免疫医学); 及びInternational Leukocyte Typing Workshopより入手のモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1又はN U - B 2 (Valentine等, Leukocyte Typing III (McMichael, 編集, 440頁, Oxford University Press (1987))). 本明細書中の好適なCD20抗体は、キメラCD20抗体、ヒト化CD20抗体またはヒトCD20抗体、より好ましくはリツキシマブ、ヒト化2H7、キメラないしはヒト化A20抗体(Immunomedics)、及びH U M A X - C D 2 0 ^{T M} ヒトCD20抗体(Genmab)である。

10

本明細書中の「リツキシマブ」又は「リツキサン(登録商標)」なる用語は、CD20抗原に対する遺伝的に操作したキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体を指し、出典明記によって本明細書中に組み込まれる米国特許第5736137号に記載の「C2B8」を表すものであり、CD20を結合する能力を有するその断片を含む。

20

【0090】

単に本願明細書中の目的のために、特別に明記しなければ、「ヒト化2H7」は、ヒト化CD20抗体又はその抗原結合断片を意味し、該抗体がインビボで霊長類のB細胞を枯渇させる効果を有する。抗体には、米国公開2006/0062787及びその図に記載のものが含まれ、米国公開2006/0188495に示される配列を有する抗体が含まれる。また、米国公開2006/0034835及び米国公開2006/0024300も参照のこと。本発明の様々な好適な実施態様をまとめると、米国公開2006/0062787に開示される2H7バージョン16に基づく変異体のV領域は、以下の表に示すアミノ酸置換の位置以外はv16のアミノ酸配列であるだろう。特に明記しない限りは、2H7変異形はv16のL鎖と同じである。

30

2H7バージョン	重鎖(V _H) 変化	軽鎖(V _L) 変化	Fc 変化
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

40

好適なヒト化2H7はバージョン16の配列を有するインタクト抗体又は抗体断片であ

50

る。他の好適なヒト化 2 H 7 はバージョン 1 6 の配列を有するインタクト抗体又は抗体断片である。

【 0 0 9 1 】

「 B A F F アンタゴニスト」は B A F F 又は B R 3 の活性をブロックする任意の分子である。これらには、 B A F F を結合する B R 3、 T A C I 又は B C M A の一部を含むイムノアドヘシン、又は B A F F を結合するその変異体が含まれる。他の実施態様では、 B A F F アンタゴニストは B A F F 抗体である。「 B A F F 抗体」は、 B A F F を結合する抗体であり、好ましくは該抗体はヒト B A F F の残基 1 6 2 - 2 7 5 を含むヒト B A F F の領域内で B A F F を結合する。他の実施態様では、 B A F F アンタゴニストは B R 3 抗体である。「 B R 3 抗体」は B R 3 を結合する抗体であり、好ましくはヒト B R 3 の残基 2 3 - 3 8 を含むヒト B R 3 の領域内で B R 3 を結合するものである。ヒト B A F F 及びヒト B R 3 の配列は、例えば米国公開 2006/0062787 に見られる。 B A F F 結合ポリペプチド又は B A F F 抗体の他の例は、例えば国際公開 2002/092620、国際公開 2003/014294、Gordon et al., Biochemistry 42(20):5977-5983 (2003)、Kelley et al., J. Biol. Chem., 279(16):16727-16735 (2004)、国際公開 1998/18921、国際公開 2001/12812、国際公開 2000/68378、及び国際公開 2000/40716 に見られうる。

10

【 0 0 9 2 】

「抗 I g E 抗体」には、 I g E がマスト細胞及び好塩基球上の高親和性レセプターに結合したときに架橋結合を引き起こさない様式で I g E に特異的に結合する任意の抗体が含まれる。例示的な抗体には、本発明の抗体並びに r h u m a b E 2 5 (E 2 5、 X O L A I R (登録商標))、 E 2 6、 E 2 7、並びに C G P - 5 1 0 1 (H u - 9 0 1) および H A 抗体が含まれる。ヒト化抗 I g E 抗体 E 2 5、 E 2 6 および E 2 7 の重鎖および軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、例えば米国特許第 6 1 7 2 2 1 3 号および国際公開 9 9 / 0 1 5 5 6 に開示される。 C G P - 5 1 0 1 (H u - 9 0 1) 抗体は、Corne et al., (1997) J. Clin. Invest. 99(5): 879-887、国際公開 9 2 / 1 7 2 0 7 および A T C C 寄託番号 B R L - 1 0 7 0 6、 B R L - 1 1 1 3 0、 B R L - 1 1 1 3 1、 B R L - 1 1 1 3 2 および B R L - 1 1 1 3 3 に記載されている。 H A 抗体は、 U S S N 6 0 / 4 4 4 2 2 9、国際公開 2 0 0 4 / 0 7 0 0 1 1 および国際公開 2 0 0 4 / 0 7 0 0 1 0 に記載されている。

20

【 0 0 9 3 】

I I . 本発明を実施するための様式

A . 組み換え調製

また、本発明は、アポトーシス性抗 I g E 抗体をコードする単離された核酸、該核酸を含むベクターおよび宿主細胞、及び抗体産生の組換え技術を提供する。

抗体の組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング (D N A の増幅) 又は発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。抗体をコードする D N A は直ぐに単離されるか合成されて、従来手法を用いて (例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする D N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用することによって) 配列決定される。多くのベクターが公的に入手可能である。ベクター成分には、一般に、これらに制限されるものではないが、次のものの一又は複数が含まれる：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列である。

30

40

【 0 0 9 4 】

(1) シグナル配列成分

この発明の抗体は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) ものである。天然抗体シグナル配列を認識せずプロセシングしない原核生物宿主細胞に対して、シグナル配列は、例えばアルカリホスファター

50

ぜ、ペニシリンナーゼ、l p pあるいは熱安定なエンテロトキシンI Iリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母での分泌に対して、天然シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクレイベロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含む)、又は酸ホスフォターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第90/13646号に記載されているシグナルにより置換されうる。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスg Dシグナルが利用できる。

このような前駆体領域のDNAは、好ましくは、抗体をコードするDNAに読み枠を一致させて結合される。

10

【0095】

(2) 複製起点成分

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいて、この配列は宿主染色体DNAとは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2µプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始成分は不要である(SV40開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる)。

20

【0096】

(3) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばパシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑制する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

30

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、まず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞(例えばATCC CRL-9096)である。

40

【0097】

あるいは、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4965199号を参照のこと。

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝

50

子である(Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979))。trp1遺伝子は、例えば、ATCC第44076号あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。酵母宿主細胞ゲノムにtrp1破壊が存在することは、ついでトリプトファンの不在下における増殖による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2欠陥酵母株(ATCC20622あるいは38626)は、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

更に、1.6µmの円形プラスミドpKD1由来のベクターは、クルイヴェロマイシス(Kluyveromyces)酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え仔ウシのキモシンの大規模生産のための発現系がK.ラクティス(lactis)に対して報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株による、組換え体成熟ヒト血清アルブミンの分泌のための安定した複数コピー発現ベクターもまた開示されている。Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

【0098】

(4) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され抗体核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、phoAプロモーター、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するプロモーターもまた抗体をコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるATリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCAAT領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるATAAA配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターは、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域である。酵母の発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許73657に更に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に好適に用いられる。

【0099】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体の転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及び最も好ましくはサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40ウィルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウィルスの複製起点を更に

10

20

30

40

50

含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中でDNAを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウィルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞中でのヒトインターフェロンcDNAの発現について、Reyes等、Nature, 297:598-601(1982)を参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0100】

(5) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体をコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0101】

(6) 転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

【0102】

(7) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンズ及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びバシリ・リチェフォルミス(licheniformis)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710に開示されたバシリ・リチェニフォルミス41P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC31446)であるが、他の大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31537)及び大腸菌W3110(ATCC27325)のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

完全長抗体、抗体断片、および抗体融合タンパク質は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能は必要でない、例として、治療的抗体が細胞障害性剤(例として、毒素)にコンジュゲートして、その免疫コンジュゲートが腫瘍細胞破壊に効果的である場合などに、細菌内で生成することができる。全長抗体は循環中で半減期が長い。大腸菌での生成がより早くよりコスト効率がよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現について、発現および分泌を最適化する転写開始領域(TIR)およびシグナル配列を記載し

10

20

30

40

50

ている米国特許第5,648,237号 (Carter et al.)、同第5,789,199号(Joly et al.)、および同第5,840,523号 (Simmons et al.)を参照のこと。発現後、可溶性分画の大腸菌ペーストから抗体を単離し、例としてアイソタイプによるプロテインAまたはGカラムにより精製しうる。例としてCHO細胞で発現した抗体精製工程と同様にして最終的精製を行う。

【0103】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、IgE結合抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でここで使用できる、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ；クルイベロマイセス宿主、例えばK.ラクティス、K.フラギリリス(ATCC 12424)、K.ブルガリカス(ATCC 16045)、K.ウィッケラマイ(ATCC 24178)、K.ワルチイ(ATCC 56500)、K.ドロソフィラルム(ATCC 36906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアナス；ヤローウィア(EP 402226)；ピチアパストリス(EP 183070)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア(EP 244234)；アカパンカビ；シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス；及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリボクラジウム、及びコウジカビ属宿主、例えば偽巢性コウジ菌及びクロカビが使用できる。

10

グリコシル化抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドプテラ・フルギベルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンピクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニカNPVのL-1変異体とボンピクス・モリ NPVのBm-5株が公に利用でき、そのようなウイルスは本発明においてここに記載したウイルスとして使用でき、特にスポドプテラ・フルギベルダ細胞の形質転換に使用できる。

20

綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することができる。

【0104】

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977))；ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞/ -DHFR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))；マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))；サルの腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザルの腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HEL4, ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；パッファローラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065)；マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51)；TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS 4細胞；及びヒト肝臓株(Hep G2)である。

30

40

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

【0105】

(8) 宿主細胞の培養

50

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM), (シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), (シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0106】

(9) 抗体精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔に生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。Carter等, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌された抗体の単離方法を記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の存在下で約30分間解凍する。細胞細片は遠心分離で除去できる。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 165715-75 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSETMクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

予備的精製工程に続いて、目的の抗体および混入物を含む混合液をpH約2.5 - 4.5、好ましくは低塩濃度(例として、約0 - 0.25 M塩)の溶出緩衝液を用いて低pH疎水性作用クロマトグラフィを行う。

【0107】

B . 抗体の調製

1) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下 (s c) 又は腹腔内 (i p) 注射することにより動物に産生される。免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンベットヘモシアニン (K L H)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビターに関連抗原を、二官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基による抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 $SOCl_2$ 、又はRとR¹が異なったアルキル基であるR¹N=C=N Rにより抱合させることが有用である。用いられるアジュバントの例には、完全フロイントアジュバント及びM P L - T D Mアジュバント(モノホスホリルLipid A、合成トレハロースジコリノミコレート)が含まれる。免疫の方法は、過度の実験をすることなく当業者によって選択することができる。

10

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 µg又は5 µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまたタンパク融合として組換え細胞培養中で調製することもできる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

20

【0108】

2) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体集団から得られるが、つまり、該集団を含む個々の抗体は、少量存在する起こりうる自然発生的突然変異及び/又は翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化)を除いて同一である。従って、「モノクローナル」という形容詞は、別個の抗体の混合物ではないとの抗体の特徴を示すものである。

例えば、モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作成することができる。

30

ハイブリドーマ法においては、マウス又はハムスターなどのその他の適当な宿主動物を上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を誘導する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

【0109】

免疫化剤は、典型的には抗原タンパク質又はそれらの融合変異型を含む。一般には、ヒト起源の細胞が望まれる場合において末梢血リンパ球(「P B L」)が用いられるか、又は非ヒト哺乳動物ソースが望まれる場合において脾臓細胞又はリンパ節細胞が用いられるかのいずれかである。次に、リンパ球を、ハイブリドーマ細胞を調製するためにポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いて不死化細胞株と融合する。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp.59-103。

40

通常、不死化細胞はトランスフォームされた哺乳動物細胞であり、実用的にはげっ歯類、ウシ及びヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラット又はマウスミエローマ細胞株が用いられる。このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは、融合していない親のミエローマ細胞の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親のミエローマ細胞が酵素であるヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R T又はH P R T)を欠失する場合、ハイブ

50

リドーマのための培地は、典型的には、HGPRT - 欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むことになる(HAT 培地)。

好ましい不死化ミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現をサポートし、HAT培地のような培地に対して感受性の細胞である。これらの中でも、好ましいミエローマ株化細胞は、マウスミエローマ株、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAより入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及び、American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAより入手し得るSP-2細胞(及びその誘導体、例えばX63-Ag8-653)由来のものである。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

10

【0110】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

ハイブリドーマ細胞を培養している培地を、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、モノクローナル抗体の結合親和性及び特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定できる。このような技術及びアッセイは当業者に周知である。結合親和性は、例えば、Munsonら., Anal. Biochem., 107:220(1980)のスクッチャード分析によって測定することができる。

20

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されると、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, 上掲)。この目的に対して好適な培地には、例えば、DMEM又はRPMI-1640培地が含まれる。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

【0111】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィー等のような従来の免疫グロブリン精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離することができる。

30

また、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号などに記載される及び前述に記載のような組み換えDNA法により作製されてもよい。モノクローナル抗体をコードするDNAは、定法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に分離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。一度単離されれば、該DNAを発現ベクター中に挿入し、次に、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は他にイムノグロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするDNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130:151-188(1992)が含まれる。

40

さらなる実施態様では、抗体は、McCaffertyら, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clacksonら, Nature, 352:624-628 (1991)及びMarksら, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離について記述している。次の刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生産(Marksら, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、並びに非常に大きなファージライブラリーを構

50

築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え (Waterhouseら, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266[1993]) を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の単離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

【 0 1 1 2 】

また、該 DNA は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を、相対的マウス配列に代えて置換することによって (米国特許第4,816,567号 ; Morrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:6851(1984))、又はイムノグロブリンコード配列に非イムノグロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾することができる。典型的には、かかる非イムノグロブリンポリペプチドは抗体の定常領域の代わりに置換され、又は抗体の1つの抗原結合部位の変域ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有するある抗原結合部位、及び異なる抗原に対する特異性を有する他の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

ここに示すモノクローナル抗体は一価性であり、その調整方法は当業者に周知である。例えば、免疫グロブリンの軽鎖及び修飾重鎖の組み換え発現を伴う方法がある。一般的に重鎖はFc領域の任意の場所で切断して重鎖の交差組み換え (クロスリンク) を予防する。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基に置き換えたり、交差組み換えを防ぐために欠損させてもよい。また、一価抗体の調製に好適なインビトロの方法がある。当業者によくある技術を用いて抗体のフラグメント、特にFabフラグメントを産生することができる。

また、キメラ又はハイブリッド抗体はクロスリンク剤を伴う方法を含む合成タンパク質化学における既知の方法を用いてインビトロにおいても調製される。例えば、免疫毒素はジスルフィド置換反応を用いて、又はチオエーテル結合を形成させることにより構築される。当該目的にとって適切な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミデートが含まれる。

【 0 1 1 3 】

3) ヒト化抗体

本発明の抗体には、さらにヒト化又はヒト抗体が含まれる。非ヒト (例えばマウス) 抗体のヒト化形とは、キメライムノグロブリン、イムノグロブリン鎖あるいはその断片 (例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 又は抗体の他の抗原結合サブ配列) であって、非ヒトイムノグロブリン由来の最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域 (CDR) の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギのような非ヒト種 (ドナー抗体) のCDRの残基によって置換されたヒトイムノグロブリン (レシピエント抗体) を含む。ある場合には、ヒトイムノグロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、また典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、この場合、CDR領域の全て若しくは実質的に全てが、非ヒトイムノグロブリンのものに相当し、FR領域の全て若しくは実質的に全てが、ヒトイムノグロブリンコンセンサス配列である。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒトのイムノグロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Op Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)。

【 0 1 1 4 】

非ヒト抗体をヒト化する方法は当該技術分野において周知である。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「移入」残基と称され、典型的には「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は基本的には、Winter及び共同研究者、Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536 (1988) の方法に従うか、又は齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列

を置換することにより実施される。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号)、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域(FR)として受容される。Sims等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothiaら, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987)。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる。Carterほか, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Prestaほか, *J. Immunol.*, 151:2623(1993)。

【0115】

さらに、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持したまま、抗体をヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法に従って、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析過程によりヒト化抗体を調製する。三次元イムノグロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補イムノグロブリン配列の予想される三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を観察することで、候補イムノグロブリン配列の機能における残基の想定され得る役割の分析、すなわち候補イムノグロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

ヒト化抗体の様々な形態が考えられる。例えば、ヒト化抗体は、抗体断片、例えばFab、場合によっては免疫コンジュゲートを作成するために1又は複数の細胞障害剤でコンジュゲートされたものであってもよい。あるいは、ヒト化抗体又は、親和性成熟抗体は、完全な抗体、例えば完全なIgG1抗体であってもよい。

【0116】

4) ヒト抗体

ヒト化の代わりにヒト抗体を産生することができる。例えば、内在性のイムノグロブリン産生がない状態で、ヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子の同型接合欠損が内因性抗体産生を完全に阻害することが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列イムノグロブリン遺伝子列の移入は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。例としてJakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第5591669号及び国際公開97/17852を参照。

あるいは、ファージディスプレイ技術を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。McCaffertyら, *Nature* 348:552-553(1990); Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991)。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13またはfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のいずれかにおいてイン-フレームをクローンし、ファージ粒子の表面上に機能的抗体フラグメントとして表出する。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖のDNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、これらの特性を示す抗体をコ

10

20

30

40

50

ードする遺伝子の選択がなされる。よって、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる；例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)を参照のこと。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clacksonら, *Nature*, 352:624-628(1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライブラリーからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成可能で、抗原(自己抗原を含む)とは異なる配列の抗体を、Marksら, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)、又はGriffithら, *EMBO J.* 12:725-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第5,565,332号及び同5,573,905号を参照のこと。

10

【0117】

また、Cole等及びBoerner等の技術もヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である(Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985)及びBoerner等, *J. Immunol.* 147(1):86-95 (1991))。同様に、トランスジェニック動物、例えば、内在性のイムノグロブリン遺伝子が部分的に又は完全に不活性化されているマウスなどに、ヒトイムノグロブリン遺伝子座を導入することによりヒト抗体を作製することができる。免疫すると、遺伝子再構成、構築及び抗体レパートリーを含め、あらゆる観点においてヒトで観察されるものと近似したヒト抗体の産生が観察される。本アプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号；5,545,806号、5,569,825号、5,625,126号、5,633,425号、5,661,016号及び以下の特定の刊行物中に記載されている：Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)；Lonberg等, *Nature* 368:856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994)、Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996)、Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996)及びLonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。

20

最後に、また、ヒト抗体は活性化B細胞によりインビトロで産生してもよい(米国特許第5,567,610号及び同第5,229,275号を参照)。

【0118】

5) 抗体フラグメント(抗体断片)

ある状況では、全抗体を用いるよりもむしろ抗体フラグメントを用いる方が有利なことがある。より小さいサイズのフラグメントは急速にクリアランスを受け、固形腫瘍にアクセスしやすい。

30

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennanら, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。Fab、Fv及びscFv抗体フラグメントはすべて大腸菌内で発現され分泌されるため、これらフラグメントを大量に産生することが容易である。抗体フラグメントは上記した抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントは大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合して(Fab')₂フラグメントを形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、(Fab')₂フラグメントを組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が延長したFab及び(Fab')₂は米国特許第5,869,046号に記載されている。他の実施態様では、選択抗体は単鎖Fvフラグメント(scFv)である。国際公開第93/16185号；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号を参照のこと。また、抗体フラグメントは、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

40

【0119】

6) 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開81/

50

01145を参照)を活性な抗癌剤へ変換するプロドラッグ活性化酵素へ抗体をコンジュゲートすることによって、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公開88/07378及び米国特許第4975278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に変換するようにプロドラッグへ作用し得る任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、本発明の方法に有用な酵素には、グリコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヒトリゾチーム、ヒトグルクロニダーゼ、ホスフェート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；サルフェート含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なアリルサルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ（例えば、カルボキシペプチダーゼG2及びカルボキシペプチダーゼA）及びカテプシン（例えば、カテプシンB及びL）で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に変換するのに有用なガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に変換するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体は、本発明のプロドラッグを、遊離の活性薬剤に変換させるために使用することもできる（例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照）。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば前述部分で検討したヘテロ二官能性クロスリンク剤を使用することにより、ここに示すポリペプチド又は抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる（例えば、Neuberger等, Nature 312:604-608 (1984)を参照のこと）。

【0120】

7) 二重特異性及び多重特異性抗体

二重特異性抗体(BsAb)は、同じまたは異なるタンパク質上のエピトープを含む少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。あるいは、一つのアームは標的抗原に結合するものであり、他方のアームは、白血球上のトリガー分子、例えば、T細胞レセプター分子（例えばCD3）又はFcR1(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)のFcレセプターに結合して、標的抗原を発現する細胞に対する細胞性防御機能を集中及び局在化させることができる。このような抗体は、全長抗体又は抗体又は抗体フラグメント（例えばF(ab')₂二重特異性抗体）から誘導することができる。

また、標的抗原を発現する細胞に細胞障害性剤を局在化させるために二重特異性抗体を用いてもよい。そのような抗体は、所望の抗原に結合するアームと細胞障害性剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン-a、ビンカアルカロイド(vinca alkaloid)、リシンA鎖、メトトレキサート又は放射性活性同位体ハプテン）に結合するアームを持つ。周知の二重特異性抗体の例には、抗Erbb2/抗FcγRIII(国際公開96/16673)、抗Erbb2/抗FcγRI(米国特許第5837234)、抗Erbb2/抗CD3(米国特許第5821337)がある。

【0121】

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野において知られている。全長二重特異性抗体の従来生産は、二つのイムノグロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づいているが

、この場合二つの鎖は異なる特異性を持っている。Millstein等, Nature, 305:537-539(1983)。イムノグロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を産生し、そのうち一つだけが正しい二重特異性構造を有する。アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる目的の分子の精製はかなり煩雑で、収率は低い。同様の方法がW093/08829及びTrautnecker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

異なるアプローチにより、望ましい結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)をイムノグロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は、好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含むイムノグロブリン重鎖定常ドメインと行われる。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。イムノグロブリン重鎖の融合、望まれるならばイムノグロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、構築に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率である場合、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がない場合は、2または3全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、W094/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0122】

国際公開96/27011又は米国特許第5731168号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF(ab')₂断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F(ab')₂-TNB誘導体の一つをついでF(ab')₂-TNB誘導体に再転換して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0123】

F(ab')₂フラグメントを直接大腸菌から回収して、これは化学的に結合させて二重特異性抗体を形成してもよい。Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記述している。各F(ab')₂断片は大腸菌から別個に分泌され、インピトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びErbbB2レセプター

を過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

また、組換え細胞培養から直接的に二価抗体断片を作成し単離する様々な技術も記述されている。例えば、二価ヘテロ二量体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体のFab'部分に結合させた。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。Hollinger等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性/二価抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、短かすぎて同一鎖上の2つのドメイン間の対形成ができないリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(FsFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)を参照されたい。

【0124】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttlら *J. Immunol.* 147:60(1991)。

例示的な二重特異性抗体は対象の分子上の2つの異なるエピトープ上に結合する。あるいは、抗タンパク質アームは、細胞の防御機構を特定のタンパク質を発現する細胞に集中させるために、T細胞レセプター分子(例えば、CD2, CD3, CD28又はB7)、又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)などIgGに対するFcレセプター(FcR)等の白血球上の誘因分子に結合するアームと組み合わせてもよい。また、二重特異性抗体を特定のタンパク質を発現する細胞に細胞障害性薬剤を局在化させるために用いてもよい。そのような抗体は、タンパク質-結合アーム、及び細胞障害性薬剤又はEOTUBE, DPTA, DOTA, TETAなどの放射性核種キレート剤に結合するアームを保持する。その他の目的たる二重特異的抗体は、対象のタンパク質に結合し、さらに組織因子(TF)に結合する。

【0125】

8) 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2~約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

【0126】

9) ヘテロコンジュゲート抗体

また、ヘテロコンジュゲート抗体も本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。例えば、ヘテロコンジュゲートの一方の抗体はアビジンに結合し、他方はビオチンに結合可能である。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせることが、米国特許第4676980号、及びHIV感染の治療のために提案されている。国際公開91/00360；国際公開92/200373；欧州特許第03089号。該抗体は、クロスリンク剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。ヘテロコンジュゲート抗体は簡便なクロスリンク法を用いて作製してもよい。好適なクロスリンク剤は当業者に周知であり、クロスリンク技術の番号と共に米国特許第4676980号に開示されている。

【0127】

10) エフェクター機能の加工

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)を上げるために、本発明の抗体をエフェクター機能について改変することが望ましい。これは、抗体のFc領域の一又は複数のアミノ酸置換を導入することによって達成される。あるいは又はさらに、システイン残基(一又は複数)をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性(ADCC)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

【0128】

11) イムノコンジュゲート(免疫複合体)

また、本発明は、化学治療薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)とコンジュゲートしている抗体を含むイムノコンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)に関する。このようなADCは許容可能な安全性質を示さなくてはならない。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、例えば癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体-薬剤コンジュゲートを用いると(Syrgos及びEpenetos, Anticancer Research 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz及びSpringer, Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172 (1997); 米国特許第4975278号)、腫瘍への薬剤部分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, Lancet, 603-05 (1986); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera等(編), pp. 475-506 (1985))。これによ

10

20

30

40

50

って、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている (Rowland等, *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87 (1986))。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、リシンなどの植物毒、ゲルダナマイシン (Mandler等, *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (19):1573-1581 (2000); Mandler等, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 (2000); 及びMandler等, *Bioconjugate Chem.* 13:786-791 (2002))、メイタンシノイド (欧州特許第 1 3 9 1 2 1 3 号; Liu等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8618-8623 (1996))、及びカリケアマイシン (Lode等, *Cancer Res.*, 58:2928 (1998); Hinman等, *Cancer Res.*, 53:3336-3342 (1993)) などの小分子毒素などのが含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含むメカニズムにより、その細胞障害性及び細胞分裂停止性効果を発揮しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

そのような免疫複合体の生成の際に有用な化学治療剤にはBCNU、ストレプトゾイン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、アドリアマイシン及び5-フルオロウラシルが含まれる。

【0129】

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(P A P I、P A P I I及びP A P - S)、モモルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*Saponaaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。様々な放射性核種は、放射性コンジュゲートした抗体の産生に利用できる。例として²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reなどがある。抗体と細胞障害性剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(M X - D T P A)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。

抗体と細胞障害性剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238:1098(1987)

10

20

30

40

50

に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害性剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992))。

【0130】

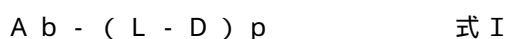
更に、小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド(米国特許第5208020号)、トリコセン(trichothene)及びCC1065も、本発明の製剤に使用する包
10
合可能な毒素と考えられる。一実施態様では、完全長抗体又はその抗原結合断片は一又は複数のメイタンシノイド分子(例えば、抗体分子当たり約1~約10メイタンシノイド分子)と結合できる。メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。天然源からの単離又は化学的に調製したメイタンシノイドには、メイタンシン、メイタンシナル及び誘導體と、例として米国特許第5,208,020号及びここに挙げた文献(col.2, 53行目からcol.3, 10行目を参照)及び米国特許第3896111号及び同第4151042号に記載の類似体が含まれる。また、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートの調整方法は米国特許第5,208,020号にも記載されている。好ましい実施態様では、メイタンシノイドはジスルフィド又は他の硫黄含有リンカー基を介して抗体に結合する。例えば、メイタンシンをMay-SS-Meに変換し、それをMay-S
20
H3に還元して、修飾抗体に再作用させてメイタンシノイド-抗体免疫コンジュゲートを生成してもよい。Charl等, Cancer Res. 52:127-131(1992)。抗体は周知の方法にて修飾し、ついで遊離型又は保護したチオール基を含む抗体をメイタンシノイドを含むジスルフィドに再作用させてコンジュゲートを生成する。抗体-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害活性は周知の方法及びIC₅₀決定法によりインビボ又はインビトロで測定できる。

カリケアマイシンは対象となるもう一つの免疫コンジュゲートである。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、¹I、²I、³I、N-アセチル-¹I、PSAG及び¹I₁(Hinman等, Cancer Research
30
, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998))が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0131】

抗体と核溶解活性(例えば、リボヌクレアーゼ又は、デオキシリボヌクレアーゼやDNAアーゼ等のDNAエンドヌクレアーゼ)を有する化合物の間で形成される免疫コンジュゲートも考えられる。

本発明のADCにおいて、リンカー(L)を介して、抗体(Ab)を、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態及び試薬を用いて調製される:
40
(1)共有結合を介してAb-Lを形成し、その後に薬剤部分Dと反応させるための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応;及び(2)共有結合を介してD-Lを形成し、その後に抗体の求核基と反応させるための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。



抗体上の求核基は、限定するものでなく、以下のものを含む:(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えばリシン、(iii)側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv)抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール及び水
50

酸基は求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群及びリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(i) 活性エステル、例えばNHSEエステル、HOBtエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT（ジチオトレイトール）による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン（トラウトの試薬）を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。

10

【0132】

また、本発明の抗体-薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入することによって生成してよく、リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤（Domen等、J. Chromatog., 510:293-302 (1990)）上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル（アルデヒド及びケトン）基が生じう

20

。

【0133】

同様に、薬剤部分上の求核基は、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、(i) 活性エステル、例えばNHSEエステル、HOBtエステル、ハロギ酸、及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及び

30

リンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル、及びアリアルヒドラジド基。

別法として、抗体及び細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする各領域を含有する。

40

【0134】

本明細書に記載のADCは、あるいは、架橋剤、例えば市販（例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより）のBMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、スルホ-SMPB、及びSVSB（スクシンイミジル-（4-ビニルスルホン）安息香酸塩）を用いて調製される。

また、抗体は高い放射活性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗

50

体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例として、 At^{211} 、 Bi^{212} 、 I^{131} 、 In^{113} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば Tc^{99} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴 (nmr) 映像 (核磁気共鳴映像、mri としても公知) 用のスピン標識、例えば ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含むなど適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば Tc^{99} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90 はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN (登録商標) 法は、ヨウ素-123 の導入に使用することができる (Fraker 等 (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)。放射性核種の他の方法は、「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」 (Chatal, CRC Press 1989) に記載されている。

別法として、抗体及び細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNA の長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」 (例えばストレプトアビジン) に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤 (例えば放射性ヌクレオチド) にコンジュゲートする「リガンド」 (例えばアビジン) を投与する。

【0135】

12) 他のアミノ酸配列修飾

本発明の抗体およびポリペプチドのアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれうる。本発明の抗体およびポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、それらをコードする核酸中に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、本発明の抗体およびポリペプチドのアミノ酸配列内の残基の欠失及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特徴を有するとするならば、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、その最終コンストラクトに達するまでなされる。また、アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数又は位置の変化などの、本発明の抗体およびポリペプチドの翻訳後プロセスを変更しうる。

突然変異誘発の好ましい位置である本発明の抗体およびポリペプチドの所定の残基又は領域の特定のために有用な方法は、Cunningham 及び Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989) に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され (例えば、arg, asp, his, lys, 及び glu 等の荷電残基)、中性又は負荷電アミノ酸 (最も好ましくはアラニン又はポリアラニン) に置換され、アミノ酸と抗原 (例として抗組織因子抗体) との相互作用に影響を及ぼす。ついて置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更なる又は他の変異体を導入することにより精製される。しかして、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を分析するために、ala スキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された抗体又はポリペプチド変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

【0136】

アミノ酸配列挿入は、1 残基から 100 以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び/又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内

挿入物を含む。末端挿入物の例には、N末端メチオニル残基を持つ抗体ないしポリペプチド又は細胞障害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増加させる酵素(例えばADEPT)又はポリペプチドへの、抗体のN又はC末端への融合物を含む。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体又はポリペプチド分子において少なくとも一つのアミノ酸残基が異なる残基で置換されている。置換突然変異に対して最も興味深い部位は高頻度可変領域を含むが、FR変化も考えられる。保存的置換は、「好ましい置換」と題して以下の表Aに示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表Aに「例示的置換」と名前を付け、又はアミノ酸の分類に関して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてもよい。

10

表 A

アミノ酸置換

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

20

30

40

【 0 1 3 7 】

ポリペプチドおよび抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

50

- (2) 中性の親水性 : cys、ser、thr、
- (3) 酸性 : asp、glu ;
- (4) 塩基性 : asn、gln、his、lys、arg ;
- (5) 鎖配向に影響する残基 : gly、pro ; 及び
- (6) 芳香族 : trp、tyr、phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

抗体の適切な配置の維持に関与しない任意のシステイン残基は、一般にセリンで置換し、分子の酸化安定性を向上させて異常な架橋を防止する。逆に、抗体にシステイン結合を付加して、その安定性を向上させてもよい（特にここでの抗体は抗体断片、例としてFv断片である）。

10

【 0 1 3 8 】

ある型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位（例えば6 - 7部位）を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とIgEの接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

20

抗体のアミノ酸変異の他の型は、抗体の元のグリコシル化パターンを変更する。変更とは、抗体に見い出される一又は複数の糖鎖部分の欠失、及び/又は抗体に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

30

【 0 1 3 9 】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン（ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸）のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

40

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、それが一又は複数の上述したトリペプチド配列（N結合グリコシル化部位のもの）を含むように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる（O-結合グリコシル化部位の場合）。

抗IgE抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離（天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合）又は初期に調製された変異体又は抗IgE抗体の非変異体のオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

50

【 0 1 4 0 】

1 3) 他 の 抗 体 修 飾

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキサラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール (例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。このような技術及び他の好適な製剤はRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)に開示されている。

10

20

【 0 1 4 1 】

C . 薬 理 学 的 製 剤

治療用製剤は任意の製薬上許容可能な担体、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する活性成分とを混合することにより、調製され保管される (Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990])。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシipientに対して無毒性であり、緩衝液、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE、異性重亜硫酸ナトリウムを含む抗酸化剤；防腐剤、等張剤 (isotonicifier)、安定剤、金属複合体 (例えば、Zn-タンパク質複合体)；EDTA等のキレート剤及び/又は非イオン性界面活性剤を含む。

30

治療剤として抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持した抗体断片又はペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marscoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

【 0 1 4 2 】

緩衝液 (バッファ) は、特に pH に依存して安定する場合に、治療的有効性が最適になる範囲に pH を調節するために用いる。緩衝液は約 50 mM から 250 mM の濃度範囲であるのが好ましい。本発明の使用のために好適な緩衝剤には、有機及び無機酸の両方とそれらの塩が含まれる。例えば、クエン酸塩、リン酸塩、琥珀酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩。更に、緩衝液はトリスのようなヒスチジン及びトリメチルアミンからなり得る。

40

防腐剤 (保存剤) は細菌の成長を遅らせるために一般的に 0.2% - 1.0% (w/v) の範囲で添加される。本発明の使用に好適な保存剤には、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；ベンザルコニウムハロゲン化合物 (例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物)、塩化ベンゼトニウム；チメロサール、フェノール、ブチル及びベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及び m-クレゾールが含まれる。

時に「安定剤」としても知られる緊張剤は、液体成分の緊張性を調節又は維持するため

50

にある。タンパク質や抗体のような大きな、荷電した生体分子と共に用いる場合、アミノ酸側鎖の荷電基と相互作用して分子内及び分子間相互作用を潜在的に減少させるのでたびたび「安定剤」と呼称される。緊張剤は重量にして0.1%~25%、好ましくは1~5%の間で、他の成分との相対的な量を考慮して任意の量で加える。緊張剤には、多価糖質アルコール類、好ましくは三水素又はより高い糖質アルコール類、例えばグリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。

【0143】

更なる賦形剤には、以下のうちの1以上の役割をする薬剤が含まれる：(1)充填剤、(2)溶解亢進剤、(3)安定剤及び(4)変性や容器壁への付着を防止する作用剤。安定剤は活性なタンパク質又は抗体の重量当たり0.1~10000分の1の範囲で加えることができる。一般的な安定剤には：多価糖質アルコール類(上記を列挙した)；アミノ酸、例えばアラニン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、オルニチン、ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニン、その他；有機糖質または糖質アルコール類、例えば蔗糖、ラクトース、ラクチトール(lactitol)、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイノシトース(myoinisitose)、ミオイノシトール、ガラクトース、ガラクトチトール、グリセロール、シクリトール(例えばイノシトール)、ポリエチレングリコール)；硫黄を含んでいる還元剤、例えば尿素、グルタチオン、チオクト酸、ナトリウムチオグリコール酸塩、チオグリセロール、モノチオグリセロール及びナトリウムチオ硫酸塩；低分子量のタンパク質、例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは他の免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；単糖類(例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、ブドウ糖)；二糖類(例えばラクトース、マルトース、蔗糖)；三糖類(例えばラフィノース)；及び多糖類(例えばデキストリンまたはデキストラン)が含まれる。

【0144】

非イオン性界面活性剤又は洗浄剤(「湿潤剤」としても知られている)は、攪拌誘導性凝集から治療的タンパク質を保護するだけでなく治療的薬剤を溶解するのを促進し、それによって製剤が曝され、活性な治療的タンパク質又は抗体の変性の原因となることなく表面ストレスを剥奪する。非イオン性界面活性剤は約0.05mg/ml~約1.0mg/ml、好ましくは約0.07mg/ml~約0.2mg/mlの範囲内で加える。

好適な非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート(20, 40, 60, 65, 80, 等)、ポリオキサマー(184, 188, 等)、ピューロニック(Pluronic)(登録商標)、ポリオルズ(polyols)、トリトン(登録商標)、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(トウイーン(登録商標)-20、トウイーン(登録商標)-80、等)、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン水素化されたヒマシ油10、50及び60、グリセロールモノステアレート、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースが含まれる。使用可能な陰イオン界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルナトリウムスルホサクシネート及びジオクチルナトリウムスルホン酸塩が含まれる。陽イオン界面活性剤には、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムが含まれる。

【0145】

製剤をインピボ投与に用いるために、滅菌しなければいけない。滅菌濾過膜に濾過することによって製剤を無菌的に精製してもよい。ここでいう医薬組成物は一般的に、滅菌したアクセスポートを有する容器、例えば、静脈溶液バッグ又は皮下注射針によって穴を開けることができる栓を有するバイアルに納めてある。

投与方法は公知で適応できる方法に従う、例として、単回又は複数回のポーラス投与、又は好適な方法での長時間をかけての輸液、例えば、皮下、静脈内、腹膜内、筋肉内、動脈内、病巣内、関節内による注入又は輸液、局所投与、吸入、又は持続的除放あるいは伸展的除放方法による。

10

20

30

40

50

また、ここでいう製剤は、治療する特定の症状に必要な一以上の活性な化合物、好ましくはお互い悪影響を示さない相補的活性を有する化合物を含んでよい。あるいは又は加えて、化合物は細胞障害性剤、サイトカイン又は成長阻害性剤を含んでよい。そのような分子は意図する目的に有効な量で適切に組み合わせる。

また、活性成分は、例としてコアセルベーション技術または界面重合法により調製したマイクロカプセル、例として、それぞれ、コロイド薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミン微小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）における又はマクロエマルジョンにおける、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに包含してよい。これらの技術は、上掲のRemington's Pharmaceutical Sciences 18th editionに開示されている。

10

【0146】

ここで開示したタンパク質及び抗体の安定性は、非毒性の「水溶性多価金属塩」の使用により亢進されるであろう。例として、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Sn^{4+} 、 Al^{2+} 、及び Al^{3+} が含まれる。上記多価金属陽イオンと共に水溶性塩を形成する陰イオンの例には、無機酸及び/又は有機酸によって形成されるものが含まれる。このような水溶性塩は水(20)に少なくとも20mg/ml、或いは100mg/ml、或いは200mg/mlの溶解度を持つ。

「水溶性多価金属塩」を形成するのに使用可能な好適な無機酸には、塩酸、酢酸、硫酸、硝酸、チオシアン酸及びリン酸が含まれる。使用可能な好適な有機酸には、脂肪族カルボン酸及び芳香族の酸が含まれる。この定義の範囲内の脂肪族の酸は、飽和又は不飽和 C_{2-9} カルボン酸(例えば、脂肪族モノ-、ジ-及びトリ-カルボン酸)と定義してよい。例として、この定義の範囲内の例示的モノカルボン酸には、飽和 C_{2-9} モノカルボン酢酸(monocarboxylic acids acetic)、プロピオン酸、酪酸、バレリアン酸、カプロン酸、エナント酸、カプリルペラルゴン酸及びカプリオニック(capryonic)酸、及び不飽和 C_{2-9} モノカルボン酸アクリル(monocarboxylic acids acrylic)、プロピオン酸、メタクリル酸、クロトン酸及びイソクロトン酸が含まれる。例示的ジカルボン酸には、飽和 C_{2-9} ジカルボン酸マロン(dicarboxylic acids malonic)、コハク酸、グルタル酸、脂肪族及びピメリン酸が含まれ、一方、不飽和 C_{2-9} ジカルボン酸にはマレイン酸、フマル酸、シトラコニック(citraconic)酸及びメサコン酸が含まれる。例示的トリカルボン酸には、不飽和 C_{2-9} トリカルボン酸トリカルバリル酸及び1,2,3-ブタネトリカルボキシル酸が含まれる。更にまた、この定義のカルボン酸は、ヒドロキシカルボン酸を形成するように一又は二の水酸基を持つ。例示的ヒドロキシカルボン酸には、グリコール酸、乳酸、グリセリン酸、タルトロン酸、リンゴ酸、酒石酸及びクエン酸が含まれる。この定義の範囲内の芳香族の酸は、安息香酸性及びサリチル酸を含む。

20

30

本発明のカプセル化ポリペプチドを安定化を亢進するために使用可能な一般的に用いられる水溶性多価金属塩には、例として：(1)ハロゲン化物(例えば塩化亜鉛、塩化カルシウム)、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩及びチオシアン酸塩の無機酸性金属塩類；(2)脂肪族カルボン酸金属塩(例えば酢酸カルシウム、酢酸亜鉛、カルシウムプロピオン酸、亜鉛グリコール酸塩、カルシウム乳酸塩、亜鉛乳酸塩及び亜鉛酒石酸塩)；及び(3)ベンゾアートの芳香族のカルボン酸金属塩(例えば亜鉛ベンゾアート)及びサリチル酸塩が含まれる。

40

【0147】

D. 治療方法

疾患の予防又は治療のために、活性剤の適量は、上記のように治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び過程、予防を目的としてか治療を目的として薬剤を投与するのか、現在の治療法、患者の病歴、及び薬剤への反応、注意深い医師の判断により決定されるであろう。一時又は一連の治療を通じて患者に薬剤を好適に投与する。

好ましい治療方法は、IgE媒介疾患の治療である。IgE媒介疾患にはアトピー性疾患が含まれ、アトピー性疾患は多くの共通の天然に生じる吸入性及び経口摂取性の抗原と連続的に産生されるIgE抗体に対して免疫学的応答を遺伝的に起こすことに特徴がある

50

。特定のアトピー性疾患には、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎及びアレルギー性胃腸疾患が含まれる。アトピー患者はたびたび複数のアレルギーをもつ、これは、花粉、真菌（例えば、カビ）、動物及び虫の死骸、とある種の食物に対するIgE抗体とそれによる症状を有することを意味する。

しかしながら、亢進したIgEレベルに関する疾患は遺伝的（アトピー性）の原因のものに限らない。IgE媒介性のようであり、本発明の製剤によって治療可能である亢進したIgEレベルに関する他の疾患には、過敏症（例えば、アナフィラキシー性過敏症）、湿疹、蕁麻疹、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、寄生虫病、高IgE症候群、毛細血管拡張性運動失調、ウスコット-アルドリッヒ症候群、胸腺リンパ形成不全症、IgE骨髄腫及び対宿主性移植片反応が含まれる。

10

【0148】

アレルギー性鼻炎；アレルギー性鼻結膜炎又は枯草熱としても知られる、は、吸入性のアレルゲンに対する最も一般的なアトピー反応の症状であり、その重症度や持続期間はたびたびアレルゲンへの曝露の強度および長さに相関する。何歳でも発症しうるが、通常は小児期又は青年期に発症する慢性疾患である。典型的な発作は、おびただしい水性鼻漏、発作的なくしゃみ、鼻閉塞及び鼻と口蓋の痒みからなる。また、後鼻腔の粘液排出により咽頭炎、咽頭痰及び咳が起こる。また、結膜及び眼瞼の強い痒み、赤み、流涙及び羞明を伴うアレルギー性眼瞼結膜炎の症状もある。重症発作ではたびたび、全身性不快感、脱力感、疲労、時には激しいくしゃみの連続後の筋肉苦痛を伴う。

【0149】

20

喘息；可逆的閉塞性気道疾患としても知られる、は、可逆的に自然発症するまたは治療が必要な呼吸器刺激及び気管支収縮剤化学物質に対する気道の過剰反応、喘鳴発作の発起、呼吸困難、胸部圧迫、及び咳に特徴付けられる。気道全体を含む慢性疾患であるが、時々軽い一過性の発症から重い慢性の生命を脅かす気道閉塞まで重症度は様々である。喘息とアトピーは共存し、喘息患者の半分ほどはアトピーを持ち、さらに少ない割合のアトピー患者もまた喘息を持つ。アトピーと喘息は完全に非依存性のものであるが、特に小児期の間に、非アトピー性患者よりもアトピー患者により頻繁に喘息が起こる。さらに喘息は歴史的に2つのサブグループ、外因性喘息と内因性喘息に分けられている。

アレルギー性、アトピー性または免疫性喘息としても知られる外因性喘息は、通常、乳児期又は小児期の人生の初期に普遍的に喘息になった患者を指す。湿疹又はアレルギー性鼻炎を含むアトピーの他の症状は、たびたび共存する。喘息発作は、花粉の季節、動物の存在、ハウスダスト、羽毛枕又は他のアレルゲンへの曝露によって起こる。皮膚検査は原因となるアレルゲンに対して陽性の膨疹・発赤反応を示す。興味深いことに、全血清中のIgE濃度はしばしば上昇するが時に正常である。

30

【0150】

非アレルギー性又は特発性喘息として知られる内因性喘息は、一般的には成人期の呼吸器感染症後又は顕性時期に最初に発症する。症状は、花粉の季節又は他のアレルゲンへの曝露に関係のない慢性又は再発性気管支閉塞を含む。皮膚検査では通常のアトピー性アレルゲンに陰性であり、血清中のIgE濃度は正常である。更なる症状には、痰血及び好酸球増加が含まれる。アスピリン感受性か、運動誘発性か、感染症か及び心理学的なものかなどの、喘息をサブグループに分類する他のスキームは、他の患者よりもある特定の患者に影響する外因性のトリガー因子を単に規定する。

40

最後に、重要なことには、歴史的に関連したIgE依存性のアレルギー性喘息のみを分類したものがあがるが、現在では、IgEと喘息（アレルギー性及び非アレルギー性の両方）に相関関係を示す統計学的に有意なデータがあることを注記する。Chapter 27, 「The Atopic Diseases」, A.I. Terr in Medical Immunology, 9th Ed., Simon and Schuster, Stites等, 編集. (1997)。結果として、この明細書の目的としての「IgE媒介疾患」の用語はアレルギー性及び非アレルギー性喘息の両方を含む。

【0151】

喘息発作の身体的特徴には、呼吸促迫、聞こえる程度の喘鳴、及び呼吸の付属筋の使用

50

が含まれる。また、速い脈拍と上昇した血圧が一般的にあり、末梢血及び鼻腔内分泌物中の好酸球レベルの上昇がある。肺機能では、流量及び1秒強制呼気量(FEV₁)の減少がみられる。全肺気量及び余剰肺気量は一般的に正常またはわずかに増加しているが、極度の気管支痙攣により減少しうる。

喘息の病理は即時型反応と遅発型反応に分けられる。即時型反応は、平滑筋収縮、浮腫及び分泌過多に特徴があり、一方後期反応は細胞性炎症に特徴がある。喘息は、感染症(例として、ウイルス性呼吸器感染症)、物理的要因(例として、運動、過換気、深呼吸、心理的要因)、大気要因(例えば二酸化硫黄、アンモニア、冷気、オゾン、蒸留された水蒸気)、経口抗原(例えばプロプラノロール、アスピリン、非ステロイド性の抗炎症剤)、経験的吸入抗原(例えば高緊張の溶液、クエン酸、ヒスタミン、メタコリン、プロスタグランジンF₂)及び職業吸入抗原(例えばイソシアン酸塩)により引き起こされる。アレルギー性喘息の原因となる様々な更なる職業的または環境的アレルゲンには、動物産生物、昆虫粉塵、海生物、植物性製品、果物、種、葉及び花粉、有機染料及びインク、微生物薬品、酵素、治療薬、滅菌剤、無機及び有機化学製品が含まれる。

【0152】

湿疹、神経皮膚炎、アトピー性湿疹または Besnier's 痒疹としても知られているアトピー性皮膚炎は、アトピーの家族性及び免疫性特徴をもつ患者のサブセットに特異的な一般的な慢性皮膚疾患である。基本的な特徴は掻痒性真皮炎症性反応であり、それは特定の部位に対する偏向を有する左右対称的に分布した特徴的な皮膚の発疹を誘発する。また、高頻度にBリンパ球からのIgE過剰産生がある。アトピー性皮膚炎はアレルギー性鼻炎及び喘息及び高IgEレベルが関与するのでアトピーの皮膚型として分類されるが、皮膚炎の重症度は必ずしも皮膚試験時のアレルゲンへの曝露に相関はしておらず、減感作(他のアレルギー疾患と異なって)は効果的な治療方法ではない。高血清IgEにより確実にアレルギー性喘息が診断され、正常値ではそれが除外される。疾患の発症はいつの年代でも起こり、病変は急性の紅斑性浮腫性丘疹又は鱗屑を有するプラークから始まる。かゆみにより滲出及び痂皮を生じて、慢性苔癬化に至る。細胞レベルでは、急性病変は浮腫性であり、真皮に単核細胞であるCD4リンパ球が浸潤している。好中球、好酸球、血漿細胞及び好塩基球はまれであるが、脱顆粒性肥満細胞は存在する。慢性病変は表皮過形成、角質増殖及び不全角化症を特徴とし、真皮には単核細胞、Langerhans'細胞及びマスト細胞が浸潤する。また、小型神経の神経周膜の関係を含む線維症の病巣領域がありうる。

【0153】

好酸性胃腸疾患としても知られるアレルギー性胃腸疾患は、多数のIgE食物感受性が局所の消化管粘膜反応と関係している異常なアトピー性症状である。成人ではまれであり、乳児ではより一般的で一時的である。症状は摂取された食物アレルゲンが空腸粘膜の局所性IgE抗体に反応して、マスト細胞伝達物質を解放するとき起こり、結果として食事の直後に胃腸症状となる。継続して曝露すると慢性的な炎症となり、結果として胃腸タンパク質損失及び低タンパク質性(hypoproteinemic)浮腫になった。炎症性腸粘膜からの失血により、十分鉄欠乏症貧血症を引き起こしうる。アレルギー反応は、アレルゲン曝露後に上部消化管粘膜に局所的に起こり、アレルゲン回避により回復する。

アナフィラキシー及び蕁麻疹は明らかにIgE媒介性であるが、一般的な決定因子に欠け、アトピー性個体に偏向性はない。アナフィラキシーは急性で、さまざまな器官系、通常は心血管、呼吸器、皮膚及び胃腸が同時に関与する一般的なアレルギー反応である。反応は免疫学的な媒介であり、既に感作を受けている個体がアレルゲンに曝露すると起こる。蕁麻疹及び血管浮腫は、ヒスタミンが表在性皮膚血管上のレセプターを刺激した結果生じる物理的なはれあがり、紅斑及び掻痒感を指し、全身性アナフィラキシーの皮膚特徴である。全身性アナフィラキシーは、薬、昆虫毒物または食物から生じる、多数の器官に同時に起こるIgE-媒介反応である。それは急に、誘導されたアレルゲン、IgEを持つ肥満細胞によって生じ、さまざまな重要な器官の機能が深く致命的に変更される。必ずしも同じ程度とは限らないが、血管虚脱、急性気道閉塞、皮膚血管拡張及び浮腫、及び胃腸と尿生殖器の筋けいれんがほぼ同時に起こる。

【 0 1 5 4 】

アナフィラキシーの病理は、気道及び局所性の肺拡張不全の粘液性のつまりを伴う、血管浮腫及び高度に膨張した肺を含む。細胞レベルでは、気管支の粘膜下腺の分泌過多、粘膜及び粘膜下浮腫、気管支周囲の脈管うっ血、及び、気管支の壁の好酸球増加が、急性喘息発作中などに、同様に肺に現れる。肺水腫及び出血はありうる。気管支筋けいれん、高度膨張及びさらに肺胞の断裂もまた、起こりうる。ヒトアナフィラキシーの重要な特徴には、喉頭、気管、喉頭蓋及び下咽頭の基底膜の浮腫、脈管うっ血及び好酸球増加が含まれる。

アレルゲンへの曝露は、摂取、注射、吸入、又は皮膚または粘膜への接触を介するものでもよい。反応は、アレルゲンへの曝露の後、数秒または数分以内で始まる。初めにショック又は差し迫った死の感覚があり、その後急速に一つ以上の標的器官系の症状が続く：心血管、呼吸器、皮膚及び胃腸。

10

アナフィラキシーに寄与するアレルゲンは、一般的にアトピーに關与するものとは異なる。食物、薬物、昆虫毒物又はゴム製品が一般的原因である。食物アレルゲンには、甲殻類、軟体動物（例えばロブスタ、エビ、カニ）、魚、マメ科植物（例えばピーナッツ、エンドウ、豆、甘草）、種（例えばゴマ、綿実、キャラウエー、マスター、ブラックシード、ヒマワリ）、ナッツ、ベリー、卵白、ソバ及び牛乳の中にあるものが含まれる。薬物アレルゲンは、異種タンパク質及びポリペプチド、つまり多糖類及びハプテン薬の中にあるものを含む。昆虫アレルゲンは、ミツバチ、スズメバチ (yellow jacket, hornet, wasp) 及びフシアリを含む膜翅目昆虫を含む。

20

エピネフリンがアナフィラキシーのための代表的な処置である一方、抗ヒスタミン剤または他のヒスタミン遮断剤は一般的により重症でない蕁麻疹又は血管性浮腫反応に処方される。

【 0 1 5 5 】

E . 併用療法

本発明の方法は、I g E 媒介疾患の公知の処置方法、すなわち併用又は追加的処置工程としてか、治療用製剤の追加的成分としての何れかで併用できる。

例えば、抗ヒスタミン、特に非鎮痛性抗ヒスタミンを、本発明の抗 I g E 抗体と同時、先立って又は投与前に投与してもよい。好適な抗ヒスタミン剤には、アルキルアミン（例えば、クロルフェニラミン）、エタノールアミン（例えば、ジフェンヒドラミン）及びフェノチアジン（例えば、プロメタジン）が含まれる。多くの抗ヒスタミンはエフェクター細胞上にあるレセプター部位を遮断することによってヒスタミンの薬理的効果に拮抗するが、他の一般的な抗ヒスタミン剤は、感作を受けてアレルゲン特異的 I g E（例えば、クロモグリク酸ナトリウム）を備えている肥満細胞からのヒスタミン放出を遮断することによって作用する。抗ヒスタミン剤の例には、アステミゾール、アザタジンマレイン酸塩、プロフェニラミンマレイン酸塩、カルビノキサミンマレイン酸塩、塩酸セチリジン、クレマスチンフマル酸塩、シプロヘプタジン塩酸塩、d-マレイン酸プロムフェニラミン、d-マレイン酸クロルフェニラミン、ジメンヒドリナート、塩酸ジフェンヒドラミン、ドキシラミン琥珀酸塩、塩酸フェクソフェナジン、塩酸テルフェナジン、塩酸ヒドロキシジン、ロラチジン (loratidine)、塩酸メクリジン、クエン酸トリベレナミン、塩酸トリベレナミン、塩酸トリプロリジンが含まれる。

30

40

【 0 1 5 6 】

I g E 媒介疾患の特徴的な症状（例えば、即時型反応）は、交感神経模倣薬又は気管支拡張効果を持つ薬剤により寛解することができる。エピネフリンは広範作用性及びアドレナリン性であり、しばしば 1 : 1 0 0 の水溶液 0 . 2 - 0 . 5 m l の用量で皮下的に投与する。また、長時間の持続効果が望まれるときは、1 : 2 0 0 で混合している長時間作用性エピネフリン（すなわち、テルブタリン）を用いる。適切な付加的な - アドレナリン作用性物質には、経鼻投与（例えば、携帯ネビュライザ、断続的な陽圧呼吸装置または単位用量加圧吸入器）又は経口投与のためのアルブテロール、ピルブテロール、メタプロテレノール、サルメテロール、イソエタリン及びフォルモテロールが含まれる。

50

また、特にそれらが上記の交感神経作動性薬物と組み合わせるときに、キサンチンの投与によって気管支拡張症が起こりうる。キサンチンの例には、アミノフィリン（静注、250 - 500 mg）及びテオフィリン（経口、10 - 20 μ g/mlの血清濃度）が含まれる。

多様なIgE媒介疾患（例えば遅発型反応）による他の症状は、糖質コルチコイド又は抗炎症性効果を有する他の薬物による処置によって軽減することができる。ベクロメタゾンニプロピオン酸塩、トリアムシノロンアセトニド及びフルニソリドは長期の維持療法としてエアロゾル化した形で投与するが、プレドニゾン（30 - 60 mg 毎日）は重症発作のために全身的に投与する。更に、抗炎症性効果を有する副腎皮質ステロイドは、以下から成る：ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、フルニソリド、フルチカゾン（fluticasone）プロピオン酸塩、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾン、プレドニゾン、トリアムシノロン。

【0157】

また、本発明の治療法と組み合わせることができる非ステロイド性の抗炎症剤には、アセトアミノフェン、アスピリン、ブロムフェナクナトリウム、ジクロフェナクナトリウム、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェンカルシウム、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナム酸ナトリウム、メフェナム酸、ナブメトン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン（phenylbutzone）、ピロキシカム、スリンダク、トルメチンナトリウムが含まれる。

さらにまた、最大の治療的効果は、鬱血除去薬（例えばフェニレフリン、フェニルプロパノラミン、シュードエファドリン（pseudoephadrin））、咳抑制剤（例えばデキストロメトルファン、コデインまたはヒドロコドン）または鎮痛薬（例えばアセトアミノフェン、アスピリン）の投与によって達成されることができる。

アレルゲン脱感作は、アレルギー反応を減弱又は排除することを目的として患者にアレルゲンを注入する治療方法である。それは、また、アレルゲン免疫治療、減感作又はアレルギー注入治療として知られている。頻繁ではないが、一次処置として、他のアレルギー処置と組み合わせればしばしば用いられる。アレルゲン回避が不可能なときに、成功裏に行われている。代表的なアレルゲン脱感作処置は、注射部位に一過性の小さくて局所性の炎症領域ができるまで、服用回数を週に一回又は2回に増やして無菌のアレルゲンを皮下注射することを含む。そうして2 - 4週に一度のスケジュールで服用する。アレルギー性脱感作は、アナフィラキシーの治療にも成功するが、多くの場合アレルギー性喘息及びアレルギー性鼻炎の処置において用いられる。また、脱感作は、アジュバント、例えば、鉱油の水性抗原のエマルジョンである不完全なフロイントアジュバント、の使用によって効果的に用いられる。生理的効果により、アレルゲンの液滴が段階的に放出される不溶性の液貯蔵所が作られる。アレルゲン脱感作の他の形は、免疫原性の効果的程度を保持する一方で比較的低いアレルギー性（すなわち、アレルギー性反応を引き起こす）を有する分子をつくるためにグルタルアルデヒドを有する単量体アレルゲンを重合させることである。

【0158】

F. 薬剤用量：

本発明の医薬品組成物の用量及び所望の薬物濃度は、想定する特定の使用によって変化する。適当な用量の測定または投与のルートは、当分野の技術の範囲内でよい。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定のための確実な手引きとなる。有効量の異種間スケールリングは、Mordenti, J. 及び Chappell, W. 「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics」, In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi 等, 編集, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46. に記載の原理に従って行うことができる。

本願明細書において記載されているポリペプチドまたは抗体のインビボ投与が用いられるとき、正常な用量は投与のルートによって、哺乳動物体重量にして1日当たり約10 ng/kg ~ 約100 mg/kg 以下又はそれより多く、好ましくは約1 mg/kg/日 ~ 10 mg/kg/日と異なる。特定の用量及び運搬の方法に関する手引きは、文献に示さ

10

20

30

40

50

れる；例として、米国特許第4,657,760号；5,206,344；又は5,225,212を参照。異なる製剤が異なる処置及び異なる疾患のために効果的であること、及び特定の器官または組織を治療することを目的とする投与は他の器官または組織への投与と異なる方法で運搬する必要があることは本発明の範囲内である。さらに、用量は、一つ以上の別々の投与によって、又は持続性点滴によって投与することができる。数日以上にわたる繰り返し投与の処置は、症状に応じて、疾患症状が希望通りに抑制されるまで継続する。しかしながら、他の投与計画は有効でありうる。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

【0159】

G．製剤の投与

限定はしないが、再構成される製剤を含む本発明の製剤は、タンパク質による治療を必要としている哺乳動物、好ましくはヒト、に対して、ポータル又はある期間にわたる連続的注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、腱鞘内、口内、局部的又は吸入経路による既知の方法に従い投与される。

好ましい実施態様において、製剤は皮下（すなわち、皮膚の下）投与によって哺乳動物に投与される。かかる目的のため、製剤はシリンジを用いて注射される。しかし、製剤の投与のための他の装置、例えば、注射装置（例えば、Inject-ease™及びGenject™装置）；インジェクターペン（GenPen™など）；自動インジェクター装置、針なし装置（例えば、MediJector™及びBioJector™）；及び皮下パッチ送達システムなどが利用可能である。

特定の実施態様では、本発明は、単回用量投与単位のキットに関する。そのようなキットには、単一又は複数のチャンバーを有するあらかじめ充填したシリンジを包含する、治療用タンパク質又は抗体の液体製剤の容器を含む。あらかじめ充填したシリンジの例には、Vetter GmbH, Ravensburg, Germanyから入手したものがある。

【0160】

タンパク質の適当な投与量（「治療上有効量」）は、例えば、治療される状態、該タンパク質が予防的又は治療的目的で投与される状態の重篤性及び経過、治療歴、患者の病歴及び該タンパク質に対する反応性、使用されるタンパク質のタイプ、主治医の判断に依存するであろう。タンパク質は、一時期に又は一連の治療にわたり適切に投与され、その後の診断による任意の時期に患者に投与される。タンパク質は、単一の治療として又は他の薬物又は問題の状態を治療するのに有用な療法と併せて投与してもよい。

選択されるタンパク質が抗体の場合、例えば、一回又は複数回に分けての投与のいずれであっても、患者への投与に関する初回の推奨される投与量は、約0.1 - 20 mg / kgである。しかし、他の投与計画が有効な場合もある。本治療の進捗は、従来技術によって容易にモニターすることができる。

抗IgE製剤（例えば、rhUMA b E - 25、rhMA b E - 26、Hu - 901）の使用には、例えば、IgEを介したアレルギー性疾患、寄生虫感染、間質性膀胱炎及び喘息の治療又は予防法が含まれる。治療されるべき疾病又は疾患に依存して、抗IgE抗体の治療上有効量（例えば、約1 - 15 mg / kg）が患者へ投与される。

【0161】

H．製造品

本発明の他の実施態様では、製剤を含有する製造品が提供され、好ましくはその使用のための説明書を提供する。製造品は容器を含む。適切な容器には、例えばボトル、バイアル（例えば、二重チャンパーバイアル）、シリンジ（二重チャンパーシリンジなど）、及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような様々な材料で形成することができる。容器は製剤及び該容器の上又は該容器に付随したラベルを保持し、再構成及び／又は使用のための指示を表示する。さらに、該ラベルは製剤が皮下投与にとって有用であること、又は意図されることを表示する。製剤を収容する容器は、多目的使用バイアルであってもよく、再構成された製剤の繰り返し（例えば、2 - 6投与）投与を可能ならしめる。さらに、製造品は適切な希釈液（例えば、BWF I）を含む第二の容器を包含して

10

20

30

40

50

もよい。希釈液と凍結乾燥製剤を混合すると、再構成された製剤中の最終タンパク質濃度は、通常、少なくとも50 mg/mlになるであろう。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明に関する添付文書を含む、市販及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでいてもよい。

本発明は以下の実施例を参照することにより、さらに十分に理解されるであろう。しかし、それらは本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきものではない。本開示を通して全ての引例は、ここに出典により明確に取り込まれる。

他の実施態様では、本発明は、自動インジェクター装置での投与のためにここに記載の製剤を含む製造品を提供する。自動インジェクター装置は、作動すると患者又は投与する者の付加的必須の動作をすることなく内容物が運ばれる注射装置である。特に、投与量が一定で、投与回数が数回より多いときの、治療用製剤の自己投薬に適している。

【実施例】

【0162】

実施例1

霊長類 IgE の単離

ヒト IgE はヒト IgE 骨髄腫細胞株 U266 からクローニングした (ATCC, Manassas, VA, TIB # 196)。アカゲザルおよびカニクイザルの IgE 配列は、IgE スイッチ細胞を生成するように刺激されたアカゲザル及びカニクイザルの末梢血単核細胞 (PBMC) から得た cDNA からクローニングして配列決定した。フォワード及びリバースプライマー (下記) は、ヒト IgE 配列から設定した。上流のフォワードプライマーは CH2 ドメインのちょうど上流に設定した。リバースプライマーは膜貫通ドメインの末端に設定した。アカゲザルおよびカニクイザルの PBMC は、California National Primate Research Center (Davis, CA) から入手した。5 × 10⁶ の PBMC を IL-4 (100 ng/ml) および CD40L (3 µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN、それぞれ # 204-IL 及び # 617-CL) とともに 4 日間培養した。次いで細胞を回収し、RNA を調製し (RNeasy Miniキット、#74106、Qiagen, Valencia, CA)、BD Sprint Powerscript oligo dT プライミングキット (BD Biosciences, San Jose, CA、#639558) を用いて cDNA を作製した。次いで、RT-PCR を行った [94 2分; 94 15秒; 60 30秒; 68 2分; 30 サイクル; 68 10分]。TA クローニングのために A オーバーハングを付加するために、Taq ポリメラーゼを示したサイクルの後に添加した (72 10分) (Invitrogen, Carlsbad, CA、#45-0641)。PCR 産物は、TOPO-TA クローニングによってクローニングし、その後クローンの配列を確認した (Genentech, Inc.)。ヒト、アカゲザルおよびカニクイザルの配列は構内の分析プログラム (Genentech, Inc.) を使用して配列比較した。以下の相同性は CH2 および膜貫通ドメイン間の配列についてである。アカゲザル (432 アミノ酸) とカニクイザル (431 アミノ酸) との間では、6 の相違があり、およそ 98.6% 相同である。ヒトとアカゲザルとの間では、53 の相違があり、87.7% 相同に等しかった。ヒトとカニクイザルでは、56 の相違があり、87% 相同に等しかった (図1を参照)。

クローニングに用いたプライマー:

CH2 配列の上流のフォワードプライマー:

5' - ccgcccaccgtgaagatcttacagtc (配列番号: 63)

膜貫通ドメインの終わりのリバースプライマー:

5' - cggtctgagacttaggcgtggggctggaggacgttg (配列番号: 64)

【0163】

実施例2

抗 IgE / M1' Ab の単離

CH3 - CH4 - M1' / Fc 融合タンパク質の生成

ヒト IgE CH3 - CH4 - M1' / Fc 融合タンパク質は、ヒト IgE CH3 - CH4 - M1' ドメインに、U266 細胞から調製した cDNA の M1' ドメインのすぐ下流の更なる 15 アミノ酸を付加して PCR 増幅させて生成した (ATCC Manassas, VA、TIB

B # 1 9 6)。RNAはU 2 6 6細胞から調製し(R N e a s y M i n iキット、# 7 4 1 0 6、Qiagen, Valencia, CA)、BD Sprint Powerscript oligo dTプライミングキット(BD Biosciences, San Jose, CA、# 6 3 9 5 5 8)を用いてc DNAを作製した。RT - P C Rを行い、P C R産物をT O P O - T Aクローニングによってクローニングした(Invitrogen, Carlsbad, CA、# 4 5 - 0 6 4 1)。哺乳動物細胞内での発現のためにP C R突然変異誘発によってN末端シグナル配列を加え、シグナル配列 + C H 3 + C H 4 + M 1' + 1 5アミノ酸を発現ベクター(p R K h u I g G 1 F c ; Genentech)にクローニングし、ヒトI g G 1 F c領域とのC末端融合を生成した。シグナル配列およびヒトI g G 1 F cを含む最終的なタンパク質の配列は、以下の通りである。

MGWSCIIILFLVATATGVHSTKCKCADSNPRGVSAYLSRPSFDLFI RKSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSRASGKPVNHS
TRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTDRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACL
IQNFMPEDI SVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNP
GLAGGSAQSQRAPDRVLCHSGQQQLPRAAGGSVPHPRCHCGAGRADWPGPELDVVCVEEAEGEAPWRAQVTDKAAHYTL
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 6 5)

タンパク質はC H O細胞(Genentech)の一過性の形質移入によって製造され、標準的なプロテインAセファロースカラムクロマトグラフィ技術を用いて細胞培養物上清からタンパク質を精製した。

【 0 1 6 4 】

免疫化およびハイブリドーマの作製

ヒトI g E - M 1'のM 1'部位を選択的に結合する全特異的抗体のパネルを、C H 3 - C H 4 - M 1' / F cタンパク質を使用して生成した。B A L B / cマウスの各後足蹠に、3日から4日の間隔で、一リン酸化リポドAおよびトレハロースd i c o r y n o m y c o l a t e (M P L^{T M} + T D M)アジュバント(Corixa, Hamilton, MT)に再懸濁した1 μgのC H 3 - C H 4 - M 1' / F cを注入した。8回の追加免疫の後に血清を採取し、酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)及び蛍光標示式細胞分取及びフローサイトメトリー(F A C Sスクリーニング、次のセクションを参照)によって力価を測定し、マウスがC H 3 - C H 4 - M 1' / F cに対して良好に免疫応答したことを確認した最後の追加免疫の3日後に、膝窩節細胞をマウスミエローマ細胞株P 3 X 6 3 A g . U . 1と融合させた(例としてChuntharapai et al., 1997, Methods Enzymol. 288:15-27を参照のこと)。融合したハイブリドーマ細胞は、ClonaCell(登録商標)ハイブリドーマ選択キット(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)のメディアウムD中のヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン(H A T)選択を用いて融合していない膝窩節又はミエローマ細胞から選択し、4 2 2 4クローンの生成を得た。

【 0 1 6 5 】

全特異的抗ヒトM 1'抗体についてのスクリーニング

上記のように生成したハイブリドーマクローンは、C H 3 - C H 4 - M 1' / F cタンパク質のM 1'領域、A 2 0マウスB細胞リンパ腫細胞株の表面上に安定して発現されるヒトI g E - M 1'のM 1'領域(I g E - M 1' / A 2 0)、及びB J A BヒトB細胞リンパ腫細胞株の表面上に安定して発現されるヒトI g E - M 1'のM 1'領域(I g E - M 1' / B J A B)に結合するモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングした。ネガティブコントロールには、ヒトC D - 4 / F c、A 2 0マウスB細胞リンパ腫細胞株の表面上に安定して発現されるヒトI g E (I g E / A 2 0)、A 2 0マウスB細胞リンパ腫細胞株(A 2 0)、B J A BヒトB細胞リンパ腫細胞株の表面上に安定して発現されるヒトI g E (I g E / B J A B)、およびB J A BヒトB細胞リンパ腫細胞株(B J A B)を含めた。

【 0 1 6 6 】

E L I S Aスクリーニング

4 2 2 4クローンを選別するために、酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)を一般的にBaker et al., 2002, Trends Biotechnol., 20:149 - 156に記載されているように行っ

10

20

30

40

50

た。アッセイは、384 - および96 - ウェルプレートで行った。簡単にいうと、384 - (又は96 -)ウェルのプレートを、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のヤギ抗ヒトIgG Fc (MP Biomedicals, Irvine, CA)を含む $50 \mu\text{l}$ のコートングバッファ(0.05 M 炭酸バッファ、pH 9.6)にてコートし、密閉して、4 で終夜保存した。コートング溶液を除去した後、PBS (pH 7.4)中に0.5%ウシ血清アルブミンと0.05% Tween (登録商標) 20を含む $80 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $200 \mu\text{l}$)のアッセイ/ブロック溶液(ELISA希釈液)を各ウェルに添加し、プレートを室温で1時間攪拌しながら培養した。次いで、0.05% Tween (登録商標) 20を含む $100 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $300 \mu\text{l}$)のPBSにてウェルを3回洗浄した。

洗浄工程の後、ELISA希釈液中に $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCH3 - CH4 - M1' / Fc又はヒトCD - 4 / Fcを含む $50 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $100 \mu\text{l}$)の抗原溶液を各ウェルに添加し、プレートを攪拌しながら室温で1時間培養した。前記のように洗浄バッファにてウェルを3回洗浄した。それぞれCH3 - CH4 - M1' / Fcを有する1ウェルとヒトCD - 4 / Fcを有する1ウェルに、単一ハイブリドーマクローンからの $50 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $100 \mu\text{l}$)の上清を含むように、各々のハイブリドーマクローンの上清を加えた。室温で攪拌しながら1時間プレートをインキュベートし、上記のように洗浄バッファにてウェルを3回洗浄した。

洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼにカップリングさせたヒツジ抗マウスIgG(ヒトIgG (MP Biomedicals)とは交差反応しない)をELISA希釈液にて1:1000に希釈したものを $50 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $100 \mu\text{l}$)各ウェルに加えた。室温で攪拌しながら1時間プレートをインキュベートし、上記のように洗浄バッファにて3回洗浄し、たたくようにして乾燥させた。 $50 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $100 \mu\text{l}$)のテトラメチルベンジジン(TMB)マイクロウェルペルオキシダーゼ基質(BioFX Laboratories, Owing Mills, MD、カタログ# TMBW - 0100 - 01)を各ウェルに添加してウェルを反応させ、5~10分間、又は良好な色の変化が観察されるまで室温でインキュベートした。 $50 \mu\text{l}$ (又は96ウェルプレートには $100 \mu\text{l}$)のTMBストップ溶液(BioFX Laboratories、カタログ# BSTP - 0100 - 01)を各ウェルに加えて反応を止めた。Sunriseプレート読み取り機(Tecan US, Inc., Research Triangle Park, NC)により650 nmにてプレートを分析した

プレブレットとポリセラをコントロールとして用いた。プレブレット試料は免疫化前のマウス血清を含み、ポリセラ試料は10の免疫化処置の後に得られたマウス抗血清を含む。

【0167】

FACSスクリーニング

実施例1で生成した3221クローンを選別するために、IgE - M1' / A20およびIgE - M1' / BJAB細胞株を用いて蛍光標示式細胞分取(FACS)を行った。IgE / A20、IgE / BJAB、A20およびBJAB細胞株をネガティブコントロールとした。細胞を再懸濁し、4 で5分間、 500g で遠心分離した。培地を吸引し、細胞を1%ウシ胎児血清を含む4 のFACS Flow (BD Biosciences, San Jose, CA)バッファ(細胞染色バッファ)に再懸濁した。前記のように細胞を遠心分離し、培地を吸引し、細胞を4 の細胞染色バッファ 1ml 当たり 2×10^6 細胞で再懸濁した。 $50 \mu\text{l}$ /ウェル(1×10^5 細胞/ウェル)の細胞を96ウェル丸底プレートに加え、各ハイブリドーマ上清が1ウェルが各細胞株を含んでインキュベートされるように、各ハイブリドーマクローンの $100 \mu\text{l}$ の上清を各ウェルに加えた。プレートを30分間氷上でインキュベートした。プレートを4 で5分間、 500g にて遠心分離し、上清を吸引した。各ウェルは4 の $200 \mu\text{l}$ の細胞染色バッファに再懸濁し、プレートを前記のように遠心分離した。細胞染色バッファは吸引した。

洗浄工程の後、各ウェルの細胞を、R - フィコエリトリン(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)にカップリングさせたヤギ抗マウスIgG Fcを4 の細胞染色バッファにて1:1000に希釈したものを $100 \mu\text{l}$ に再懸濁し、プレートを暗所にて氷上で3

10

20

30

40

50

0 分間インキュベートした。プレート を 4 で 5 分間、5 0 0 g にて遠心分離し、上清を吸引した。各ウェルを 4 の 2 0 0 μ l の細胞染色バッファに再懸濁し、プレートを前記のように遠心分離した。細胞染色バッファは吸引した。各ウェルの細胞を 4 の 2 0 0 μ l の細胞染色バッファに再懸濁し、1 . 2 m l のマイクロタイターチューブ(Quality Scientific Plastics, Petaluma, CA)に移した。F A C S c a n 又は F A C S C a l i b u r (BD Biosciences)にて F A C S を行った。

【 0 1 6 8 】

N 末端配列決定 / R N A の単離 / 配列決定およびクローニング

抗体は、抗 I g E / M 1 'ハイブリドーマの上清から精製し、リン酸緩衝生理食塩水のクローナリティ測定のための N 末端配列決定について分析した。各抗体は、還元条件下で P r e c a s t 4 - 2 0 % トリス H C l S D S - P A G E (Invitrogen, Carlsbad, CA)にて分離した。分析された重鎖(H C)および軽鎖(L C)をそれぞれ、Henzel et al. Analytical Biochemistry 267, 148 - 160 (1999)に記載されているように、P r o c i s e 4 9 4 N 末端シーケンサー(Applied Biosystems, Foster City, CA)にて 2 0 分のサイクルを用いて N 末端配列決定を行った。始めの 2 5 残基を配列決定して、モノクローナル性を確認した。A b の H C 又は L C 鎖が、N 末端アミノ酸をエドマン配列決定できなくさせたピログルタミル基にてブロックされた場合には、配列決定の前にブロック基の除去を行った。Pham et al. Electrophoresis 2005, 26 4243-4251に記載されるプロトコルを用いて、ピログルタミル基は、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ酵素(P G A P、Sigma, St Louis, MO)にて除去した。

【 0 1 6 9 】

重鎖(H C)および軽鎖(L C) M 1 '抗体 7 A 6、1 C 1 1、4 7 H 4、2 6 A 1 1、4 5 C 1 および 2 8 E 9 の配列を決定すると以下の通りであった。

7 A 6

H C QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS (配列番号 : 6 6)

L C DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTLSCKS (配列番号 : 6 7)

1 C 1 1

H C QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS (配列番号 : 6 8)

L C DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKS (配列番号 : 6 9)

4 7 H 4

H C EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSKAAS (配列番号 : 7 0)

L C DVVLTQTPLSLPVSLGDAQSI (配列番号 : 7 1)

2 6 A 1 1

H C EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS (配列番号 : 7 2)

L C DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRS (配列番号 : 7 3)

4 5 C 1

H C QIQLVQSGPELKKPGETVK (配列番号 : 7 4)

L C DVVMTQTPLTSLVTLGQPASISCK (配列番号 : 7 5)

2 8 E 9

H C EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS (配列番号 : 7 6)

L C DIQMTQSPASLSVSVGETVTFTCR (配列番号 : 7 7)

【 0 1 7 0 】

完全長配列を決定するために、N 末端アミノ酸配列と既知の I g 遺伝子セグメントから 5 '縮重プライマーを設定し、縮重下流重鎖及び軽鎖保存配列にて P C R を行った。

フォワードプライマー

7 A 6

H C F O R . B s i W I 5' - tgcacgtacgctcaggttcagctgcagcaatctggggctgagctgg (配列番号 : 7 8)

L C F O R . E c o R V 5' - gatcgatatcgtgatgtcccagctctccctcctcctaac (配列番号 : 7 9)

10

20

30

40

50

1 C 1 1
 H C F O R . B s i W I 5' - tcgacgtacgctcaggttcaattgcagcagctctggggctgagctgg (配列番号 : 8 0)
 L C F O R . E c o R V 5' - gatcgatatcgtaatgtctcagctctccttccctccctagc (配列番号 : 8 1)
 4 7 H 4
 H C 9 . 1 H C F . B s i W I 5' - tcgacgtacgctgaggtgaagttggtggagtctgggggagggcttag (配列番号 : 8 2)
 L C 4 7 H 4 L C F . E c o R V 5' - gatcgatatcgtgctgactcagactccactctccctgcc (配列番号 : 8 3) 10
 2 6 A 1 1
 H C C 7 F 7 H C F . B s i W I 5' - tcgacgtacgctgaggtccagctccagcagctctggacctgagc (配列番号 : 8 4)
 L C 2 B 4 L C F . E c o R V 5' - gatcgatatccagatgacccaaactacatcctccctg (配列番号 : 8 5)
 4 5 C 1
 H C 2 G 6 H C F . B s i W I 5' - tcgacgtacgctcagatccagttggtgcagctctggacctgagctg (配列番号 : 8 6)
 L C 9 C 1 0 L C F . E c o R V 5' - gatcgatatcgtgatgacgcagactccactcactttgtcgg (配列番号 : 8 7) 20
 2 8 E 9
 H C 9 . 1 H C F B s i W I 5' - tcgacgtacgctgaggtgaagctggtggagtctgaaggaggcttgg (配列番号 : 8 8)
 L C 5 E 1 0 . L C F . E c o R V 5' - gatcgatatccagatgaccagctctccagcctccctatc (配列番号 : 8 9)

リバースプライマー

重鎖プライマー (H C R) 5' - ctggacagggatccagagttccaggtcactgtcactggctcaggg (配列番号 : 9 0)
 軽鎖プライマー (遅発皮膚反応) 5' - ctgtaggtgctgtctttgctgtcctgatcagtcctaactg (配列番号 : 9 1) 30

【 0 1 7 1 】

抗 I g E / M 1 ' ハイブリドーマ (RNeasy Miniキット、 # 7 4 1 0 6、 Qiagen, Valencia, CA) から R N A を回収し、 BD Sprint Powerscript oligo dT プライミングキット (BD Biosciences, San Jose, CA、 # 6 3 9 5 5 8) を用いて c D N A を調製した。上記プライマーを用いて P C R を行い、 P C R 産物を、 T O P O - T A キット (Invitrogen, Carlsbad, CA、 # 4 5 - 0 6 4 1) を使用してクローニングした。Platinum Pfx High Fidelity ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA、 # 1 1 7 0 8 - 0 3 9) を用いて、以下の P C R 条件にて P C R を行った。 [9 4 2 分 ; 9 4 1 5 秒 ; 6 0 3 0 秒 ; 6 8 2 分 ; 3 0 サイクル ; 6 8 1 0 分]。クローンをインサートについてスクリーニングし、複数のクローンを配列決定して (Genentech, Inc.)、元の抗 I g E / M 1 ' の重鎖及び軽鎖の遺伝子配列を確認した。 40

抗 M 1 ' 抗体可変ドメインを異なる F c 領域とともに発現ベクターにサブクローニングし、異なる種および / またはアイソタイプ F c の F c を有するキメラ抗体を生成した。マウス I g G 2 a、マウス I g G 2 a - D A N A およびヒト I g G 1 F c 領域に可変ドメイン (C D R + フレームワーク) をクローニングするためにプライマーを設定した。

重鎖および軽鎖配列とともに制限部位を組み込むようにプライマーを設定した。重鎖は、 B s i W I および A p a I を用いてクローニングした。軽鎖は、 E c o R V および K p n I を用いてクローニングした。次いで、新規の P C R 産物を消化して、重鎖又は m K a p p a (L P G 2) ないしは h u K a p p a 発現ベクター (Genentech, Inc.) のために m I 50

g G 2 a (L P G 1 0)、m I g G 2 a - D A N A (p E r k - E 2 7 D A N A) 又は h u I g G 1 にライゲーションした。最終的なクローンを配列確認した(Genentech, Inc.)。

【 0 1 7 2 】

可変 C D R 配列のクローニングのための 3' プライマーとフォワード及びリバースプライマーの組合せは、以下の通りである。

リバースプライマー

7 A 6

H C R E V . A p a I 5' - accgatgggccccttggtggaggctgaagagactgtgag (配列番号 : 9 2)

L C R E V . K p n I 5' - ccttggtaccccctccgaacgtgtacggatagctataatattg (配列番号 : 9 3) 10

1 C 1 1

H C R E V . A p a I 5' - gaccgatgggccccttggtggaggctgaggagactgtg (配列番号 : 9 4)

L C R E V . K p n I 5' - ccttggtaccccctccgaacgtgtacggatagctataa (配列番号 : 9 5)

4 7 H 4

H C 4 7 H 4 H C R . A p a I 5' - tgggccccttggtggaggctgaggagacggtgactgag (配列番号 : 9 6)

L C 4 7 H 4 L C R . K p n I 5' - ttccaacttggtacctccacc (配列番号 : 9 7) 20

2 6 A 1 1

H C 7 G 8 H C R . A p a I 5' - gaccgatgggccccttggtggargctgcagagacagtgaccagag (配列番号 : 9 8)

L C 4 7 H 4 L C R . K p n I 5' - ttccaacttggtacctccacc (配列番号 : 9 9)

4 5 C 1

H C 4 5 C 1 H C R . A p a I 5' - cgatgggccccttggtggargckgaggagacggtgagaatg (配列番号 : 1 0 0)

L C 5 C 2 L C R . K p n I 5' - agcttggtaccccctccg (配列番号 : 1 0 1)

2 8 E 9

H C 2 8 E 9 . H C . R E V . A p a I 5' - cgatgggccccttggtggaggctgaggagacggcgactgag (配列番号 : 1 0 2) 30

L C 1 D 5 . 2 L C R , K p n I 5' - ttccaacttggtacccgagccg (配列番号 : 1 0 3)

【 0 1 7 3 】

プライマー組合せ :

フォワード

リバース

7 A 6 : H C 7 A 6 . F O R . B s i W I - - - 7 A 6 . R E V . A p a I

L C 7 A 6 . F O R . E c o R V - - - 7 A 6 . R E V . K p n I

1 C 1 1 : H C 1 C 1 1 . F O R . B s i W I - - - 1 C 1 1 . R E V . A p a I

L C 1 C 1 1 . F O R . E c o R V - - - 1 C 1 1 . R E V . K p n I 40

4 7 H 4 : H C 9 . 1 . H C F . B s i W I - - - 7 H 4 H C R . A p a I

L C * 4 7 H 4 . L C F . E c o R V - - - 4 7 H 4 . L C R . K p n I

2 6 A 1 1 H C C 7 F 7 . H C F . B s i W I - - - 7 G 8 . H C R . A p a I

L C 2 B 4 . L C F . E c o R V - - - 4 7 H 4 . L C R . K p n I

4 5 C 1 H C 2 G 6 . H C F . B s i W I - - - 4 5 C 1 . H C R . A p a I

L C 9 C 1 0 . L C F . E c o R V - - - 5 C 2 . L C R . K p n I

28E9 HC 9.1.HCF.BsiWI - - - 28E9.HCR.ApaI
LC 5E10.LCF.EcoRV - - - 1D52.LCR.KpnI

【0174】

47H4軽鎖は、mKappaおよびhukappa発現ベクターへの直接クローニングを妨げる内部のKpnI部位があった。内部のKpnI部位はQuick Change XL部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene, Cedar Creek, Texas, #200517-5)を用いて変異させた。[95 1分; 95 50秒; 60 50秒; 68 4.5分; 68 7分]。キットの必要性に応じてプライマーを設定し、アミノ酸配列を変化させないKpnI部位内の単一ヌクレオチドを変異させた。TACは、その位置でのチロシン(Y)を保存するTATに変異させた。最終的なクローンを配列確認した(Genentech, Inc. 10)。

突然変異誘発に使用するプライマーは、以下の通りであった。

FOR 5' - cc tat tta cat tgg tat ctg cag aag cca ggc c (配列番号: 104)

REV 5' - ggc ctg gct tct gca gat acc aat gta aat agg (配列番号: 105)

【0175】

実施例2A

抗IgE/M1'抗体のヒト化

この実施例は、マウスの抗IgE/M1'抗体26A11、7A6および47H4のヒト化を記載する。

【0176】

材料と方法

膜結合のヒトIgEのM1'ドメインは、CHO細胞のFc融合として発現させ、従来の方法によって精製した。抗体26A11、7A6および47H4を発現するハイブリドーマは、組換えM1'-Fc融合タンパク質にてマウスを免疫化して得、M1'-Fcにてコートしたプレートを用いたELISAにて同定した。機能的抗体は、M1'発現細胞への結合能及びアポトーシス促進能によって同定した。

マウスの26A11、7A6および47H4可変ドメインのクローニング - 標準的な分析法を用いて26A11、7A6又は47H4を産生するハイブリドーマ細胞から総RNAを抽出した。可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)ドメインは、重鎖および軽鎖に対する縮重プライマーを用いたRT-PCRにて増幅した。フォワードプライマーは、VLおよびVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、LCおよびHCリバープライマーを設定して、種間で高い保存性を有する定常軽鎖(CL)および定常重鎖ドメイン1(CH1)内の領域にアニールさせた。インサートのポリヌクレオチド配列は、慣例的な配列決定法を使用して決定した。26A11、7A6および47H4のVLとVHアミノ酸配列は、それぞれ図6Aと6D、6Bと6E、および6Cと6Fに示す。

【0177】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワークへの直接高頻度可変領域移植片 - この実験に用いたファジミドは一価性Fab-g3ディスプレイベクターであり、単一phoAプロモーターの制御下の2つのオープンリーディングフレームからなる。第一のオープンリーディングフレームはアクセプター軽鎖のVL及びCH1ドメインに融合したstIIシグナル配列からなり、第二のオープンリーディングフレームはアクセプター重鎖のVH及びCH1ドメインに融合したstIIシグナル配列とその後に続くマイナーファージコートタンパク質P3からなる。

マウスの26A11、7A6又は47H4抗体(mu26A11、mu7A6又はmu47H4)のVLおよびVHドメインを、ヒトVL I(huKI)及びヒトVHサブグループIII(huIII)コンセンサス配列と配列比較した。CDR移植片を作製するために、huI及びhuIIIコンセンサスアクセプターフレームワーク内にmu26A11、mu7A6又はmu47H4の高頻度可変領域を移植して、直接のCDR-移植片(26A11.v1、7A6.v1又は47H4.v1)を生成した(図6A-6F)。VLドメインでは、以下の領域をヒトコンセンサスアクセプターに融合させた。位置24-34(L 50)

1)、50-56(L2)および89-97(L3)。VHドメインでは、位置26-35(H1)、49-65(H2)および94-102(H3)を融合させた。MacCallum et al. [MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)]は、抗体と抗原複合体結晶構造を分析して、重鎖の位置49と94が接触領域の一部であることを発見したので、抗体をヒト化する場合にCDR-H2及びCDR-H3の定義にこれらの位置が含まれると考えられる。

各高頻度可変領域について別々のオリゴヌクレオチドを用いたLC及びHC発現ベクターのクエンケル突然変異誘発により、ヒト化抗IgE/M1'抗体26A11.v1、7A6.v1及び47H4.v1を、IgG抗体として生成した。安定性を増やすためのアミノ酸変化もまた、クエンケル突然変異誘発を使用して行った。Kunkel et al., J. Biol. Chem. 263(29): 14784-14789 (1988)。正しいクローンは、DNA塩基配列決定によって識別した。

【0178】

IgG産生 - スクリーニングのために、始めにIgG変異体を293細胞内で産生させた。VLおよびVH(25µg)をコードするベクターを、FuGeneシステムを使用して293細胞内へ形質移入した。500µlのFuGeneを、FBSを含まない4.5mlのDMEM培地と混合して、室温で5分間インキュベートした。それぞれの鎖(25µg)をこの混合物に添加して、室温で20分間インキュベートし、次いで、形質移入のために5つのT-150フラスコに移して、5%CO₂下、37°Cに終夜置いた。次の日、形質移入混合物を含む培地を取り除き、0.1ml/Lの微量元素(A0934)と10mg/Lのインスリン(A0940)を含む23mlのPS04培地に置き換えた。さらに5日間細胞をインキュベートし、その後、1000rpmで5分間かけて培地を集め、0.22µm低タンパク-結合フィルターを使用してフィルター滅菌した。125mlの培地に対して2.5mlの0.1%PMSFを添加した後、試料を4°Cで保存することができる。

【0179】

親和性測定 - スキャッチャード分析、細胞結合ELISA、BIAcore™-2000又はA100を用いた表面プラズモン共鳴によって親和性測定を行った。

スキャッチャード分析 - ダウディ-ヒト、アカゲザルおよびカニクイザルIgE/M1'細胞は、基本培地からなる冷たい結合バッファに結合のために調製し、10mM HEPES pH7.4および2%FBS並びに40ug/mlのヒトIgGとした。1.7×10⁶細胞/mlの濃度に細胞を希釈し、アッセイに添加するまで氷上に置く。タンパク質/抗体は、ヨード法によってヨード化する。様々な濃度の冷たいタンパク質を、飽和濃度から0の濃度までの1:2希釈により、計14の濃縮物として、3通りずつ調製する。単一の濃度の温かいタンパク質をすべての希釈物に加え、冷たいタンパク質と競合させる。最後に、細胞を温かいタンパク質と冷たいタンパク質の混合物に加え、1試料当たり250000細胞を用いた。アッセイは、振とうさせながら4°Cに4時間保った。次いで各試料を集め、メンブランにて濾過し、少なくとも3回結合バッファにて洗浄し、乾燥させ、その後Perkin Elmer Wizard 1470自動ガンマカウンターを用いて1分間計測した。

【0180】

競合的電気化学発光細胞結合アッセイ - ヒト化変異体の相対的な結合親和性は、競合的電気化学発光細胞結合アッセイを用いて測定した。IgE-M1'を発現する形質移入BJAB細胞(BJAB-IgE/M1')(long)又はM1'を発現しないコントロール形質移入細胞(BJAB-IgE)(short)を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて洗浄し、96ウェルMULTI-ARRAY High Bindプレート(Meso Scale Discovery)に25µlのPBS中25000細胞/ウェルで密閉した。細胞をプレート上で室温で1時間インキュベートして、細胞をウェルに接着させた。非特異的結合をブロックするために、30%FBSを含む25µlのPBSを各ウェルに添加した。次いで、プレートを緩やかに攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。ブロック溶液を静かに注ぎ、一定量のビオチン化抗IgE-M1'抗体(33.3nMの26A11又は47H4)を含む25µlの2%FBS含有PBSを

10

20

30

40

50

添加したヒト化変異体の段階希釈物(0.022 - 1333 nM)を添加した。緩やかに攪拌しながら室温で1時間インキュベートした後、マイクロプレート洗浄機(ELx405 Select, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)を用いて、PBS(300 µl/ウェル)にてプレートを3回洗浄した。結合した抗体は、25 µlの0.25 µg/mlルテニウム標識ストレプトアビジンをアッセイバッファに添加して検出した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、TrisベースのReadバッファT(1x、界面活性物質なし)(Meso Scale Discovery)を添加した(150 µl/ウェル)。電気化学発光シグナルは、Sector Imager 6000読み取り機(Meso Scale Discovery)を使用して記録した。
【0181】

Biacore 2000 - 2つの測定を用いた。M1'-Fc又は特定の抗体変異体を固定し(およそ100 RU、10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.8 中、CM5 センサーチップ上に)、対応するリガンド(それぞれ抗体変異体又はM1'-Fc)を分析物とした(30 µl/分の流速で注入し、PBSTの0.5から1000 nMの2倍段階希釈物を用いる)。各々の試料は、3分の会合と10分の解離によって分析した。各注入の後、チップは、10 mM グリシン pH 1.7 を使用して再生した。

Biacore A-100 - M1'を固定し(およそ100 RU、10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.8 中、CM5 センサーチップ上に)、抗体変異体を分析物とした(30 µl/分の流速で注入し、PBSTの0.5から1000 nMの2倍段階希釈物を用いる)。各々の試料は、5分の会合と5分の解離によって分析した。各注入の後、チップは、10 mM グリシン pH 1.7 を使用して再生した。

結合応答は、コントロールフローセルを18F7変異体IgGフローセルから減算することによって修正した。 k_{on} と k_{off} の同時フィッティングの1:1 Langmuirモデルを動態分析のために用いた。

【0182】

結果と考察

26A11、7A6および47H4のCDR移植 - ヒト化のために用いたヒトアクセプターフレームワークはコンセンサスヒト IVDメインと、コンセンサスヒトサブグループIIIVHDメインに基づく。mu26A11、mu7A6およびmu47H4のVLおよびVHドメインを、ヒト IおよびサブグループIIIドメインと配列比較した。各々の相補性決定領域(CDR)が同定され、ヒトアクセプターフレームワークに移植し、IgGとして発現されうるCDR移植片を生成した(図6A-6F)。

親和性評価 - 26A11.v1、7A6.v1および47H4.v1は、細胞結合ELISAと表面プラスモン共鳴を用いて評価した(表1)。これらのアッセイは、CDR移植片が各々のハイブリドーマ抗体と非常に類似した親和性を有したことを示した。

26A11及び47H4のCDR-L1内の潜在的脱アミドとイソアスパラギン酸形成部位の除去 - 起こりうる製造上の問題を避けるために、47H4.v1のCDR-L1内の潜在的イソアスパラギン酸形成部位であるAsn₂₈-Gly₂₉と26A11.v1のCDR-L1内のAsn₃₁-Ser₃₂を、これらの位置で他の抗体に見られる残基をサンプリングすることによって除去した(図6A、6C、表I)。47H4.v1(47H4.v2および47H4.v5)のCDR-L1内のGly₂₉をAla₂₉に、26A11(26A11.v3および26A11.v6)のCDR-L1内のSer₃₂をTyr₃₂に、又はAla₃₂(26A11.v2又は26A11.v5)に変化させるのが好適な置換であることがわかった。さらに、Asn₃₁をSer₃₁に(26A11.v13又は26A11.v15)又はGln₃₁に(26A11.v14又は26A11.v16)変化させることも、脱アミドとイソアスパラギン酸形成の可能性を取り除くのに役立つ。それぞれのハイブリドーマ抗体と同様な親和性をもつ候補物質が得られた。

26A11.v1又は47H4.v1のCDR-H1内のMet₃₄の酸化の可能性は、M1'結合に影響を及ぼすことなく、両抗体内のこの残基をIle₃₄に変化させることによって、回避させた。

【0183】

実施例 3

抗 M 1 ' A b の特異性

抗 I g E / M 1 ' 抗体クローンの特異性は、M 1 ' 配列を有する I g E (「ロング型」) 又は M 1 ' 配列を欠く I g E (「ショート型」) を形質移入したヒト B 細胞株 B J A B (ATCC Manassas, VA、# H B - 1 3 6) にて試験した。I g E B J A B 細胞株は、p M S C V 発現ベクター (Washington University, St. Louis, MO) を用いた B J A B 細胞のレトロウイルスの形質導入によって生成された。ヒト I g E B 細胞レセプターの完全長重鎖および軽鎖の c D N A は、ヒト I g E ミエローマ細胞株 U 2 6 6 (ATCC, Manassas, VA、T I B # 1 9 6) から得、I R E S (Internal Ribosomal Entry Sequence) と組み合わせてレトロウイルスベクター内にサブクローニングし、抗体重鎖および軽鎖のバイシストロン性の同時形質移入と同時発現を可能にした。レトロウイルスの形質導入の方法の更なる解説を下記に示す。

P G 1 3 内包細胞 (A T C C C R L - 1 0 6 8 6) を、1 0 c m 組織培養プレートに 2×10^6 細胞 / プレート (D M E M 高グルコース、1 0 % F B S、ペニシリン、ストレプトマイシン、2 m M L - グルタミン) で 2 4 時間播いた。細胞に、F u G E N E 6 を用いて p M S C V D N A コンストラクトを形質移入し、3 7 ° C、5 % C O 2 にて 2 日間培養した。レトロウイルス粒子を含む細胞培養上清を回収し、0 . 4 マイクロフィルターにて濾過した。無菌の硫酸プロタミンを 1 0 μ g / m l の終濃度まで加え、4 m l の上清を用いて、3 2 ° C で 9 0 分間のスピン感染によりおよそ 1×10^6 の B J A B 細胞を感染させ、その後レトロウイルス上清中で 5 % C O 2、3 7 ° C で 3 - 4 時間培養を続けた。感染した B J A B 細胞を回収し、R P M I 細胞培養培地 (R P M I、1 0 % F B S (Hyclone, Logun, UT, # S H 3 0 0 7 1 . 0 3)、ペニシリン、ストレプトマイシン、2 m M L - グルタミン) に移し、分類のために広げた。ポジティブに形質移入した細胞は、表面 I g E を検出するための M A E 1 1 (Genentech) 抗ヒト I g E 抗体を用いたフローサイトメトリーによって同定した。

【 0 1 8 4 】

抗 I g E / M 1 ' 抗体は、B J A B I g E ショート及びロング型の細胞株のフローサイトメトリー染色によって決定されるように、膜 I g E のロング型に特異的であったがショート型には特異的でなかった。抗ヒト I g E (M a e 1 1) 抗体 (Genentech, Inc.) は、I g E のロング型及びショート型の結合能に関するポジティブコントロールとして用いた。抗 g p 1 2 0 m I g G 1 又は抗ブタクサ m I g G 2 a 抗体は、アイソタイプコントロール (Genentech, Inc) として用いた。

B J A B 細胞は R P M I 1 0 % F B S (Hyclone, Logun, UT, #SH30071.03)、ペニシリン / ストレプトマイシン、2 m M L - グルタミン (Genentech, Inc.) 中で生育させた。0 . 5 $\times 10^6$ の B J A B - L o n g 又は B J A B - s h o r t の細胞は、1 0 0 μ l の F A C s 洗浄バッファ (2 % F B S を含む 1 \times P B S (Genentech, Inc.)) 中で氷上で 1 5 分かけて、マウス血清 (1 0 μ l) (VWR, #RLD108-0100) 及びヒト血清 (1 0 μ l) (Sigma, St. Louis, MO, #S-2257) にてブロックした。次いで、細胞を、1 μ g / m l の各抗 M 1 ' 抗体にて氷上にさらに 2 0 分置いて染色し、その後 1 m l の F A C s 洗浄バッファにて洗浄し、1 2 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。細胞を 1 0 0 μ l の F A C s 洗浄バッファに再懸濁し、その後ヤギ抗マウス I g G - P E (5 μ l) (Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, #M30004-4) にて氷上に 2 0 分置いて染色した。細胞を前記のように洗浄し、F A C s C a l i b u r 機 (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ) による分析のために 1 m l の F A C s 洗浄バッファに再懸濁した。試験したすべての抗体は I g E のロング型に特異的であり、アイソタイプコントロールを超えて B J A B - I g E / ショート細胞を結合しなかった。発明者等は染色強度に基づいて広い範囲の相対的な親和性を観察した。

発明者等はまた、細胞表面上に低レベルの M 1 ' 含有ヒト I g E を天然に発現する U 2 6 6 細胞株 (ATCC, Manassas, VA, #TIB196) に結合する抗 M 1 ' 抗体を評価した。U 2 6 6 細胞は、ハイブリドーマ培地 [R P M I 1 6 4 0、1 5 % 胎仔ウシ血清、2 m M L - グルタミン、1 0 m M H E P E S、4 . 5 g / l グルコース、1 . 5 g / l 重炭酸塩]

中で高密度 ($1 - 2 \times 10^6 / \text{ml}$) に維持される。U266細胞は $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 M1'抗体にて染色した。47H4、47G4および42A5は、Ma e 1 1 と同等のレベルでU266を染色した。抗体42H4、45C1および28E9は、非常に低いレベルでU266を染色した。7A6、1C11、26A11、51D2及び26B11はU266を染色しなかった。(図2C)

【0185】

実施例3A

マウス抗IgE/M1'結合特異性

図2D-Fは、ヒト、アカゲザル又はカニクイザルのIgE/M1'を発現する細胞株の集団に対する、マウス抗IgE/M1'抗体47H4、26A11及び7A6の結合を示す。

抗IgE/M1'抗体クローンの特異性は、レトロウイルスに感染させて、M1'配列を有するIgEのロング型又はM1'配列を欠くIgEのショート型を発現させているヒトB細胞株BJAB(ATCC Manassas, VA、#HB-136)及びダウディ(ATCC#CCL-213)にて試験した。BJAB細胞はRPMI 10% FBS (Hyclone, Logan, UT, #SH30071.03)、ペニシリン/ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン(Genentech, Inc.)中で生育させた。 0.5×10^6 のBJAB-Long又はBJAB-shortの細胞は、 $100 \mu\text{l}$ のFACS洗浄バッファ(2% FBSを含む1xPBS(Genentech, Inc.))中で氷上で15分かけて、マウス血清($10 \mu\text{l}$)(VWR, #RLD108-0100)及びヒト血清($10 \mu\text{l}$)(Sigma, St. Louis, MO, #S-2257)にてブロックした。次いで、細胞を、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の各抗M1'抗体にて氷上にさらに20分置いて染色し、その後1mlのFACS洗浄バッファにて洗浄し、 1200rpm で5分間遠心分離した。細胞を $100 \mu\text{l}$ のFACS洗浄バッファに再懸濁し、その後ヤギ抗マウスIgG-PE($5 \mu\text{l}$)(Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, #M30004-4)にて氷上に20分置いて染色した。細胞を前記のように洗浄し、FACS Calibur機(BD, Inc, Franklin Lakes, NJ)による分析のために1mlのFACS洗浄バッファに再懸濁した。試験したすべての抗体はIgEのロング型に特異的であり、アイソタイプコントロールを超えてBJAB-IgE/ショート細胞を結合しなかった。発明者等は染色強度に基づいて広い範囲の相対的な親和性を観察した。

【0186】

抗IgE/M1'抗体クローンの特異性は、レトロウイルスを感染させてM1'配列を有する膜IgE(ロング型)又はM1'配列を欠く膜IgE(ショート型)を発現させているヒトB細胞株ダウディにて試験した。抗IgE/M1'抗体(47H4、26A11、7A6)はロング型に特異的であったが、ショート型には特異的でなかった(図2D)。抗gp120 mIgG1は、アイソタイプコントロールとして用いた(Genentech, Inc)。

ヒトB細胞株ダウディに、アカゲザル又はカニクイザル又はヒトのIgE/M1'のためのヒトIgE/霊長類M1'カセットを含むレトロウイルスを形質導入した。形質導入後、ヒト、アカゲザル又はカニクイザルのIgE/M1'を発現する細胞を、3~4回の分類により98%より高い純度にまでFACS分類機により分類した。

図2Fは、アカゲザルおよびカニクイザルのM1'を結合する抗IgE/M1'抗体の能力を示す。47H4及び7A6はアカゲザル及びカニクイザルのM1'を結合するのに対して、26A11はアカゲザルM1'のみを結合する。

ダウディ形質移入細胞株に加えて、発明者等は、ヒトIgEメラノーマ細胞株(ATCC, Manassas, VA、#TIB196)であるU266に結合する抗IgE/M1'抗体を評価した。U266細胞は、ハイブリドーマ培地[RPMI 1640、15%胎仔ウシ血清、2mM L-グルタミン、10mM HEPES、4.5g/l グルコース、1.5g/l 重炭酸塩]中で高密度 ($1 - 2 \times 10^6 / \text{ml}$) に維持される。U266細胞は $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 M1'抗体にて染色した。抗IgE/M1'抗体47H4はU266を結合したのに対して、26A11及び7A6は結合しなかった(図2E)。

【0187】

実施例 3 B

ヒト化抗 I g E / M 1 ' 結合特異性

実施例 3 B は、ヒト、アカゲザル又はカニクイザルの I g E / M 1 ' を発現する細胞株の集団に対する、ヒト化抗 I g E / M 1 ' 抗体の結合を示す。

実施例 3 A において検討したヒト、アカゲザル又はカニクイザル M 1 ' を過剰発現する同じダウディ又は B J A B ヒト B 細胞株を用いて、ヒト化抗 I g E / M 1 ' 抗体クローンの特異性は、レトロウイルスに感染させて、M 1 ' 配列を有する I g E のロング型又は M 1 ' 配列を欠く I g E のショート型を発現させているヒト B 細胞株ダウディにて試験した。ヒト化抗 I g E / M 1 ' 抗体 (4 7 H 4 v 5、2 6 A 1 1 v 6、7 A 6 v 1) はロング型に特異的であり、ショート型 (M 1 ' なし) には特異的でない (図 2 G)。ハーセプチン (登録商標) 抗 H e r 2 M A b h u I g G 1 をアイソタイプコントロールとして用いた (Genentech, Inc.)。さらに、ヒト化抗 I g E / M 1 ' 抗体 (4 7 H 4 v 5 および 2 6 A 1 1 v 6) は U 2 6 6 細胞株に結合する (図 2 H)。

図 2 I は、ヒト化抗 I g E / M 1 ' 抗体の、アカゲザルおよびカニクイザルの M 1 ' への結合能を示す。抗体 4 7 H 4 v 5 及び 7 A 6 v 1 はアカゲザル及びカニクイザルの M 1 ' を結合するのに対して、2 6 A 1 1 v 6 はアカゲザル M 1 ' のみを結合する。

【 0 1 8 8 】

実施例 4

抗 M 1 ' 抗体の相対的な結合親和性

発明者等は、1 μ g / m l での抗 I g E / M 1 ' 抗体の広い範囲の結合強度を観察した。I g E - l o n g レセプターに対するこれら抗体の相対的な親和度を評価するために、発明者等は、B J A B - L o n g 細胞を抗 M 1 ' 抗体の段階希釈物 (1、0 . 1、0 . 0 1、0 . 0 0 1 μ g / m l) にて染色した。B J A B - L o n g 細胞は、マウスおよびヒトの血清 (1 0 μ l) にて氷上で 2 0 分かけてブロックした。細胞は、適量の抗 M 1 ' 抗体、又は抗 g p 1 2 0 m I g G 1 ないしは抗 プタクサ m I g G 2 a アイソタイプコントロールにてさらに 2 0 分かけて染色した。次いで、細胞を F A C s 洗浄バッファ (1 m l) にて洗浄し、遠心分離をし (1 2 0 0 r p m にて 5 分間)、その後検出のために、ヤギ抗マウス I g G - P E 抗体 (5 μ l) (Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, #M30004-4) を有する 1 0 0 μ l の F A C s 洗浄バッファに再懸濁した。細胞を上記のように再び洗浄し、その後 F A C C a l i b u r 機 (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ) にて分析した。電圧環境は、0 . 0 0 1 μ g / m l アイソタイプコントロールに基づいた。これらの結果から、抗 I g E / M 1 ' 抗体候補は、相対的な結合親和性に従って以下のようにランク付けした。

4 2 H 4 > 7 A 6、4 7 H 4、4 7 G 4 > 4 2 A 5、2 6 A 1 1、4 5 C 1 > 5 1 D 2、2 6 B 1 1 > 1 C 1 1 > 2 8 E 9

抗体力価および F A C s 検出による相対的な親和性測定に加えて、発明者等は、スクヤッチャード分析を用いて、I g E ロング型を発現する B J A B 細胞株に対する選択した抗 M 1 ' 抗体の親和性も決定した。B J A B - L o n g 細胞は、基本培地からなる冷たい結合バッファに結合のために調製し、1 0 m M H E P E S p H 7 . 4 および 2 % F B S 並びに 4 0 μ g / m l のヒト I g G とした。1 . 7 \times 1 0 ⁶ 細胞 / m l の濃度に細胞を希釈し、アッセイに添加するまで氷上に置く。抗体は、ヨード法によってヨード化する。様々な濃度の非標識抗体を、飽和濃度から 0 の濃度までの 1 : 2 希釈により、計 1 4 の濃縮物として、3 通りずつ調製した。単一濃度のヨード化抗体を、競合非標識抗体のすべての希釈物に加えた。最後に、2 5 0 0 0 0 の B J A B - L o n g 細胞を、ヨード化抗体及び非標識抗体の各々の混合物に加えた。試料は、振とうしながら 4 で 4 時間インキュベートした。次いで各試料を集め、メンブランにて濾過し、結合バッファにて少なくとも 3 回洗浄し、乾燥させて、その後 Perkin Elmer Wizard 1470 自動ガンマ計測器を用いて 1 分間測定した。

【 0 1 8 9 】

実施例 4 A

マウス抗 I g E / M 1 ' 抗体のスクヤッチャード親和性

10

20

30

40

50

M 1'を有する又は有さない様々な形態の I g E (ヒト、アカゲザル、カニクイザル)を発現する B J A B 細胞又はダウディ細胞は、基本培地からなる冷たい結合バッファに結合のために調製し、10 mM H E P E S pH 7.4 および 2 % F B S 並びに 40 μ g / ml のヒト I g G とした。1.7 \times 10⁶ 細胞 / ml の濃度に細胞を希釈し、アッセイに添加するまで氷上に置く。タンパク質 / 抗体は、ヨード法によってヨード化する。様々な濃度の冷たいタンパク質を、飽和濃度から 0 の濃度までの 1 : 2 希釈により、計 14 の濃縮物として、3 通りずつ調製した。単一の濃度の温かいタンパク質をすべての希釈物に加え、冷たいタンパク質と競合させる。最後に、細胞を温かいタンパク質と冷たいタンパク質の混合物に加え、1 試料当たり 250000 細胞を用いた。アッセイは、振とうさせながら 4 時間に 4 時間保った。次いで各試料を集め、メンブランにて濾過し、少なくとも 3 回結合バッファにて洗浄し、乾燥させ、その後 Perkin Elmer Wizard 1470 自動ガンマカウンターを用いて 1 分間計測した。

10

図 3 O は、スキッチャード分析によって測定される、マウス抗 M 1' 抗体の親和性をまとめたものである。マウス抗体 47H4 m I g G 1 は、ヒト、アカゲザル、カニクイザルの M 1' を、それぞれ 0.79、0.77 及び 0.97 nM の親和性で結合した。マウス抗体 26A11 m I g G 1 及び 7A6 m I g G 1 は、ヒト M 1' を、それぞれ 2.3 及び 0.64 nM の親和性で結合した。

図 3 P は、ヒト、アカゲザル及びカニクイザルの M 1' に対する、ヒト化抗 I g E / M 1' 抗体の結合親和性をまとめたものである。ヒト化抗体 47H4 v 5 h u I g G 1 は、ヒト、アカゲザル及びカニクイザルの M 1' を、それぞれ 1.5、1.3 及び 2.5 nM の親和性で結合した。ヒト化抗体 47H4 v 2、47H4 v 1、26A11 v 6、26A11 v 14 および 26A11 v 1 は、ヒト M 1' を、それぞれ 0.54、0.37、1.85、1.5 および 1.06 の親和性で結合した。

20

【0190】

実施例 5

抗 I g E / M 1' エピトープ結合 / ブロック実験

抗 I g E / M 1' 抗体候補物質間でブロック実験を行い、オーバーラッピング又は明らかな結合エピトープを決定した。ブロック及び検出抗体が異なるアイソタイプ(すなわち、I g G 1 対 I g G 2 a)のものである場合、これらのアイソタイプの相違を活かして、アイソタイプ特異的二次抗体(CALTAG/Invitrogen, Carlsbad, CA、ヤギ抗マウス I g G 1 - P E #32004、又はヤギ抗マウス I g G 2 a #M32204)にて検出することによってブロックの程度を決定した。ブロック及び検出抗体が同じアイソタイプのものである場合、抗体をビオチン(Pierce, Rockford, IL, EZ-link-sulfo-NHS-LC- Biotin #CAS 127062-220)にコンジュゲートさせ、ストレプトアビジン - P E (BD #554061)にて検出するか、A l e x a - 647 (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, #A20173)にコンジュゲートさせた。まず最初に、ブロック抗体と検出抗体を 1 : 1 の比率(10 μ g / ml)で用いた(図 4 A - 4 B)。始めに全く又は一部のみのブロックを示す抗体組合せを、検出抗体に対するブロック抗体の比率を 10 : 1 にして更なる試験を行った。B J A B - L o n g 細胞をマウス及びヒトの血清にてブロックし(上記のように)、その後ブロック抗体(10 μ g / ml)を含む F A C S 洗浄バッファ(2 % F B S / 1 \times P B S)にて氷上で 20 分かけて染色した。細胞を F A C S 洗浄バッファにて洗浄し、その後、1 : 1 (10 μ g / ml)又は 10 : 1 (1 μ g / ml)の検出抗体にて氷上で 20 分間かけて染色した。細胞を上記のように再度洗浄し、その後 F A C S C a l i b u r 機(BD, Inc, Franklin Lakes, NJ)にて分析した。染色された細胞は、抗 g p 120 m I g G 1 (Genentech, Inc.)又は抗プタクサ m I g G 2 a (Genentech, Inc.)何れかのアイソタイプコントロール抗体と比較した(図 4 C)。比較のために、可能な場合コンジュゲートしていない同じ抗体にて染色して完全ブロックを決定した。

30

40

ブロック実験により、3つの主な結合グループ A 及び B 及び C が明らかとなった。グループ A は、部分的にオーバーラップしているエピトープに基づいてさらに 2つのグループ A 1 (47H4、47G4、42H4、42A5)及び A 2 (45C1、51D2、26A

50

11)に分類された(図4D)。グループC(26B11)は他の抗体候補物質とほとんどオーバーラップしていなかった。3つの候補物質は他の候補物質よりも広くオーバーラップしていた。1C11は、グループA1とA2と結合をオーバーラップしているようであり、グループB(28E9)により部分的にのみブロックされた。7A6は主にグループA1に属しているが、グループA2候補物質と一部相互作用を有していた。28E9はそれのみで一のグループに属する。28E9はグループA2候補物質と一部のみ相互作用した。

【0191】

実施例5A

エピトープマッピング

図5A-Eは、抗IgE/M1'抗体を用いて行ったエピトープ結合実験を示す。マウス抗体47H4、7A6および26A11を図5Bおよび5Dに示し、ヒト化変異体47H4v5、7A6v1および26A11v6を図5C及び5Eに示す。

エピトープマッピング実験：マウス候補物質

ヒトM1'を囲む及び内包する配列を繋ぐ15ペプチドを生成した(Clifford Quan)(図5A)。ペプチドをdH₂O又は50%DMSOに再懸濁した。ペプチドは、コーティングバッファ(0.05M炭酸/炭酸水素(pH9.6)(100μl/ウェル))中に1μg/mlで96ウェルプレート(NUNC Maxisorp high protein-binding capacity ELISA plates #44-2404)上にコートした。M1'-Fc融合タンパク質を結合についてのポジティブコントロールとして用いた。ネガティブコントロールには、ヒトIgE(U266)でコートしたウェルと非コートウェルを用いた。ペプチドを4に終夜置いてコートさせた。次の朝にプレートを洗浄バッファ(PBS/0.05%Tween-20(pH7.4))にて3回洗浄した。次いで、プレートをブロックバッファ(PBS、0.5%BSA(pH7.4))中で緩やかに攪拌しながら1時間ブロックした。試験する抗体(47H4 mIgG1、47H4v5 huIgG1、26A11 mIgG1、26A11v6 huIgG1、7A6 mIgG1、7A6v1 huIgG1)の希釈(40ng/ml及び1ng/ml)は、マジックバッファ[PBS(pH7.4)、0.5%BSA、0.05%Tween-20、10ppmProclin、0.2%BGG、0.25%Chaps、5mMEDTA、0.35MNaCl]にて行った。抗gp120 mIgG1およびハーセプチン(登録商標)huIgG1抗体を、それぞれマウス及びヒトの抗IgE/M1'抗体に対するコントロールとして用いた。プレートを十分にブロックした後(0.5%BSA/1xPBS)、プレートを3回洗浄し、その後抗体を3通りずつプレートに添加した(100μl/ウェル)。プレートは、それから室温で、2時間暖められた。マウス抗体プレートを3回洗浄し、その後抗マウスIgG1-ビオチン(BD Biosciences(A85-1)#553441)を添加して(1:10000、100μl/ウェル)、室温で1時間インキュベートした。3回の洗浄の後、SA-HRP(BD Biosciences#554066)を加え(1:20,000、100μl/ウェル)、1時間インキュベートした。ヒトIgG1抗体プレートを前記のように洗浄し、抗huIgG.Fc-HRP(Jackson ImmunoResearch(#109-036-098))を加え(1:10000、100μl/ウェル)、室温で1時間インキュベートした。二次インキュベートが完了したら、プレートを6回洗浄し、TMB基質(BD OptEIA #555214)を加えた(100μl/ウェル)。基質-HRP反応は4分以内に1M H₃PO₄にて止めた。その後プレートを450/650で読み取った。データは相対的なOD(OD450/CD650)として表された。

【0192】

図5B及び5Dは、マウスの47H4、26A11および7A6抗IgE/M1'候補物質のM1'ペプチドへの結合を示す。これらの候補物質の結合は、抗体ブロック実験で示されたエピトープグループ分けと関連している。47H4 mIgG1はペプチド4(SAQSQRAPDRVLCHS)(配列番号：8)を結合した。7A6 mIgG1はペプチド4(SAQSQRAPDRVLCHS)(配列番号：8)と5(RAPDRVLCHSGQQG)(配列番号：9)を結合した。26A11 mIgG1はペプチド7(GQQQLPRAAGGSVP)(配列番号：11)と8(PRAAGGSVPHPRCH)(配列番号：12)を結合した。

10

20

30

40

50

図5C及び5Eは、ヒト化抗IgE/M1'抗体のM1'ペプチドへの結合を示す。異なる二次抗体を用いたことを除いて、前記のように、対応するマウス抗体についてエピトープマッピングを行った。ヒトIgG1抗体プレートを前記のように洗浄し、抗IgG.Fc-HRP二次抗体(Jackson ImmunoResearch(#109-036-098)を加え(1:10,000、100µl/ウェル)、室温で1時間インキュベートした。エピトープ結合は親マウス抗体により観察されるものと同様である。47H4 v5はペプチド4(SAQSQRAPDRVLCHS)(配列番号:8)を結合する。7A6 v1はペプチド4(SAQSQRAPDRVLCHS)(配列番号:8)と5(RAPDRVLCHSGQQG)(配列番号:9)を結合した。26A11 mIgG1はペプチド7(GQQGLPRAAGGSVP)(配列番号:11)と8(PRAAGGSVPHPRCH)(配列番号:12)を結合した。

【0193】

実施例6

ダウディ-IgE/Long細胞におけるマウス抗IgE/M1'によるアポトーシスの誘導

ダウディ-Long(IgE/M1')細胞を用いて、アポトーシスの誘導に対する架橋した表面IgEの効果を試験した。ダウディ細胞(ATCC, Manassas, VA, #CCL-213)は、BCR架橋に反応してアポトーシスを起こしやすいことが知られているヒトバークリリンパ腫細胞株である。IgEのロング型を発現するダウディ細胞は、M1'を有するIgEのU266重鎖および軽鎖のレトロウイルス形質導入によって生成した。BJAB IgE Long細胞の生成については上記の通りである。内在性IgM及び形質移入したIgE B細胞レセプターに対する抗体を用いたダウディ-IgE/Long細胞のフローサイトメトリー分析はIgEよりもIgMの高い発現を示す。ダウディ-IgE/Long細胞のアポトーシスは、培養培地[RPMI、10% FBS(Hyclone, Logan, UT, #SH30071.03)、ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #15140-122)、2mM グルタミン(Genentech, Inc.)、10mM HEPES(7.2)(Genentech, Inc.)、1mM NaPyruvate(Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #11360)、1.59g/l 炭酸水素ナトリウム溶液(Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #25080-094)]中で $0.2 \times 10^6 / 1.5 \text{ ml}$ の密度にまで培養した細胞において試験した。アポトーシスアッセイを始める前に、フィコール勾配(GE Healthcare #17-1440-03)により死んでいる細胞(dead cell)を除去し、アッセイにおける細胞死のバックグラウンドレベルを減らした。 0.2×10^6 の細胞を、抗M1'抗体又はコントロール抗体のある場合とない場合3通りずつ、溶液中で72時間培養した。次いで細胞を回収し、アネキシンV-FITCアポトーシス検出キットI(BD Biosciences, San Jose, CA #556547)を用いてアポトーシスのレベルを分析した。細胞を冷たいPBS(Genentech, Inc.)にて2回洗浄し、その後100µlの1×結合バッファ(0.1M HEPES/NaOH(pH7.4)、1.4M NaCl、25mM CaCl₂)(BD Biosciences, San Jose, CA, #51-66121E)に再懸濁した。次いで細胞を、2.5µlのアネキシンV-FITC抗体(BD Biosciences, San Jose, CA #51-65874X)と5µlのヨウ化プロピジウム(PI)(BD Biosciences, San Jose, CA #51-66211E)にて暗所で染色した。15分後に、400µlの1×結合バッファを各チューブに加え、細胞をFACS Caliburフローサイトメトリー機(BD, Inc. Franklin Lakes, NJ)にて分析した。各試料についておよそ10-20000の事象が集められた。死にかけている細胞(dying cell)は、アネキシン-VポジティブかつPIネガティブとして定義される。死んでいる細胞は、アネキシン-VおよびPIの両方についてポジティブである。各集団(dead及びdying)の割合はFlowJo FACS分析ソフトウェア(Tree Star, Inc., Ashland, Oregon)を用いて算出した。3通りのデータを平均し、標準偏差を算出した。%アポトーシスは、dead及びdying細胞の合計として算出し、エクセル(Microsoft, Inc.)を用いてグラフにした。

【0194】

カンプトセシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, #C9911-100mg)と抗IgM抗体(Jackson Immuno Research, West Grove, PA, #109-006-120)を、Dauid-IgE/Long細胞株におけるアポトーシス誘導についてのポジティブコントロールとして用

10

20

30

40

50

いた。抗gp120 mIgG1又は抗ブタクサmIgG1抗体(Genentech, Inc.)を、このアッセイのネガティブコントロールとして用いた。ダウディ-IgE/Lon g細胞は、一定の範囲の抗IgE/M1'又はアイソタイプコントロール抗体濃度(25、10、1、0.1、0.01、0.001 µg/ml)で培養した。試験した抗IgE/M1'抗体は、7A6、47H4、47G4、42A5、42H4、1C11、26A11、51D2、45C1、26B11および28E9(Genentech, Inc.)であった。抗ヒトIgE抗体(Mae11-mIgG1)も比較のために用いた。

アイソタイプコントロール抗gp120及び抗ブタクサ抗体は未処理の細胞を超えるアポトーシスを誘導しなかった。アポトーシスのバックグラウンドレベルは、各実験について10-15%の範囲であった。抗IgE/M1'抗体7A6(>10 µg/ml)、47H4(>10 µg/ml)および47G4(25 µg/ml)は、ダウディIgE Lon g細胞のアポトーシスを誘導した。26A11は、同程度のアポトーシスを誘導したが(30-50%以下)、さらに低い濃度(>0.1 µg/ml)であった。42A5、51D2、45C1、26B11及び28E9はバックグラウンドレベルを超えるほどのアポトーシスを誘導しなかった。またMae11はバックグラウンドレベルを超えるほどのアポトーシスを誘導しなかった。

また、発明者等は、ヤギ抗マウスIgG F(ab')₂二次抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA#115-006-062)の存在下でアポトーシスアッセイを行い、ダウディ細胞株上のIgE B細胞レセプターを強く架橋させた。架橋実験は、ヤギ抗マウスIgG F(ab')₂抗体(30 µg)(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA、#115-006-062)の存在下で行った。26B11(30%)を除いて、すべての抗体は、異なる濃度であるが70-80%の最大アポトーシスレベルを誘導した。これらの抗体は2つのグループに分類されうる。7A6、1C11、26A11、51D2、45C1および28E9は、最も高い濃度で最大アポトーシスを誘導した。他方のグループの47H4、47G4、42A5、及び42H4、とMAE11は高い濃度ほどアポトーシスの低減を示した。

【0195】

実施例6A

Daud/IgE-Lon g細胞におけるヒト化抗IgE/M1'抗体のアポトーシスの誘導

ダウディ-Lon g(IgE/M1')細胞を用いて、この細胞株におけるアポトーシスの誘導に対する架橋した表面IgEの効果を試験した。ダウディ細胞(ATCC, Manassas, VA, #CCL-213)は、BCR架橋に応答してアポトーシスを起こしやすいことが知られているヒトパーキットリンパ腫細胞株である。ダウディ-IgE/Lon g細胞は、培養培地[RPMI、10% FBS(Hyclone, Logan, UT, #SH30071.03)、ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #15140-122)、2mM グルタミン(Genentech, Inc.)、10mM HEPES(7.2)(Genentech, Inc.)、1mM NaPyruvate(Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #11360)、1.59g/l 炭酸水素ナトリウム溶液(Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #25080-094)]中で $0.2 \times 10^6 / 1.5 \text{ ml}$ の密度にまで一晚培養し、その後翌日dead細胞をフィコール勾配(GE Healthcare #17-1440-03)にて取り除いた。これによりアッセイ中の細胞死のバックグラウンドレベルを低減した。 0.2×10^6 の細胞を、抗M1'抗体又はコントロール抗体のある場合とない場合3通りずつ、溶液中で72時間培養した。次いで細胞を回収し、アネキシンV-FITCアポトーシス検出キットI(BD Biosciences, San Jose, CA#556547)を用いてアポトーシスのレベルを分析した。細胞を冷たいPBS(Genentech, Inc.)にて2回洗浄し、その後100 µlの1×結合バッファ(0.1M Hepes/NaOH(pH7.4)、1.4M NaCl、25mM CaCl₂)(BD Biosciences, San Jose, CA, #51-66121E)に再懸濁した。次いで細胞を、2.5 µlのアネキシンV-FITC抗体(BD Biosciences, San Jose, CA#51-65874X)と5 µlのヨウ化プロピジウム(PI)(BD Biosciences, San Jose, CA#51-66211E)にて暗所で染色した。15分後に、400 µlの1×結合バッファを各チューブに加え、細胞をFACS Caliburフローサイトメトリー機(BD, Inc. Frankli

n Lakes, NJ)にて分析した。各試料についておよそ10 - 20000の事象が集められた。dying細胞は、アネキシン - VポジティブかつPIネガティブとして定義される。dead細胞は、アネキシン - VおよびPIの両方についてポジティブである。各集団(dead及びdying)の割合はFlowJo FACS分析ソフトウェア(Tree Star, Inc., Ashland, Oregon)を用いて算出した3通りのデータを平均し、標準偏差を算出した。%アポトーシスは、dead及びdying細胞の合計として算出し、エクセル(Microsoft, Inc.)を用いてグラフにした。

【0196】

抗IgM抗体(JacksonImmuno Research, West Grove, PA, #109-006-120)を、Dauidi-IgE/Lon g細胞株におけるアポトーシス誘導についてのポジティブコントロールとして用いた。ハーセプチン(登録商標)huIgG1(Genentech, Inc.)を、このアッセイのためのネガティブコントロールとして用いた。ダウディ-IgE/Lon g細胞は、一定の範囲の抗IgE/M1'又はアイソタイプコントロール抗体濃度(25、10、1、0.1、0.01、0.001µg/ml)で培養した。二次架橋実験はヤギ抗ヒトIgGF(ab')₂抗体(50µg)(Biosource#AH11301)の存在下で行った。試験した抗IgE/M1'抗体は、47H4v5、26A11v6、7A6v1 huIgG1であった。

10

アイソタイプコントロールハーセプチン(登録商標)huIgG1は未処理細胞を超えてアポトーシスを誘導しなかった。アポトーシスのバックグラウンドレベルは、各実験について10 - 15%の範囲であった。抗IgE/M1'抗体47H4v5、26A11v6および7A6v1は、30 - 40%の範囲のアポトーシスを誘導した(図8A)。

20

発明者等は、ヤギ抗ヒトIgGF(ab')₂二次抗体(Biosource#AH11301)の存在下で同様のアッセイを繰り返し、ダウディ細胞株上のIgEレセプターを架橋した。すべての抗体は70 - 90%の最大アポトーシスレベルを誘導し、いくつかは高濃度の一次抗IgE/M1'抗体でアポトーシス活性が減少した(図8B)。

【0197】

二次的に架橋することなくアポトーシスを誘導する際の野生型対無フコシル化の47H4v5

47H4v5の無フコシル化(AF)バージョンは、BIOWA細胞株(Genentech, Inc.)を用いて製造した。47H4v5のWTおよびAFバージョンは、同様のレベルまでアポトーシスを誘導することができた(図8C)。

30

表1 ヒト化抗IgE/M1'結合親和性

ヒト化抗-IgE/M1' 結合親和性

	配列変化			Scatchard	BJAB-IgE		Biacore A100		Biacore 2000	
	L1-31/32	H1-34/35		細胞結合			M1' 固定	M1' 固定	IgG 固定	
				KD (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	
mu26A11	NS	MM		1.6 nM	12	25/26	0.3			5.1
26A11.v1	NS	MM			15	19	0.2	1.7		9.0
26A11.v2	NA	MM			18		0.3			
26A11.v3	NY	MM			10	22	0.0	2.8		
26A11.v4	NS	IM			20	29	0.9			
26A11.v5	NA	IM			25	35				
26A11.v6	NY	IM			11	23	2.6			8.3
26A11.v7	NS	IH				890			非常に弱い	
26A11.v10	NS	IN			~3300		1064			
26A11.v11	NA	IN			~540		21364			
26A11.v12	NY	IN			~1200					
26A11.v13	SS	MM				19		4.0		
26A11.v14	QS	MM				19		3.9		
26A11.v15	SS	IM				32		8.4		
26A11.v16	QS	IM				27		8.8		
<hr/>										
	L1-27e/28	H1-34	H3-100k							
mu47H4	NG	M	M	0.4 nM	62	57	5.6	12		1.5
47H4.v1	NG	M	M		12	18	7.8			3.1
47H4.v2	NA	M	M		38		7.4			2.8
47H4.v3	NG	I	L		~7600		69			
47H4.v4	NA	I	L		>1300		56			
47H4.v5	NA	I	M			60		23		
47H4.v6	NA	M	L			170		54		
<hr/>										
	H1-34	H3-100k								
mu7A6	M	M		0.6 nM	52		4.5			
7A6.v1	M	M			39		15			
7A6.v2	I	L			~370		571			

40

50

【 0 1 9 8 】

実施例 7

誘導されたカルシウム流動

発明者等は、抗 M 1 ' 抗体が I g E B 細胞レセプターの下流の細胞性シグナル伝達を誘導することができる証拠として、抗 M 1 ' 抗体の、ダウディ - I g E / L o n g 細胞におけるカルシウム流動の誘導能を調べた。I g E / M 1 ' のロング型を過剰発現するダウディ細胞(ATCC, Manassas, VA, #CCL-213)を $0.2 \times 10^6 / \text{ml}$ の薄い濃度で終夜培養した。翌朝 dead 細胞をフィコール勾配(GE Healthcare #17-1440-03)にて除去した。細胞は、I n d o - 1 とともに大量に流し(load)、すべての刺激群間で同等な負荷(loading)とした。細胞は、培養培地(R P M I - 1 0 % F B S (Hyclone)、ペニシリン/ストレプトマイシン、2 m M L - グルタミン)中で $5 \times 10^6 / \text{ml}$ で再懸濁し、カルシウム検出色素 I n d o - 1 (5 μ M)(Molecular probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, #11223)と組み合わせた。次いで細胞を培養培地にて洗浄し、 $10^6 / \text{ml}$ で再懸濁した。1 刺激群につき 10^6 細胞を用いた。試料を 3 7 の水槽中で 5 分間温め、F A C s V a n t a g e 機(BD, Inc, Franklin Lakes, NJ)にて実行した。まず最初に試料を 1 分間実行して基準を生成させ、その後、抗 I g M (1 0 μ g)を除いて 2 0 μ g の各抗体により試料を刺激した。8 - 1 0 分間、データを集めた。F l o w J o F A C s 分析ソフトウェア(Tree Star, Inc., Ashland, Oregon)にて動態解析を行った。I n d o - 1 4 0 5 B o u n d / I n d o - 1 1 5 3 0 F r e e の比率としてデータを示す。すべての抗 M 1 ' 抗体は、アイソタイプコントロール抗 g p 1 2 0 m I g G 1 (2 0 μ g)と比較した。抗ヒト I g M (Jackson Immuno - Research, West Grove, PA, #109-005-129)と抗 I g E (M a e 1 1、Genentech, Inc.)をポジティブコントロールとして用いた。7 A 6、4 7 H 4、4 7 G 4、2 6 A 1 1 および 1 C 1 1 は、ダウディ I g E L o n g 細胞においてカルシウム流動を誘導した。2 8 E 9 および 4 2 A 5 は低いレベルのカルシウム流動を誘導した。4 5 C 1、2 6 B 1 1 及び 5 1 D 2 はカルシウム流動を誘導しなかった。

【 0 1 9 9 】

実施例 8

抗 I g E / M 1 ' 4 7 H 4 v 5 w t および無フコシル化による A D C C の誘導

抗体依存性細胞媒介性毒性により、細胞障害性細胞は抗原結合標的細胞に(抗体を介して)結合し、その後細胞毒性により標的細胞を殺すことができる。A D C C 活性又は亢進した A D C C 活性を有する抗 I g E / M 1 ' 抗体は、I g E が媒介する疾患の治療における治療的値を向上するかもしれない。

無フコシル化されている哺乳動物細胞において産生される抗体が A D C C 活性を亢進していたことを発見した。以下の実験は、無フコシル化された抗 I g E / M 1 ' 抗体の産生を記述した。

N K 細胞は 1 0 0 m l の全血(RosetteSep #15065, Stem Cell Technologies)から単離した。N K 細胞の純度は抗ヒト C D 5 6 染色にて決定した。7 0 % より大きな純度の C D 5 6 + N K 細胞を各アッセイに用いた。抗 I g E / M 1 ' 抗体およびハーセプチン(登録商標)抗 H e r 2 M A b h u I g G 1 アイソタイプコントロールは、連続的に力価測定した。これら抗体(5 0 μ l)は、細胞表面上にヒト I g E / M 1 ' を過剰発現する B J A B 細胞とともに、1 % F B S を含む R P M I - 1 6 4 0 (フェノールレッドなし)(BioWhittaker #12-918F)中で、室温で 3 0 分間インキュベートした(細胞株は上記に概説したように生成された)。次いで、N K 細胞(5 0 μ l)を 1 5 : 1 の比で細胞株に添加した(1 5 0 0 0 0 の N K 細胞対 1 0 0 0 0 標的(B J A B - L o n g))。アッセイは 3 通りずつ行った。次いで B J A B - h u L o n g、抗体及び N K 細胞を 3 7 で 4 時間インキュベートした。培養の後、9 6 ウェル丸底プレートを回転させ、上清を回収した(1 0 0 μ l)。次いで上清は、L D H 反応アッセイ(Roche # 1644793)を用いて L D H 放出について試験した。標的のみ及び溶解した標的を用いて % 細胞毒性を算出した。上清は、製造業者によって概説されるように、L D H 反応混合物と同じ体積で 3 0 - 6 0 分間インキュベートした。次いでプレートを 4 9 0 n m で読み取った。% 細胞毒性は以下の通りに算出した。= (E x

p 値 - 標的のみ) / 標的溶解物 - 標的のみ)。K a l e i d a g r a p h を用いてデータをプロットし、ベストフィット曲線を用いて E D 5 0 値を求めた。

図 1 0 では、ハーセプチン(登録商標) h u I g G 1 アイソタイプコントロール抗体は、低レベルの細胞毒性を誘導した。抗 I g E / M 1 ' 抗体は特異的な細胞毒性を誘導した。抗 I g E / M 1 ' 4 7 H 4 v 5 の野生型および無フコシル化型は、同等の最大%細胞毒性(70 - 80%以下)を誘導した。無フコシル化 4 7 H 4 v 5 は野生型よりも強力であった(無フコシル化 4 7 H 4 v 5 の E C 5 0 は 0 . 8 3 n M 以下であり、野生型 4 7 H 4 v 5 の E C 5 0 は 6 . 6 n M 以下であった)。

【 0 2 0 0 】

実施例 9

アトピー h u - S C I D マウスにおけるマウス抗 I g E / M 1 ' 抗体の効果

図 1 2 A および 1 3 A は、抗 I g E / M 1 ' 抗体(それぞれマウス及びヒト化の両方)の有するアトピー h u - S C I D モデルにおける血清 I g E および I g E を産生するプラズマ細胞の産生を阻害する能力を示す。実験 1 (# 0 7 - 0 3 7 7) はマウス抗 I g E / M 1 ' 候補物質を試験し、実験 2 (# 0 7 - 1 2 3 2) はヒト化抗 I g E / M 1 ' を試験した。

ドナーは、ハウスロイコパック血液ドナープログラムにおいて我々から血清 I g E レベルについて検索した。アトピー h u - S C I D モデルに細胞を提供するために選択された 2 つのドナーは、アレルギーがあると識別され、1 6 9 6 および 1 1 5 2 n g / m l の血清 I g E レベルを有していた。通常、正常ドナーは 1 0 0 - 3 0 0 n g / m l 未満の I g E を有する。

h u - S C I D 実験は図 1 2 A 及び 1 3 A に概説する。P B M C は白血球フェレーシス及びフィコール密度勾配(GE Healthcare #17-1440-03)によって単離し、計数した。1 0 8 の P B M C 細胞(1 0⁸ / 1 0 0 μ l) を 0 日目に放射線照射した S C I D ベージュマウス内に腹腔内投与した。I g E 産生に対する応答をゆがめるために、マウスは、0 及び 3 日目に抗 I F N (BD Biosciences, San Jose, CA、# 554698) 及び抗 I L 1 2 抗体(1 0 0 μ g / 用量)(BD Biosciences, San Jose, CA、# 554659) にて、2、3、4 日目に r h I L - 4 (1 0 0 n g / 用量)(R&D Systems, Minneapolis, MN、#204-IL-010) にて処置した。マウスは、実験の 0 日目から終わるまで、週 3 回(およそ 3 日おき)に、実験的抗体(すなわち抗 I g E / M 1 ') にて処置した。7 日からマウスを安楽死させた 1 4 日までヒト細胞を増やした(expand)。7 日目と実験の最後に血液を採取した。実験の最終日にマウスを安楽死させ、脾細胞を単離した。単一細胞懸濁液を I g E エリスロットアッセイ及び F A C s に用いて、ヒト細胞再構成および I g E プラズマ細胞枯渇の程度を決定した。

データは平均 ± 標準偏差として表す。P 値は J M P 統計ソフトウェアを用いて算出した。ダネットの試験はグループ平均を比較するものであり、すべての実験群は参照群に対して試験される。各対のスチューデント t 検定はスチューデント t 検定を用いて各群の対を比較する。その後、ボンフェローニ補正を行い、各対のスチューデント t 検定の p 値を調製し、一対比較を防いだ。すべての p 値の閾値は 0 . 0 5 である。図 1 2 A - I 及び 1 3 A - H に示されるデータの%変化は、基準レベルに正規化することなく、処置群とコントロール群の間で算出した。

【 0 2 0 1 】

フリー I g E レベルはヒト E L I S A 法を用いて決定した。この方法では、M a x i s o r p 3 8 4 - ウェル E L I S A プレート(Nalge Nunc International, Rochester, NY) を 1 μ g / m l のモノクローナル抗体 M A E 1 1 を含む 5 0 m M 炭酸バッファ、p H 9 . 6 にて、4 で終夜をかけてコートし、0 . 5 % ウシ血清アルブミンを含む P B S にて室温で 1 時間かけてブロックした。0 . 5 % ウシ血清アルブミン、0 . 0 5 % ポリソルベート 2 0、1 0 百分率(p.p.m) P r o c l i n 3 0 0 (Supelco, Bellefonte, PA)、0 . 2 5 % C H A P S (Sigma, St. Louis, MO)。0 . 2 % ウシ グロブリン(Biocell, Rancho Dominguez, CA) 及び 5 m M E D T A を含む P B S 中の標準物質(0 . 0 9 8 - 1 2 . 5 n g / m l) と試料の 3 倍段階希釈物(任意の血清効果を妨げるために 1 : 1 0 を最小希釈とする)を、プレート上で室温で 1 時間インキュベートした。結合した I g E は、ペルオキシダ

10

20

30

40

50

ーゼ標識したヤギ抗ヒト I g E 抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)をウェル中で1時間インキュベートして検出した。基質 3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を加え、1 M リン酸を加えて反応を止めた。工程の間でプレートを洗浄した。Titertek stacker読み取り機(ICN, Costa Mesa, CA)にて450 nmの吸光度を読み取った。標準曲線を4パラメーター非線形回帰曲線フィッティングプログラム(Genentechにて開発)を用いてフィットさせた。標準曲線の線形範囲内のデータポイントを、試料の I g E 濃度を算出するために用いた。

【0202】

ヒト免疫グロブリンアイソタイプパネルは、マウスモノクローナル抗体(A b)をヒト I g G 1 (クローン 2 C 1 1、Abcam Inc., Cambridge, MA)として行い、0.05 M 炭酸ナトリウムバッファ、pH 9.6にて4 u g / m lに希釈し、4 で終夜インキュベートしてE L I S Aプレート(384-well, high-bind plates, Greiner Bio One, Monroe, NC)上にコートした。洗浄バッファ(P B S / 0.05% T w e e n - 2 0)にて3回洗浄した後、プレートをP B S / 0.5%ウシ血清アルブミン(B S A)にて1 - 2時間かけてブロックした。これと他のすべてのインキュベートは室温で環状に振とうしながら実施した。マウス血清試料は、アッセイバッファ(P B S / 0.5% B S A / 0.05% T w e e n 2 0 / 0.25% C H A P S / 5 m M E D T A / 1 5 P P M P r o c l i n)を用いて1 : 1 0 0に希釈した後、段階的に1 : 3希釈を行った。同じバッファを使用して、標準曲線のためにI g G 1の階段希釈物を調製した(12.20 - 1560 n g / m l)。標準曲線の高い、真ん中、低い領域の予め希釈した凍結コントロールを解凍した。ブロッ 20
ク工程の後、プレートを洗浄し、試料、標準物質およびコントロールを384ウェルプレートに加え、2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ヒトI g G 1に対するビオチン化マウス m A b (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA)をアッセイバッファにて1 : 5 0 0に希釈し、洗浄したプレートに加えて1時間インキュベートした。ストレプトアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ(S A - H R P)(GE Healthcare, Piscataway, NJ)は、アッセイプレートにて1 : 4 0 0 0 0に希釈し、洗浄後プレートに加えた。30分のインキュベートと最終的な洗浄工程の後に、テトラメチルベンジジン(T M B)(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を加え、10 - 15分間発色させた。1 M リン酸を加えて反応を止めた。マイクロプレート読み取り機を用いて光学密度を求め(450 nm、650 nm参照波長)、標準曲線の4 - パラメーターフィットから試料 30
濃度を算出した。マウス血清試料中のヒトI g G 1の最小の定量化可能濃度は、1.22 u g / m lであった。

上記の全体のE L I S A法は他のI g アイソタイプの分析にも用いた。

【0203】

I g G 2

マウス抗ヒトI g G 2 m A b(2鎖特異的)(Southern Biotech, Birmingham, AL)を、4 u g / m lでE L I S Aプレート上にコートした。ヒトI g G 2標準曲線範囲は12.20 - 1560 n g / m lであった。ビオチン化マウス抗ヒトI g G 2 m A b(2鎖特異的)(Southern Biotech)を0.5 u g / m lに希釈して、検出抗体として用いた。S A - H R Pは、1 : 1 0 0 0 0の希釈で384ウェルプレートに加えた。マウス血清試料 40
中のヒトI g G 2の最小定量化可能濃度は1.22 u g / m lであった。

I g G 3

マウス抗ヒトI g G 3 m A b(Zymed Laboratories)を1 u g / m lに希釈し、E L I S Aプレートにコートした。ヒトI g G 3標準曲線範囲は0.78 - 100 n g / m lであった。ビオチン化マウス抗ヒトI g G 3 m A b(3鎖特異的)(Southern Biotech)を0.1 u g / m lに希釈し、検出抗体として用いた。S A - H R Pは1 : 2 0 0 0 0の希釈で384ウェルプレートに加えた。マウス血清試料中のヒトI g G 3の最小定量化可能濃度は78.1 n g / m lであった。

I g G 4

精製したマウス抗ヒトI g G 4 m A b(BD Pharmingen, San Jose, CA)を0.25 u g 50

/mlに希釈し、ELISAプレートにコートした。ヒトIgG4標準曲線範囲は0.20 - 25 ng/mlであった。ビオチンコンジュゲートマウス抗ヒトIgG4 mAb (BD Pharmingen)を0.25 µg/mlに希釈し、検出抗体として用いた。SA-HRPは1:20000の希釈で384ウェルプレートに加えた。マウス血清試料中のヒトIgG4の最小定量化可能濃度は39.1 ng/mlであった。

IgA

精製したマウス抗ヒトIgA1/A2 mAb (BD Pharmingen)を2 µg/mlに希釈し、ELISAプレートにコートした。ヒトIgA標準曲線範囲は0.20 - 25 ng/mlであった。ビオチンコンジュゲートマウス抗ヒトIgA1/A2 mAb (BD Pharmingen)を1 µg/mlに希釈し、検出抗体として用いた。SA-HRPは1:80000の希釈で384ウェルプレートに加えた。マウス血清試料中のヒトIgAの最小定量化可能濃度は39.1 ng/mlであった。

10

IgM

精製したマウス抗ヒトIgM mAb (BD Pharmingen)を0.5 µg/mlに希釈し、ELISAプレートにコートした。ヒトIgM標準曲線範囲は0.78 - 100 ng/mlであった。ビオチンコンジュゲートマウス抗ヒトIgM mAb (BD Pharmingen)を0.5 µg/mlに希釈し、検出抗体として用いた。SA-HRPは1:40000の希釈で384ウェルプレートに加えた。マウス血清試料中のヒトIgMの最小定量化可能濃度は156 ng/mlであった。

【0204】

20

Hu-SCID脾細胞、マウス脾細胞又はリンパ節細胞は、FACS Calibur フローサイトメーター (BD (San Jose, CA))上のFluoresbrite YGマイクロファイア (Polysciences, Inc. #18862)を用いて計数した。

エリスポットアッセイを用いて、rhIL-4、抗IFNおよび抗IL-12抗体にて15日間処置した後、hu-SCIDマウスのIgE産生プラズマ細胞の頻度を決定した。エリスポットプレート (Millipore, Billerica, MA, #MSIPS4510, clear)は、コートバッファ [Genentech, Inc. (A3323)] (100 µl/ウェル)での一次非コンジュゲート抗ヒトIgE抗体 (AXXORA, San Diego, CA, #BET-A80-108A)の1:500希釈物にて4で終夜をかけてコートした。次いで、一次抗体溶液を注ぎ、洗浄バッファ (1 x PBS、0.05% Tween-20)にてプレートを2回洗浄した。メンブランを200 µl/ウェルの0.5% BSA含有1 x PBSにて37で0.5 - 1時間かけてブロックした。ブロック溶液を除去し、ポジティブコントロール細胞又はhu-SCID脾細胞をプレートに加えた。ヒトミエローマIgE産生U266細胞株 (ATCC, Manassas, VA, #TIB196)をポジティブコントロールとして用いた。U266細胞は、3000細胞/0.1 ml (= 0.032×10^6 / ml)のハイブリドーマ培地 [RPMI 1640、15%胎仔ウシ血清、2 mM L-グルタミン、10 mM HEPES、4.5 g/l グルコース、1.5 g/l 重炭酸塩]の濃度から、7の階段希釈物 (1:2)でプレートに加えた。全脾臓単細胞懸濁液は1 mlの培地に再懸濁した。100 µlを第一ウェルに加えた。次いで7つの1:2段階希釈を行った。U266ハイブリドーマ及び脾細胞を37で終夜インキュベートした。翌日洗浄バッファ (1 x PBS、0.05% Tween-20)にてプレートを3回洗浄し、その後100 µl/ウェルの二次抗体、抗ヒトIgE-アルカリフォスファターゼコンジュゲート (Sigma, St. Louis, MO, A-3525)を、0.5% BSA / 1 x PBSにて1:2000で各ウェルに加え、37で2時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、その後ddH₂O (Genentech, Inc.)にて1回すすいだ。100 µl/ウェルのBCIP/NBT溶液 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Elispot Blue Color Module, #SEL002)を各ウェルに加え、暗所にて30分間インキュベートした。次いでプレートをddH₂Oにて1回すすぎ、プレートを室温で乾燥させた。プレートは計数のためにBD Biosciencesに送った (BD, Inc., Franklin Lakes, NJ)。プラズマ細胞の数は、検出したスポットの数、希釈倍率 (細胞インプット) 及び総脾細胞数を用いて算出した。

30

40

【0205】

50

ヒトプラズマ細胞は、抗体処置した *h u - S C I D* マウスから 15 日目に脾臓を摘出して調製した。単一細胞懸濁液を調製して濾過した。 5×10^6 細胞は、ヒト血清 (Sigma, St. Louis, MO, #S-2257) 及びマウス血清 (VWR, #RLD108-0100) にてブロックし、その後、抗ヒト *C D 3 8 P E* 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA, #555460) 及び抗ヒト *P E F I T C* 抗体 (Dakocytomation, Glostrup, Denmark, #K2311) を含む *F A C s* 洗浄バッファ (2% *F B S*、1% *P B S*) にて氷上に 20 分置いて染色した。次いで細胞を洗浄し、*F A C s C a l i b u r* 機 (BD, Inc., Franklin Lakes, NJ) にて分析した。ヒト *C D 3 8* 発現を成功ヒト *P B M C* 転移についてのポジティブコントロールとして用いた。プラズマ細胞は *C D 3 8 h i g h*、*P C +* と定義された。

実験 # 07 - 0377 (図 12A) では、3 つの抗 *I g E / M 1'* 抗体 (47H4、26A11 および 7A6) が、アイソタイプコントロール抗 *g p 1 2 0 - m u I g G 1* に対して試験された。アイソタイプコントロール処置マウスは、9 日目までに高レベルのヒト *I g E* を生成した。抗 *I g E / M 1'* 候補物質による処置により、*I g E* レベルが 65 - 84% 減少した (図 12B - C)。抗 *I g E / M 1'* 処置によっても、インビボの *I g E* 産生細胞が 19 - 69% 減少した (図 12D - E)。他の血清 *I g* は抗 *I g E / M 1'* 処置の作用を相対的に受けなかった (*h u I g 1*、*I g G 3* 及び *I g G 4* に対するいくつかの抗 *M 1'* 抗体において 30% 以下の減少が観察された) (図 12F - G)。抗 *I g E / M 1'* 処置により、脾臓の総プラズマ細胞の割合の減少は観察されなかった (図 12H - I)。

実験 # 07 - 1232 (図 13A) では、ヒト化抗 *I g E / M 1'* (47H4v5) が、アイソタイプコントロール抗体ハーセプチン (登録商標) - *h u I g G 1* に対して試験された。アイソタイプコントロール処置マウスは、8 日目までに高レベルの血清 *I g E* を生成した。抗 *I g E / M 1' h u I g G 1* による処置により、*I g E* レベルが 79% (図 13B - D)、そして *I g E* 産生プラズマ細胞が 75% (図 13C - D) 減少した。他の血清 *I g* (*I g G 1*、*I g G 2*、*I g G 3*、*I g G 4*、*I g M*、*I g A*) (図 13E - F) にも脾臓中の総プラズマ細胞の割合にも減少が観察されなかった (図 13G - H)。これらの実験から、抗 *I g E / M 1'* 抗体が血清 *I g E* と *I g E* 産生細胞を特異的に減少させるが、他のアイソタイプの免疫グロブリンはを減少させないことが示唆される。

【0206】

実施例 10

ヒト *M 1'* トランスジェニックマウス

h u M 1' トランスジェニック「ノックイン」マウスの作製

マウスはヒトと同様な *M 1'* ドメインを通常発現しないので、ヒト *M 1'* ドメインをマウス *I g E* 遺伝子座「にノックイン」したマウスを作製した。ヒト *M 1'* 配列は、上流のマウス *M 1'* スプライスアクセプター部位を使用し、その後下流のマウス *M 1'* 配列に融合する (図 14B)。 *I R E S - E G F P p A - N e o* カセットも、マウス *M 2'* 配列の 3' にノックインした。このノックインにより、*I g E* + B 細胞の表面上にヒト *M 1'* ドメインを有するマウス *I g E* の発現が可能となる。*M 1'* 配列は分泌された *I g E* には発現されないであろう。

【0207】

M 1' ノックインシステムのスクリーニング (PCR)

ヒト *M 1'* ノックインマウスを、マウス *I g E* 遺伝子座及びヒト *M 1'* 配列に特異的なプライマーを用いた PCR によって遺伝子タイピングを行った。用いたプライマーは以下の通りである。

W T F O R 5'-GGCCAAAGACCCTAAGACAGTC (配列番号: 106)

h u M 1' F O R 5'-GGGCTGGCTGGCGGCTCCGC (配列番号: 107)

W T R E V 5'-CTATGCCCTGGTCTGGAAGATG (配列番号: 108)

精製したゲノム DNA は、32 サイクルの以下のプログラムを使用して上記のプライマーにて分析した [94 4 分; 94 1 分; 60 30 秒; 72 1 分 (30 サイクル); 72 10 分]。次いで PCR 産物を 2% アガロース 0.5x TBE ゲルに流した。野生型 PCR 遺伝子型は 668 bp の産物を示し、*h u - M 1'* ノックインは 4

10

20

30

40

50

57bpの産物を生成した(図14C)。

【0208】

M1'ノックイン系統のスクリーニング(サザン)

huM1'ノックインES細胞と最終マウス系統をスクリーニングし、サザンプロットにて確認した。10 μ gの精製したES細胞またはTailゲノムDNAを、HindIIIにて左アーム又はBamHIにて右アームを終夜消化した。次いで消化したDNAを0.8%アガロース1 \times TAEゲルに流した。次いでDNAを、変性バッファ(1.5M NaCl; 0.5M NaOH)を用いてナイロンメンブラン(Roche #1417240)に終夜転移させた。メンブランをすすいで、UV架橋させ、その後DIG Easy Hyb 溶液(Roche #1585762)に回転させながら46 $^{\circ}$ で4時間浸漬させた。製造業者の指示の通りにPCR DIG

10

プローブ合成キット(Roche #11636090910)を用いたPCRによってプローブを生成した。

左アームのプライマーは以下の通りである。

FOR 5'-TGTCTGGTGGTGGACCTGGAAAGCG (配列番号: 109)

REV 5'-TCCTCGCTCTCCTCTCTGGTGGTG (配列番号: 110)

右アームのプライマーは以下の通りである。

FOR 5'-CCATGCAACCTAGTATCCTATTCTC (配列番号: 111)

REV 5'-CTTTATACAGGAGAACCTAGCCCAG (配列番号: 112)

非標識のPCR産物に対してプローブを試験し、サイズを大きくし、良好にDIG標識させた。次いで回転させながらプローブを46 $^{\circ}$ で終夜温め、プロットを終夜検索した。翌日プロットを洗浄し、製造業者の指示に従って抗DIG抗体にて反応させた。プロットは15-20分間フィルムにさらした。図14Dはサザンの結果を示す。野生型マウスは、左アームの7.4kBのHindIII断片を生成するが、これはhu-M1'ノックイン対立遺伝子では3kBの断片になる。野生型マウスは、右アームの14.1kBのBamHI断片を生成するが、これはhu-M1'ノックイン対立遺伝子では18.1kBの断片になる。野生型およびヘテロ接合のマウスを示す(図14D)。

20

【0209】

実施例11

Hu-M1'トランスジェニックモデル: TNP-OVA免疫化

この実験は、TNP-OVAに対する免疫一次応答(Exp. #07-0234F; 図15A-I)又はメモリー応答(Exp. #07-0234B; 図16A-K)免疫応答におけるTNP-OVAによって刺激されて生じるIgEの生成を阻害する抗IgE/M1'候補物質の能力を示す。TNP-OVA又はトリニトロフェニル-卵白アルブミンは、強力な抗体免疫応答を生成させるために用いられることが多い非常に強い免疫原である。

30

データは平均 \pm 標準偏差として表す。JMP統計ソフトウェアを用いてP値を算出した。ダネットの試験はグループ平均を比較するものであり、すべての実験群は参照群に対して試験される。各対のスチューデントt検定はスチューデントt検定を用いて各群の対を比較する。その後、ボンフェローニ補正を行い、各対のスチューデントt検定のp値を調製し、一対比較を防いだ。すべてのp値の閾値は0.05である。一次応答(図15A-I)及びメモリー免疫応答(図A-K)について示されたデータ内の%変化は、各々のマウス値から非感染又は非免疫化群の平均値を減じて算出し、群の平均は算出し直し、次いで%変化は各時点のコントロール群に対して算出した。

40

ヒトIgE/M1'ノックインマウス(C57BL/6)のTNP-OVA免疫化によりインビボでのTh1/Th2応答が均衡化される。一次免疫および抗原投与後の抗原特異的IgEレベルは、10-200ng/ml以下のレベルに達する。実験#07-0234Fでは、huM1'ノックインマウス(C57BL/6)は、0日目にTNP-OVA(Bioscience Technologies, Novato, CA)(100 μ g、1マウス当たり2mgのミョウバン中、腹腔内投与)にて免疫化した。次いで、マウスは、0から28日目まで、0.1mg/kgの抗体を週3回投与した(図15A)。実験#07-0234Bでは、(前述同様に)0日目にTNP-OVA/ミョウバンにてhuM1'ノックインマウス(C57BL/6)を免疫化し、その後28日目にTNP-OVA(1マウス当たり100 μ g)にて追加免疫し

50

た(図16A)。28から49日目に10mg/kgの抗体にてマウスを処置した(図16A)。免疫応答の経過中にマウスの採血を行い、抗原特異的血清IgE及びIgG1レベルをモニターした。

【0210】

50mM 炭酸ナトリウム/炭酸水素, pH9.6にて0.5µg/mlに希釈した25µl/ウェルのTNP-OVA(13:1の比のTNP:OVA)(Biosearch Technologies, Novato, CA)にて、2-8で12-18時間かけてコートしたELISAプレート(MaxiSorp™表面を有する384ウェル、Nunc, Neptune, NJ)を用いて、TNP-OVA特異的IgE IgG1を測定した。次いでプレートを移し、拭き取って乾燥させた。ブロックバッファ(PBS, 0.5% BSA, pH7.2, 50µl/ウェル)をプレートに加えて1-2時間置いた。これ以降のインキュベーションは緩やかに攪拌しながら室温で行った。試料をアッセイ希釈液(PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween-20, 0.01% Proclin 300)にて1/50に希釈した後、段階的に11時点にわたって1/3希釈を行った。標準物質は、1ng/mlの抗TNP-OVA IgG1及び3ng/mlの抗TNP-OVA IgEで初めて、アッセイ希釈液にて、7時点にわたって2倍に段階的に希釈した。プレートは洗浄バッファ(PBS, 0.05% Tween-20, pH7.2)にて3回洗浄し、標準物質、試料及びコントロールを加えて(25µl/ウェル)、IgG及びIgEアイソタイプを別々に検出するためにプレートを複製した。1.5-2時間インキュベートした後、プレートを洗浄バッファにて6回洗浄した。ビオチン化ラット抗マウスIgG1およびIgE mAb (BD Biosciences, San Diego, CA)は、IgG1の場合には0.5µg/mL又はIgEの場合には1.0µg/mLにアッセイ希釈液にて希釈し、適切なプレートに加えた(25µl/ウェル)。プレートを1-1.5時間インキュベートし、洗浄バッファにて6回洗浄した。ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(AMDEX, GE Healthcare, Piscataway, NJ)を、IgG1の場合には1/80000又はIgEの場合には1/5000に希釈し、プレートに加えて30分置いた(25µl/ウェル)。洗浄バッファにて6回洗浄した後、プレートに、25µl/ウェルのテトラメチルベンジジン(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を加えてIgG1の場合には15分間、IgEの場合には25分間インキュベートして反応させた。25µl/ウェルの1M H₃PO₄を加えて反応を止め、620nmを参照として450nmの吸光度を読み取った。未知の試料の結果は標準曲線の4パラメーターフィットのものを用いた。

【0211】

最初に、脾臓又はリンパ節からのマウスプラズマ細胞をCD138+細胞を分離することによって識別した。これらIgEを産生するプラズマ細胞はエリスロット法によって定量化した。総IgE産生細胞には、1ウェル当たり50µlのELISAコーティングバッファを用いて、1:2の希釈で抗IgE抗体(BD OptEIA mIgE set #555248から)をMultiScreen HTSプレート(Millipore #MSIPS4W10)にコートした。。4で終夜をかけてコートした。翌朝、組織培養フードにてmultichannelピペットを用いて200µlの滅菌PBS-tween 20(0.05%)にてプレートを5回洗浄した。次いで、300µlのPBS/5% BSA又は細胞培養培地(RPMI-1640, 10% FBS)中で室温で2時間かけてプレートをブロックした。脾臓又はリンパ節から単一細胞懸濁液を調製し、(上記のように)細胞をFACSにて計数した。細胞は、107細胞の後、TNP-OVA免疫化モデルのために3-4倍に希釈するか、又はニッポストロンギルス感染モデルのためには4×10⁶細胞の後2倍希釈して、プレーティングのために調製した。マウスA20 B細胞株はネガティブコントロールとして用い、TIB-141細胞株はポジティブコントロールとして用いた。細胞希釈物は、細胞培養培地(RPMI-1640+10% FBS)において調製した。ブロック工程の後、プレートを細胞培養培地にて1回洗浄し、吸引した。1ウェル当たり100µlで細胞をプレートに播いた。次いで、5%CO₂、37でプレートを終夜インキュベートした。翌日、SkanWasher 300 (Molecular Devices (Sunnyvale, CA))を用いてPBS-tween 20 (0.05%)にてプレートを6回洗

10

20

30

40

50

浄した。次いで、BD OptEIA mIgE set (#555248)のビオチン化二次抗体を製造業者の示す濃度で、通常100 μ l / ウェル中1 : 250 - 1 : 500 で用いた。二次抗体をPBS / 1% BSAにて調製した。次いで、プレートを室温で1時間インキュベートし、その後SkanWasher300を用いてPBS - tween 20 (0.05%)にて6回洗浄した。次いで、ストレプトアビジンAPを1ウェル当たり100 μ l 中1 : 60の希釈で加え、再びPBS / 1% BSAにて調製し、室温で1時間インキュベートした。次いでプレートを上記のように3回洗浄し、その後DI水にて2回すすいだ。液体が残っていればペーパータオルで拭き取った。次いで、反応試薬であるBCIP / NBT (100 μ l / ウェル)を加え、プレートを暗所、室温で30分間インキュベートした。次いで基質を別の容器へ移し、プレートをDI水にて2回すすいだ。プレートを逆さまにして、過剰な水分を除去し、乾燥させた。解剖顕微鏡を用いてスポットを定量化した。

10

【0212】

実験#07-0234Fでは、TNP-OVA一次免疫に対するIgE応答を阻害する、抗IgE / M1'の能力を試験した。抗gp120アイソタイプコントロール処置マウスは血清IgEを生成し、8から14日目にピークのレベルに達した(25 ng / ml以下)(図15B)。抗IgE / M1'処置により、8日目(98%)および14日目(99%)までに血清IgEの増加が妨げられた(図15C-D)。この減少はアイソタイプ処置動物とは有意に異なり、非免疫化マウスとは有意な違いはなかった(図15C-E)。抗原特異的IgG1のレベルは、28日の実験中に抗IgE / M1'の作用をわずかにしか受けなかった(図15F-I)。

20

実験#07-0234Bでは、TNP-OVAに対する二次/メモリーIgE応答を阻害する、抗IgE / M1'の能力を試験した。28日目のTNP-OVA追加免疫に対する二次IgE応答は即時的であり、一次応答で8-9日間であったのに対して4日後にピークに達した(図16B)。28日目の追加免疫を始めとした抗IgE / M1'候補物質による処置により、28日目と35日目の間のIgEの増加が減少した(図16B)。抗IgE / M1'処置IgEレベルは、アイソタイプコントロールと比較して有意に減少し、32日目までに59-75%、35日目までに90-93%であった(図16C-D)。35-42日目まで、IgEレベルは非免疫化マウスとは有意な違いがなかった。さらに、28日目と49日目との間のこれら処置群の濃度曲線下面積の分析から、抗IgE / M1'は血清IgEレベルを74-84%低減し、抗原特異的IgEの日当たり平均レベルも74-83%減少したことが示された(図16F-H)。抗IgE / M1'による処置後に抗原特異的IgG1の有意な減少は観察されなかった(図16I-K)。

30

【0213】

実施例12

Hu-M1'トランスジェニックモデル：ブラジル鉤虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)感染モデル

この実験は、抗IgE / M1'抗体が有する、IgE産生の阻害能、並びに既にブラジル鉤虫感染を起こしている場合のIgE産生を治療的に低減する能力を示す。IgE産生の減少は、免疫応答のピークIgE時(図18A-I)及び免疫応答の遅発時(図19A-G)の両方で抗IgE / M1'抗体の投与により促進した。

40

ブラジル鉤虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)はラット及びマウスに感染する胃腸管系の線虫である。その卵は、糞便において孵化して、感染段階である幼虫L3に成長する。L3幼虫は皮膚を介して宿主に入り、血管へ移動し、その後1-2日後に肺へ移動する。肺においてL4段階の幼虫に成長した後、宿主の気管および食道に沿って移動し、2-3日で空腸に達する。幼虫は成虫となり交配して、およそ5日で産卵する。ブラジル鉤虫の卵は糞便とともに宿主外に排泄される。

ブラジル鉤虫に感染したマウスは、最初の自然免疫応答を示し、その後強力な2型免疫が続き感染を除去する。感染の初期段階では補体およびフィブロネクチン沈着が見られ、白血球動員および付着が促される。エフェクター細胞、例えば好酸球性、好塩基およびCD4+Th2細胞は肺に動員されて、感染と戦う。Th2サイトカイン、IL-4および

50

I L - 1 3 は、肺の免疫応答を維持する際に必須の役割を果たし、腸内の虫クリアランスに必要である。2 型応答は、I g E を含む抗体産生のレベルが高いことを特徴とする。

【 0 2 1 4 】

ヒト I g E / M 1 ' ノックインマウス (C 5 7 B L / 6) は、1 5 - 2 0 日にピークとなるブラジル鉤虫感染に対して強い I g E 応答を示す。その後血清 I g E レベルは下がるが、高いレベルに維持される。0 日目にマウスにブラジル鉤虫を感染させた。3 つすべてのブラジル鉤虫感染実験は、1 0 m g / k g の抗 I g E / M 1 ' m I g G 1 抗体又は抗 g p 1 2 0 m I g G 1 アイソタイプコントロールにて処置した。予防研究では (図 1 7 A)、h u M 1 ' ノックインマウスは、0 日目から 2 1 日目まで週 3 回処置した。ピーク産生研究では (図 1 8 A)、h u M 1 ' ノックインマウスは、1 1 日目から 2 1 日目まで週 3 回処置した。後期介入研究では (図 1 9 A)、h u M 1 ' ノックインマウスは、4 1 日目から 6 2 日目まで週 3 回処置した。

データは平均 ± 標準偏差として表す。P 値は J M P 統計ソフトウェアを用いて算出した。ダネットの試験はグループ平均を比較するものであり、すべての実験群は参照群に対して試験される。各対のスチューデント t 検定はスチューデント t 検定を用いて各群の対を比較する。その後、ボンフェローニ補正を行い、各対のスチューデント t 検定の p 値を調整し、一対比較を防いだ。すべての p 値の閾値は 0 . 0 5 である。予防研究及びピーク産生研究において示されたデータ内の % 変化は、各々のマウス値から非感染又は非免疫化群の平均値を減じて算出し、群の平均は算出し直し、次いで % 変化は各時点のコントロール群に対して算出した。後期介入研究では、% 変化は 4 8 日目と 5 5 日目を 4 1 日目と比較して各処置群内で算出した。

実施例 1 2 において既に記載したように、I g E を産生するプラズマ細胞を定め、エリススポットによって評価した。

【 0 2 1 5 】

予防研究は、一次ブラジル鉤虫感染に反応した I g E の増加を予防する抗 I g E / M 1 ' の能力を試験した。コントロール (アイソタイプ処置) マウスは、感染後 1 5 日までに高レベルの I g E 産生に達した (3 0 0 0 n g / m l 以下)。抗 I g E / M 1 ' 処置マウスは感染後の I g E 産生を低減させ (抗 g p 1 2 0 m I g G 1 と比較して 9 3 - 9 4 % 減)、それは非感染マウスと有意な違いがなかった (図 1 7 B - D)。

ピーク産生研究は、ブラジル鉤虫感染に対する I g E 応答のピーク時の I g E レベルを治療的に低減する抗 I g E / M 1 ' の能力を試験した。すべての処置群は、ブラジル鉤虫感染後 1 1 日までに高いレベルの I g E に達した (2 0 0 0 n g / m l) (図 1 8 B)。抗 I g E / M 1 ' 処置はこの応答のピーク時の 1 1 日目に開始した。抗 I g E / M 1 ' m I g G 1 候補物質は、処置の 4 日以内に血清 I g E レベルを 8 2 - 8 9 % 減少した (図 1 8 C - D)。2 1 日目までに、抗 I g E / M 1 ' 処置マウスにおける I g E レベルは、9 7 - 9 8 % 減少し、非感染コントロール群と統計学的な相違がないレベルとなった (図 1 8 E)。I g E を産生するプラズマ細胞は、抗 I g E エリススポットによって定量化した。ブラジル鉤虫感染により、腸間膜リンパ節 (4×10^6 当たり 3 0 細胞以下 ; 図 1 8 F) 及び脾臓 (4×10^6 当たり 1 0 細胞以下 ; 図 1 8 G) に有意な数の I g E 産生細胞が誘導された。2 1 日目までに、抗 I g E / M 1 ' 処置により、腸間膜リンパ節では 8 8 - 9 4 %、脾臓では 5 7 - 6 6 % の I g E 産生細胞が減少した。腸間膜リンパ節及び脾臓での総プラズマ細胞 (C D 1 3 8 + 細胞) の頻度は、非感染マウスと比較してすべての処置群において増加し、抗 I g E / M 1 ' による処置のためにいずれの臓器でも総プラズマ細胞頻度の有意な変化はなかった (図 1 8 H - I)。これらの結果は、I g E 産生レベルがピークの時であっても、抗 I g E / M 1 ' 抗体が、インビボの I g E 産生細胞を枯渇することによってわずかなレベルに血清 I g E を低減する能力を示す。

後期介入研究は、感染サイクルの後期に達する低レベルに維持された I g E を低減する抗 I g E / M 1 ' の能力を試験した。すべての処置群は 1 5 日頃に I g E 産生のピークに達した。4 1 日目の抗 I g E / M 1 ' 処置の開始により、処置群間で血清 I g E レベルがいくらか異なった (図 1 9 B - C)。これは 4 1 日目を 1 0 0 % として正規化した (図 1 9

10

20

30

40

50

D)。抗 I g E / M 1 ' 処置により、48 日目から 55 日目に抗 g p 1 2 0 m I g G 1 アイソタイプコントロールと比較して、血清 I g E レベルが有意に減少した(図 1 9 E - G)。48 日目及び 55 日目までに、I g E レベルは、それぞれ 20 % 及び 37 % 減少したアイソタイプコントロール(抗 g p 1 2 0 m I g G 1)と比較して、それぞれ 64 - 75 % および 75 - 84 % 減少した(図 1 9 F - G)。処置群間の平均 I g E レベルの相違は、抗 I g E / M 1 ' 治療の開始前のアイソタイプコントロール群(g p 1 2 0)と有意な差はなかった(図 1 9 E)。しかしながら、抗 I g E / M 1 ' 抗体による処置は、48 日及び 55 日までにコントロール群で観察されるレベルよりも血清 I g E レベルのより劇的かつ有意な減少を示した(図 1 9 G)。% 変化及び p 値(41 日)は、48 日又は 55 日の各処置群を、治療前の 41 日の同じ群の開始時の値に比較して算出した。

10

【 0 2 1 6 】

実施例 1 3

哺乳動物細胞における抗 I g E / M 1 ' 抗体の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現による、所望のタンパク質又は抗体のグリコシル化されうる形態の調製を例示する。

ベクター、p R K 5 (1989 年 3 月 15 日発行の欧州特許第 3 0 7 2 4 7 号を参照)を発現ベクターとして用いた。場合によって、抗 I g E / M 1 ' 抗体の軽鎖及び / 又は重鎖をコードする D N A を、上掲の Sambrook et al. に記載されるようなライゲーション法を用いて該 D N A の挿入が可能ないように制限酵素が選択された p R K 5 内にライゲートする。

20

一実施態様では、選択した宿主細胞は 2 9 3 細胞であってもよい。ヒト 2 9 3 細胞(A T C C C C L 1 5 7 3)は、胎仔ウシ血清及び場合によって栄養成分及び / 又は抗生物質を添加した D M E M などの培地を含む組織培養プレート内で集密になるまで生育させる。p R K 5 内にライゲートした抗 I g E / M 1 ' 抗体をコードする、およそ 1 0 μ g の D N A は、V A R N A 遺伝子をコードする D N A およそ 1 μ g と混合し [Thimmappaya et al., Cell, 31:543 (1982)]、5 0 0 μ l の 1 m M トリス - H C l、0 . 1 m M E D T A、0 . 2 2 7 M C a C l₂ に溶解する。この混合物に 5 0 0 μ l の 5 0 m M H E P E S (p H 7 . 3 5)、2 8 0 m M N a C l、1 . 5 m M N a P O₄ を滴下して加え、2 5 に 1 0 分おいて沈殿物を形成させる。沈殿物を懸濁し、2 9 3 細胞に加え、3 7 におよそ 4 時間静置する。培養培地を吸引して除き、2 0 % グリセロールを含む 2 m l の P B S を 3 0 秒加える。次いで 2 9 3 細胞を無血清培地にて洗浄し、新鮮な培地を加え、およそ 5 日間細胞をインキュベートした。

30

【 0 2 1 7 】

形質移入のおよそ 2 4 時間後に、培地を除去し、培地(単独)又は 2 0 0 μ C i / m l ^{3 5} S - システインと 2 0 0 μ C i / m l ^{3 5} S - メチオニンを含む培地と交換する。1 2 時間のインキュベートの後、条件培地を回収し、スピンドフィルターにて濃縮し、1 5 % S D S ゲルに流した。処理したゲルを乾燥させ、選択した時間の間フィルターに露光させて、抗 I g E / M 1 ' 抗体の存在を明らかにしてもよい。形質移入させた細胞を含む培養物をさらにインキュベートして(無血清培地中で)、培地を選択したバイオアッセイにて試験してもよい。

40

代替技術では、抗 I g E / M 1 ' 抗体は、Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981) によって記述されるデキストラン硫酸法を用いて過渡的に 2 9 3 細胞に導入されてもよい。2 9 3 細胞はスピナーフラスコ内での最大の密度にまで生育させ、p R K 5 内にライゲートした抗 I g E / M 1 ' 抗体をコードする 7 0 0 μ g の D N A を加えた。始めに遠心分離によってスピナーフラスコから細胞を濃縮し、P B S にて洗浄した。D N A - デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で 4 時間インキュベートした。2 0 % グリセロールにて 9 0 秒間細胞を処理し、組織培養培地にて洗浄し、組織培養培地、5 μ g / m l ウシインスリンおよび 0 . 1 μ g / m l ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに移す。およそ 4 日後に、条件培地を遠心分離し、濾過して細胞および細片を取り除く。次いで、発現された抗 I g E / M 1 ' 抗体を含む試料は、濃縮され、透析および / ま

50

たはカラムクロマトグラフィ等の任意の選択された方法によって精製されてもよい。

他の実施態様では、抗 I g E / M 1 '抗体は C H O 細胞において発現されてもよい。p R K 5 にライゲートされた抗 I g E / M 1 '抗体をコードする D N A は、公知の試薬、例えば C a P O₄ 又は D E A E - デキストランを用いて C H O 細胞に形質移入されてもよい。前記の通り、細胞培養物をインキュベートし、培地を、培養培地(単独)又は³⁵S - メチオニン等の放射性標識を含む培地と交換してもよい。抗 I g E / M 1 '抗体の存在を決定した後に、培養培地を無血清培地と交換してもよい。好ましくは、培養物はおよそ6日間インキュベートし、条件培地を回収する。次いで、発現された抗 I g E / M 1 '抗体を含む培地は濃縮され、任意の選択された方法によって精製されてもよい。

【0218】

抗 I g E / M 1 '抗体のエピトープタグ付加変異体もまた、宿主 C H O 細胞において発現されてもよい。p R K 5 内にライゲートされる抗 I g E / M 1 '抗体をコードする D N A は p R K 5 ベクターからサブクローニングされてもよい。サブクローンインサートは、バキュロウイルス発現ベクター内のポリ h i s タグのような選択されたエピトープタグとインフレームに融合するように P C R を行うことができる。次いで、抗 I g E / M 1 '抗体インサートをコードするポリ h i s タグ付加 D N A は、安定クローンを選択するための D H F R のような選択マーカーを含む S V 4 0 作動性ベクター内にサブクローニングしてもよい。最後に、C H O 細胞に、(前記の通り) S V 4 0 作動性ベクターを形質移入させてもよい。発現を確認するために、前記のように標識を行ってもよい。次いで、発現したポリ H i s タグ付加抗 I g E / M 1 '抗体を含む培養培地を濃縮して、N i²⁺ - キレート

アフィニティクロマトグラフィなどの選択された方法によって精製されてもよい。抗 I g E / M 1 '抗体はまた、過渡的発現手順によって C H O および / または C O S 細胞において発現されてもよいし、他の安定発現手順によって C H O 細胞において発現されてもよい。

【0219】

C H O 細胞における安定発現は以下の手順を使用して実行される。タンパク質は I g G コンストラクト(イムノアドヘシン)として発現される。このとき、それぞれのタンパク質の可溶型(例えば細胞外ドメイン)のコード配列は、ヒンジ、C H 2 および C H 2 ドメインを含む I g G 1 定常領域配列に融合され、および / またはポリ H i s がタグ化された形態である。

P C R 増幅後、それぞれの D N A は、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997) に記載されるように、標準的な技術を用いて C H O 発現ベクターにサブクローニングされる。C H O 発現ベクターは、c D N A が簡便に輸送されるように、対象の D N A の 5' 及び 3' に互換性のある制限酵素部位を有するように構築される。C H O 細胞内での発現に用いられるベクターは、Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24: 9 (1774 - 1779 (1996) に記載されている通りであり、S V 4 0 初期プロモーター / エンハンサーを用いて対象の c D N A とジヒドロ葉酸還元酵素(D H F R)の発現を作動する。D H F R 発現により形質移入後にプラスミドを安定して維持しているものを選択することができる。

1 2 μ g の所望のプラスミド D N A は、市販の形質移入試薬 S U P E R F E C T (登録商標)(Quiagen)、D O S P E R (登録商標)又は F U G E N E (登録商標)(Boehringer Mannheim)を用いておよそ 1 0 0 0 0 0 0 の C H O 細胞に導入される。細胞は上掲の Lucas et al. に記載のように生育させる。およそ 3 × 1 0⁻⁷ 細胞は、後述する更なる成長および産生のためにアンプルに凍結する。

プラスミド D N A を含むアンプルは水槽内で解凍し、ボルテックスにて混合する。内容物は、1 0 m l の培地を含む遠心チューブ内でピペティングされ、1 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離される。上清を吸引し、細胞は 1 0 m l の選択培地(5%の 0.2 μ m 濾過した胎仔ウシ血清を含む 0.2 μ m 濾過 P S 2 0)に再懸濁する。次いで細胞は、9 0 m l の選択培地を含む 1 0 0 m l のスピナーに等分する。1 - 2 日後、細胞は、1 5 0 m l の選択増殖培地を満たした 2 5 0 m l スピナーに移し、3 7 °C でインキュベートした。さ

10

20

30

40

50

らに2 - 3日後に、250 ml、500 mlおよび2000 mlのスピナーに、 3×10^5 細胞/mlを播く。細胞培地は、遠心分離をして産生培地に再懸濁して新鮮培地と交換する。好適なCHO培地を用いるが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5122469号に記載される産生培地を用いてもよい。3Lの産生スピナーには 1.2×10^6 細胞/mlで播く。0日目に、細胞数とpHを測定する。1日目に、スピナーを抽出し、除菌空気の散布を開始した。2日目に、スピナーを抽出し、33に温度を変え、30 mlの500 g/Lグルコースと0.6 mlの10%消泡剤(例えば、35%ポリジメチルシロキサン乳剤, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)を用いる。製造全体にわたって、pHはおおよそ7.2に保たれるように、必要に応じて調整される。10日後、あるいは生存度が70%以下に低下するまで、細胞培養物は、遠心分離と0.22 μ mフィルターによる濾過によって回収する。濾液は、4で保存するか又は精製のためにカラムにすぐに流した。

【0220】

ポリHisタグ付加コンストラクトの場合、タンパク質はNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、条件培地に、5 mMの濃度になるまでイミダゾールを加える。条件培地は、0.3 M NaCl及び5 mM イミダゾールを含む20 mM Hepes, pH 7.4バッファにて4で平衡化した6 ml Ni-NTAカラムに、4 - 5 ml/分の流速で流す。負荷の後、カラムは付加的な平衡化バッファにて洗浄し、タンパク質を、0.25 M イミダゾールを含む平衡化バッファにて溶出する。次に、高度に精製したタンパク質は、10 mM Hepes, 0.14 M NaCl及び4%マンニトール, pH 6.8を含む貯蔵バッファ中で脱塩し、25 mlのG25 Superfine (Pharmacia)カラムにて-80で保存する。

イムノアドヘシン(Fc含有)コンストラクトは、以下の通りに条件培地から精製される。条件培地を、20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 6.8に平衡化した5 mlのプロテインAカラム(Pharmacia)に流し込む。負荷の後、カラムを平衡化バッファにて広く洗浄し、その後100 mM クエン酸、pH 3.5にて溶出する。溶出されたタンパク質は、275 μ lの1 M トリスバッファ、pH 9を含むチューブに1 mlの分画を集めることによって、直ちに中和する。その後、高度に精製されたタンパク質は、ポリ-Hisタグ付加タンパク質のために前記の通りに貯蔵バッファ内で脱塩される。均質性は、SDSポリアクリルアミドゲルによって、そして、エドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定によって評価する。

【0221】

材料の寄託

以下の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia, 20110-2209, USA(ATCC)に寄託した:

材料	ATCC寄託番号	寄託日
7A6.18	PTA-8268	2007年3月21日
1C11.10.20	PTA-8267	2007年3月21日
47G4.6.2	PTA-8266	2007年3月21日
47H4.12.10	PTA-8270	2007年3月21日
42H4.6.9	PTA-8260	2007年3月21日
42A5.20.11	PTA-8265	2007年3月21日
26A11.6.5	PTA-8262	2007年3月21日
51D2.22.15	PTA-8264	2007年3月21日
45C1.6.14	PTA-8269	2007年3月21日
26B11.3.12	PTA-8261	2007年3月21日
28E9.12.9	PTA-8263	2007年3月21日

【0222】

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄

10

20

30

40

50

託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願のいずれか早いものの公開時に、寄託培養物の後代が永久かつ非制限的に一般に入手可能となることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者が後代を入手できることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されているときに死亡もしくは損失又は破壊された場合、通知時に材料を同一の他のものに即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

【0223】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。本発明の権利範囲は本明細書中に示す実施例によって限定されるものではない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

【図1】



【図1A】

IgE/M1 Sequences

Human	1	ILQ	S	C	D	G	S	R	F	P	F	I	Q	L	C	L	S	S	G	T	P	P	G	I	N	T	N	T	E	D	G	Q	V	M	V	D	E	S	I	A	50							
Rhesus	1	ILQ	S	C	D	D	D	G	R	F	P	P	I	Q	L	L	I	S	G	T	P	P	G	A	N	V	T	N	L	E	N	G	Q	V	K	K	V	N	S	P	F	P	A	50				
Cyno	1	ILQ	S	C	D	D	D	G	R	F	P	P	I	Q	L	L	I	S	G	T	P	P	G	A	N	V	T	N	L	E	N	G	Q	V	K	K	V	N	S	P	F	P	A	50				
Human	51	T	Q	E	L	A	S	T	S	E	T	L	L	Q	K	H	L	S	D	R	T	T	C	V	Y	Q	G	T	F	E	D	E	T	K	K	A	D	S	N	P	R	100						
Rhesus	51	T	Q	E	L	A	S	T	S	E	F	T	L	Q	K	H	L	S	D	R	T	T	C	V	Y	Q	G	T	F	E	D	E	T	K	K	A	D	S	N	P	R	100						
Cyno	51	T	Q	E	L	A	S	T	S	E	F	T	L	Q	K	H	L	S	D	R	T	T	C	V	Y	Q	G	T	F	E	D	E	T	K	K	A	D	S	N	P	R	100						
Human	101	G	V	S	A	Y	L	S	R	P	S	F	D	L	I	K	S	F	T	I	C	L	V	D	L	A	P	S	K	G	V	N	L	T	S	R	A	S	G	K	P	V	P	H	150			
Rhesus	101	G	V	S	A	Y	L	S	R	P	S	F	D	L	I	K	S	F	T	I	C	L	V	D	L	A	P	S	K	E	T	V	N	L	T	S	R	A	S	G	K	P	V	P	H	150		
Cyno	101	G	V	S	A	Y	L	S	R	P	S	F	D	L	I	K	S	F	T	I	C	L	V	D	L	A	P	S	K	E	T	V	N	L	T	S	R	A	S	G	K	P	V	P	H	150		
Human	151	S	T	R	K	K	Q	R	N	G	T	L	V	T	S	L	P	P	V	G	T	D	W	I	E	G	E	T	Y	Q	C	R	V	T	H	P	L	P	R	A	L	V	R	S	199			
Rhesus	151	T	P	A	T	E	K	K	Q	R	N	G	T	L	V	T	S	L	P	P	V	G	T	D	W	I	E	G	E	T	Y	Q	C	R	V	T	H	P	L	P	R	A	L	V	R	S	200	
Cyno	151	T	P	A	T	E	K	K	Q	R	N	G	T	L	V	T	S	L	P	P	V	G	T	D	W	I	E	G	E	T	Y	Q	C	R	V	T	H	P	L	P	R	A	L	V	R	S	199	
Human	200	T	K	T	S	G	P	R	A	A	E	V	Y	A	T	P	E	F	E	G	S	R	R	K	T	L	A	C	L	I	Q	M	F	M	P	E	D	I	S	V	Q	W	L	H	S	D	Y	249
Rhesus	200	T	K	T	S	G	P	R	A	A	E	V	Y	A	T	P	E	F	E	S	R	R	K	T	L	A	C	L	I	Q	M	F	M	P	E	D	I	S	V	Q	W	L	H	S	D	Y	250	
Cyno	200	T	K	T	S	G	P	R	A	A	E	V	Y	A	T	P	E	K	L	E	S	R	R	K	T	L	A	C	L	I	Q	M	F	M	P	E	D	I	S	V	Q	W	L	H	S	D	Y	249

FIG. 1A

【 1 B 】

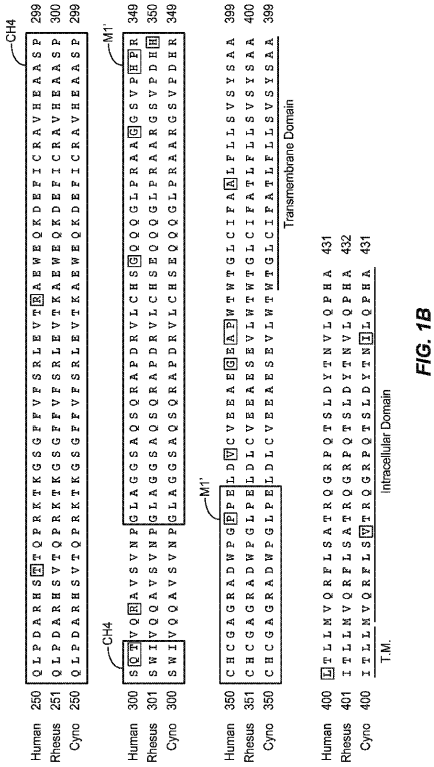
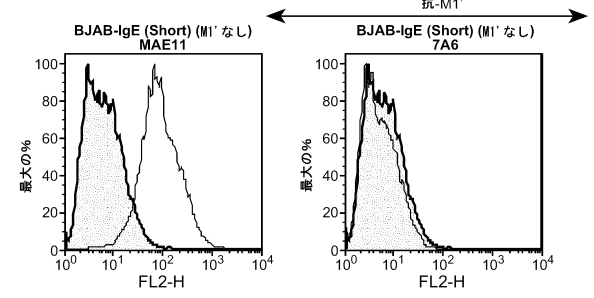
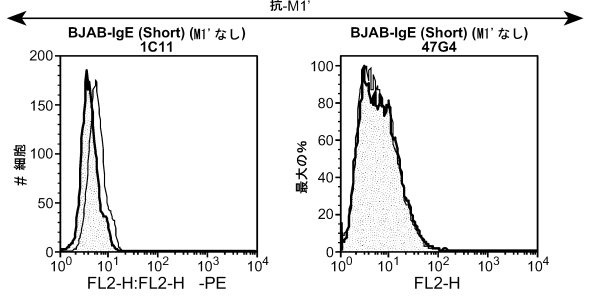


FIG. 1B

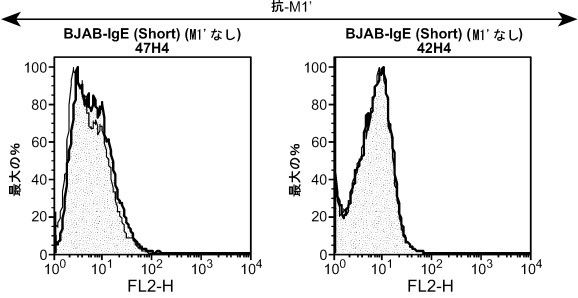
【 2 A - 1 】



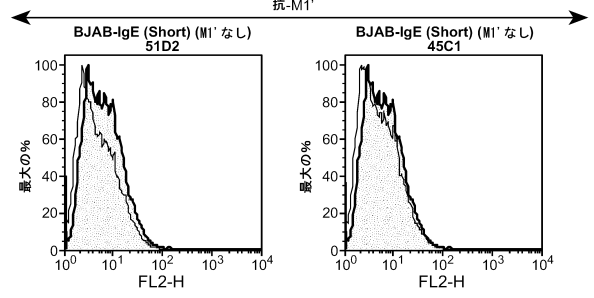
【 2 A - 2 】



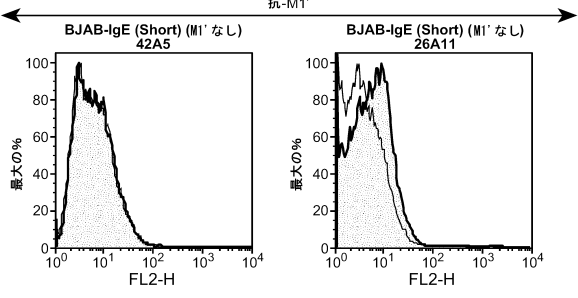
【 2 A - 3 】



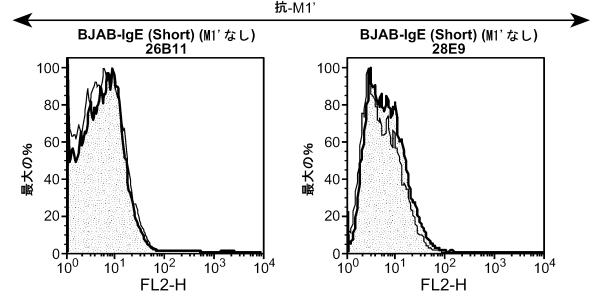
【 2 A - 5 】



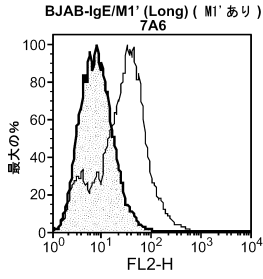
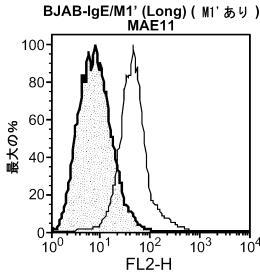
【 2 A - 4 】



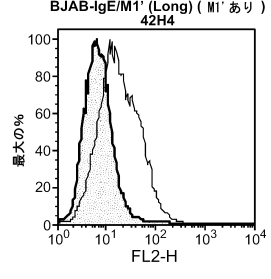
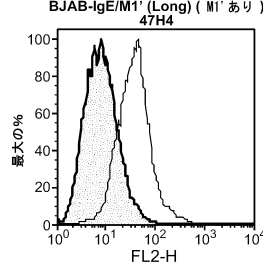
【 2 A - 6 】



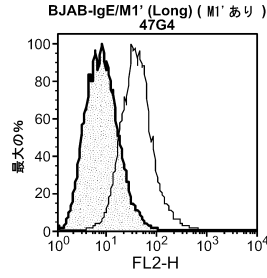
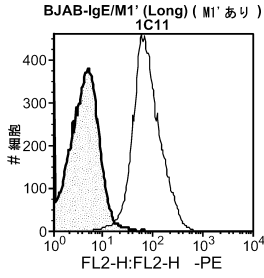
【 図 2 B - 1 】



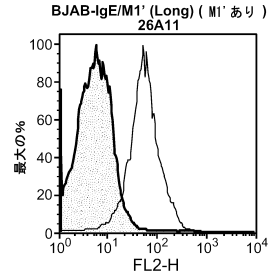
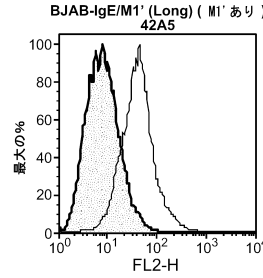
【 図 2 B - 3 】



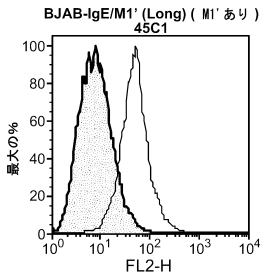
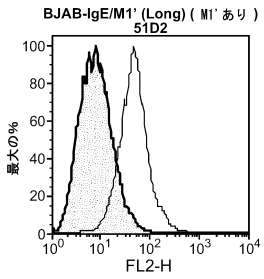
【 図 2 B - 2 】



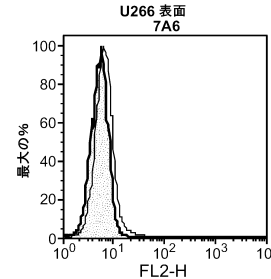
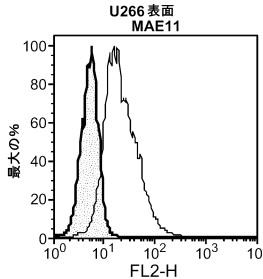
【 図 2 B - 4 】



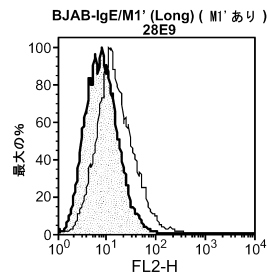
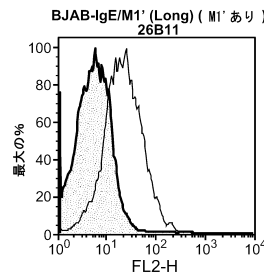
【 図 2 B - 5 】



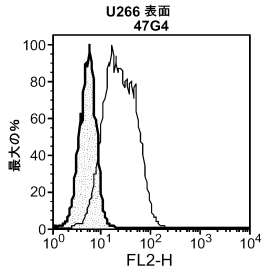
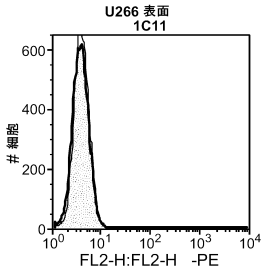
【 図 2 C - 1 】



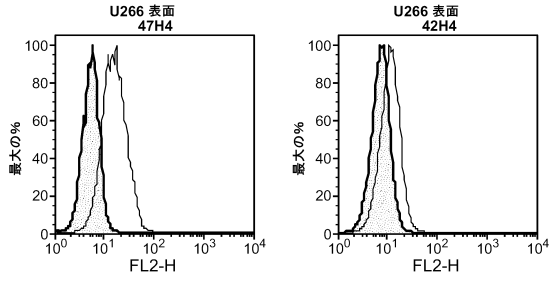
【 図 2 B - 6 】



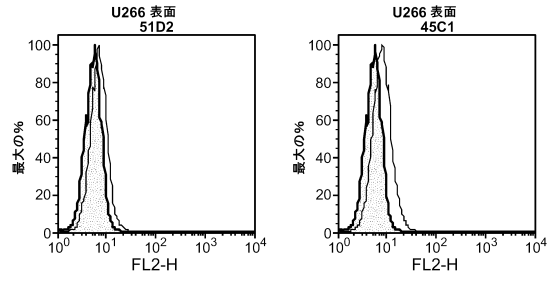
【 図 2 C - 2 】



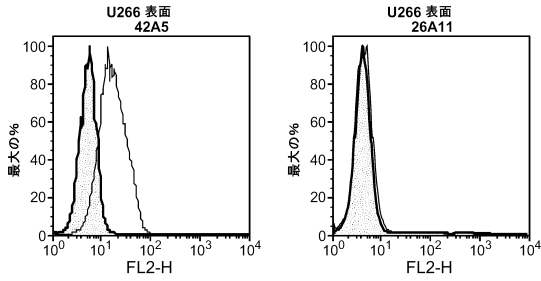
【 図 2 C - 3 】



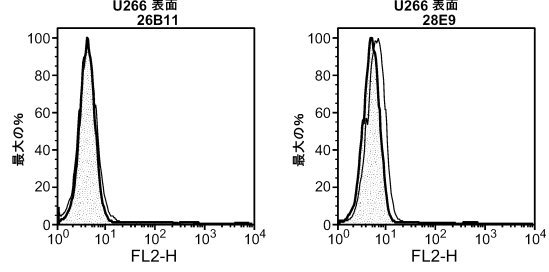
【 図 2 C - 5 】



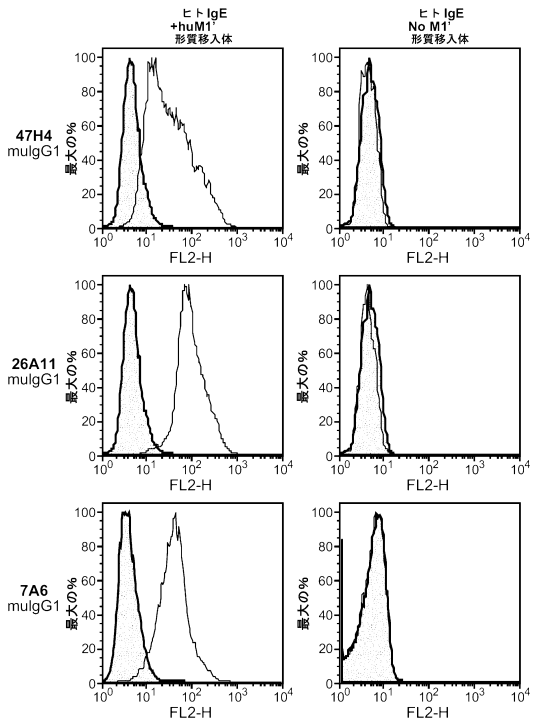
【 図 2 C - 4 】



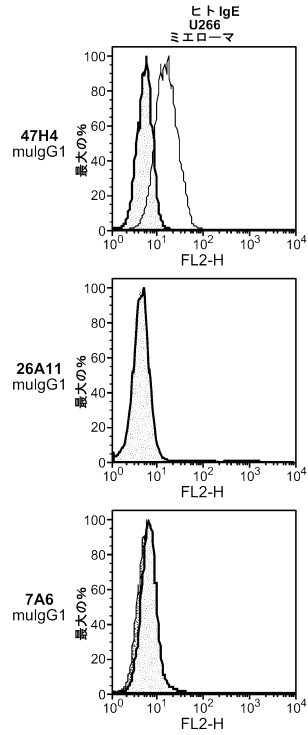
【 図 2 C - 6 】



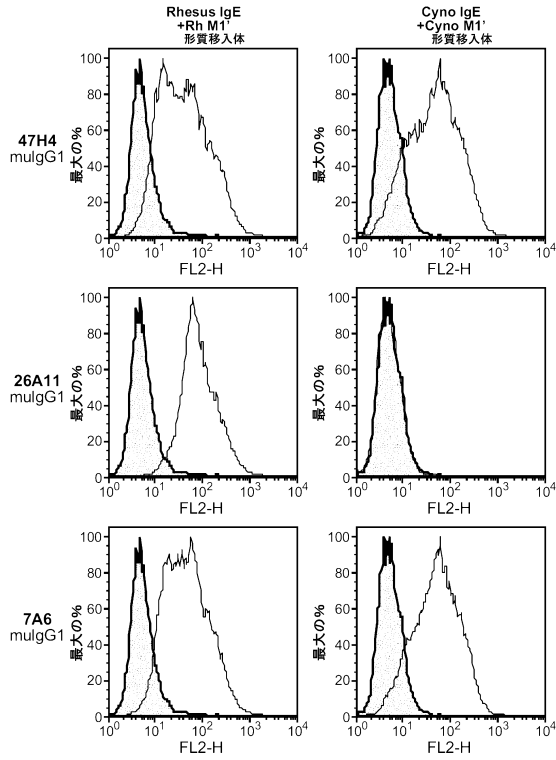
【 図 2 D 】



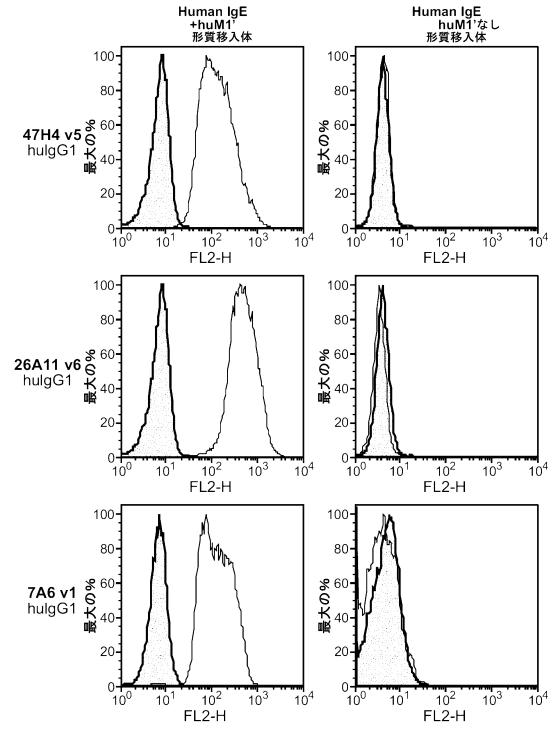
【 図 2 E 】



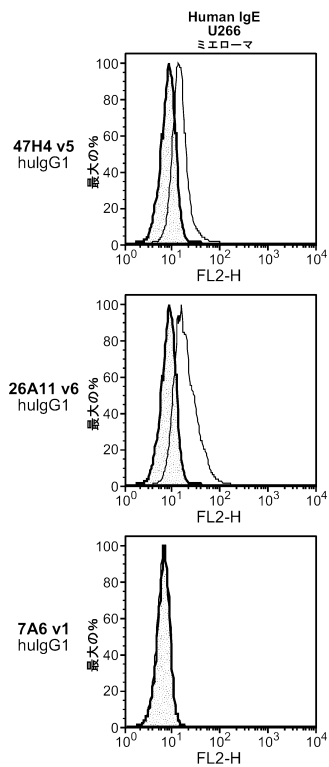
【 図 2 F 】



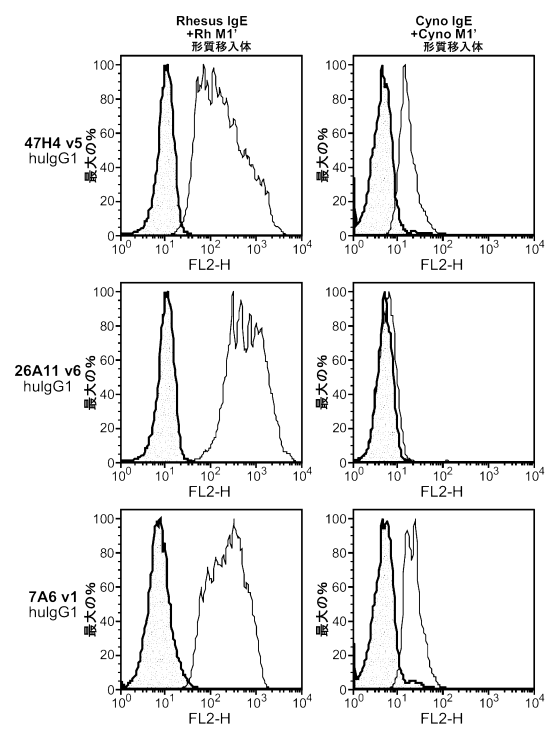
【 図 2 G 】



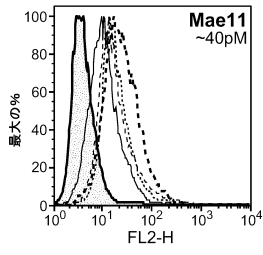
【 図 2 H 】



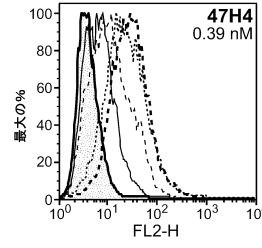
【 図 2 I 】



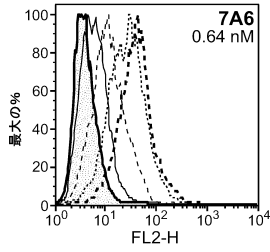
【 図 3 A 】



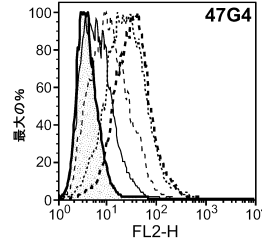
【 図 3 C 】



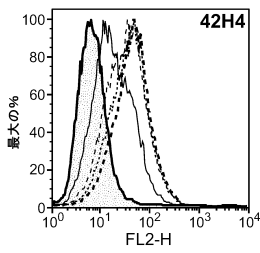
【 図 3 B 】



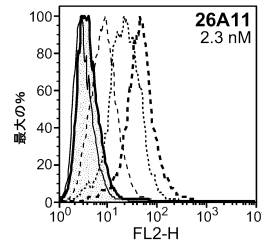
【 図 3 D 】



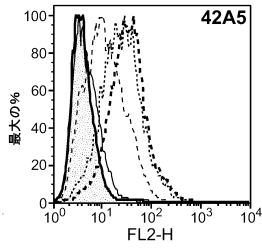
【 図 3 E 】



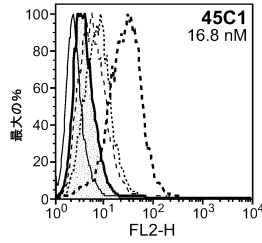
【 図 3 G 】



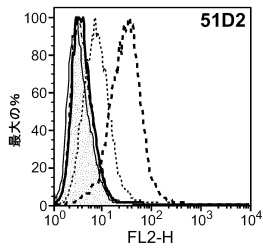
【 図 3 F 】



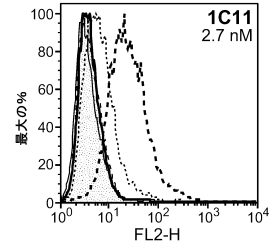
【 図 3 H 】



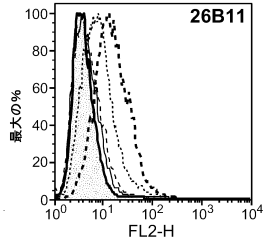
【図 3 I】



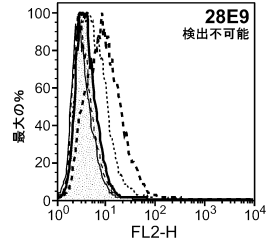
【図 3 K】



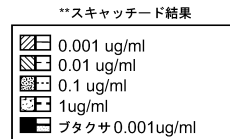
【図 3 J】



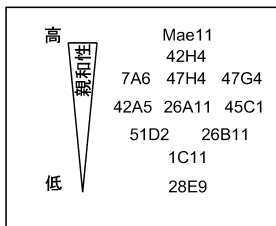
【図 3 L】



【図 3 M】



【図 3 N】



【図 3 P】

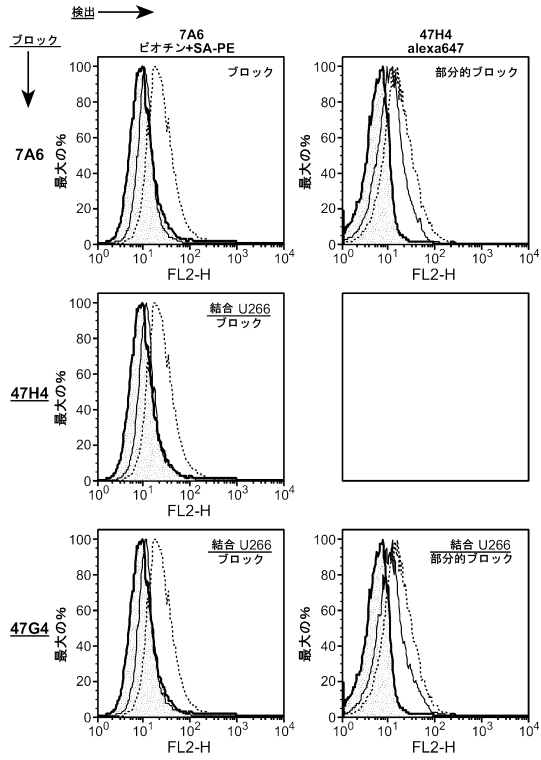
	スキッチード ヒトM1' (nM)	スキッチード アカゲザル M1' (nM)	スキッチード カニクイザル M1' (nM)
47H4 v5 hulG1	1.5	1.3	2.5
47H4 v2 hulG1	0.54	na	na
47H4 v1 hulG1	0.37	na	na
26A11 v6 hulG1	1.85	na	na
26A11 v14 hulG1	1.5	na	na
26A11 v1 hulG1	1.06	na	na

【図 3 O】

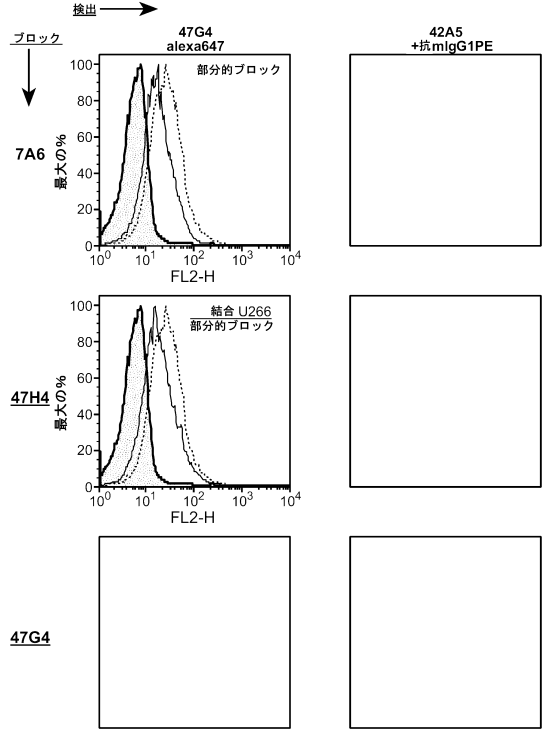
ヒト化抗-IgE/M1' 結合親和性

	スキッチードヒトM1' (nM)			スキッチード アカゲザル M1' (nM)	スキッチード カニクイザル M1' (nM)
	測定値	平均	S.D.		
47H4 mlgG1				0.77	0.97
-exp. 1	0.74 0.83	0.79			
-exp. 2	0.55 0.52	0.54			
-exp. 3	0.47 0.30	0.39			
合計		0.57	0.190936		
26A11 mlgG1					
-exp. 1	1.68 2.59	2.14			
-exp. 2	1.20 2.30	1.75			
合計		1.94	0.623772		
7A6 mlgG1		0.64		na	na

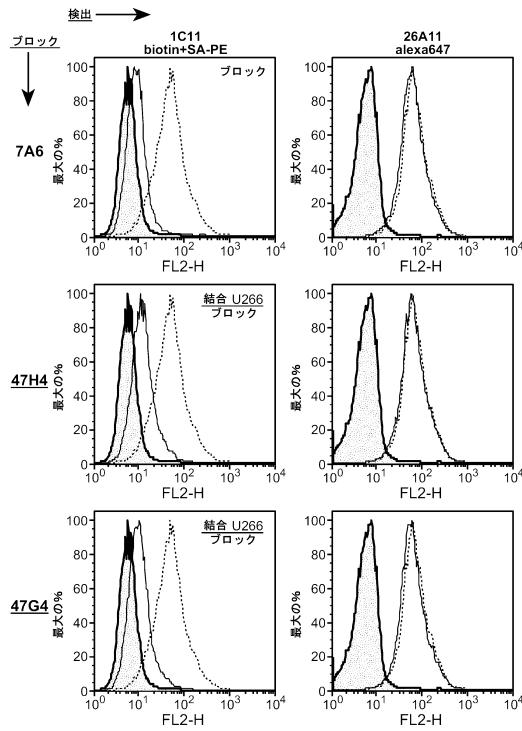
【図4A-1】



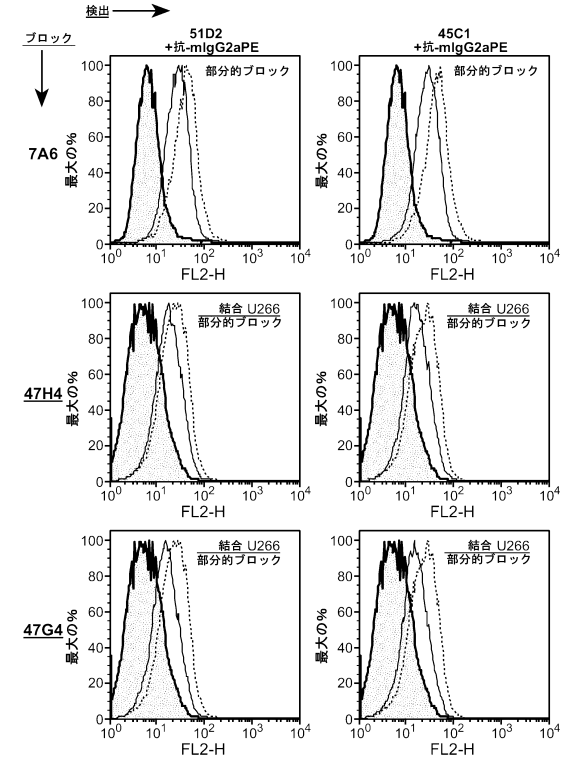
【図4A-2】



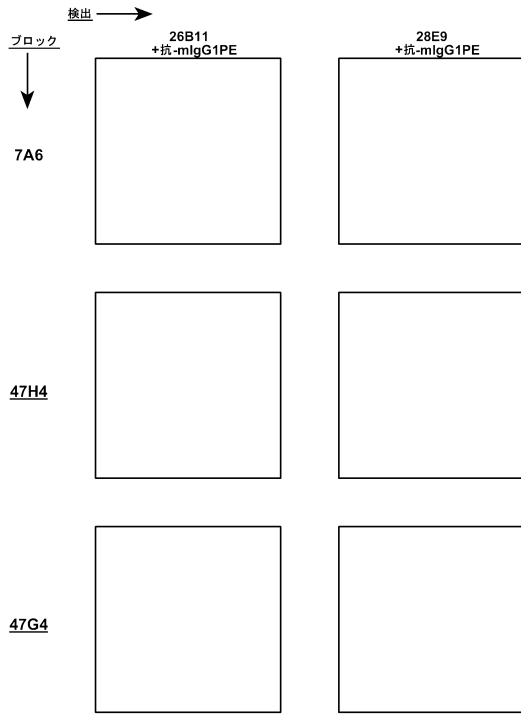
【図4A-3】



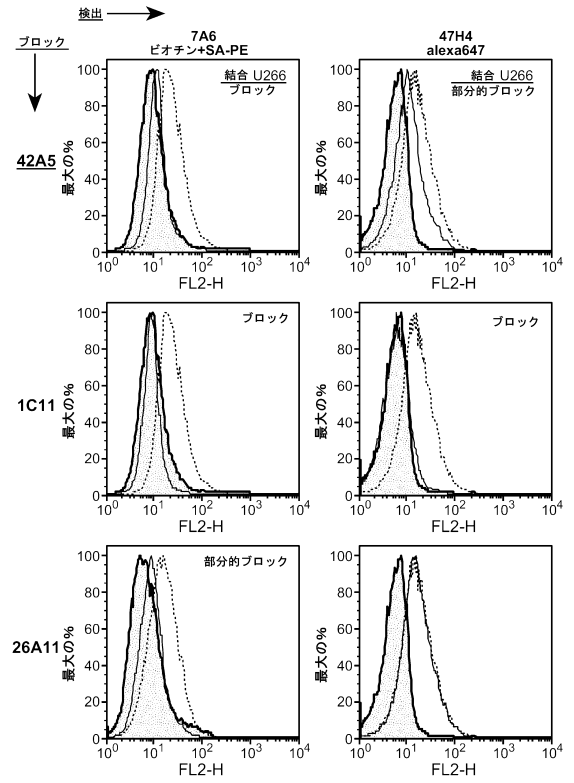
【図4A-4】



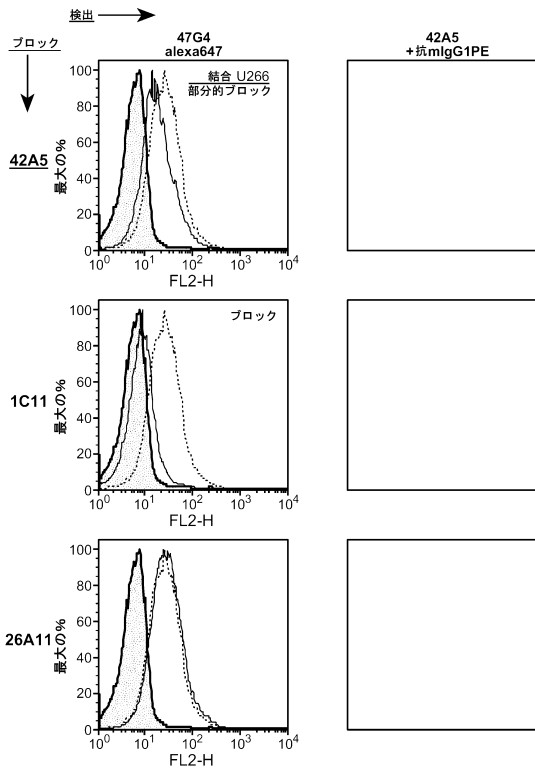
【 図 4 A - 5 】



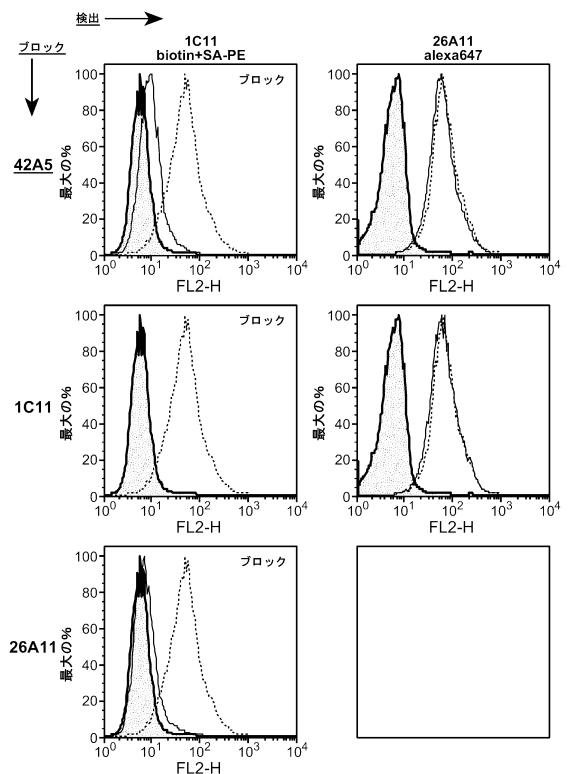
【 図 4 A - 6 】



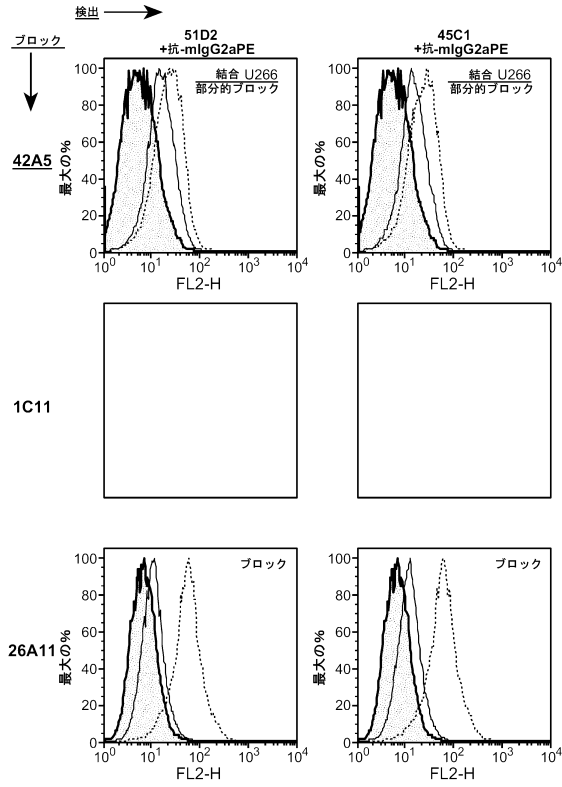
【 図 4 A - 7 】



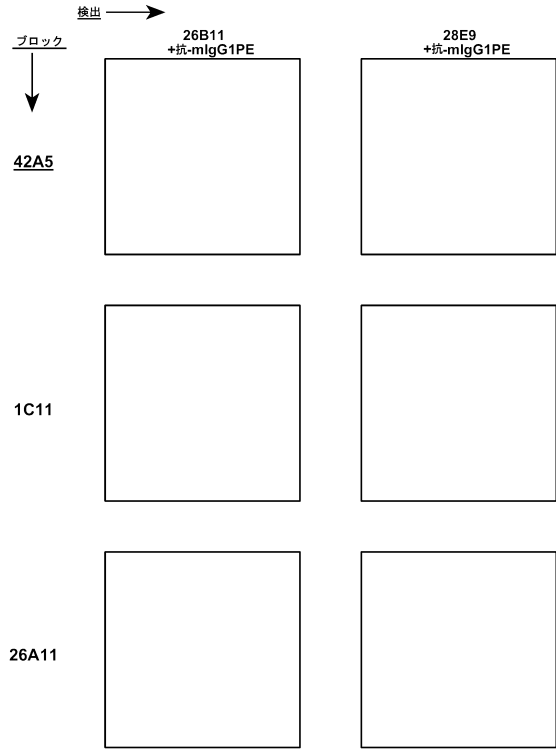
【 図 4 A - 8 】



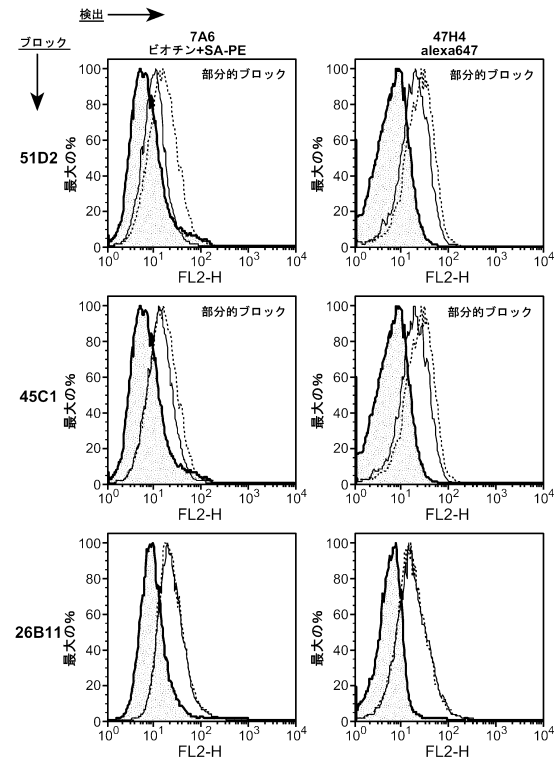
【 図 4 A - 9 】



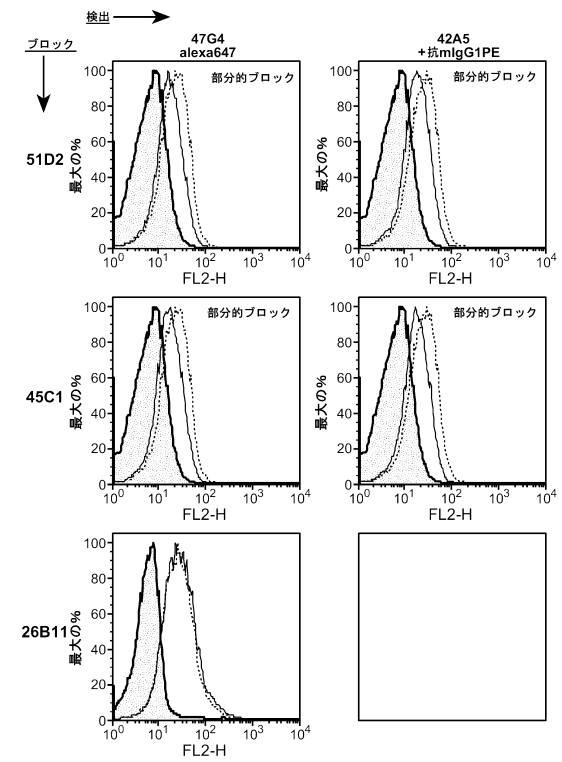
【 図 4 A - 10 】



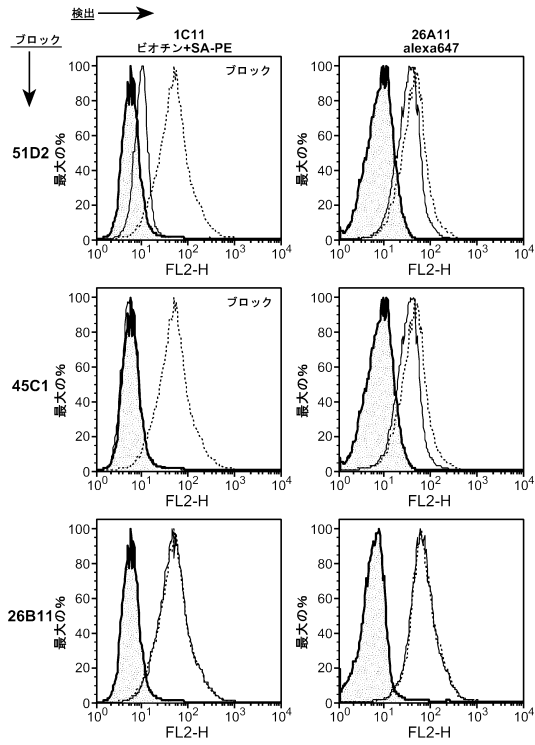
【 図 4 A - 11 】



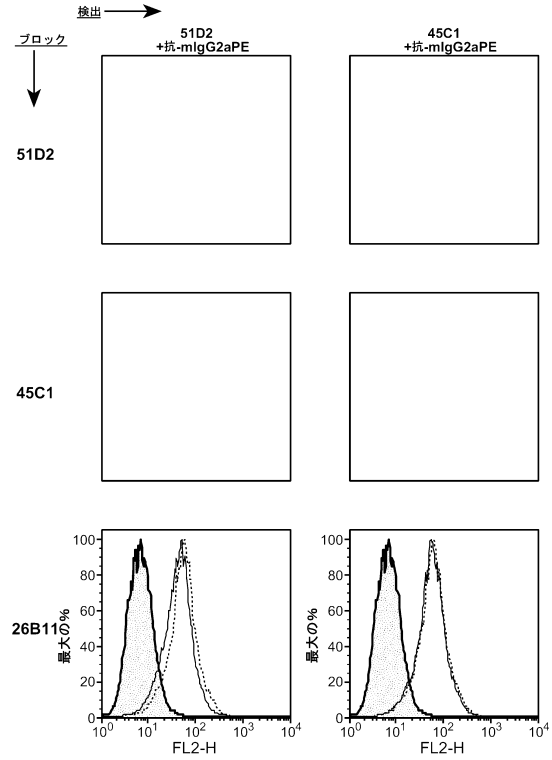
【 図 4 A - 12 】



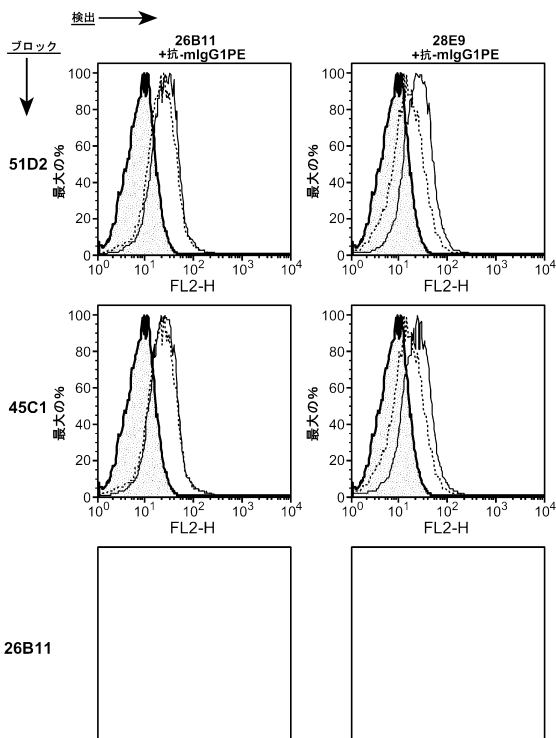
【 図 4 A - 1 3 】



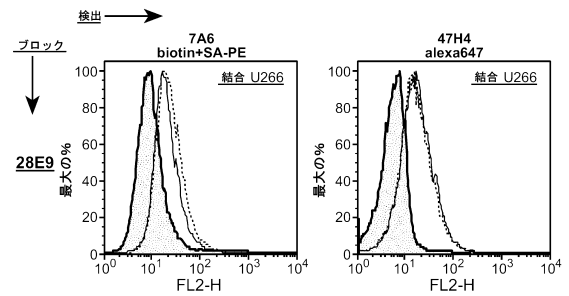
【 図 4 A - 1 4 】



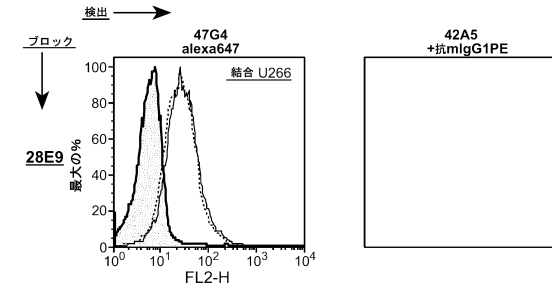
【 図 4 A - 1 5 】



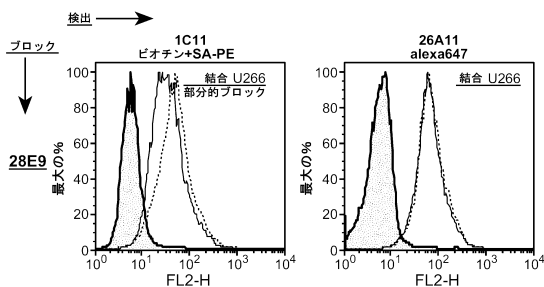
【 図 4 A - 1 6 】



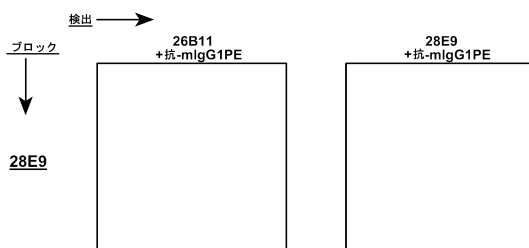
【 図 4 A - 1 7 】



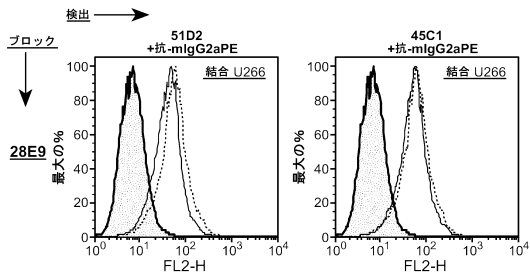
【 図 4 A - 1 8 】



【 図 4 A - 2 0 】



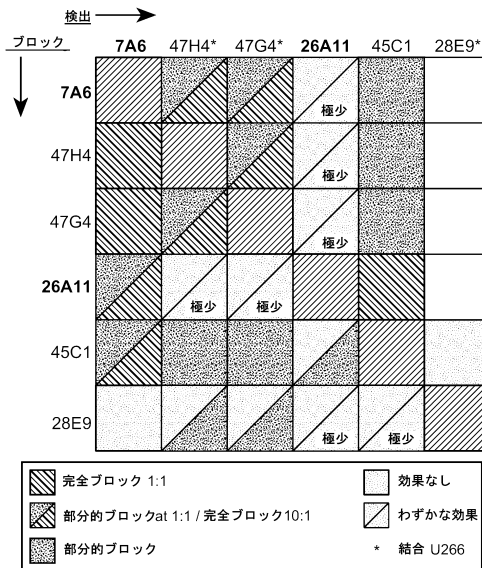
【 図 4 A - 1 9 】



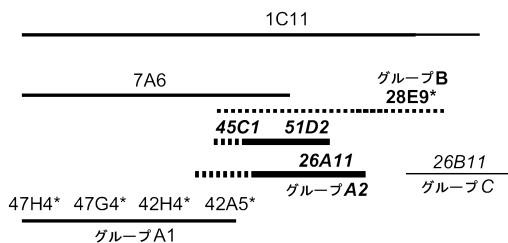
【 図 4 B 】

1° 検出	2° 検出										
	7A6 ビオチン	47H4 alexa647	47G4 alexa647	42A5 mIgG1	42H4 mIgG1	1C11 biotin	26A11 mIgG1/alexa647	51D2 mIgG2a	45C1 mIgG2a	28E9 mIgG1	26B11 mIgG1
7A6	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
47H4*	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
47G4*	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
42A5*	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
42H4*	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
1C11	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
26A11	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
mIgG2a	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし	効果なし
51D2	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし	効果なし
45C1	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1	効果なし
28E9*	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1
26B11	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	完全ブロック 1:1

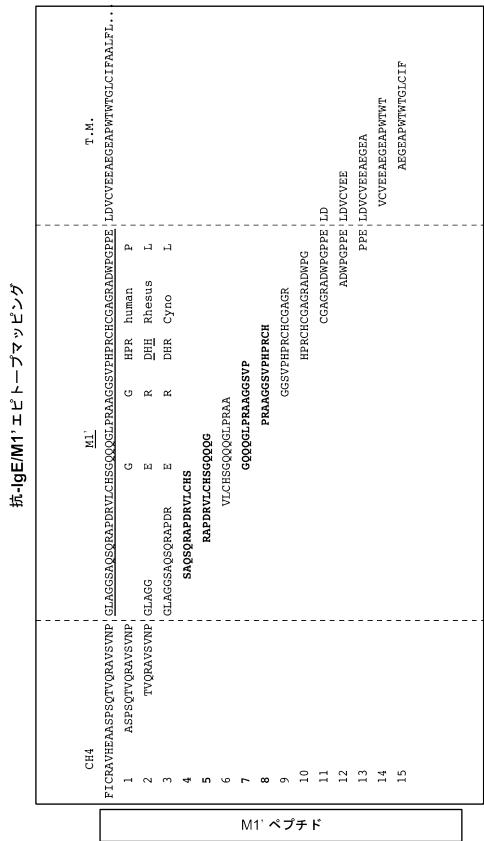
【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】

抗-IgE/M1' エピトープマッピング

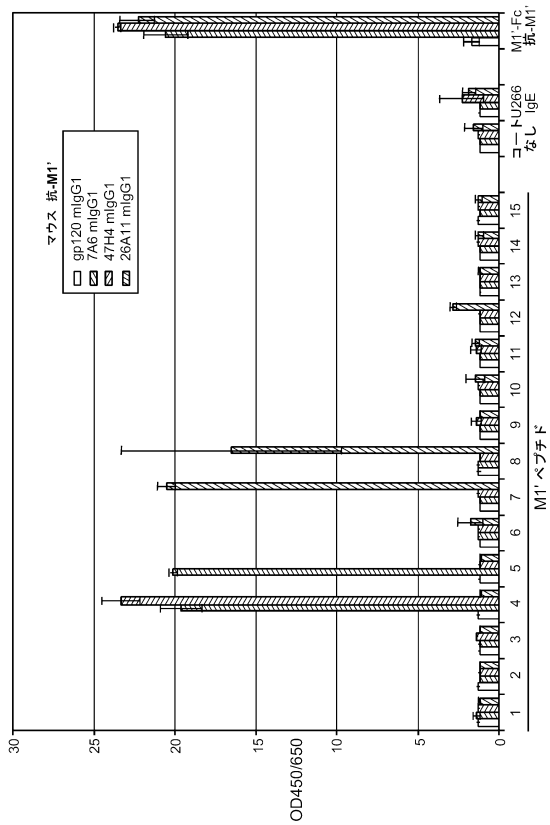
ペプチド#	ペプチド配列
47H4	4 SAQSQRAPDRVLCHS
7A6	4 SAQSQRAPDRVLCHS
	5 RAPDRVLCHSGQQG
26A11	7 GQQQLPRAAGGSVP
	8 PRAAGGSVPHRCH

【 図 5 C 】

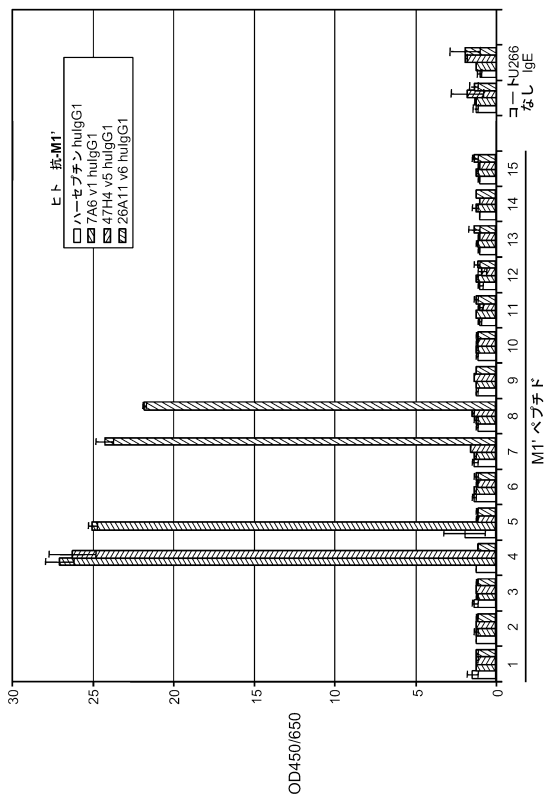
抗-IgE エピトープマッピング

ペプチド#	ペプチド配列
47H4 v5	4 SAQSQRAPDRVLCHS
7A6 v1	4 SAQSQRAPDRVLCHS
	5 RAPDRVLCHSGQQG
26A11 v6	7 GQQQLPRAAGGSVP
	8 PRAAGGSVPHRCH

【 図 5 D 】



【 図 5 E 】



【 6 A 】

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37	26A11 - VL	
			Kabat - CDR L1 Choithia - CDR L1
huK1	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R E A S Q		S I S N D L H R Y Q
mu26A11	D I Q M T O T S S L S A S G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu26A11.v1.4	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu26A11.v2.5	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu26A11.v3.6	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu26A11.v13.15	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu26A11.v14.16	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	7A6 - VL	
			Kabat - CDR L2 Choithia - CDR L2
huK1	Q K P G K A P K L L I Y C Q Q Y N S L P		M T F G Q G T K V R I K R
mu26A11	Q K P G D S P K L L I Y W A S T R E S G V P		E D A Y Y C Q Q Y S Y P
hu26A11.v1-16	Q K P G K A P K L L I Y C Q Q Y N S L P		E D F A T Y Y C Q Q Y S Y P
Kabat#	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	26A11 - VL	
			Kabat - CDR L3 Choithia - CDR L3
huK1	E D P A A Y Y C Q Q Y N S L P		W T F G G T K V E I K R
mu26A11	E D P A T Y Y C Q Q G H T L P		W T F G G T K V E I K R
hu26A11.v1-16	E D P A T Y Y C Q Q G H T L P		W T F G G T K V E I K R

【 6 B 】

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37	7A6 - VL	
			Kabat - CDR L1 Choithia - CDR L1
huK1	D I Q M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q		S I S N Y L A H R Y Q
mu7A6	D I I M Q S P S S L S V S V G E K V T I T C K S S Q T L L Y S T N Q K N Y L A H R Y Q		K K S S Q T L L Y S T N Q K N Y L A H R Y Q
hu7A6.v1	D I Q M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q		S I S N Y L A H R Y Q
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	7A6 - VL	
			Kabat - CDR L2 Choithia - CDR L2
huK1	Q K P G K A P K L L I Y C Q Q Y N S L P		M T F G Q G T K V R I K R
mu7A6	Q K P G D S P K L L I Y W A S T R E S G V P		E D A Y Y C Q Q Y S Y P
hu7A6.v1	Q K P G K A P K L L I Y C Q Q Y N S L P		E D F A T Y Y C Q Q Y S Y P
Kabat#	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	26A11 - VL	
			Kabat - CDR L3 Choithia - CDR L3
huK1	E D P A A Y Y C Q Q Y N S L P		W T F G Q G T K V R I K R
mu7A6	E D P A T Y Y C Q Q G H T L P		W T F G G T K V E I K R
hu7A6.v1	E D P A T Y Y C Q Q G H T L P		W T F G G T K V E I K R

【 6 C 】

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37	47H4 - VL	
			Kabat - CDR L1 Choithia - CDR L1
huK1	D I O Y T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R E A S Q		S I S N Y L H R Y Q
mu47H4	D I Q M T O T S S L S A S G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu47H4.v1.3	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
hu47H4.v2.4-6	D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q		D I S N S L H R Y Q
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	47H4 - VL	
			Kabat - CDR L2 Choithia - CDR L2
huK1	Q K P G K A P K L L I Y C Q Q Y N S L P		M T F G Q G T K V R I K R
mu47H4	Q K P G D S P K L L I Y W A S T R E S G V P		E D A Y Y C Q Q Y S Y P
hu47H4.v1-6	Q K P G K A P K L L I Y C Q Q Y N S L P		E D F A T Y Y C Q Q Y S Y P
Kabat#	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	26A11 - VL	
			Kabat - CDR L3 Choithia - CDR L3
huK1	E D P A A Y Y C Q Q Y N S L P		W T F G G T K V E I K R
mu47H4	E D P A T Y Y C Q Q G H T L P		W T F G G T K V E I K R
hu47H4.v1-6	E D P A T Y Y C Q Q G H T L P		W T F G G T K V E I K R

【 6 D 】

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41	26A11 - VH	
			Kabat - CDR H1 Choithia - CDR H1
humI11	E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G		T P E S Y W R V R Q A P
mu26A11	E V Q L L Q S G L V P P G G S Y R M S C A A S G		T P E S Y W R V R Q A P
hu26A11.v1-3,13,14	E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G		T P E S Y W R V R Q A P
hu26A11.v4-6,15,16	E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G		T P E S Y W R V R Q A P
Kabat#	42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	26A11 - VH	
			Kabat - CDR H2 Choithia - CDR H2
humI11	G K G L E M V E S V I S G G S T F Y A D S V S K G R F		T I S R D M S K M T L Y L
mu26A11	G K G L E M V E S D I M P N M Y D T S Y N Q K P K G K		T I T D I Y N M M V Q Q E E
hu26A11.v1-16	G K G L E M V E S D I M P N M Y D T S Y N Q K P K G K		T I T D I Y N M M V R Q A P
Kabat#	81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113	26A11 - VH	
			Kabat - CDR H3 Choithia - CDR H3
humI11	Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G		E D Y W G Q G T L V T V S S
mu26A11	Q M N S L T S E D S I A V Y Y C A S		K A Y W G Q G T L V T V S S
hu26A11.v1-16	Q M N S L R A E D T A V Y Y C A S		K A Y W G Q G T L V T V S S

【 6 E 】

7A6 - VH

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41

Choithia - GDR H1 Kabat - GDR H1
 Choithia - GDR H2 Kabat - GDR H2
 Choithia - CDR H1 Kabat - CDR H1
 Choithia - CDR H2 Kabat - CDR H2

humIII E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y A M S H V R Q A P
 mu7A6 Q V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y A M S H V R Q A P
 hu7A6.v1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y A M S H V R Q A P

Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a . b . c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Choithia - GDR H1 Kabat - GDR H1
 Choithia - GDR H2 Kabat - GDR H2
 Choithia - CDR H1 Kabat - CDR H1
 Choithia - CDR H2 Kabat - CDR H2

humIII G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
 mu7A6 T H S L E R L I G A I D P E T G T A F Y N Q K F K G K R I T A A F S S T A Y L
 hu7A6.v1 G K G L E W V G A I D P E T G T A F Y N Q K F K G K R E T I S A D T S K V T A Y L

Kabat# 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
 Kabat - CDR H3 Choithia - CDR H3
 Kabat - CDR H3 Choithia - CDR H3

humIII Q M N S I R A E D T A V Y Y C R E G L Z R P P H Y D Y D N A E D Y H G Q G T I V T V S S
 mu7A6 E E S S L I S E D T A V Y Y C R E G L Z R P P H Y D Y D N A E D Y H G Q G T I V T V S S
 hu7A6.v1 Q M N S L R A E D T A V Y Y C R E G L Z R P P H Y D Y D N A M D S W G Q G I L V T V S S

【 6 F 】

47H4 - VH

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41

Choithia - CDR H1 Kabat - CDR H1
 Choithia - CDR H2 Kabat - CDR H2
 Choithia - CDR H3 Kabat - CDR H3

humIII E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y A M S H V R Q A P
 mu47H4 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y A M S H V R Q A P
 hu47H4.v3-5 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y A M S H V R Q A P

Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a . b . c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

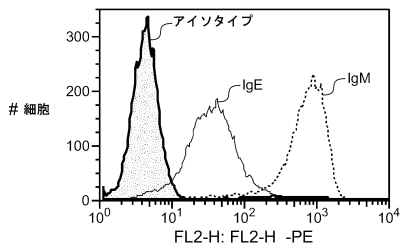
Choithia - CDR H1 Kabat - CDR H1
 Choithia - CDR H2 Kabat - CDR H2
 Choithia - CDR H3 Kabat - CDR H3

humIII G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
 mu47H4 G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
 hu47H4.v1-4 G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L

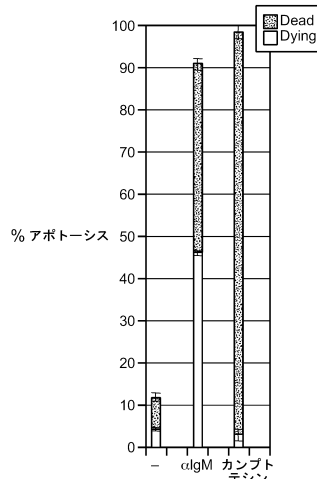
Kabat# 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z
 Kabat - CDR H3 Choithia - CDR H3
 Kabat - CDR H3 Choithia - CDR H3

humIII Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G L Z R P P H Y D Y D N A E D Y H G Q G T L V T V S S
 mu47H4 E M S L R A E D T A V Y Y C A R E G L Z R P P H Y D Y D N A M D Y W G Q G T L V T V S S
 hu47H4.v1-2,5 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D N W D A H D Y W G Q G T L V T V S S
 hu47H4.v3-4,6 Q M N S L R A E D T A V I I C A R D N W D A E D I W G Q G T L V T V S S

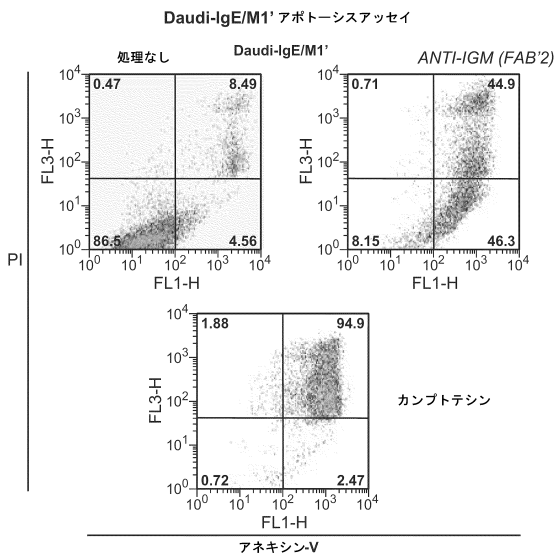
【 7 A 】



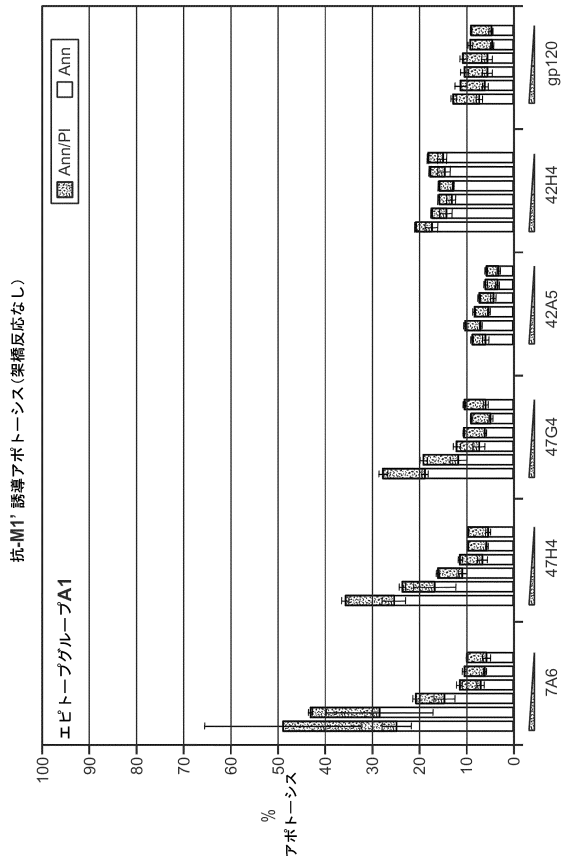
【 7 C 】



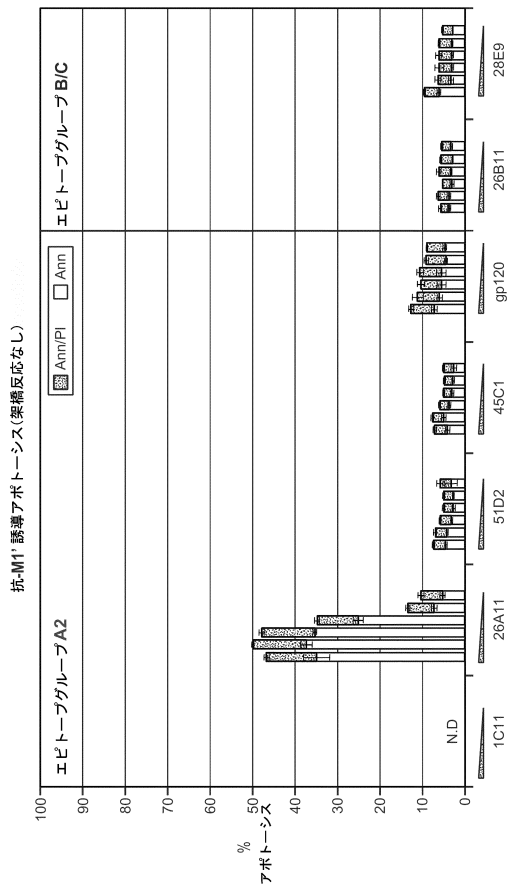
【 7 B 】



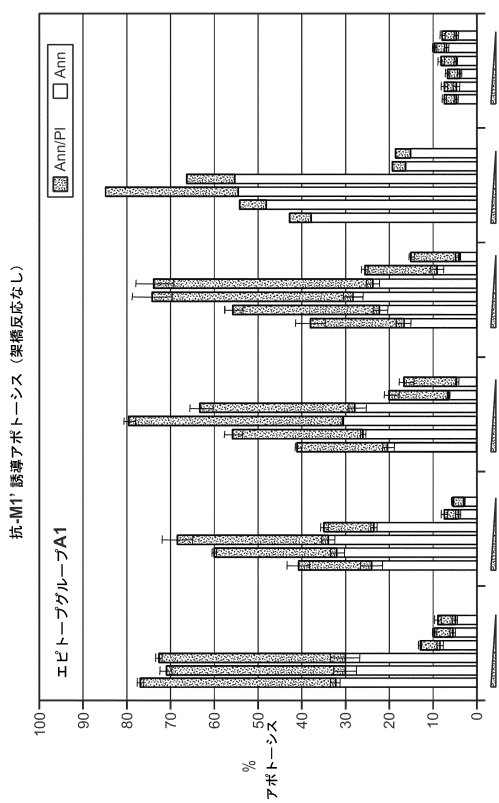
【 7 D 】



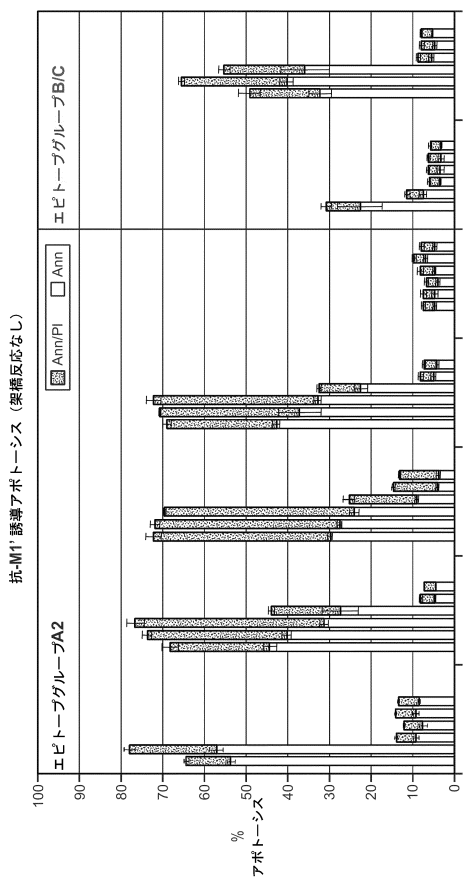
【 7 E 】



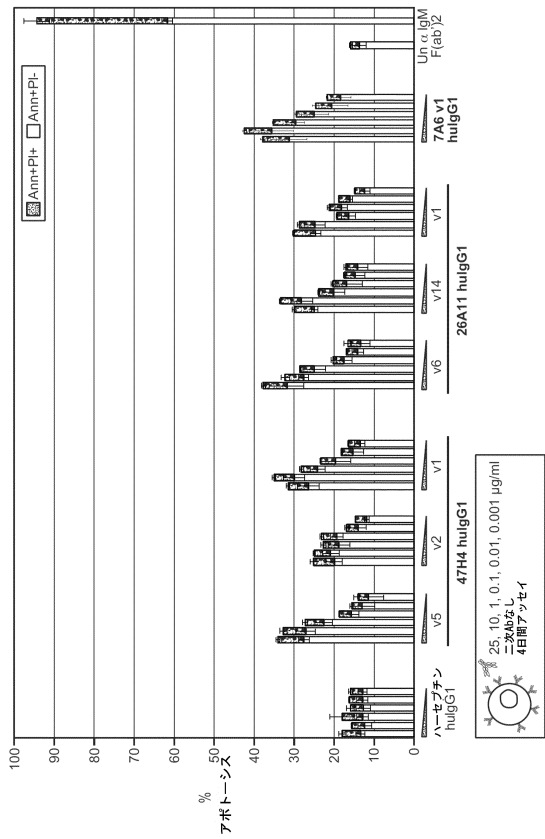
【 7 F 】



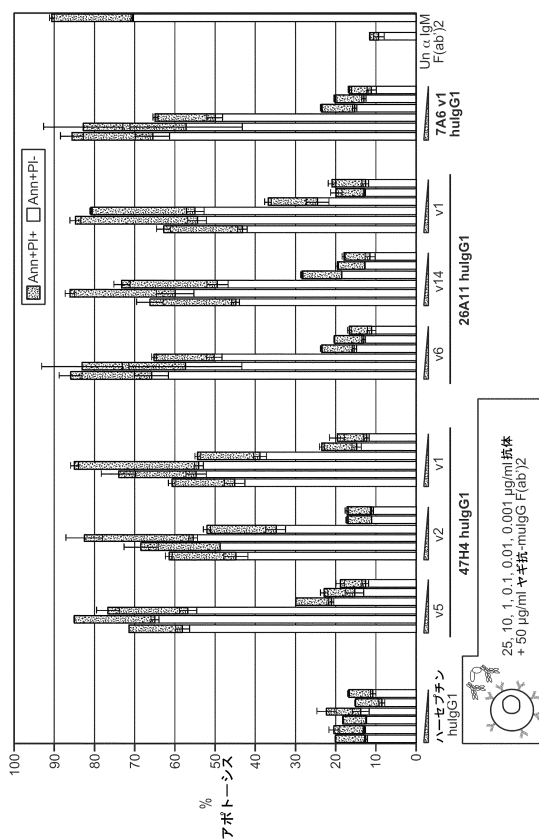
【 7 G 】



【 8 A 】

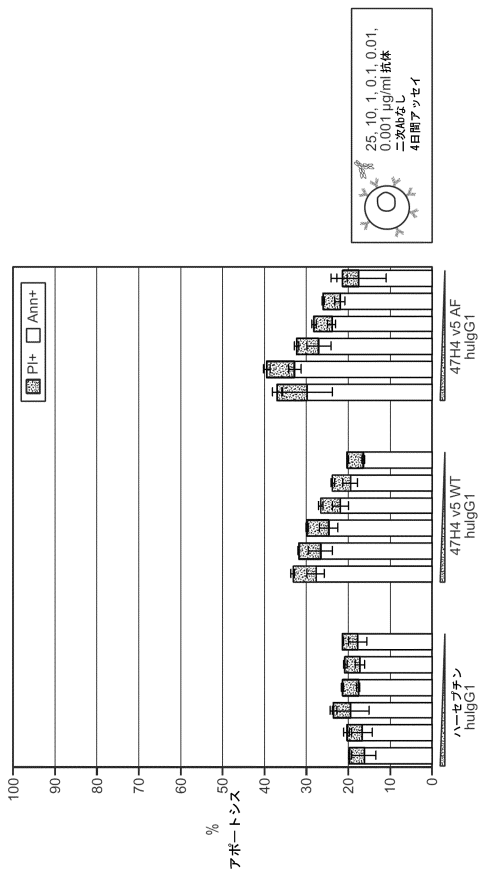


【 8 B 】



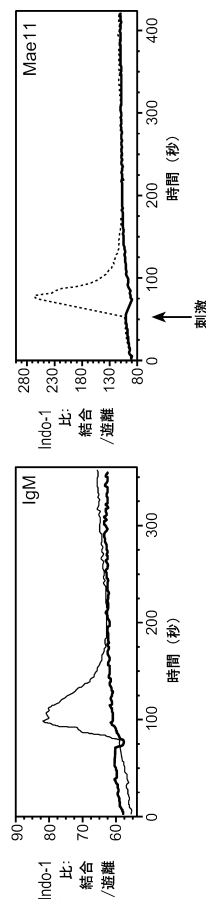
【 8 C 】

抗-IgE/M1' 47H4 v5 huIgG1 野生型 vs. アポソル化

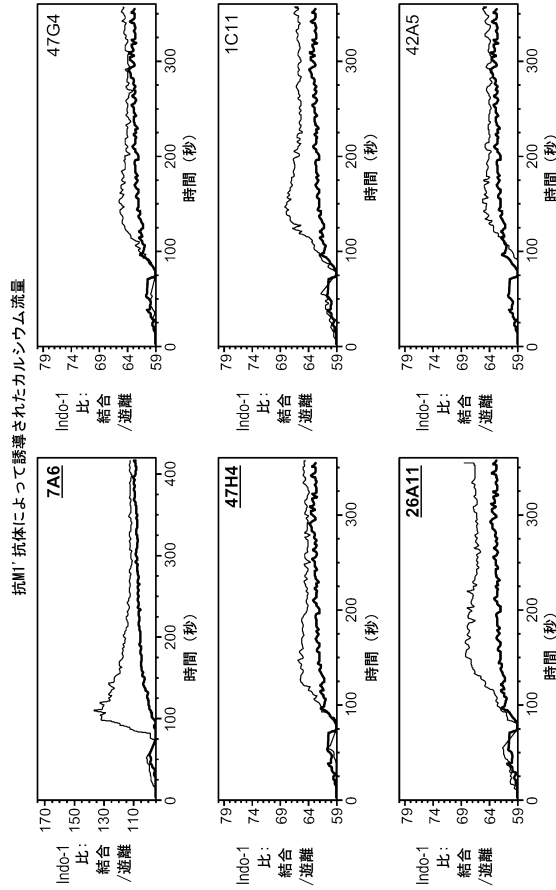


【 9 A 】

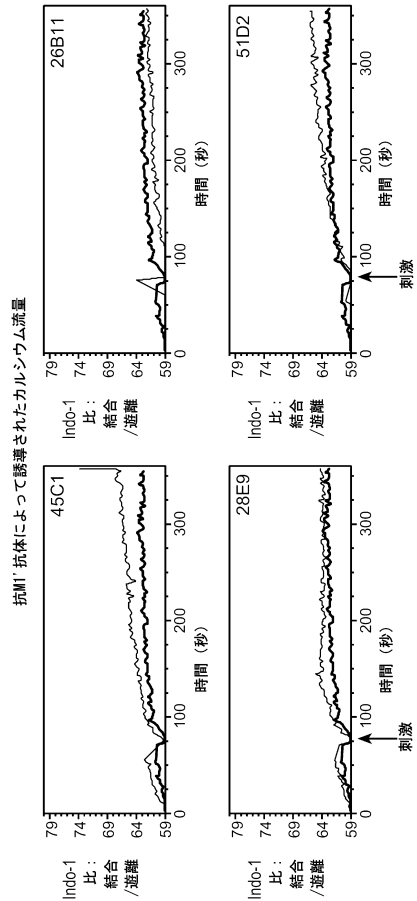
抗M1' 抗体によって誘導されたカルシウム流量



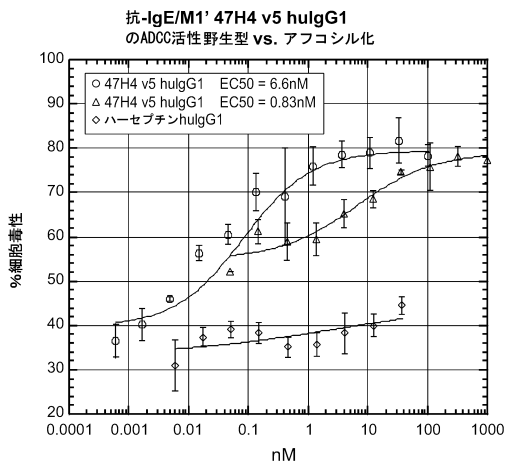
【 図 9 B - 1 】



【 図 9 B - 2 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 A 】

7A6 HC mlgG1

QVQLQQSGAELVRFPGASVTLSCKASGYTFIDYEMHWKQTPVHGLEWIGALDPEFGTGTAYNQKFLKGLATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCFLRPHYDYDNAMDSWGQGTLLTVSSASTKGP // SVYPLAPGSAAQNTSMVTLGCLLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWTPSEITVTCNVAVHASPSTKVDKIKVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDSKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSELPIMHQDWLNGK EFKCRVNSAAPPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVVEQWQNGQPAENYKNTQPIMDTDGSIYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKLSLHSPGK

7A6 LC mkappa

DI VMSQSPSSLLTVSVEKRVTLSCKSSOTLLYSTNOKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV PDRFTGSGSGTDFTLTISVVAEDLAVYYCQYYSYPTFGGGT // KVEIKRADAAPTYSIFP PSSEQLTSGGASVVCPLNFFPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQSDKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSPIVKSFNRRNEC

7A6

【 図 1 1 B 】

47H4

47H4 HC mlgG1

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGTFSDYGMWVRQAPGKPEWVAFISDLAYTIYYADVT TGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDALYYCARDNDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPP // S SVYPLAPGSAAQNTSMVTLGCLLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWTPSEITVTCNVAVHASPSTKVDKIKVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDSKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSELPIMHQDWLNGK EFKCRVNSAAPPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVVEQWQNGQPAENYKNTQPIMDTDGSIYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKLSLHSPGK

47H4 LC mkappa

DIVLVTQPLSLPVLGDAQASISCRSSQSLVHNNGNITLHLYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGGTDFTLKISRLEAEDLVYFCSONTLVPTFGGGT // KVEIKRADAAPTYSIFP PSSEQLTSGGASVVCPLNFFPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQSDKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSPIVKSFNRRNEC

【 図 1 1 C 】

26A11

26A11 HC mlgG1

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYMMWVRQSHGKSLLEWIGDINPNVYDTSYNOKFKGKATLTVDKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYYCASKAYWGQGLTVSAASTTPP // SVYPLAPGSAAQNTSMVTLGCLLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWTPSEITVTCNVAVHASPSTKVDKIKVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDSKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSELPIMHQDWLNGK EFKCRVNSAAPPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVVEQWQNGQPAENYKNTQPIMDTDGSIYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKLSLHSPGK

26A11 LC mkappa

DIQMTQTSSLSASLGRVITICRSDISNSLNWYQQKPDGPVKKLIYSTSRHLSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISNLEQEDLATYFCQQGHTLPTFGGGT // KVEIKRADAAPTYSIFP PSSEQLTSGGASVVCPLNFFPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQSDKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSPIVKSFNRRNEC

【 1 1 D 】

45C1

45C1 HC mlgG2a

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTYGMNWKQAPCKGLKMMWINTYTGPEYVDDF
KGRFASFLETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCARGIYYDNDIYWGQTLITVSSAKTAP //
SVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYPPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDLYTLSSSVTV
TSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDKKEIPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVL
MISLSPIVTCVVVDVSDDDPDVQISWFWNNVVEVHTAQQTTHREDYNSLTRVVSALPIQHQDMS
GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEPEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV
EWTNNKTELNYKNTPEVLDSDGYSFMYSKLVRVEKKNVVERNSYSCSVVHEGLNHHHTKFSFR
TPGK

45C1 LC mkappa

DIVMTQPTLTLVIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLVVYCWQGTFFHPTFGGTT // KVEIKRADAAPTYSIFP
PSSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYMSMSSTLTLTK
DEYERHNSYTCETHKSTSPVKSFNRRNEC

【 1 1 E 】

28E9

28E9 HC mlgG1

EVKLVESEGLVQPGSLRLSCATSGFTFTDYMSWVRQPPGKPLEWLGFISNKLNGYTTYESS
SVQGRFTISRDDSQSILYLQMNLTLPEDSAAYCARDMVPIYYALDYWGQTSVAVSSAKTTPP
// SVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYPPEPVTVWNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDLYTLSS
SVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKEIPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI
TLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
EFKCRVNSAAPPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYI PPKPKQMAKDKVSLTCMIDTDFPEDITVEW
QWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHHHTKLSHSP
GK

28E9 LC mkappa

DIQMTQSPASLSVSGEFTVFTCRTSENIYTYLANIQKQKGSQPLLVAQAIAEGVPSRFSG
SGSGQFSLQINSLQPEDFGYCYCHHYGTFPTFGSGT // KVEIKRADAAPTYSIFPSSSQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYMSMSSTLTLTKDEYER
HNSYTCETHKSTSPVKSFNRRNEC

【 1 1 F 】

1C11

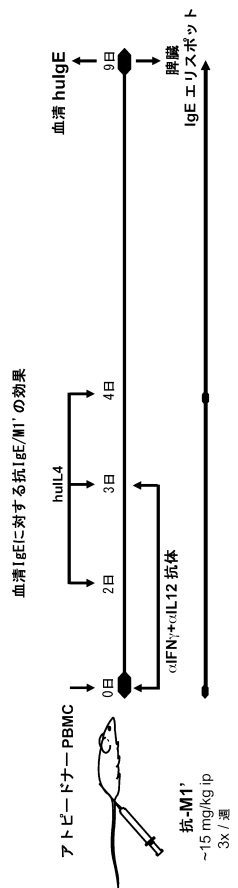
1C11 HC mlgG1

QVQLQQSGAELVRFPGASVTLSCASGYTFTDFEMHWKQTPVHGLEWIGAIAPETGTSAYNQKF
RKGATLTADISSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCTIYYAAPWFAYWGQGLVTVSSASTKGP //
SVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYPPEPVTVWNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDLYTLSSSVTV
PSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKEIPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLP
KVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKFKFC
RVNSAAPPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYI PPKPKQMAKDKVSLTCMIDTDFPEDITVEWQWNG
QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHHHTKLSHSPGK

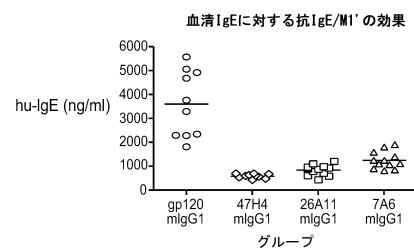
1C11 LC mkappa

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQKPKGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSVTDFPLTISVKAEDLAVYCYQYYSYPYTFGGGT // KVEIKRADAAPTYSIFP
PSSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYMSMSSTLTLTK
KDEYERHNSYTCETHKSTSPVKSFNRRNEC

【 1 2 A 】



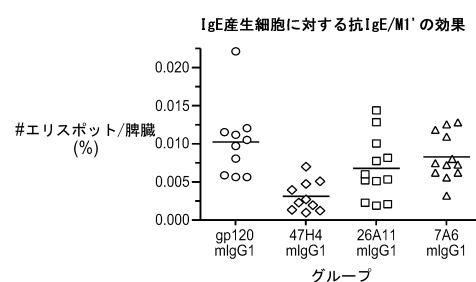
【 1 2 B 】



【 1 2 C 】

Table with 5 columns: Group, Average, S.D., % Change, p-value. Rows include gp120 mlgG1, 47H4 mlgG1, 26A11 mlgG1, and 7A6 mlgG1.

【 1 2 D 】

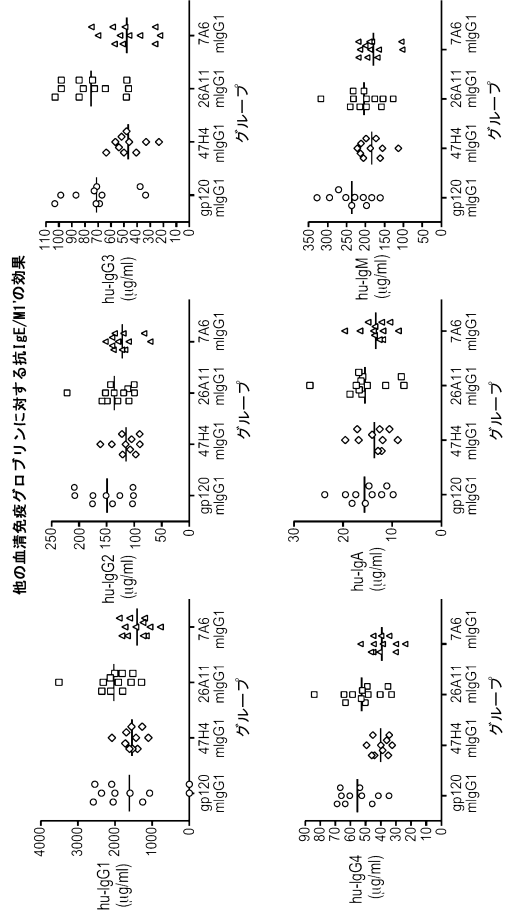


【 図 1 2 E 】

IgE産生細胞に対する抗IgE/M1'の効果

#07-0377	#エリスポット/脾臓(%)			
	グループ	平均	S.D.	p-値
gp120 mlgG1	0.0103	0.0040	na	na
47H4 mlgG1	0.0032	0.0020	-68.9%	0.0003
26A11 mlgG1	0.0068	0.0040	-34.0%	0.0815
7A6 mlgG1	0.0083	0.0030	-19.4%	0.4518

【 図 1 2 F 】



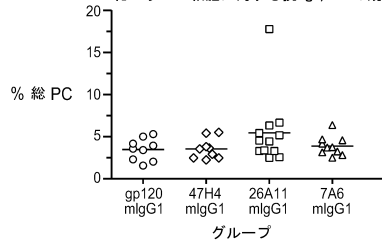
【 図 1 2 G 】

他の血清免疫グロブリンに対する抗IgE/M1'の効果

#07-0377	huIgG1				huIgG2				huIgG3				huIgG4				huIgA			
	グループ	平均	S.D.	%変化	p-値	平均	S.D.	%変化	p-値	平均	S.D.	%変化	p-値	平均	S.D.	%変化	p-値	平均	S.D.	%変化
gp120 mlgG1	1936.8	512.2	na	na	149.4	41.5	na	na	55.7	11.8	na	na	15.7	4.2	na	na	236.9	51.7	na	na
47H4 mlgG1	1540.8	269.1	-20.4	0.1265	115.4	22.7	-22.8	0.0504	40.5	5.8	-27.3	0.0071	184.8	33.8	-22	0.0321	13.7	3.3	-12.7	0.5443
26A11 mlgG1	2028.7	567	+4.7	0.9278	136.4	33.8	-8.7	0.6389	53	14	-4.8	0.8799	205.2	50	-13.4	0.2375	15.6	5	-0.6	+1.0
7A6 mlgG1	1406.8	341	-27.4	0.0210	121.8	24.2	-18.5	0.1125	39.7	8.4	-28.7	0.0031	180.2	39.2	-23.9	0.0131	13.4	2.9	-14.6	0.3992

【 図 1 2 H 】

総プラズマ細胞に対する抗IgE/M1'の効果

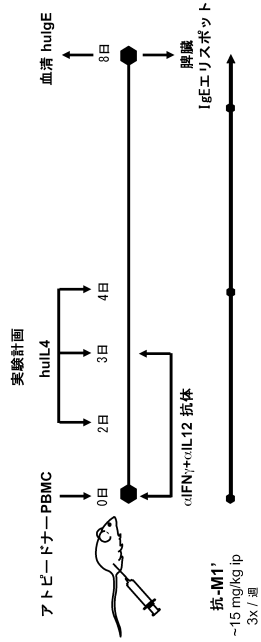


【 図 1 2 I 】

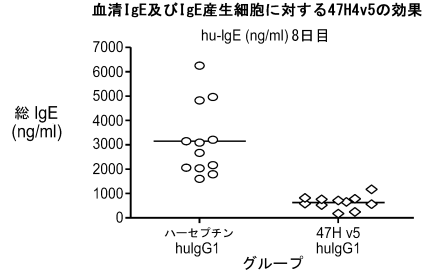
総プラズマ細胞に対する抗IgE/M1'の効果

#07-0377	% 総 PC			
	グループ	平均	S.D.	p-値
gp120 mlgG1	4.24	1.52	na	na
47H4 mlgG1	4.20	1.30	-1%	1.0000
26A11 mlgG1	6.18	4.51	+45.8%	0.2667
7A6 mlgG1	4.6	1.28	+8.5%	0.9835

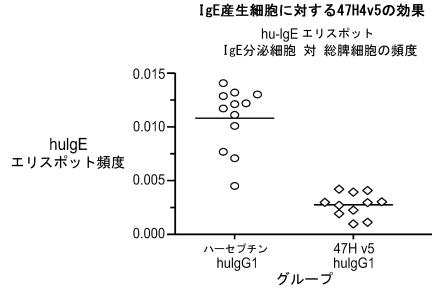
【 図 1 3 A 】



【 図 1 3 B 】



【 図 1 3 C 】

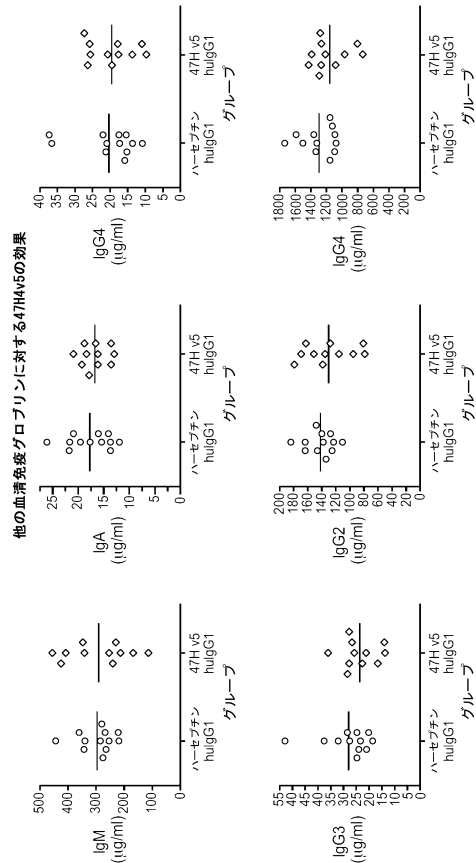


【 図 1 3 D 】

血清IgE及びIgE産生細胞に対する47Hv5の効果

グループ	平均		S.D.		% 変化		p-値	
	ハセブチン hulG1	47H v5 hulG1	ハセブチン hulG1	47H v5 hulG1	ハセブチン hulG1	47H v5 hulG1	ハセブチン hulG1	47H v5 hulG1
総IgE (ng/ml)	3158.2	651.9	1458.5	272.8	na	-79.4%	na	<0.0001
hu-IgE エリスポット頻度	0.0108	0.0028	0.0029	0.0011	na	-74.5%	na	<0.0001

【 図 1 3 E 】



【図13F】

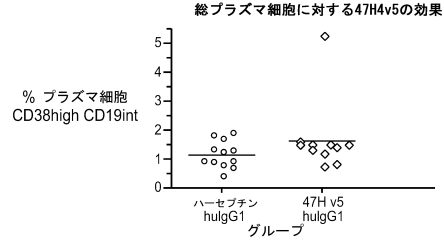
他の血清免疫グロブリンに対する47H4v5の効果

グループ	hulgG1			hulg2		
	平均	S.D.	% 変化	平均	S.D.	% 変化
ハーセプチン hulgG1	1304.8	221	na	142.2	20.5	na
47H4 v5 hulgG1	1165.2	232.4	-10.7	130.7	34.7	-8.1
47H4 v5 hulgG1	1165.2	232.4	-10.7	130.7	34.7	-8.1

グループ	hulg3			hulg4		
	平均	S.D.	% 変化	平均	S.D.	% 変化
ハーセプチン hulgG1	27.9	9.5	na	20.5	8.9	na
47H4 v5 hulgG1	23.6	6.9	-15.4	19.7	6.3	-3.9
47H4 v5 hulgG1	23.6	6.9	-15.4	19.7	6.3	-3.9

グループ	hulgM		
	平均	S.D.	% 変化
ハーセプチン hulgG1	17.7	4.3	na
47H4 v5 hulgG1	16.7	2.6	-5.6
47H4 v5 hulgG1	16.7	2.6	-5.6

【図13G】

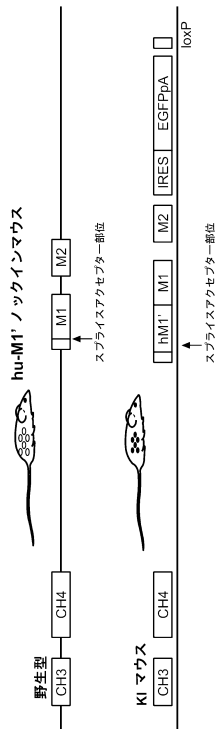


【図13H】

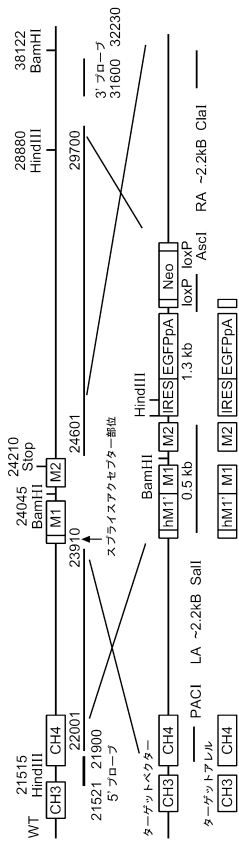
総プラズマ細胞に対する47H4v5の効果

グループ	総 PC %			
	平均	S.D.	% 変化	p-値
ハーセプチン hulgG1	1.2%	0.46%	na	na
47H4 v5 hulgG1	1.6%	1.2%	+33.3%	0.2132

【図14A】



【図14B】



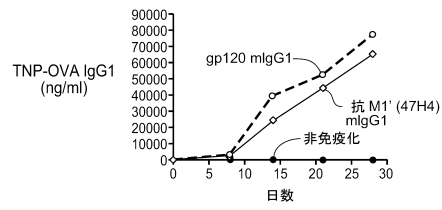
【 図 1 5 E 】

TNP-OVAに対するIgEレベル-一次免疫応答に対する抗IgE/M1'の効果

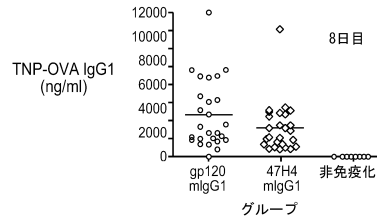
グループ	8日目			14日目		
	平均	S.D.	% 変化	平均	S.D.	% 変化
gp120 mlgG1	19.3	17.8	na	25	36.8	na
47H4 mlgG1	2.8	1.4	-97.5%	2.6	1.4	-98.7%
非免疫化	<2.3	0	-100.0%	<2.3	0	-100%

【 図 1 5 F 】

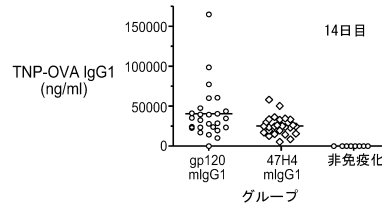
TNP-OVAに対する一次免疫応答におけるIgG1のレベルに対する抗IgE/M1'の効果



【 図 1 5 G 】



【 図 1 5 H 】

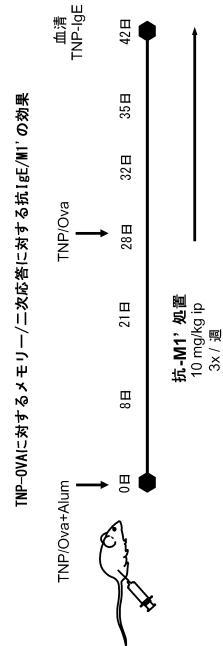


【 図 1 5 I 】

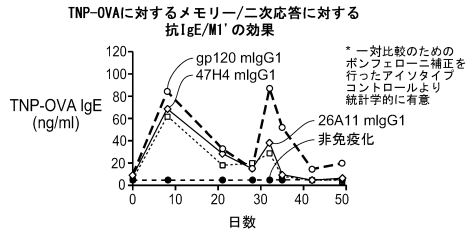
TNP-OVAに対するIgG1レベル-一次免疫応答に対する抗IgE/M1'の効果

グループ	8日目			14日目		
	平均	S.D.	% 変化	平均	S.D.	% 変化
gp120 mlgG1	3467.1	2841.7	na	40592.8	32951.3	na
47H4 mlgG1	2393.3	2049.5	-31.1%	25363.4	11750.8	-37.5%
非免疫化	3.4	5.1	-100%	11.4	21.8	-100%

【 図 1 6 A 】



【図16B】

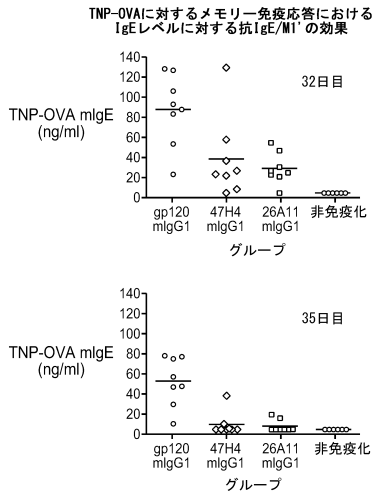


【図16D】

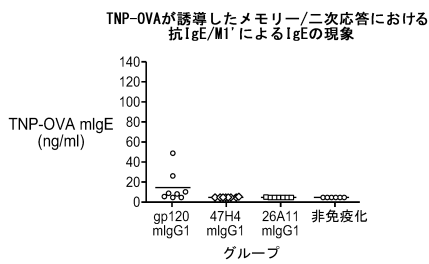
TNP-OVAに対するメモリー免疫応答におけるIgEレベルに対する抗IgE/Mi'の効果

グループ	TNP-OVA IgE (ng/ml) 32日目				TNP-OVA IgE (ng/ml) 35日目			
	平均	S.D.	%変化	p-値	平均	S.D.	%変化	p-値
gp120 mlgG1	87.3	35.3	na	na	52.3	24	na	na
47H4 mlgG1	38.5	40	-59.1%	0.0066	9.7	11.6	-89.5%	<0.0001
26A11 mlgG1	25.3	12.5	-75.1%	0.001	7.8	5.8	-93.3%	<0.0001
非免疫化	<4.69	0.0	-100%	<0.0001	<4.69	0.0	-100.0%	<0.0001

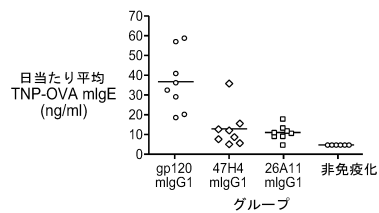
【図16C】



【図16E】



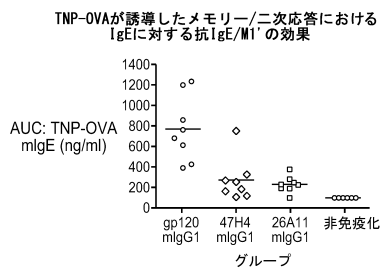
【図16G】



#07-0234 B

グループ	平均	S.D.	%変化	p-値
gp120 mlgG1	14.7	15.4	na	na
47H4 mlgG1	4.78	0.25	-99.1%	0.059
26A11 mlgG1	4.78	0.24	-99.1%	0.071
非免疫化	<4.69	0.0	-100%	0.083

【図16F】



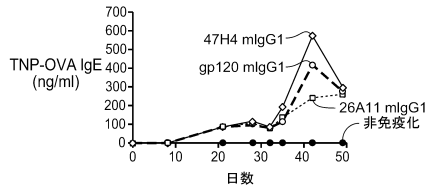
【 図 1 6 H 】

TNP-OVAが誘導したメモリー/二次応答におけるIgEレベルに対する抗IgE/M1'の効果

グループ	AUC: TNP-OVA IgE (ng/ml)				日当たり平均 TNP-OVA IgE			
	平均	S.D.	% 変化	p-値	平均	S.D.	% 変化	p-値
gp120 mlgG1	770	316.4	na	na	36.7	15.1	na	na
47H4 mlgG1	271	208.5	-74.3%	0.0001	12.9	9.9	-74.3%	0.0001
26A11 mlgG1	214	61.6	-83.5%	<0.0001	10.2	2.9	-83.4%	<0.0001
非免疫化	98.4	0.0	-100%	<0.0001	<4.69	0.0	-100%	<0.0001

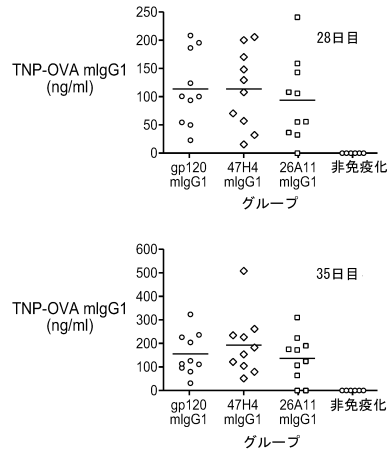
【 図 1 6 I 】

TNP-OVAが誘導したメモリー/二次応答におけるIgEに対する抗IgE/M1'の効果



【 図 1 6 J 】

TNP-OVAが誘導したメモリー/二次応答におけるIgEに対する抗IgE/M1'の効果

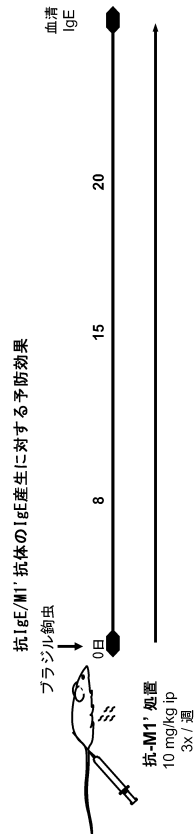


【 図 1 6 K 】

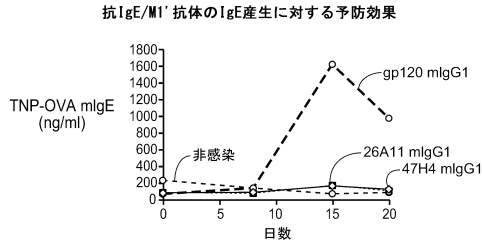
TNP-OVAが誘導したメモリー/二次応答におけるIgEに対する抗IgE/M1'の効果

グループ	TNP-OVA mlgG1 (μg/ml) 28日目				TNP-OVA mlgG1 (μg/ml) 35日目			
	平均	S.D.	% 変化	p-値	平均	S.D.	% 変化	p-値
gp120 mlgG1	107	64.7	na	na	139	92.7	na	na
47H4 mlgG1	91.7	56.3	-14.3%	0.8866	149	73.8	+7.2%	0.9879
26A11 mlgG1	61.7	48.3	-42.3%	0.2544	99.3	84.4	-28.6%	0.6294
非免疫化	<0.00078	0.0	-100%	0.0024*	<0.00078	0.0	-100%	0.006*

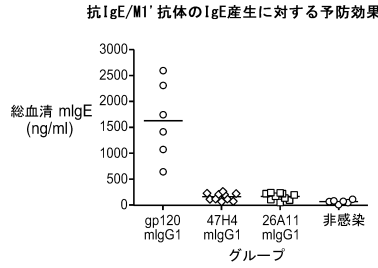
【 図 1 7 A 】



【図17B】



【図17C】



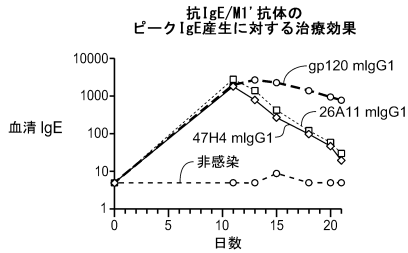
【図17D】

抗IgE/M1'抗体のIgE産生に対する予防効果

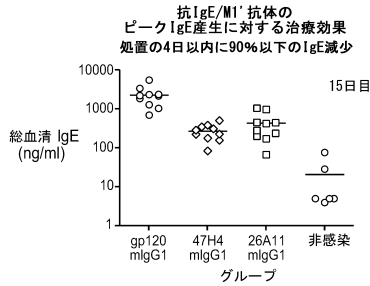
#07-0234 B

グループ	平均	S.D.	%変化	p-値
gp120 mlgG1	1633.6	738.8	na	na
47H4 mlgG1	166.3	70.4	93.8%	<0.0001
26A11 mlgG1	174	66.5	93.4%	<0.0001
非感染	70.1	35.9	-100%	<0.0001

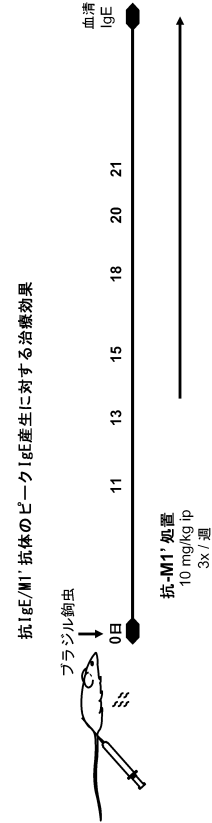
【図18B】



【図18C】



【図18A】



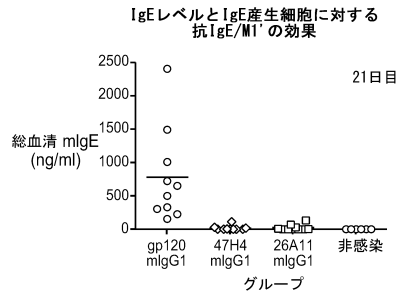
【図18D】

抗IgE/M1'抗体のピークIgE産生に対する治療効果

グループ	平均	S.D.	%変化	p-値
gp120 mlgG1	2289	1367	na	na
47H4 mlgG1	270	123	-89.0%	<0.0001*
26A11 mlgG1	431	332	-81.9%	<0.0001*
非免疫化	20.72	29.12	-100%	<0.0001*

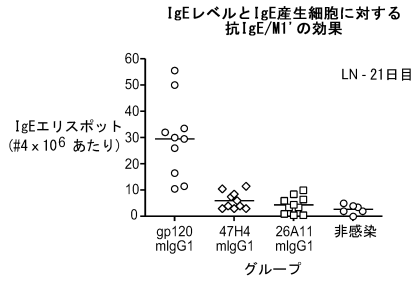
* 一対比較のためのボンフェローニ補正を行ったアイソタイプコントロールより統計学的に有意

【図18E】



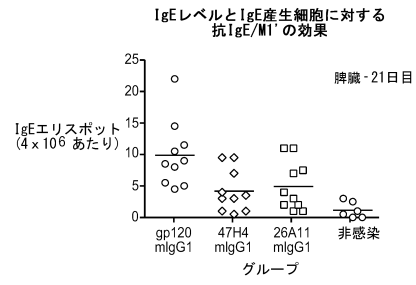
グループ	平均	S.D.	%変化	p-値
120 mlgG1	784.5	701	na	na
47H4 mlgG1	21.4	35.4	-97.9%	0.0002*
26A11 mlgG1	30.3	44.8	-96.8%	0.0002*
非免疫化	5	0.0	-100%	0.0009*

【 図 1 8 F 】



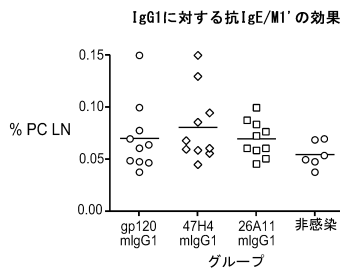
グループ	IgE エリスポット頻度 LN			
	平均	S.D.	% 変化	p-値
120 mlgG1	29.5	14.9	na	na
47H4 mlgG1	6.1	3.2	-87.6%	<0.0001*
26A11 mlgG1	4.5	3.3	-93.8%	<0.0001*
非免疫化	2.8	1.8	-100	<0.0001*

【 図 1 8 G 】



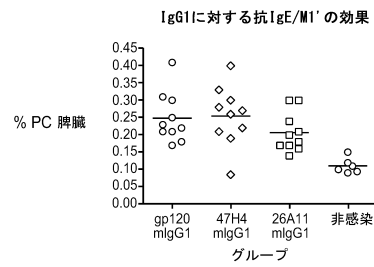
グループ	IgE エリスポット頻度 脾臓			
	平均	S.D.	%変化	p-値
gp120 mlgG1	9.9	5.3	na	na
47H4 mlgG1	4.2	3.4	-65.5%	0.0079*
26A11 mlgG1	4.95	3.9	-56.9%	0.0229*
非免疫化	1.2	1.3	-100%	0.0004*

【 図 1 8 H 】



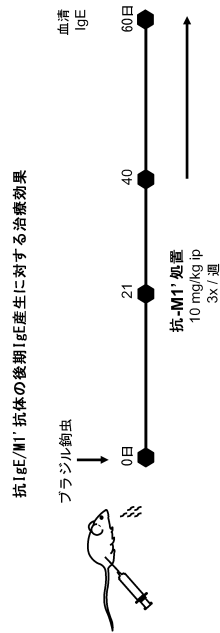
グループ	総 PC 頻度 LN			
	平均 (%)	S.D.	% 変化	p-値
gp120 mlgG1	0.07	0.03	na	na
47H4 mlgG1	0.08	0.03	+50%	0.7377
26A11 mlgG1	0.07	0.02	0	1.0
非免疫化	0.05	0.01	-100%	0.5596

【 図 1 8 I 】

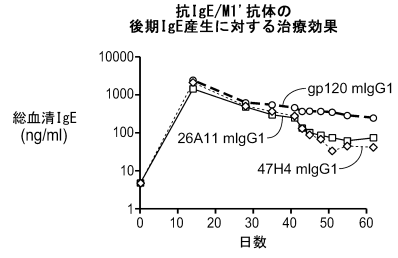


グループ	総 PC 頻度 脾臓			
	平均	S.D.	% 変化	p-値
gp120 mlgG1	0.25	0.07	na	na
47H4 mlgG1	0.25	0.09	0	0.9959
26A11 mlgG1	0.21	0.06	-28.6%	0.3839
非免疫化	0.11	0.02	-100%	0.0010

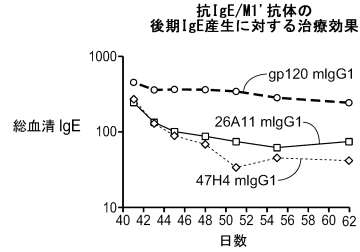
【図19A】



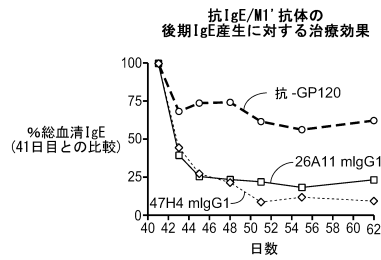
【図19B】



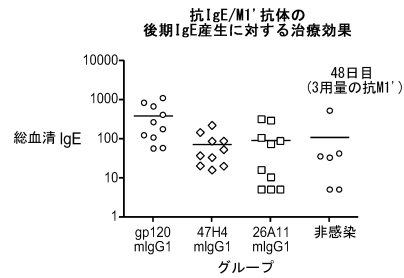
【図19C】



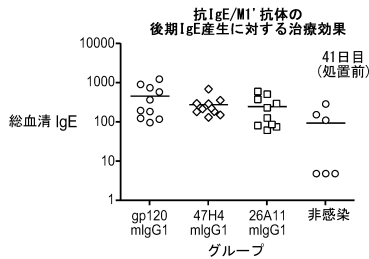
【図19D】



【図19F】



【図19E】



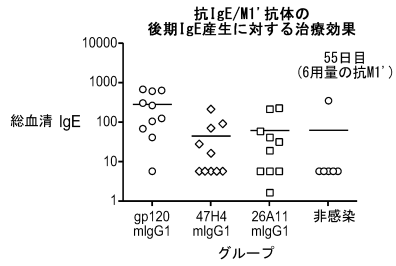
グループ	総血清 IgE			
	平均	S.D.	% 変化 (41日)	p-値 (41日)
gp120 mlgG1	372.3	359.4	-20.3%	0.7715
47H4 mlgG1	69.8	64.2	-75.1%	0.0005*
26A11 mlgG1	89.7	115.5	-64.4%	0.0326*
非感染	105.0	199.9	+7.6%	0.9938

* 一対比較のためのボンフェローニ補正を行った
アインタイプコントロールより統計学的に有意

グループ	総血清 IgE			
	平均	S.D.	% 変化 (41日)	p-値 (41日)
gp120 mlgG1	467.2	407.8	0	na
47H4 mlgG1	280.0	168.6	0	0.2738
26A11 mlgG1	252.3	201.8	0	0.1843
非感染	97.6	116.9	0	0.0267*

* 一対比較のためのボンフェローニ補正を行った
アインタイプコントロールより統計学的に有意

【図19G】



グループ	総血清 IgE			
	平均	S.D.	% 変化 (41日)	p-値 (41日)
gp120 mlgG1	292.4	271.0	-37.4%	0.4401
47H4 mlgG1	46.3	68.4	-83.5%	0.0001*
26A11 mlgG1	63.3	89.3	-74.9%	0.0126*
非感染	64.9	144.2	-33.5%	0.9158

*一対比較のためのボンフェローニ補正を行った
アイソタイプコントロールより統計学的に有意

【配列表】

0005723594000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P 13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 U
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

微生物の受託番号 ATCC PTA-8264
 微生物の受託番号 ATCC PTA-8265
 微生物の受託番号 ATCC PTA-8266
 微生物の受託番号 ATCC PTA-8267
 微生物の受託番号 ATCC PTA-8268
 微生物の受託番号 ATCC PTA-8269
 微生物の受託番号 ATCC PTA-8270

前置審査

- (72)発明者 バラージュ, メルセデス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 4 5, ハイワード, ドリフトウッド ストリート
 2 7 3 5
- (72)発明者 ブライトビル, ハンス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 3, サン フランシスコ, ドロレス ストリート
 2 4 0, 1 2 4号
- (72)発明者 チャン, アンドリュー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5, メンロー パーク, クラウド アベニュー
 1 2 0 1
- (72)発明者 チェン, イボンヌ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 1, サン マテオ, 8番 アヴェニュー 2 2 2
 , 3 2 0番
- (72)発明者 チュンタラパイ, アナン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 5, コルマ, エリス ドライブ 8 2 6
- (72)発明者 デニス, マーク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, プリマス アヴェニュー
 1 2 0
- (72)発明者 ウォン, テレンス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 1, アラメダ, シェル ゲート ロード 3 1 2

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 特表平05 - 5 0 4 4 8 2 (J P , A)
 POGGIANELLA MONICA, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 米国, 2 0 0 6年 9月15日, V177 N6,

P3597-3605

CHEN HUAN YUAN , INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY , 2 0 0 2年 5月 2日 , V128 N4 , P315-324

CHANG TSE WEN , ALLERGY AND ASTHMA PROCEEDINGS , 2 0 0 6年 3月 , V27 N2.SUPPL1 , P. S7-S14

FASEB JOURNAL(March 8, 2001),Vol.15,No.5,p.A1018

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

A 0 1 K 6 7 / 0 2 7

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 1 / 0 4

A 6 1 P 1 1 / 0 0

A 6 1 P 1 1 / 0 2

A 6 1 P 1 1 / 0 6

A 6 1 P 1 3 / 1 0

A 6 1 P 1 7 / 0 0

A 6 1 P 1 9 / 0 0

A 6 1 P 3 3 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 6

A 6 1 P 3 7 / 0 8

C 0 7 K 1 6 / 4 2

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 P 2 1 / 0 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d

C i N i i

W P I D S (S T N)