

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-79240

(P2013-79240A)

(43) 公開日 平成25年5月2日(2013.5.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-248395 (P2012-248395)	(71) 出願人	504149971
(22) 出願日	平成24年11月12日 (2012.11.12)		イミューノメディクス、インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2007-545628 (P2007-545628) の分割		I M M U N O M E D I C S , I N C .
原出願日	平成17年12月8日 (2005.12.8)		アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、ブレインズ、アメリカン、ロード、3 O O
(31) 優先権主張番号	60/634, 076	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成16年12月8日 (2004.12.8)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096769
			弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100114591
			弁理士 河村 英文
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患および免疫調節不全疾患、感染性疾患、病的血管新生およびがんの免疫療法および検出のための方法および組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】少なくとも2つの異なるマーカーを標的化する多特異的アンタゴニストを用いる、炎症性疾患および免疫調節性疾患の免疫治療のための方法および組成物を提供する。

【解決手段】異なる標的としては、(i) 先天的免疫系の炎症促進性エフェクターと、(i i) 凝固因子と、(i i i) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的、または感染性疾患と特異的に関連する標的が挙げられる。多特異的アンタゴニストは、治療されている疾患細胞または状態に関連する少なくとも1つの結合特異性、免疫系の成分、凝固の調節因子、または炎症促進性サイトカインに対する少なくとも1つの特異性を含有する。多特異的アンタゴニストは、先天的な免疫系の炎症促進性エフェクターまたは凝固因子によって生成されるか悪化されるか、そうでなければそれらに参与する種々の疾患の治療において用いられる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 2 つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストであって、該標的が、(A) 先天的免疫系の炎症促進性エフェクターと、(B) 凝固因子と、(C) 補体因子および補体調節タンパク質と、(D) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的であって、後者の標的が (A) でも、(B) でも、(C) でもない標的とからなる群より選択され、

(i) 前記標的の少なくとも 1 つが (A)、(B) または (C) であり、

(i i) 前記多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、C D 7 4 が前記アンタゴニストの標的として排除され、そして

(i i i) 前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体の 1 つが B 細胞抗原を標的化し、かつもう一方の抗体が T 細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除され、前記抗体の 1 つが C D 2 0 を標的化し、かつもう一方の抗体が C 3 b または C D 4 0 を標的化する組み合わせも排除される、多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2】

2 つの別個の抗体の組み合わせである、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 3】

多特異的抗体である、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 4】

融合タンパク質である、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 5】

前記 2 つの異なる標的の 1 つが標的 (D) である、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 6】

前記アンタゴニストが、(A)、(B) および (C) の標的の群からの少なくとも 2 つの異なる標的と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 7】

前記アンタゴニストがさらに、標的 (D) と特異的に反応する、請求項 6 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 8】

前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体のうちの 1 つが C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3 または C D 8 0 を標的化し、もう一方の抗体が補体因子を標的化する組み合わせが排除される、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 9】

前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体のうちの 1 つが C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3 または C D 8 0 を標的化し、もう一方の抗体が C 3 b または C D 4 0 を標的化する組み合わせが排除される、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 10】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの炎症促進性エフェクターサイトカインと特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 11】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの炎症促進性エフェクターケモカインと特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 12】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの炎症促進性エフェクターレセプターと特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 13】

前記アンタゴニストが、炎症促進性エフェクターレセプターを含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 1 4】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの凝固因子と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 1 5】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの補体因子と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 1 6】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの補体調節タンパク質と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 1 7】

前記標的のうちの 1 つが、C 3、C 5、C 3 a、C 3 b および C 5 a からなる群より選択される補体因子であり、前記アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせである場合、前記抗体のもう一方が C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3 または C D 8 0 を標的化する標的の組み合わせが排除される、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 1 8】

前記アンタゴニストが、先天的免疫系の 2 つの異なる炎症促進性エフェクターと特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 1 9】

前記アンタゴニストが、2 つの異なる凝固因子と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 0】

前記アンタゴニストが、2 つの異なる補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 1】

前記アンタゴニストが、先天的免疫系の少なくとも 1 つの炎症促進性エフェクターと、少なくとも 1 つの凝固因子と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 2】

前記アンタゴニストが、先天的免疫系の少なくとも 1 つの炎症促進性エフェクターと、少なくとも 1 つの補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 3】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの凝固因子と、少なくとも 1 つの補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 4】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの可溶性レセプターを含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 5】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの抗体に融合された少なくとも 1 つの可溶性レセプターを含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 6】

前記アンタゴニストが、少なくとも 1 つの炎症促進性エフェクターレセプターの細胞外ドメインを含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 7】

前記アンタゴニストが、炎症促進性エフェクターレセプターと反応性である少なくとも 1 つの分子を含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

前記分子が、前記炎症促進性エフェクターレセプターの天然のアンタゴニスト、または前記レセプターと特異的に相互作用する前記アンタゴニストのフラグメントもしくは変異体である、請求項 27 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 29】

樹状細胞、顆粒球、単球、マクロファージ、NK細胞、血小板、または内皮細胞を標的化する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 30】

適応的免疫系の抗原またはレセプターを標的化する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 31】

がん細胞レセプターまたはがん関連抗原を標的化する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 32】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記炎症促進性エフェクターと特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 33】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記凝固因子と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 34】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 35】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記凝固因子と特異的に反応し、少なくとも 1 つのアームが前記炎症促進性エフェクターと反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 36】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応し、少なくとも 1 つのアームが前記炎症促進性エフェクターと反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 37】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記凝固因子と特異的に反応し、少なくとも 1 つのアームが先天的免疫系の炎症促進性エフェクターでも凝固因子でもない前記標的と反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 38】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが前記補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応し、少なくとも 1 つのアームが前記凝固因子と反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 39】

前記アンタゴニストが、少なくとも二重特異的である抗体を含み、前記抗体の少なくとも 1 つのアームが少なくとも 1 つの標的 (A)、(B) または (C) と特異的に反応し、少なくとも 1 つのアームが標的 (D) と反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 40】

前記アンタゴニストが、単一の活性成分を含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

先天的免疫系の成分に作用する二次的な治療剤をさらに含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 4 2】

凝固に作用する二次的な治療剤をさらに含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 4 3】

適応免疫系の成分に作用する二次的な治療剤をさらに含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 4 4】

(A)、(B) または (C) の標的の 2 つ以上のエピトープと特異的に反応する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 4 5】

前記少なくとも 1 つの他の標的が、感染性疾患、急性呼吸窮迫症候群、敗血症または敗血性ショック、移植片対宿主病または移植片拒絶、アテローム性動脈硬化症、喘息、肉芽腫性疾患、神経障害、悪液質、血液凝固障害、座瘡、巨細胞性動脈炎または心筋虚血に関連する、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 4 6】

炎症性障害または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、または感染性疾患から選択される状態を治療する方法であって、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニストの治療上有効な量を、このような状態を有すると診断されている患者に対して投与する工程を含む方法。

【請求項 4 7】

前記状態が自己免疫疾患でない、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記状態が自己免疫疾患である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記状態がクラス I I I の自己免疫疾患である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記状態が、敗血症または敗血性ショック、感染性疾患、神経障害、移植片対宿主病または移植片拒絶、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫性疾患、喘息、アテローム性動脈硬化症、悪液質、病的血管新生、がん、血液凝固障害、座瘡、巨細胞性動脈炎または心筋虚血である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記アンタゴニストが、診断物質／検出物質を含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 5 2】

前記診断物質／検出物質が、診断用放射性核種、造影剤、蛍光標識および光活性物質からなる群より選択される、請求項 5 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 5 3】

前記アンタゴニストが、治療剤を含む免疫コンジュゲートである、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 5 4】

前記治療剤が、放射性核種、ホウ素、免疫調節物質、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素インヒビター、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤、細胞毒性剤、抗体、血管新生インヒビター、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 5 3 に記載の多特異的アンタゴニスト。

【請求項 5 5】

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患から選択される状態を診断または検出する方法であって、請求項 5 7 に記載の多特異的アンタゴ

10

20

30

40

50

ニストの診断上有効な量を、このような状態を有すると疑われている患者に対して投与する工程と；標的部位で多特異的アンタゴニストを融合させる工程と；多特異的抗体が循環して血流から除去されることを待つか、またはクリアリング剤を用いる工程と；検出手段を用いてこのような部位で、前記標識された多特異的アンタゴニストの上昇したレベルを検出することによって、前記標識された多特異的アンタゴニストの付着の部位を位置決めする工程とを含む方法。

【請求項 56】

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患から選択される状態を診断または検出する方法であって、ハプテン結合部位を含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニストの診断上有効な量を、このような状態を有すると疑われている患者に対して投与する工程と；標的部位で多特異的アンタゴニストを融合させる工程と；多特異的抗体が循環して血流から除去されることを待つか、またはクリアリング剤を用いる工程と；診断物質／検出物質で標識されたハプテンを前記被験体に投与する工程と；前記多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に対して前記標識されたハプテンを結合させる工程と；検出手段を用いてこのような部位で、前記標識されたハプテンに結合された前記多特異的アンタゴニストの上昇したレベルを検出することによって、前記多特異的アンタゴニストの付着の部位を位置決めする工程とを含む方法。

【請求項 57】

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患から選択される状態を治療する方法であって、ハプテン結合部位を含む、請求項 1 に記載の多特異的アンタゴニストの治療上有効な量を、このような状態を有すると疑われている患者に対して投与する工程と；標的部位で多特異的アンタゴニストを融合させる工程と；多特異的抗体が循環して血流から除去されることを待つか、またはクリアリング剤を投与する工程と；治療剤を含むハプテンを前記被験体に投与する工程と；前記多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に対して前記ハプテンが前記治療剤とともに結合することを可能にする工程とを含む方法。

【請求項 58】

少なくとも 2 つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストの使用であって、前記標的が、(A) 先天的免疫系の炎症促進性エフェクターと、(B) 凝固因子と、(C) 補体因子および補体調節タンパク質と、(D) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的であって、前記後者の標的が (A) でも、(B) でも、(C) でもない標的とからなる群から選択され、ここで (i) 前記標的の少なくとも 1 つが (A)、(B) または (C) であり、(i i) 前記多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、CD74 が前記アンタゴニストの標的として排除され、そして (i i i) 前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体の 1 つが B 細胞抗原を標的化し、かつもう一方の抗体が T 細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除され、前記抗体の 1 つが CD20 を標的化し、かつもう一方の抗体が CD3b または CD40 を標的化する組み合わせも排除され、

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患である状態の治療のための医薬であって、前記医薬が前記多特異的アンタゴニストの治療上有効な量を含む医薬の製造における使用。

【請求項 59】

前記状態が自己免疫疾患ではない、請求項 58 に記載の使用。

【請求項 60】

前記状態が自己免疫疾患である、請求項 58 に記載の使用。

【請求項 61】

前記状態がクラス I I I 自己免疫疾患である、請求項 58 に記載の使用。

【請求項 62】

前記状態が、敗血症または敗血性ショック、感染性疾患、神経障害、移植片対宿主病ま

10

20

30

40

50

たは移植片拒絶、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫性疾患、喘息、アテローム性動脈硬化症、悪液質、病的血管新生、がん、血液凝固障害、座瘡、巨細胞性動脈炎または心筋虚血である、請求項 58 に記載の使用。

【請求項 63】

前記多特異的アンタゴニストが、治療剤を含む免疫コンジュゲートである、請求項 58 に記載の使用。

【請求項 64】

前記治療剤が、放射性核種、ホウ素、免疫調節物質、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素インヒビター、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤、細胞毒性剤、抗体、血管新生インヒビター、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 63 に記載の使用。

10

【請求項 65】

ハプテン結合部位を含み、少なくとも 2 つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストの使用であって、前記標的が、(A) 先天的免疫系の炎症促進性エフェクターと、(B) 凝固因子と、(C) 補体因子および補体調節タンパク質と、(D) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんとは特異的に関連する標的であって、前記後者の標的が (A) でも、(B) でもまたは (C) でもない標的とからなる群より選択され、ここで (i) 前記標的の少なくとも 1 つが (A)、(B) または (C) であり、(i i) 前記多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、CD74 が前記アンタゴニストの標的として排除され、そして (i i i) 前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体の 1 つが B 細胞抗原を標的化し、かつもう一方の抗体が T 細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除され、そして前記抗体の 1 つが CD20 を標的化し、かつもう一方の抗体が CD3b または CD40 を標的化する組み合わせも排除され、

20

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患である状態の治療のための医薬であって、前記医薬が前記多特異的アンタゴニストの治療上有効な量を含む医薬の製造における使用。

【請求項 66】

前記多特異的アンタゴニストが、標的部位で融合することを可能にさせ；次いで、循環している多特異的抗体を血流から除去させるか、またはクリアリング剤を投与し；次いで、治療剤を含むハプテンを前記被験体に投与して、前記多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に対する結合を可能にさせる、請求項 63 に記載の使用。

30

【請求項 67】

前記治療剤が、放射性核種、ホウ素、免疫調節物質、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素インヒビター、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤、細胞毒性剤、抗体、血管新生インヒビター、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 66 に記載の使用。

【請求項 68】

前記状態が自己免疫疾患ではない、請求項 66 に記載の使用。

40

【請求項 69】

前記状態が自己免疫疾患である、請求項 66 に記載の使用。

【請求項 70】

前記状態がクラス I I I 自己免疫疾患である、請求項 66 に記載の使用。

【請求項 71】

前記状態が、敗血症または敗血性ショック、感染性疾患、神経障害、移植片対宿主病または移植片拒絶、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫性疾患、喘息、アテローム性動脈硬化症、悪液質、病的血管新生、がん、血液凝固障害、座瘡、巨細胞性動脈炎または心筋虚血である、請求項 66 に記載の使用。

【請求項 72】

50

少なくとも2つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストの使用であって、前記標的が、(A) 先天的免疫系の炎症促進性エフェクターと、(B) 凝固因子と、(C) 補体因子および補体調節タンパク質と、(D) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的であって、前記後者の標的が(A)でも、(B)でも、(C)でもない標的とからなる群から選択され、ここで(i) 前記標的の少なくとも1つが(A)、(B)または(C)であり、(ii) 前記多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、CD74が前記アンタゴニストの標的として排除され、そして(iii) 前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体の1つがB細胞抗原を標的化し、かつもう一方の抗体がT細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除され、前記抗体の1つがCD20を標的化し、かつもう一方の抗体がCD3bまたはCD40を標的化する組み合わせも排除され、

10

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、または感染性疾患である状態の検出のための物質であって、前記物質が診断／検出物質の診断上有効な量で標識されている物質の製造における使用。

【請求項73】

前記診断／検出が、診断用放射性核種、造影剤、蛍光標識および光活性物質からなる群より選択される、請求項72に記載の使用。

【請求項74】

前記多特異的アンタゴニストが、標的部位で融合することを可能にさせ；次いで、循環している多特異的抗体を血流から除去させるか、またはクリアリング剤を投与し；次いで、前記標識された物質の上昇したレベルを、検出手段を用いて融合の部位で検出する、請求項73に記載の使用。

20

【請求項75】

ハプテン結合部位を含み、少なくとも2つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストの使用であって、前記標的が、(A) 先天的免疫系の炎症促進性エフェクターと、(B) 凝固因子と、(C) 補体因子および補体調節タンパク質と、(D) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的であって、前記後者の標的が(A)でも、(B)でも、(C)でもない標的とからなる群から選択され、ここで(i) 前記標的の少なくとも1つが(A)、(B)または(C)であり、(ii) 前記多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、CD74が前記アンタゴニストの標的として排除され、そして(iii) 前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体の1つがB細胞抗原を標的化し、もう一方の抗体がT細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除され、そして前記抗体の1つがCD20を標的化し、かつもう一方の抗体がCD3bまたはCD40を標的化する組み合わせも排除され、

30

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、または感染性疾患である状態の検出のための物質であって、前記物質が前記多特異的アンタゴニストの診断上有効な量を含む物質の製造における使用。

40

【請求項76】

前記多特異的アンタゴニストが、標的部位で融合することを可能にさせ；次いで、循環している多特異的抗体を血流から除去させるか、またはクリアリング剤を投与し；次いで、診断／検出物質で標識されたハプテンを前記被験体に投与して、前記多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に対する結合を可能し、次いで前記標識された多特異的アンタゴニストの上昇したレベルが、融合部位で検出手段によって検出される、請求項75に記載の使用。

【請求項77】

前記診断／検出物質が、診断用放射性核種、造影剤、蛍光標識、および光活性物質からなる群より選択される、請求項76に記載の使用。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2004年12月8日に提出された米国仮特許出願第60/634,076号の利点を請求する。

【0002】

[発明の分野]

本発明は一般に、少なくとも2つの異なるマーカーを標的化する多特異的アンタゴニストを用いる、炎症性疾患および免疫調節不全疾患の免疫療法のための方法および組成物に関する。このマーカーは、リンパ球、マクロファージ、単球または樹状細胞（DC）に対する抗原および／またはレセプターである。本発明は詳細には、細胞およびそれらのレセプターに結合して、これらの細胞およびそれらのレセプターによって生じるかもしくは悪化され、またはそうでなければそれに関与する種々の疾患の治療を果たすための特異的な抗体および抗体異種コンジュゲートを用いて、免疫標的細胞および免疫プロセッシング細胞に対するレセプターを調節するための方法および組成物に関する。このような疾患としてはさらに詳細には、急性および慢性の炎症性障害、自己免疫疾患、敗血症および敗血性ショック、神経障害、移植片対宿主病、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫性疾患、巨細胞性動脈炎、座瘡、汎発性血管内凝固（DIC）、移植片拒絶、喘息、悪液質、心筋虚血、およびアテローム性動脈硬化症が挙げられる。本方法および組成物はまた、病的血管新生およびがんを治療するのに有用である。本方法および組成物は、がんレセプターまたはがん関連抗原に関する二次治療剤を含み得る。方法および組成物はまた、この疾患の改良された診断／検出について記載される。

【背景技術】

【0003】

免疫系は、先天的免疫系、および適応性または後天性の免疫系の両方を含む。多くの宿主細胞が、好中球、Tリンパ球およびBリンパ球、マクロファージおよび単球、樹状細胞および形質細胞のような、先天性および適応性の免疫の過程に関与する。それらは、通常、協調して機能し、詳細には、先天性および外因性の有害物（noxi-ent）の認識および処理に寄与する特定の要因およびサイトカインの調節において互いに影響し、そしてこれらの系は、脊椎動物、哺乳動物およびヒト生物体の発達の数百万年にわたって進化してきた。

【0004】

免疫療法の主要な目的は、悪性細胞または侵入する微生物のような先天性の有害物または外来の有害物に対して、患者の免疫系を開発または増強することである。この免疫系は、原発性の異常、例えば、がんおよび特定の自己免疫および免疫調節不全疾患に関してよりも、微生物のような外因性の有害物に対する認識および応答に関して、さらに研究されている。なぜなら、詳細には後者は、遺伝的成分および環境的成分の両方を有し得るからである。微生物、例えば、細菌、真菌、寄生生物およびウイルスに対する防御は、特定の生物体に対して先天性であって、免疫系は、これらの微生物の生化学的なパターンを認識して、その微生物に対する事前の曝露の必要なしにそれらを攻撃するように応答するようにプログラムされている。この先天的免疫系としては、直接の吞食および破壊によって侵入している微生物を根絶し得る、例えば、好中球、ナチュラルキラー細胞、および単球／マクロファージが挙げられる。

【0005】

この先天性の免疫応答はしばしば、より特異的な適応性免疫系が特定の抗体およびT細胞を導くことができるまで侵入する外来の有害物を制御する、非特異的な応答と呼ばれる（Modlin et al., N Engl J Med 1999, 340:1834-1835; Das, Crit Care 2000; 4; 290-296を参照のこと）。非特異的な免疫応答は、リンパ系および食細胞を包含する。このリンパ系は、リンパ球およびマクロファージを含む。マクロファージは、外来の粒子を吞食し、殺傷しそし

T細胞は、細胞内病原体の存在を検出し得る。なぜなら感染した細胞は、病原体タンパ

50

ク質由来のペプチドフラグメントをその表面に提示するからである。これらの外来のペプチドは、主要組織適合複合体（MHC）分子と呼ばれる、特殊な宿主細胞糖タンパク質によって細胞表面に送達される。MHC分子に対して結合した、そして細胞表面に提示された、小ペプチドフラグメントとしての抗原の認識は、T細胞の最も典型的な特徴の1つである。MHCクラスIおよびMHCクラスIIとして既知の2つの異なるクラスのMHC分子があり、これはペプチドを種々の細胞区画から、感染した細胞の表面に送達する。細胞質ゾル由来のペプチドは、有核細胞の大部分で発現されるMHCクラスI分子に結合され、そしてCD8+T細胞によって認識される。MHCクラスII分子は対照的に、CD4+T細胞に提示される。Bryant and Ploegh, Curr Opin Immunol 2004; 16: 96-102。

10

【0012】

CD8+T細胞は、細胞傷害性T細胞に分化して細胞を殺傷する。CD4+T細胞は、2つのタイプのエフェクターT細胞に分化する。マクロファージ小胞の内側に多数蓄積する病原体は、 T_H1 細胞の分化を刺激する傾向があり、この細胞が、マクロファージを活性化し、そしてB細胞がIgG抗体を作成するように誘導し、IgG抗体は食細胞による取り込みの際に細胞外病原体をオプソニン化するのに有効である。細胞外抗原は、 T_H2 細胞の産生を刺激する傾向があり、 T_H2 細胞がナイーブな抗原特異的B細胞を活性化することによって体液性免疫応答を開始し、とりわけ、IgM抗体を生成する。

【0013】

20

先天的免疫系と適応性の免疫系とは、免疫物質を生成し得る特定の細胞を活性化することによって、例えば、白血球のリンパ系のT細胞およびB細胞を活性化することによって、適応性免疫系と相互作用し得るかまたは適応性免疫系を誘発し得る種々の分子を、先天的免疫系の細胞が発現し得るという点で、相互作用する。初期に誘導されたが、非適応性の応答は、二つの主要な理由で重要である。第一に、それらは、適応性免疫応答が組み込まれ得るまで、病原体を撃退し得るか、またはより高頻度には制御し得る。第二に、これらの初期の応答は、いくつかの方法で適応性の応答に影響する。例えば、先天性の免疫応答は、感染の局所部位に対する新規な食細胞の補充を含むその後の事象において顕著な影響を有する、サイトカインおよび他の炎症性メディエーターを生成する。これらのメディエーターの別の影響は、局所の血管の内皮細胞に対する接着分子の発現を誘導することであり、接着分子は、循環中の単球および好中球の表面に結合して、血管の外側および組織の内側へのこれらの細胞の遊走の速度を大きく増大する。これらの事象は全て、外来物質を隔離、破壊および除去するように局所部位での防御的応答の一部を形成する先天性免疫系の特徴である、炎症の条件で含まれる。この後に修復が続く。炎症は、急性および慢性の形態に分けられる。

30

【0014】

免疫系は、非特異的な組織耐性物質を介して連絡する。これらは、ウイルス、内毒素および特定の細菌に応答して生成されるタンパク質であるインターフェロンを含む。インターフェロンは、ウイルスの複製を阻害し、特定の宿主防御応答を活性化する。感染された細胞は、インターフェロンを産生し、これが感染した細胞を他の隣接する細胞に結合させ、それらに抗ウイルスタンパク質およびウイルスの遺伝子転写およびタンパク質合成を妨害する酵素を産生させる。インターフェロンは、正常な細胞成長に影響し、そして細胞媒介性免疫を抑制し得る。

40

【0015】

補体は、別の非特異的な組織耐性物質であって、血漿タンパク質および膜タンパク質を含み、このタンパク質が特異的および非特異的な防御を媒介する。補体は、2つの経路、特異的な防御に関連する古典的な経路、および特異的な抗体の非存在下で活性化され、従って非特異的である別の経路を有する。古典的な経路では、抗原-抗体複合体は、C1がIgM、そしてある程度はIgGのような抗体のFcと相互作用する場合に認識され、最終的には、多くの機構のうちの1つとして、走化性因子、血管メディエーターおよび呼吸

50

バーストを食細胞中で肥満細胞に放出させる。重要な補体因子としてはC3aおよびC5aが挙げられ、これによって肥満細胞は走化性因子、例えば、ヒスタミンおよびセロトニンを放出し、これが食細胞、抗体および補体などを誘引する。他の重要な補体因子は、外来の細胞の食作用を増強するC3bおよびC5b、ならびに外来の細胞の溶解を誘導する(膜攻撃複合体)C8およびC9である。

【0016】

がん細胞は、補体活性化を回避することによって、特に、膜結合した補体調節タンパク質、例えば、CD55(分解促進因子)、CD46(膜補因子タンパク質)およびCD59(タンパク質)の発現によって免疫サーベイランスを回避し得、そしてがん細胞の膜上のこれらのタンパク質の過剰発現は、補体活性化からこれらのがんを防御すると考えられる(Brasoveanu et al., Lab Invest 1996; 74: 33-42; Jarvis et al., Int J Cancer 1997; 71: 1049-1055; Yu et al., Clin Exp Immunol 1999; 115: 13-18; Murray et al., Gynecol Oncol 2000; 76: 176-182; Donin et al., Clin Exp Immunol 2003; 131: 254-263)。CD46、CD55およびCD59に対する中和抗体の使用による補体媒介性溶解に対する影響の受け易さを増大するための試みは行われているがうまくいっていない(Varsano et al., Clin Exp Immunol 1998; 113: 173-182; Junnikkala et al., J Immunol 2000; 164: 6075-6081; Maenpaa et al., Am J Pathol 1996; 148: 1139-1162; Gorter Lab Invest 1996; 74: 1039-1049)。後者の研究では、CD46およびCD55抗体は、CD59抗体と対照的に、有効ではない。このことは、他の標的、または複数の補体調節タンパク質に対する、または補体調節タンパク質および免疫の他のメディエーターの両方に対する抗体の使用が必要であり得ることを示唆する。この一般的な失敗はFishelson et al. (Mol Immunol 2003; 40: 109-123)の推測、および抗がん補体固定抗体と組み合わせた膜補体調節タンパク質に対する抗体を用いるがん患者の治療は治療有効性を改善するという他の研究からの示唆と矛盾し、そのため、がん患者においてこのようなストラテジーが最高に実現され得る方法を解明する必要性が残る。

【0017】

Gelderman et al. (Mol Immunol 2003; 40: 13-23)は、膜結合した補体調節タンパク質(mCRP)が、同系のラットの結腸直腸がんモデルにおいて免疫療法的mAbによる補体活性化を阻害することを報告した。腫瘍抗原およびmCRPに対するmAbの使用は、腫瘍細胞上のmCRPの観察された効果を克服するが、このアプローチを支持する直接の証拠はない。CD55に対する、そして腫瘍抗原(G250またはEpCAM)に対する二重特異的な抗体を用いるさらに他の試みは、親の抗腫瘍抗体の使用に比較してC3沈着において2~13倍の増大を示したインビトロの研究に基づいて、Gelderman et al. (Lab Invest 2002; 82: 483-493; Eur J Immunol 2002; 32: 128-135)によって示唆されている。しかし、細胞殺傷の増強に関する結果は報告されていない。Jurianz et al. (Immunopharmacology 1999; 42: 209-218)はまた、インビトロにおける抗HER2抗体での腫瘍の併用治療が、膜-補体-調節性タンパク質の抗体-中和での事前治療によって増強され得ることを示唆したが、ここでもやはりインビボの結果は示されなかった。Sier et al. (Int J Cancer 2004; 109: 900-908)は近年、腎細胞癌(Mab G250)の上で発現される抗原およびCD55に対して作成された二重特異的な抗体が、βグルカンが投与された場合、球状の腎癌細胞の殺傷を増強したことを報告し、これによってCR3プライミングβ-グルカンの存在が必須であることが示唆された。

【0018】

先天性免疫応答に関与する別の細胞である好中球はまた、碎片を摂取し、分解して、処分する。好中球は補体および抗体のレセプターを有する。補体－レセプター架橋および抗体によって、外来の有害物は、吞食および殺傷のために食細胞に捕獲されて提示され得る。

【0019】

マクロファージは、外来の抗原物質を継続的に検索する先天性の系の一部である白血球である。先天性の免疫応答の一部として、マクロファージは外来の粒子を吞食し、殺傷し、そして処分する。しかし、それらはまた、体液性または細胞媒介性の免疫応答に関与する、B細胞およびT細胞への提示のために抗原を処理もする。

10

【0020】

樹状細胞は、先天性および適応性の免疫系が連絡する主要な手段の1つである (Reise Sousa, Curr Opin Immunol 2004; 16: 21-25)。これらの細胞は、微生物分子またはシグナルに対する反応によって適応性免疫応答を先鋭にすると考えられる。樹状細胞は、抗原を捕獲し、処理して、提示し、これによってCD4+およびCD8+ナイーブなTリンパ球を活性化して、一次免疫応答の誘導をもたらし、そしてMHCクラスI、MHCクラスIIおよびアクセサリー分子、例えば、CD40、CD54、CD80、CD86およびT細胞活性化サイトカインの発現から、その刺激能力を駆動する (Steinman, J Exp Hematol 1996; 24: 859-862; Banchereau and Steinman, Nature 1998; 392: 245-252)。これらの特性によって、がんおよび感染性疾患の免疫療法のための樹状細胞候補物が作成され (Nestle, Oncogene 2000; 19: 673-679; Fong and Engleman, Annu Rev Immunol 2000; 18: 245-273; Lindquist and PISA, Med Oncol 2002; 19: 197-211)、そしてウイルスおよび腫瘍に対する強力な免疫を生じる抗原特異的な細胞傷害性T細胞を誘導することが示されている (Kono et al., Clin Cancer Res 2002; 8: 394-40)。

20

【0021】

また先天性および適応性の免疫系の相互作用に重要なのはNK細胞であって、これは、リンパ球として出現するが、先天的免疫系の一部のように挙動する。NK細胞は、腫瘍細胞の殺傷に、そして本質的にはウイルス感染に対する応答に関与している (Lanier, Curr Opin Immunol 2003; 15: 308-314; Carayannopoulos and Yokoyama, Curr Opin Immunol 2004; 16: 26-33)。先天的免疫系のさらに別の重要な機構は、感染の存在に対して哺乳動物宿主の他の細胞を変更するサイトカインメディエーターの活性化であり、その重要な成分は転写因子NF- κ Bである (Li and Verma, Nat Rev Immunol 2002; 2: 725-734)。

30

【0022】

初期に言及されたとおり、免疫系は、過剰反応し得、それによってアレルギーまたは自己免疫疾患が生じる。これはまた、抑制されるか、欠損されるか、または破壊され得、それによって疾患および死亡が生じる。免疫系が「自己」と「非自己」との間を識別できない場合、これは、身体の細胞および組織に接着して破壊し、自己免疫疾患、例えば、若年性糖尿病、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、リウマチ関節炎および免疫血小板減少性紫斑病を生じる。免疫不全疾患は、免疫系の1つ以上の部分の欠失または不全から生じ、そして正常な免疫系を有する個体に通常は影響しない疾患に対してその個体を感受性にさせる。免疫不全疾患の例は、重症複合免疫不全疾患 (SCID) および後天性免疫不全疾患 (AIDS) である。後者は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) から生じ、そして前者は、酵素または他の遺伝性欠損、例えば、アデノシンデアミナーゼ欠損から生じる。

40

50

【0023】

免疫応答ならびに免疫、自己免疫障害および免疫不全障害の種々の態様の包括的記述は、その全てが引用することにより本明細書の一部をなすものとする、Janeway et al., IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE, Current Biology Publications, 1999; the Medical Encyclopedia of Medline Plus (nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html); そしてインターネットのサイトであるslc2.wsu.edu:82:hurlbert/micro101/pages/hapl5.htmlに提供される。

10

【0024】

がんに対する免疫療法の適用は、抗腫瘍反応性T細胞の養子免疫伝達およびワクチンの使用、ならびに調節性細胞を阻害することによって腫瘍自己抗原に対する耐性を破壊すること、および種々のサイトカインおよびいわゆる免疫増強分子の使用によってT細胞免疫を高めることのような、免疫系に関わるかまたは開拓するための多数のアプローチを含む (Antonia et al., Curr Opin Immunol 2004; 16: 130-136)。樹状細胞ワクチンも記載されている。腫瘍細胞抗原/レセプターを標的化することによって患者に投与される抗体の直接および間接的な (宿主エフェクター細胞によって媒介される) 作用は現在、リンパ腫および白血病の治療におけるCD20 およびCD52に対する抗体; 多様な固形腫瘍の治療における、抗上皮細胞成長因子レセプター (EGFR)、抗HER2/neu 改変体; そして特定の固形腫瘍の治療のための抗血管内皮増殖因子 (VEGF) によって例証されるように、がん治療の全構成に入っている。単独で与えられた場合活性であるが、これらのほとんどは、他の治療様式、例えば、薬物および放射線と組み合わせられた場合、抗腫瘍効果の増強を示した。細胞傷害性薬物または同位元素を送達するためにこれらの腫瘍標的抗体を用いることは、免疫療法のさらに別の方法であって、臨床段階にはいつている。がん免疫療法のこれらおよび他の方法は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする、Huber and Woelfel, J Cancer Res Clin Oncol 2004; 130: 367-374に概説されている。しかし、せいぜいこれらのアプローチは、患者の一部における腫瘍の減少および生存の改善を示すだけであり、患者のほとんどは、再発して、これによってその疾患を制御するためには他の治療介入および異なる戦略が必要になる。

20

30

【0025】

敗血症は、我々の社会にとって大きな医学的および経済的な負担であり、アメリカで毎年約700,000人が罹患し、毎年200,000例を超える死者が生じ、そして1年に約167億ドルの費用がかかっている (Angus et al., Crit Care Med 2001; 29: 1303-1310; Martin et al., N Engl J Med 2003; 348: 1546-1554)。敗血症の定義は難しく、歴史的には、感染に対する全身的な宿主反応として規定された。敗血症の臨床的定義の考察は、全身性炎症反応症候群 (SIRS)、敗血症自体、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび多臓器不全症候群 (MODS) を包含し、Riedmann et al., J Clin Invest 2003; 112: 460-467に含まれる。敗血症は、侵入する微生物に対する宿主の絶大な反応によって生じること、そしてその患者は、侵入する微生物よりもこの応答によって危険にさらされるということが共通の観念であり、免疫および炎症性応答の抑制は治療の初期の目標であった。

40

【0026】

免疫抑制の、または炎症促進性サイトカインを中和することの、多くのかつ多様な方法は、敗血症および敗血性ショックを有する患者の抗炎症性の戦略では臨床成功していないことが証明されている。(Riedmann, et al., 上記で引用; Van Amersfoort et al (Clin Microbiol Rev 2

50

003; 16: 379-414)、例えば、一般的な免疫抑制、非ステロイド性抗炎症性薬物の使用、TNF- α 抗体(インフリキシマブ)またはTNF-R:Fc融合タンパク質(エターネルセプト)、IL-1(インターロイキン-1)レセプターアンタゴニスト、または高用量のコルチコステロイド。しかし、成体での敗血症の治療における成功は、PROWESS研究(Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis(Bernard et al., N Engl J Med 2001; 344: 699-709))であって、ここでは、プラセボ群(30.8%)においてよりも低い死亡率(24.7%)が示されている。この活性化されたプロテインC因子はおそらく、血栓症および炎症の両方を阻害するが、線維素溶解が助長される。Van Amersfoort et al. は、その概説(前出)において、以下のように述べている。「補体および凝固因子を含む多数の他の標的のブロックまたは調節、好中球結合、およびNO放出は、動物においては見込みがあるが、これらの治療アプローチがヒトで有効であるか否かはまだ確認されていない(Although the blocking or modulation of a number of other targets including complement and coagulation factors, neutrophil adherence, and NO release, are promising in animals, it remains to be determined whether these therapeutic approaches will be effective in humans)」。これは、Abrahamによる概説、「Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis」(Intensive Care Med 1999; 25: 556-566)においてさらに強調される。

【0027】

敗血症における免疫系は、感染または外傷後早期の激しい炎症促進性応答を有し、これが器官損傷をもたらすと考えられる、しかし侵入する微生物を効率的に殺傷することに先天免疫系はしばしば失敗するとも考えられる(Riedmann and Ward, Expert Opin Biol Ther 2003; 3: 339-350)。敗血症と組み合わせて、マクロファージ遊走阻害性因子(MIF)のいくつかの研究があり、ある程度の見込みが示されている。例えば、MIFの遮断またはMIF遺伝子の標的化破壊はマウスにおける敗血症性ショックのモデルで生存を有意に改善した(Calandra et al., Nature Med 2000; 6: 164-170)、そして証拠のいくつかの系列は、敗血症の患者における治療介入のための潜在的な標的としてMIFを指摘している(Riedmann et al., 上記で引用)。Bucala et al. (米国特許第6,645,493号B1)は、抗MIF抗体が、種々の形態の敗血症、炎症性疾患、急性呼吸器病候群、肉芽腫性疾患、慢性感染、移植片拒絶、悪液質、喘息、ウイルス感染、寄生生物感染、マラリアおよび細菌感染を含む、サイトカイン媒介性毒性によって生じる状態または疾患を治療するために治療上有効であり得ると主張し、これは、引用文献を含むその全体を引用することにより本明細書の一部をなすものとする。抗LPS(リポポリサッカライド)抗体単独の使用は同様に、敗血症性ショックを有する患者の治療において入り交じった結果であった(Astiz and Rackow, Lancet 1998; 351: 1501-1505; Van Amersfoort et al., Clin Microbiol Rev 2003; 16: 379-414)。

【0028】

LPSおよびMIFの両方とも敗血症および敗血症性ショックの治療において標的として探究されているが、抗体によってLPSまたはMIF単独を標的化するアプローチは、特に進行型および重篤型では、敗血症の多様な徴候を制御するには十分ではなかった。同様に、敗血症および他のサイトカイン媒介性毒性反応の治療のための抗体の標的としての、IL-1、IL-6(インターロイキン6)、IL-8(インターロイキン8)などのよ

うなサイトカインの使用は、この疾患の意味のある制御に十分であることは証明されていない。従って、敗血症における内因性の応答に關与するサイトカインカスケードのさらなる標的を発見する必要性に加えて、MIFまたはリポポリサッカライド(LPS)のような少なくとも1つのサイトカインまたは原因物質を標的化する二機能的および多機能的な抗体は、特に炎症性応答または免疫応答に従事する宿主細胞(またはそのレセプター)、例えば、T細胞、マクロファージ、または樹状細胞への結合と組み合わせた場合、有利であることが、今や発見されてきている。CD74のようなMHCクラスII不変鎖標的に対する抗体は、Bucala et al. (US 2003/0013122 A1) によって、MIF調節性疾患を治療することについて提唱され、そしてHansen et al. (US 2004/0115193 A1) は、免疫調節不全疾患、自己免疫疾患、器官移植片拒絶、および移植片対宿主病を治療するための少なくとも1つのCD74抗体を提唱した。Hansen et al. は、このような疾患の治療のためのリンパ球およびマクロファージのような宿主細胞に対する抗原/レセプターと反応する他の抗体と抗CD74との融合タンパク質の使用を記載している。しかし、CD74以外の標的との組み合わせは、示唆されておらず、その開示は免疫療法の異なる方法に集中している。同様の標的はまた、アテローム斑を治療するために有用である(Burger-Kentischer et al., Circulation 2002; 105: 1561-1566)。

【0029】

感染、自己免疫、器官移植、炎症、および移植片対宿主病(および他の免疫調節性疾患)の治療において、有害物もしくは微生物を殺傷もしくは排除するか、または外来の移植片もしくは免疫原に対する宿主免疫応答、または「自己」に対する抗体の宿主の産生を抑制するなどのために多様でかつ相対的に非特異的な細胞傷害性物質を用いる。しかし、これらは通常、リンパ様のそして造血系の他の部分に影響して、骨髓(造血系)および他の正常な宿主細胞に対して毒性の影響を生じる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0030】

従って、がん、ならびに敗血症および敗血性ショック、炎症、アテローム性動脈硬化症、悪液質、移植片対宿主、および他の免疫調節不全障害を含む、多様な免疫疾患の改善された、さらに選択性の療法の必要性が存在する。本発明は、上記で示される問題の1つ以上の影響を克服するかまたは少なくとも軽減することに向けられる。

【課題を解決するための手段】

【0031】

本発明は、種々の炎症性および免疫調節不全疾患、感染性疾患、病的血管新生およびがんの治療において多特異的アンタゴニストを用いる新規でかつ十分耐えられる方法を提供する。この多特異的アンタゴニストは、これらの条件に関連する唯一の標的と特異的に反応する物質よりも有効である。本発明は、少なくとも2つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストを提供する。この標的は、(A) 先天性免疫系の炎症促進性エフェクター、(B) 凝固因子、(C) 補体因子および補体調節タンパク質、ならびに(D) 炎症性障害もしくは免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的、からなる群より選択され、後者の標的は(A) でも、(B) でも、(C) でもない。この標的の少なくとも1つは(A)、(B) または(C) である。この多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、CD74はこのアンタゴニストの標的として排除される。さらに、この多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、抗体の1つがB細胞抗原を標的化し、かつもう一方の抗体がT細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除される。抗体の1つがCD20を標的化し、かつもう一方の抗体がCD3bまたはCD40を標的化する、別個の抗体の組み合わせも排除される。

【0032】

「特異的に反応する」という用語は、抗原に対する抗体または抗体フラグメントの結合だけでなく、その同族のリガンドに対するレセプターの結合も包含する。例えば、先天的免疫系の炎症促進性エフェクターのレセプターは、その炎症促進性のエフェクター同族リガンドと「特異的に反応し」、従って本発明の範囲内におさまる。いくつかの実施形態では、多特異的アンタゴニストは、2つの別個の抗体の組み合わせである。他の実施形態では、これは多特異的抗体、詳細には融合タンパク質である。

【0033】

一実施形態では、多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、この抗体のうちの1つがCD19、CD20、CD21、CD22、CD23またはCD80を標的化し、かつもう一方の抗体が補体因子を標的化する組み合わせが排除される。さらに詳細には、多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、この抗体のうちの1つがCD19、CD20、CD21、CD22、CD23またはCD80を標的化し、かつもう一方の抗体がC3bまたはCD40を標的化する組み合わせが排除される。

【0034】

先天的免疫系の炎症促進性エフェクターは、炎症促進性エフェクターサイトカイン、炎症促進性エフェクターケモカイン、または炎症促進性エフェクターレセプターであってもよい。適切な炎症促進性エフェクターサイトカインとしては、MIF、HMGB-1（高移動度群ボックスタンパク質1）、TNF- α 、IL-1、IL-4（インターロイキン4）、IL-5（インターロイキン5）、IL-6、IL-8、IL-12（インターロイキン12）、IL-15（インターロイキン15）、IL-17（インターロイキン17）、およびIL-18（インターロイキン18）が挙げられる。炎症促進性エフェクターケモカインの例としては、CCL19、CCL21、IL-8、MCP-1、RANTES、MIP-1A、MIP-1B、ENA-78、MCP-1、IP-10、GROBおよびエオタキシン（Eotaxin）が挙げられる。炎症促進性エフェクターレセプターとしてはIL-4R（インターロイキン4レセプター）、IL-6R（インターロイキン6レセプター）、IL-13R（インターロイキン-13レセプター）、IL-15R（インターロイキン-15レセプター）、IL-17R（インターロイキン-17レセプター）およびIL-18R（インターロイキン-18レセプター）が挙げられる。

【0035】

多特異的アンタゴニストはまた、少なくとも1つの凝固因子、詳細には組織因子（TF）またはトロンビンと特異的に反応し得る。他の実施形態では、多特異的アンタゴニストは、少なくとも1つの補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応する。好ましい実施形態では、その補体因子は、C3、C5、C3a、C3bおよびC5aからなる群より選択される。これらの実施形態では、標的の組み合わせは好ましくは、上記アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせである場合、他の抗体がCD19、CD20、CD21、CD22、CD23またはCD80を標的化する組み合わせを含まない。このアンタゴニストが補体調節タンパク質と特異的に反応する場合、この補体調節タンパク質は好ましくは、CD46、CD55、CD59およびmCRPからなる群より選択される。

【0036】

一実施形態では、多特異的アンタゴニストは、特異性が異なる2つ以上の抗体であって、その各々が、先天的免疫系の異なる炎症促進性エフェクターと特異的に反応する、抗体を含む。あるいは、この多特異的アンタゴニストは、特異性の異なる2つ以上の抗体であって、その各々が異なる凝固因子と特異的に反応する抗体を含む。別の実施形態では、この多特異的アンタゴニストは、特異性の異なる2つ以上の抗体であって、その各々が異なる補体因子または補体調節タンパク質と特異的に反応する抗体を含む。さらに他の実施形態では、この2つ以上の抗体は、先天的免疫系の少なくとも1つの炎症促進性エフェクターと、そして少なくとも1つの凝固因子と、または先天的免疫系の少なくとも1つの炎症促進性エフェクターと、そして少なくとも1つの補体因子または補体調節タンパク質と、または少なくとも1つの補体因子もしくは補体調節タンパク質と、そして少なくとも1つ

の凝固因子とそれぞれ特異的に反応する。あるいは、この多特異的アンタゴニストは、先天的免疫系の2つ以上の炎症促進性エフェクターと、または2つ以上の凝固因子と、または2つ以上の補体因子もしくは補体調節タンパク質と特異的に反応し得る。

【0037】

2つ以上の抗体は、先天的免疫系の同じ炎症促進性エフェクターの2つ以上のエピトープ、または同じ凝固因子の2つ以上のエピトープ、または同じ補体因子もしくは補体調節タンパク質の2つ以上のエピトープと特異的に反応し得る。任意のこれらの実施形態では、多特異的アンタゴニストはさらに、炎症性もしくは免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的と反応し得、この標的は、上記で規定されるように、(A)、(B)または(C)標的ではない。他の実施形態では、多特異的アンタゴニストは、炎症性もしくは免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんと特異的に関連する標的、及び上記のような1つ以上の(A)、(B)または(C)と特異的に関連する標的と反応する。病的血管新生の有用な標的の例は、F l t - 1である。

10

【0038】

本発明の任意の実施形態では、多特異的アンタゴニストは、多特異的抗体であってもよく、ここでこの抗体の異なるアームが、本明細書に説明された条件下で、異なる標的と反応する。このような多特異的構築物はまた、R o s s i (特許出願W O 0 4 0 9 4 6 1 3 A 2)に記載されているように、抗原標的に対する結合を増強するために、同じ抗原エピトープに対して任意のまたは全ての結合アームにおいて多価性を有してもよい。

20

【0039】

あるいは、多特異的アンタゴニストは、少なくとも1つの可溶性レセプターを、または少なくとも1つの炎症促進性エフェクターレセプターの少なくとも1つの細胞外ドメインを含んでもよい。一実施形態では、このアンタゴニストは、少なくとも1つの抗体に融合された少なくとも1つの可溶性レセプター、または炎症促進性エフェクターレセプターの少なくとも1つの細胞外ドメインを含む。

【0040】

多特異的アンタゴニストは、炎症促進性エフェクターレセプターと反応的である少なくとも1つの分子を含んでもよい。この分子は好ましくは、炎症促進性エフェクターレセプターの天然のアンタゴニスト、またはこのレセプターと特異的に相互作用するアンタゴニストのフラグメントもしくは変異体である。一実施形態では、この天然のアンタゴニストは、天然のI L - 1レセプターアンタゴニスト、またはこのアンタゴニストのフラグメントもしくは変異体である。

30

【0041】

この多特異的アンタゴニストはさらに、樹状細胞、顆粒球、単球、マクロファージ、N K細胞、血小板、または内皮細胞を標的化し得る。いくつかの実施形態では、この多特異的アンタゴニストは、適応性免疫系の少なくとも1つの抗原またはレセプターと特異的に反応する。他の実施形態では、この多特異的アンタゴニストは、がん細胞レセプターまたはがん関連抗原、例えば、B細胞系列の抗原(C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、など)、V E G F R、E G F R、がん胎児性抗原(C E A)、胎盤成長因子(P L G F)、テナスシン(tenascin)、H E R - 2 / n e u、E G P - 1、E G P - 2、C D 2 5、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 5、C D 5 2、C D 7 4、C D 8 0、C D 1 3 8、N C A 6 6、M U C 1、M U C 2、M U C 3、M U C 4、M U C 1 6、I L - 6、 α -フェトプロテイン(A F P)、A 3 3、C A 1 2 5、結腸特異的抗原-p (C S A p)、葉酸レセプター、H L A - D R、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(H C G)、I a、E L - 2、インスリン様成長因子(I L G F)およびI L G Fレセプター、K S - 1、L e (y)、M A G E、壊死抗原、P A M - 4、前立腺酸性フォスファターゼ(P A P)、P r 1、前立腺特異的抗原(P S A)、P S M A、S 1 0 0、T 1 0 1、T A C、T A G 7 2、T R A I Lレセプター、および炭酸脱水酵素I Xと特異的に反応する。増殖性骨髄細胞を標的化するF l t - 3も特定のがんを同定および治療するのに有用で

40

50

ある。あるいは、多特異的アンタゴニストは、C5a、第H因子、FHL-1、LPS、IFN γ もしくはB7のような標的と、またはCD2、CD4、CD14、CD18、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD29、CD38、CD40L、CD52、CD64、CD83、CD147もしくはCD154のような標的と特異的に反応し得る。

【0042】

多特異的アンタゴニストは、単一の活性成分を含んでもよいし、または複数の活性成分を含んでもよい。単一の活性成分を含む実施形態は、定義によれば2つ以上の活性成分を含む抗体の混合物は包含しない。2つ以上の活性成分を含む多特異的アンタゴニストとしてはまた、先天的免疫系の成分、適応性免疫系の成分、凝固、感染性因子、またはがん細胞に影響する二次治療剤を挙げてもよい。

10

【0043】

多特異的アンタゴニストは、感染性疾患、急性呼吸窮迫症候群、敗血症または敗血性ショック、移植片対宿主病または移植片拒絶、アテローム性動脈硬化症、喘息、座瘡、巨細胞性動脈炎、肉芽腫性疾患、神経障害、悪液質、血液凝固障害、例えば、汎発性血管内凝固(DIC)または心筋虚血のような特定の疾患および状態と関連する、標的またはマーカーと特異的に反応し得る。

【0044】

多特異的アンタゴニストは、炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患のような状態を治療するのに有用である。治療は、この状態のうちの1つを有すると診断されている患者に対して、多特異的アンタゴニストの治療上有効な量を投与する工程を含む。一実施形態では、この炎症性または免疫調節不全障害は、自己免疫疾患ではない。多特異的アンタゴニストは、敗血症または敗血性ショック、感染性疾患(細菌、ウイルス、真菌または寄生生物)、神経障害、移植片対宿主病または移植片拒絶、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫性疾患、喘息、アテローム性動脈硬化症、座瘡、巨細胞性動脈炎、血液凝固障害、例えば、汎発性血管内凝固(DIC)または悪液質を治療するために用いられ得る。他の実施形態では、この状態は、自己免疫疾患、特にクラスIIIの自己免疫疾患である。

20

【0045】

多特異的アンタゴニストはまた、病的血管新生またはがんを治療するために用いられ得る。がんは、造血系のがん、例えば、白血病、リンパ腫、または骨髄腫などであってもよい。あるいは、がんは、固形腫瘍、例えば、癌腫、黒色腫、肉腫、神経膠腫などであってもよい。

30

【0046】

多特異的アンタゴニストは、治療剤、例えば、放射性核種、免疫調節物質、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素インヒビター、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤、細胞毒性剤、抗体、血管新生インヒビター、およびそれらの組み合わせを含む免疫コンジュゲートであってもよい。治療剤がオリゴヌクレオチドである場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0047】

他の実施形態では、治療剤は、細胞毒性物質、例えば、薬物または毒素である。薬物は、抗有糸分裂性、アルキル化、代謝拮抗、血管新生阻害、アポトーシス性、アルカロイド、プロテアソームインヒビターおよび抗生物質製剤およびそれらの組み合わせからなる群より選択される薬学的特性を保有し得る。特定の実施形態では、この薬物は、ナイトロジェン・マスタード、ゲムシタビン、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホナート、ニトロソウレア、トリアゼン(triazene)、葉酸類似体、アントラサイクリン、SN-38、タキサン(taxane)、COX-2インヒビター、ピリミジン類似体(例えば、5-フルオロウラシル)、プリン類似体、抗生物質、酵素、酵素インヒビター、プロテアソームインヒビター、エピポドフィロトキシン、白金配位錯体、ビンカ・アルカロイド、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモンアンタゴニスト、

40

50

エンドスタチン、タキソール、カンプトテシン、ドキソルビシンおよびそれらの類似体、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗有糸分裂剤、血管新生阻害剤、アポトーシス剤、メトトレキサート、CPT-11およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。毒素は、動物、植物および微生物供給源からなる群より選択される供給源由来であってもよく、そして好ましくは、リシン、アブリン、 α 溶血毒、サポリン、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌性 (Staphylococcal) エンテロトキシン A、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素およびシュードモナス内毒素からなる群より選択される。

【0048】

他の実施形態では、この治療剤は、免疫調節剤、例えば、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン (IFN)、幹細胞増殖因子、エリスロポエチン、トロンボポエチンおよびそれらの組み合わせである。リンホトキシンは、腫瘍壊死因子 (TNF) であってもよく、造血因子は、インターロイキン (IL) であってもよく、コロニー刺激因子は、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) であってもよく、このインターフェロンは、インターフェロン α 、 β または γ であってもよく、そして幹細胞成長因子は、S1 因子であってもよい。好ましくは、この免疫調節因子は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、IL-18、IL-21、インターフェロン γ 、TNF- α 、またはその組み合わせを含む。

【0049】

あるいは、治療剤は、放射性核種である。好ましくは、この放射性核種は、60~700 keV のエネルギーを有し、好ましくは、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 ^{111}Ag 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{198}Au 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra および ^{225}Ac 、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0050】

他の実施形態では、治療剤は、光活性治療剤、例えば、色原体およびまたは色素である。治療剤はまた、酵素であってもよい。この酵素は好ましくは、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、 δ -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含む群から選択される。

【0051】

多特異的アンタゴニストは、診断／検出物質を含んでもよい。この診断／検出物質は、診断用放射性核種、造影剤、蛍光標識および光活性物質からなる群より選択され得る。

【0052】

本発明はまた、炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患から選択される条件を診断または検出する方法を提供し、この方法は、本発明による多特異的アンタゴニストの診断上有効な量を、このような状態を有すると疑われている患者に対して投与する工程と；標的部位で多特異的アンタゴニストが融合することを可能にする工程と；多特異的抗体が循環して血流から除去されることを待つか、またはクリアリング剤を用いる工程と；検出手段を用いてこのような部位で、標識された多特異的アンタゴニストの上昇したレベルを検出することによって、標識された多特異的アンタゴニストの付着の部位を位置決めする工程とを含む。

【0053】

炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患から選択される状態を診断または検出する別の方法は、ハプテン結合部位を含む、本発明による

10

20

30

40

50

多特異的アンタゴニストの診断上有効な量を、このような状態を有すると疑われている患者に対して投与する工程と；標的部位で多特異的アンタゴニストが融合することを可能にする工程と；血流から除去するために多特異的抗体が循環することを待つ工程と；診断物質／検出物質で標識されたハプテンをこの被験体に投与する工程と；多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に対して標識されたハプテンが結合することを可能にする工程と；検出手段を用いてこのような部位で、標識されたハプテンに結合された多特異的アンタゴニストの上昇したレベルを検出することによって、多特異的アンタゴニストの付着の部位を位置決めする工程とを包含する。

【0054】

本発明はまた、炎症性または免疫調節不全障害、病的血管新生もしくはがん、および感染性疾患から選択される状態を治療する方法を提供し、この方法は、ハプテン結合部位を含む、本発明による多特異的アンタゴニストの治療上有効な量を、このような状態を有すると疑われている患者に対して投与する工程と；標的部位で多特異的アンタゴニストが融合することを可能にする工程と；血流から除去するために多特異的抗体が循環することを待つ工程と；治療剤を含むハプテンを被験体に投与する工程と；多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に対してハプテンがこの治療剤とともに結合することを可能にする工程とを含む。

【発明を実施するための形態】

【0055】

定義

以下の説明において、及び引用することにより本明細書の一部をなすものとする文書では、多数の用語が広範に用いられる。以下の定義は、本発明の理解を容易にするために示される。

【0056】

構造遺伝子とは、メッセンジャーRNA（mRNA）に転写され、次いで特定のポリペプチドに特有のアミノ酸配列に翻訳されるDNA配列である。

【0057】

プロモーターとは、構造遺伝子の転写を指示するDNA配列である。代表的には、プロモーターは、構造遺伝子の転写開始部位に近位である、遺伝子の5'領域に位置する。プロモーターが誘導性プロモーターであるならば、転写の速度は、誘導性物質に応答して増大する。対照的に、転写の速度は、プロモーターが構成的プロモーターである場合には誘導性物質によっては調節されない。

【0058】

単離されたDNA分子とは、生物体のゲノムDNAに組み込まれていないDNAのフラグメントである。例えば、クローニングされた抗体遺伝子は、哺乳動物細胞のゲノムDNAから分離されているDNAフラグメントである。単離されたDNA分子の別の例は、生物体のゲノムDNAに組み込まれていない化学的に合成されたDNA分子である。

【0059】

エンハンサーとは、転写の開始部位に対するエンハンサーの距離にも方向にもかかわらず、転写の有効性を増大し得るDNA調節性エレメントである。

【0060】

相補的DNA（cDNA）とは、逆転写酵素によってmRNAのテンプレートから形成される一本鎖DNA分子である。代表的には、mRNAの一部に相補的であるプライマーを逆転写の開始に使用する。当業者はまた、このような一本鎖DNA分子およびその相補的なDNA鎖からなる二本鎖DNA分子を指すためにもこの「cDNA」という用語を用いる。

【0061】

発現という用語は、遺伝子産物の生合成を指す。例えば、構造遺伝子の場合、発現とは、mRNAへの構造遺伝子の転写、および1つ以上のポリペプチドへのmRNAの翻訳を包含する。

【0062】

クローニングベクターとは、宿主細胞において自立的に複製し得る能力を有する、プラスミド、コスミドまたはバクテリオファージのようなDNA分子である。クローニングベクターは代表的には、1または少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位であって、そこで外来DNA配列が、ベクターの必須の生物学的な機能の損失なしで検出可能な様式で挿入され得る部位と、クローニングベクターで形質転換された細胞の同定および選択における使用に適切であるマーカー遺伝子とを含む。マーカー遺伝子としては代表的には、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性を提供する遺伝子が挙げられる。

【0063】

発現ベクターとは、宿主細胞中で発現される遺伝子を含むDNA分子である。代表的には、遺伝子発現は、構成プロモーターまたは誘導性プロモーター、組織特異的調節性エレメントおよびエンハンサーを含む、特定の調節性エレメントの制御下におかれる。このような遺伝子は、調節性エレメントに対して「作動可能に連結される」と言われる。

【0064】

組み換え宿主は、クローニングベクターまたは発現ベクターのいずれかを含む任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。この用語はまた、宿主細胞の染色体またはゲノム中にクローニングされた遺伝子（単数または複数）を含むように遺伝子操作されている原核生物または真核生物細胞を含む。

【0065】

本明細書において用いる場合、抗体とは、裸の抗体およびコンジュゲートされた抗体および抗体フラグメントを包含し、これは単一特異性であっても多特異的であってもよい。これは、組み換え抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体および融合タンパク質を含む。

【0066】

キメラ抗体とは、げっ歯類の抗体に由来する可変のドメインおよび相補性決定領域を含む組み換えタンパク質であるが、残りの抗体分子は、ヒト抗体に由来する。

【0067】

ヒト化抗体とは、モノクローナル抗体のマウス相補性決定領域が、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変鎖からヒト可変領域ドメインに転移されている組み換えタンパク質である。ヒト化マウス抗体（CDR移植片）は、ヒトIgGのFRへ移植されたマウスCDRを有する。CDR移植されたヒト可変鎖は、ヒト抗体の定常領域に融合されて、インタクトなヒト化IgGが得られる。

【0068】

ヒト抗体とは、ヒトから単離されて次いで培養物中で増殖されるか、またはヒト抗体を産生することによって抗原刺激に応答するように免疫系が変更されている動物を用いて作成される抗体である。

【0069】

抗体フラグメントとは、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 sFv などのようなインタクトな抗体の一部である。構造にかかわらず、抗体フラグメントは、全長抗体によって認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗CD20モノクローナル抗体フラグメントは、CD20のエピトープと結合する。「抗体フラグメント」という用語はまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように作用する任意の合成または遺伝子操作されたタンパク質を包含する。例えば、抗体フラグメントとしては、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメントのような、可変領域からなる単離されたフラグメント、軽鎖および重鎖の可変領域がペプチドリンカーによって接続されている組み換え単鎖ポリペプチド分子（「scFvタンパク質」）、および超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位が挙げられる。

【0070】

野性型抗体の制限されたタンパク質分解によって生成される抗体フラグメントは、タンパク質分解性抗体フラグメントと呼ばれる。これらとしては、限定はしないが、以下が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0071】

F (a b ')₂フラグメントは、タンパク質分解性酵素、例えば、ペプシンまたはフィシンに対する抗体の制限された曝露によって抗体から放出される。F (a b ')₂フラグメントは、2つの「アーム (a r m)」であって、その各々が共通の抗原に向かって、そして特異的に結合する可変領域を含む、アームを含む。この2つのF a b ' 分子は、重鎖のヒンジ領域における鎖間ジスルフィド結合によって結合される；F a b ' 分子は、同じ（二価）または異なる（二重特異的な）エピトープに対して向けられ得る。

【0072】

F a b ' フラグメントは、F a bを含む単一の抗結合ドメイン、およびヒンジ領域を通じて重鎖のさらなる一部を含む。

10

【0073】

F a b ' - S Hフラグメントは代表的には、F (a b ')₂フラグメントから生成され、これは、F (a b ')₂フラグメントにおけるH鎖の間のジスルフィド結合によってお互いに保持される。温和な還元剤、例えば、非限定的な例として、βメルカプトエチルアミンでの処理は、ジスルフィド結合を破壊し、そして2つのF a b ' フラグメントが、1つのF (a b ')₂フラグメントから遊離される。F a b ' - S Hフラグメントは、一価でかつ単一特異的である。

【0074】

F a bフラグメント（すなわち、抗原結合ドメインを含み、そして軽鎖およびジスルフィド結合によって架橋された重鎖の一部を含む抗体フラグメント）は、インタクトな抗体のパパイン消化によって生成される。好都合な方法は、酵素が容易に除去でき、消化が終わるように、樹脂に固定されたパパインを使用することである。F a bフラグメントは、F (a b ')₂フラグメントに存在するH鎖の間にジスルフィド結合（単数または複数）を有さない。

20

【0075】

単鎖抗体は、抗体フラグメントの1タイプである。単鎖抗体という用語は、しばしば、「s c F v」または「s F v」と略される。これらの抗体フラグメントは、分子遺伝学および組み換えDNA技術を用いて生成される。単鎖抗体は、相互作用して抗原結合部位を形成するV_HおよびV_Lドメインの両方を含むポリペプチド鎖からなる。このV_HおよびV_Lドメインは通常、10～25のアミノ酸残基のペプチドによって結合される。「単鎖抗体」という用語は、さらに、2つの単鎖抗体（各々が異なるエピトープに向けられ得る）がジスルフィド結合によって一緒に結合される、ジスルフィド結合されたF v (d s F v)と；異なる特異性の2つの別個のs c F v sがペプチドリinkerで接続される二重特異的s F vと；二重特異性抗体（第一のs F vのV_Hドメインが第二のs F vのV_Lドメインと会合し、かつ第一のs F vのV_Lドメインが第二のs F vのV_Hドメインと会合する場合に形成される二量体化s F v；二重特異性抗体の2つの抗原結合領域は、同じまたは異なるエピトープへ向けられてもよい）と；三重特異性抗体(triabody)（二重特異性抗体と同様の方式で形成されるが、3つの抗原結合ドメインが単一の複合体中で作成される三量体化s F v；3つの抗原結合ドメインは、同じまたは異なるエピトープに向けられてもよい）を含むが、これらには限定されない。従って、s c F V、二重特異性抗体または三重特異性抗体を作製する場合、定常領域は用いられず、ヒト化可変領域がリンカーと結合される。

30

40

【0076】

相補性決定領域ペプチドまたはCDRペプチドは、抗体フラグメントの別の形態である。CDRペプチド（「最小認識単位」としても既知）とは、単一の相補性決定領域（CDR）に対応するペプチドであって、目的の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって調製され得る。このような遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成することによって、調製される。例えば、L a r r i c k e t a l . , M e t h o d s : A C o m p a n i o n t o M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 : 1 0 6 , 1 9 9 1を参照のこと。

50

【0077】

システイン修飾抗体では、システインアミノ酸を遺伝子操作によって抗体の表面上に挿入するかまたは置換して、これを用いて、この抗体を、例えば、ジスルフィド架橋を介して別の分子にコンジュゲートする。抗体についてのシステイン置換または挿入が記載されている（例えば、米国特許第5,219,996号を参照のこと）。抗体の部位特異的なコンジュゲートにおける使用のためにIgG抗体の定常領域にCys残基を導入するための方法は、Stimmell et al. (J Biol. Chem 275:330445-30450, 2000)によって記載されている。

【0078】

本明細書において用いる場合、治療剤とは、治療のために有用なコンジュゲートを生成するために抗体部分にコンジュゲートされた、分子または原子である。これらは、甲状腺新生物において ^{131}I と、がん、自己免疫疾患、移植片対宿主病において種々の細胞毒性薬物と、そして器官移植について誘導された免疫抑制においてなどのように、抗体に対してコンジュゲートしなくなった場合に活性にされ得る。治療剤の例としては、治療用放射性核種、ホウ素化合物、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素インヒビター、光活性治療剤、細胞毒性剤、および血管新生インヒビター、ならびにそれらの組み合わせが挙げられ、そしてこれらは、米国公開出願第20040057902号に記載されている。好ましい治療的放射性同位体としては、80~500keVのkeV範囲を有する β 、 α およびオージェエミッターが挙げられる。例示的な治療的放射性同位体としては、 ^{225}Ac 、 ^{177}Lu 、 ^{198}Au 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、および ^{211}At が挙げられる。

【0079】

診断／検出物質とは、本発明による多特異的アンタゴニスト、すなわち、抗体または抗体フラグメントまたはサブフラグメントにコンジュゲートされて投与され、そして抗原を含有する細胞を位置決めすることによって疾患を診断するのに有用である分子または原子である。有用な診断／検出物質としては、限定はしないが、放射性同位体、色素（例えば、ビオチン-ストレプトアビジン複合体を有するもの）、造影剤、蛍光化合物、または磁気共鳴画像化(MRI)のためのそして超音波およびコンピューター断層撮影法のための、分子および造影剤（例えば、常磁性イオン）が挙げられる。

【0080】

裸の抗体は、治療剤とコンジュゲートされていない抗体である。裸の抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびに特定の組み換え抗体、例えば、キメラ抗体およびヒト化抗体が挙げられる。

【0081】

コンジュゲートされた抗体とは、診断物質または治療剤とコンジュゲートされた抗体または抗体フラグメントである。

【0082】

多特異的な抗体とは、異なる構造である少なくとも2つの標的、例えば、同じ抗原上の2つの異なる抗原、2つの異なるエピトープ、あるいはハプテンおよび／または抗原もしくはエピトープに対して同時に結合され得る抗体である。結合アームの2つ以上が、同じ抗原の同じまたは異なるエピトープに向かってもよく、これによって、多価特異性(multispecificity)に加えて多価性(multivalency)が構築される。

【0083】

二重特異的な抗体とは、異なる構造である2つの標的に対して同時に結合し得る抗体または抗体フラグメント構築物である。

【0084】

融合タンパク質とは、組み換えにより生成された抗原結合分子であって、同じまたは異なる特異性を有する2つ以上の異なる単鎖抗体または抗体フラグメントセグメントが結合される分子である。種々の二重特異的な融合タンパク質が分子操作を用いて生成され得る。一形態では、二重特異的な融合タンパク質は一価であって、これは、例えば、ある抗原

について単独の結合部位を有する s c F v および第二の抗原について単独の結合部位を有する F a b フラグメントから構成される。別の形態では、二重特異的融合タンパク質は、二価であって、例えば、ある抗原について2つの結合部位を有する I g G および第二の抗原について2つの結合部位を有する2つの s c F v から構成される。

【0085】

感染性疾患とは、微生物または寄生生物によって生じる疾患である。

【0086】

微生物とは、ウイルス、細菌、リケッチア、マイコプラズマ、真菌などの微生物である

【0087】

寄生生物とは、感染性であって、一般に顕微鏡でしか見えない、または極めて小さく、多細胞の無脊椎動物、原生動物、またはそれらの卵子もしくは若年型であり、これは抗体誘導性クリアランスに対して、または溶解性もしくは食細胞性の破壊に対して感受性である。

【0088】

多特異的アンタゴニスト

本発明は、少なくとも2つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストを提供する。異なる標的としては、先天的免疫系の炎症促進性エフェクター、凝固因子、補体因子および補体調節タンパク質、及び炎症性または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、感染性病原体と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくはがんの特異的に関連する標的が挙げられ、この後者のクラスの標的は免疫系の炎症促進性エフェクターでも凝固因子でもない。多特異的アンタゴニストが、炎症性もしくは免疫調節不全障害と、病的血管新生もしくはがん、または感染性疾患と関連する標的と特異的に反応する場合、これはまた、免疫系の少なくとも1つの炎症促進性エフェクター、少なくとも1つの凝固因子、または少なくとも1つの補体因子もしくは補体調節タンパク質と特異的に結合する。従って、多特異的アンタゴニストは、異常細胞、病的血管新生もしくはがん、または感染性疾患に関連する少なくとも1つの結合特異性、および免疫系の成分、例えば、B細胞、T細胞、好中球、単球およびマクロファージ、および樹状細胞のレセプターもしくは抗原、または凝固の調節因子、例えば、トロンビンもしくは組織因子、または炎症促進性サイトカイン、例えば、I L - 1、I L - 6、I L - 10、H M G B - I および M I F に対する少なくとも1つの特異性を含む。

【0089】

多特異的アンタゴニストが単一の多特異的な抗体を含むならば、C D 7 4 は、このようなアンタゴニストの標的として排除される。さらに、多特異的アンタゴニストが別個の抗体の組み合わせを含む場合、成分の1つがB細胞抗原を標的化し、そして他の成分がT細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除される。

【0090】

本発明は、多特異的タンパク質および抗体、ならびにそのフラグメントを含む組成物に関するとともに、複数の別個のタンパク質もしくは抗体、またはそのフラグメントの組み合わせを含む組成物に関する。従って、一実施形態では、この多特異的アンタゴニストは、抗体融合タンパク質または異種コンジュゲートである。別の実施形態では、この多特異的アンタゴニストは、異なる標的に結合する少なくとも2つの別個の抗体を含む抗体混合物である。この実施形態では、2つ以上の抗体または抗体コンジュゲートは、同時にまたは連続して与えられる。この多特異的アンタゴニストは、裸であってもよいが、また診断用画像化剤（例えば、同位体、放射線学的造影剤）に対して、または放射性核種、ホウ素化合物、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素インヒビター、光反応性治療剤、細胞傷害性物質、血管新生インヒビター、およびそれらの組み合わせを含む治療剤にコンジュゲートされていてもよい。標的に対する多特異的アンタゴニストの結合は、ダウンレギュレートされてもよいし、そうでなければ免疫細胞

胞機能に影響してもよいが、多特異的アンタゴニストはまた、免疫細胞機能に直接影響しない他の標的に結合してもよい。例えば、CD66またはCEACAM6（例えば、NCA90またはNCA95）に対するような、抗顆粒球抗体は、感染した組織で顆粒球を標的化するために用いられてもよく、そしてまたCEACAM6を発現するがんを標的化するために用いられてもよい。

【0091】

一実施形態では、治療剤はオリゴヌクレオチドである。例えば、このオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであっても、または二本鎖の干渉RNA（RNAi）分子であってもよい。このオリゴヌクレオチドは、bc1-2またはp53のようながん遺伝子に対するものでもよい。bc1-2発現を阻害するアンチセンス分子は、米国特許第5,734,033号に記載されている。これは、本発明の多特異的アンタゴニストの治療剤部分にコンジュゲートされるか、または本発明の多特異的アンタゴニストの治療剤部分を形成し得る。あるいは、このオリゴヌクレオチドは、本発明の多特異的アンタゴニストと同時にまたは連続して投与されてもよい。

【0092】

別の実施形態では、この治療剤は、付加されたホウ素であり、そして治療には、治療剤の局在化後に熱中性子または熱外中性子での照射を要する。この治療剤はまた、光活性治療剤、特に色素原または色素であるものであってもよい。

【0093】

好ましい実施形態では、この治療剤は細胞傷害性物質、例えば、薬物または毒素である。また好ましくは、薬物は、窒素、マスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソウレア、ゲムシタビン、トリアゼン(triazene)、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン(taxane)、COX-2インヒビター、ピリミジン類似体、プリン類似体、抗生物質、酵素、酵素インヒビター、エピボドフィロトキシン、白金配位錯体、ビンカ・アルカロイド、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモンアンタゴニスト、エンドスタチン、タキソール、SN-38、カンプトテシン、ドキソルビシンおよびそれらの類似体、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗有糸分裂剤、血管新生阻害剤、アポトーシス剤、メトトレキサート、CPT-11およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0094】

別の好ましい実施形態では、この治療剤は、動物、植物および微生物供給源からなる群より選択される供給源由来の毒素である。好ましい毒素としては、リシン、アブリン、α溶血毒、サポリン、リボヌクレアーゼ(RNase)、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルススタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素およびシュードモナス内毒素が挙げられる。

【0095】

この治療剤は、免疫調節剤、例えば、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン(IFN)、幹細胞増殖因子、エリスロポエチン、トロンプオエチンおよびそれらの組み合わせであってもよい。このようなリンホトキシンは、腫瘍壊死因子(TNF)である。造血因子は、インターロイキン(IL)であってもよく、コロニー刺激因子は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)であってもよく、このインターフェロンは、インターフェロンα、βまたはγであってもよく、そして幹細胞成長因子は、S1因子であってもよい。あるいは、この免疫調節物質は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、IL-18、IL-21、インターフェロンγ、TNF-α、またはその組み合わせを含んでもよい。

【0096】

好ましい治療的な放射性核種としては、80~500keVのkeV範囲を有するβ、αおよびオージェエミッターが挙げられる。例示的な治療的放射性同位体としては、³²P、³³P、⁴⁷Sc、¹²⁵I、¹³¹I、⁸⁶Y、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、⁶⁴Cu、⁶⁷

10

20

30

40

50

Cu、⁶⁷Ga、¹¹¹In、¹¹¹Ag、¹⁴²Pr、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Raおよび²²⁵Ac、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。例示的な光活性治療剤は、色素原およびまたは色素を含む群から選択される。

【0097】

さらに好ましくは、この治療剤は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、 δ -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含む群から選択される酵素である。

【0098】

多特異的アンタゴニストは、少なくとも1つの炎症促進性エフェクターサイトカイン、炎症促進性エフェクターケモカインまたは炎症促進性エフェクターレセプターに対して特異的に結合し得る。多特異的アンタゴニストが結合し得る炎症促進性エフェクターサイトカインとしては、限定はしないがMIF、HMGB-1、TNF- α （腫瘍壊死因子 α ）、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、およびIL-18が挙げられる。炎症促進性エフェクターケモカインの例としては、限定はしないが、CCL19、CCL21、IL-8、MCP-1（単球走化性タンパク質1）、RANTES、MIP-1A（マクロファージ炎症性タンパク質1A）、MIP-1B（マクロファージ炎症性タンパク質1B）、ENA-78（上皮好中球活性化ペプチド78）、IP-10、GROB（GRO β ）およびエオタキシン（Eotaxin）が挙げられる。炎症促進性エフェクターレセプターとしては、限定はしないが、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17RおよびIL-18Rが挙げられる。多特異的アンタゴニストはまた、少なくとも1つの凝固因子、例えば、組織因子またはトロンビンと特異的に反応し得る。このリンホカイン／サイトカインは、免疫細胞上のそれらのレセプターを反応して活性化を果たし、そして抗体は、リンホカイン／サイトカインを中和することによって活性化をブロックし得る。あるいは、抗体は、リンホカイン／サイトカインレセプターと反応して活性化をブロックし得る。

【0099】

多特異的アンタゴニストが特異的に結合する異なる標的は、エフェクターおよび凝固因子の同じまたは異なるクラスに由来し得る。例えば、このアンタゴニストが特異的に結合する2つ以上の異なる標的は、同じクラスのエフェクターまたは凝固因子、例えば、2つ以上の異なる炎症促進性エフェクターサイトカイン、2つ以上の異なる炎症促進性エフェクターケモカイン、2つ以上の異なる炎症促進性エフェクターレセプター、または2つ以上の凝固因子から選択され得る。あるいは、2つ以上の異なる標的は、異なるクラスのエフェクターおよび凝固因子から選択されてもよい。例えば、ある標的は、先天的免疫系の炎症促進性エフェクターであってもよく、そしてある標的は凝固因子であってもよい。または、このアンタゴニストは、2つの異なるクラスの炎症促進性エフェクター、例えば、少なくとも1つの炎症促進性エフェクターサイトカインおよび少なくとも1つの炎症促進性エフェクターケモカイン、少なくとも1つの炎症促進性エフェクターサイトカインおよび少なくとも1つの炎症促進性エフェクターレセプター、または少なくとも1つの炎症促進性エフェクターケモカインおよび少なくとも1つの炎症促進性エフェクターレセプターと特異的に反応し得る。多特異的アンタゴニストが特異的に反応する2つの異なる標的が、先天的免疫系の同じ炎症促進性エフェクターの2つ以上のエピトープ、または同じ凝固因子の2つ以上のエピトープであるという場合もあり得る。

【0100】

従って、「2つの異なる標的」とは、2つの異なる抗原を指しても、または同じ抗原の2つの異なるエピトープを指してもよい。複数の抗体は、同じ抗原に対して用いられても

10

20

30

40

50

よく、これによって価数が増大する。例えば、M I FまたはH M G B - Iを標的化する場合、詳細には敗血症、いくつかのがんおよびアテローム斑の治療について、標的の2つの同一のエピトープに対して結合する2つの抗体は、異なる抗原、例えばH L AクラスI I不変鎖抗原、例えばC D 7 4に対する1つ以上の結合アームを有する別の抗体と融合され得る。これらは、2つの異なる抗原に結合する二重特異的抗体または二機能性の抗体、例えば、M I FおよびC D 7 4に対する抗体；H M G B - IおよびC D 7 4に対する抗体の例である。三価特異的抗体および多特異的融合タンパク質も作成されて用いられてもよく、これによって3つ以上の抗原またはレセプター分子を標的化する。これらは、各々の抗原またはエピトープに対する単一の結合アームを有してもよく、または2つ以上の結合アームを有してもよく、これによって多価性が得られる。

10

【0101】

炎症促進性エフェクターレセプターが標的化される場合、好ましい実施形態では、この実際の標的は、炎症促進性エフェクターレセプターの細胞外ドメインであってもよい。炎症促進性エフェクターレセプターのこの細胞外ドメインは、抗体に融合されてもよい。さらに詳細には、この炎症促進性エフェクターは、抗体に融合される可溶性レセプターまたはレセプターリガンドであってもよい。別の実施形態では、この多特異的アンタゴニストは、炎症促進性エフェクターレセプターと反応性である少なくとも1つの分子を含んでもよい。この分子は、この炎症促進性エフェクターレセプターの天然のアンタゴニスト、またはレセプターと特異的に相互作用するこのアンタゴニストのフラグメントもしくは変異体であってもよい。好ましい実施形態では、この天然のアンタゴニストは、天然のI L - 1レセプターアンタゴニスト、またはこのアンタゴニストのフラグメントもしくは変異体である。

20

【0102】

多特異的アンタゴニストが特異的に結合する少なくとも2つの異なる標的のうちの1つは、免疫系の炎症促進性エフェクターでも凝固因子でもない標的であり得る。この場合、多特異的アンタゴニストはまた、免疫系の少なくとも1つの炎症促進性エフェクター、または少なくとも1つの凝固因子と特異的に結合する。一実施形態では、この少なくとも1つの他の標的は、適応性免疫系の抗原またはレセプターである。他の実施形態では、この多特異的アンタゴニストの少なくとも1つの他の標的は、先天的免疫系の細胞、例えば、顆粒球、単球、マクロファージ、樹状細胞、およびNK細胞を標的化する。他の標的としては、血小板および内皮細胞が挙げられる。標的のさらに別の群は、C 5 a、L P S、I F N γ およびB 7からなる群である。適切な標的のさらなる群としては、C D 2、C D 4、C D 1 4、C D 1 8、C D 1 1 a、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 2 9、C D 3 8、C D 4 0 L、C D 5 2、C D 6 4、C D 8 3、C D 1 4 7、およびC D 1 5 4が挙げられる。C Dは、免疫細胞上の標的であって、抗体によってブロックされて免疫細胞応答を予防し得る。C D 8 3は詳細には、活性な樹状細胞のマーカーとして有用である (C a o e t a l . , B i o c h e m J . , A u g . 2 3 , 2 0 0 4 (E p u b a h e a d o f p r i n t) ; Z i n s e r e t a l . , J . E x p M e d . 2 0 0 (3) : 3 4 5 - 5 1 (2 0 0 4)) 。

30

【0103】

特定の標的は、特別な目的のもの、例えば、M I F、H M G B - I、T N F - α 、補体因子および補体調節タンパク質、および凝固因子である。M I Fは、先天的免疫系における、またはその中心的なサイトカインであり、そして炎症性応答の制御において重要な部分を果たす。マクロファージ遊走阻止因子 (M I F) として既知のタンパク質である、マクロファージの無作為な遊走を阻害するTリンパ球由来因子としてもともと記載されていたのは、ほぼ30年間にわたって、不可解なサイトカインであった。近年では、脳下垂体前葉の生成物としてのM I Fの発見、ならびに生物活性の組み換えM I Fタンパク質のクローニングおよび発現によって、インビボにおけるその重要な生物学的役割の定義が導かれている。M I Fは、糖質コルチコイドによって刺激されているマクロファージおよびTリンパ球から放出されるという固有の特性を有する。一旦放出されれば、M I Fは、イン

40

50

ピトロにおけるLPS刺激単球による、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6およびIL-8産生に対する糖質コルチコイドの阻害性の影響を克服し、そしてインビボにおける致死性内毒素血症に対するステロイドの防御的効果を抑制する。MIFはまた、IL-2およびIFN- γ 産生を回復することによって、インビトロにおけるT細胞増殖の糖質コルチコイド阻害に拮抗する。MIFは、糖質コルチコイドの阻害性の効果に対抗して調節することができ、それによって炎症および免疫の宿主制御に重要な役割を果たすことが同定された最初のメディエーターである。MIFは詳細には、がん、病的血管新生および敗血症または敗血性ショックを治療するのに有用である。

【0104】

核および細胞質のタンパク質に結合するDNAであるHMGB-Iは、IL-1 β 、TNFまたはLPSによって活性化されている単球およびマクロファージによって放出される炎症促進性サイトカインである。そのBボックスドメインを介して、これは、DCの表現型成熟を誘導する。これはまた、炎症促進性サイトカインIL-1 α 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α およびRANTESの分泌の増大を生じる。壊死性の細胞によって放出されるHMGB-Iは、組織または細胞の損傷のシグナルであり得、これは、DCによって検出された場合、免疫応答を誘導およびまたは増強する。Palumbo et al. は、HMGB1が中胚葉性血管芽細胞の遊走および増殖を誘導することを報告する(J Cell Biol, 164:441-449 (2004))。

【0105】

HMGB-Iは、TNFおよびIL-1 β に関して有意に遅れた動態を示す内毒素誘発性の致死性の後期メディエーターである。TNFおよびIL-1 β 単独のような特定の早期炎症性メディエーターを標的化する実験的な治療剤は、臨床的には有効性は示されていないが、本発明による多特異的アンタゴニストは、初期および後期の両方の炎症性メディエーターを標的化することによって応答を改善し得る。

【0106】

HMGB-Iを標的化する多特異的アンタゴニストは、関節炎、詳細にはコラーゲン誘発性関節炎において特に有用である。HMGB-Iを含む多特異的アンタゴニストはまた、敗血症および／または敗血性ショックを治療するのに有用である。Yang et al., PNAS USA 101:296-301 (2004); Kokkola et al., Arthritis Rheum, 48:2052-8 (2003); Czura et al., J Infect Dis, 187 Suppl 2:S391-6 (2003); Treutiger et al., J Intern Med, 254:375-85 (2003)。

【0107】

TNF- α は、全身性の炎症および急性期の応答に関与する重要なサイトカインである。TNF- α は、刺激された単球、線維芽細胞および内皮細胞によって放出される。マクロファージ、T細胞およびBリンパ球、顆粒球、平滑筋細胞、好酸球、軟骨細胞、骨芽細胞、肥満細胞、グリア細胞およびケラチノサイトはまた、刺激後にTNF α を生じる。その放出は、例えば感染による損傷の経過において、いくつかの他のメディエーター、例えば、インターロイキン1および細菌の内毒素によって刺激される。それは、一般にはインターロイキン1およびインターロイキン6と一緒に、種々の器官系に対する多数の作用を有する。TNF- α の作用の1つは、食欲抑制であり；それによって、悪液質を治療するための多特異的アンタゴニストは好ましくはTNF- α を標的化する。これはまた、肝臓の急性期反応を刺激し、C反応性タンパク質および多数の他のメディエーターの増大をもたらす。これはまた、敗血症または敗血性ショックを治療する場合に有用な標的である。

【0108】

補体系は、細胞レセプターによってしばしば活性化される血清糖タンパク質のタンパク質分解性切断に関与する複雑なカスケードである。「補体カスケード」は、構成的で、かつ非特異的であるが、機能するためには活性化されなければならない。補体活性化は、一方向性の順序の酵素的および生化学的反応を生じる。このカスケードでは、特異的な補体

タンパク質 C 5 は、2つの高度に活性な炎症性副産物 C 5 a および C 5 b を形成し、これが一緒に白血球を活性化する。これが次に、傷害性のサイトカイン、炎症性酵素および細胞接着分子を含む、多数の他の炎症性副産物を惹起する。まとめると、これらの副産物は、多くの炎症性疾患でみられる組織の破壊をもたらし得る。このカスケードは最終的に、炎症性応答、食細胞走化性、およびオプソニン化および細胞溶解の誘発を生じる。

【0109】

補体系は、2つの異なる経路、古典的経路および代替経路を介して活性化され得る。ほとんどの補体成分は番号付けされる（例えば、C 1、C 2、C 3 など）が、いくつかは「因子(factor)」と呼ばれる。いくつかの成分は、その機能を活性化するためには酵素的に切断されなければならない；その他は単に組み合わさって活性である複合体を形成する。古典的経路の活性成分としては、C 1 q、C 1 r、C 1 s、C 2 a、C 2 b、C 3 a、C 3 b、C 4 a、および C 4 b が挙げられる。代替の経路の活性な成分としては、C 3 a、C 3 b、第 B 因子、第 B a 因子、第 B b 因子、第 D 因子およびプロペルジンが挙げられる。各々の経路の最後の段階は、同じであって、膜攻撃複合体への成分のアセンブリに関する。膜攻撃複合体の活性成分としては、C 5 a、C 5 b、C 6、C 7、C 8、および C 9 n が挙げられる。

【0110】

補体系の任意のこれらの成分は本発明による多特異的アンタゴニストによって標的化され得るが、特定の補体成分が好ましい。C 3 a、C 4 a および C 5 a は、肥満細胞に、ヒスタミンおよびセロトニンのような走化性因子を放出させ、これが食細胞、抗体および補体などを誘引する。これらは、本発明による好ましい標的の一群を形成する。好ましい標的の別の群としては、C 3 b、C 4 b および C 5 b が挙げられ、これが外来細胞の食作用を増強する。標的の別の好ましい群は、これらの二つの群についての先行の成分であり、すなわち、C 3、C 4 および C 5、C 5 b、C 6、C 7、C 8 および C 9 が、外来細胞の溶解を誘導し（膜攻撃複合体）、そして標的のさらに別の好ましい群を形成する。

【0111】

補体 C 5 a は C 3 a と同様に、アナフィラトキシンである。これは、炎症を媒介し、そして、抗菌プロテアーゼおよび酸素ラジカルの好中球の放出の誘導の走化性誘引物質である。従って C 5 a およびその前任者 C 5 は、特に好ましい標的である。C 5 を標的化することによって、C 5 a が影響されるだけでなく、C 5 b も影響され、これが膜攻撃複合体のアセンブリを開始する。従って C 5 は、別の好ましい標的である。C 3 b およびそれに先行する C 3 はまた、C 3 b に依存する古典的および代替的な補体経路の両方として、好ましい標的である。3つのタンパク質が、この因子、C 1 インヒビター、プロテイン H および第 I 因子のレベルに影響し、そしてこれらはまた、本発明による好ましい標的である。補体調節タンパク質、例えば、C D 4 6、C D 5 5 および C D 5 9 は、多特異的アンタゴニストが結合する標的であり得る。

【0112】

凝固因子はまた、本発明による好ましい標的、詳細には組織因子 (T F) およびトロンビンである。T F はまた、組織トロンボプラスチン、C D 1 4 2、第 I I I 凝固因子、または第 I I I 因子としても既知である。T F は膜内在性レセプター、糖タンパク質およびサイトカインレセプタースーパーファミリーのメンバーである。T F のリガンド結合細胞外ドメインは、2型サイトカインレセプターのメンバーとして T F の分類と一致する特徴を有する2つの構造的モジュールからなる。T F は血液凝固プロテアーゼカスケードに関与して、T F の細胞外ドメインと循環中の凝固因子、セリンプロテアーゼ第 V I I 因子または第 V I I a 因子との間で高親和性の複合体を形成することによって、外因性および内因性の両方の血液凝固カスケードを開始する。次いで、これらの酵素的に活性な複合体は、第 I X 因子および第 X 因子を活性化して、トロンビン生成および血餅形成をもたらす。

【0113】

T F は、単球、マクロファージおよび血管内皮細胞を含む種々の細胞タイプによって発現され、そして I L - 1、T N F - α または細菌のリボポリサッカライドによって誘導さ

10

20

30

40

50

れる。プロテインキナーゼCは、内皮細胞TF発現のサイトカイン活性化に関与する。エンドトキシンおよびサイトカインによるTFの誘導は、グラム陰性の敗血症を有する患者でみられる、播種性血管内凝固症候群の開始の重要な機構である。TFはまた、炎症、がん、脳機能、免疫応答および腫瘍関連血管新生を含む種々の非止血性機能に関与すると考えられる。従って、TFを標的化する多特異的アンタゴニストは、血液凝固障害の治療においてだけでなく、敗血症、がん、病的血管新生、ならびに本発明による他の免疫および炎症性の機能不全疾患の治療においても有用である。凝固経路とサイトカインネットワークとの間の複雑な相互作用は、いくつかのサイトカインが種々の細胞におけるTF発現に影響する能力によって、そしてレセプターに対するリガンド結合の影響によって示唆される。リガンド結合（第VIIa因子）は、細胞内カルシウムシグナルを与えることが報告され、これによってTFが真のレセプターであることが示される。

10

【0114】

トロンビンは、凝固因子II（プロトロンビン）の活性化型である。これは、フィブリノーゲンをフィブリンに変換する。トロンビンはマクロファージの強力な走化性因子であって、それらのサイトカイン産生およびアラキドン酸代謝を変更し得る。これは敗血症を伴う血液凝固障害では特に重要である。多くの研究によって、敗血症患者における、または動物モデルでのLPS投与後のいずれかにおける凝固系の活性化が実証されている。30年を超える研究にもかかわらず、LPS誘発性肝毒性の機構は、十分に理解されていないままである。それらは細胞性メディエーターと体液のメディエーターとの間の複雑かつ連続的な相互作用に関与することがいまや明らかである。同じ期間に、グラム陰性の全身性の敗血症およびその続発症は、大きな健康上の懸念になり、LPSまたは種々の炎症性メディエーターに対するモノクローナル抗体を用いる試みは、本明細書においていずれかに注記されているとおり、治療上失敗しか生じていない。トロンビンおよび少なくとも1つの他の標的を標的化する本発明による多特異的アンタゴニストは、敗血症治療における臨床的な失敗に取り組む。

20

【0115】

他の実施形態では、多特異的アンタゴニストは、MHCクラスI、MHCクラスIIまたはアクセサリー分子、例えば、CD40、CD54、CD80またはCD86に結合する。この多特異的アンタゴニストはまた、T細胞活性化サイトカインに、またはサイトカインメディエーター、例えば、NF-κBに結合し得る。

30

【0116】

特定の実施形態では、少なくとも2つの異なる標的のうち1つが、がん細胞レセプターまたはがん関連抗原であってもよく、詳細には、B細胞系列の抗原（CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、など）、VEGFR、EGFR、がん胎児性抗原（CEA）、胎盤成長因子（PLGF）、テナスシン(tenascin)、HER-2/neu、EGP-1、EGP-2、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD45、CD52、CD74、CD80、CD138、NCA66、CEACAM6（がん胎児性抗原関連細胞接着分子6）、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、IL-6、α-フェトプロテイン（AFP）、A3、CA125、結腸特異的抗原-p（CSAp）、葉酸レセプター、HLA-DR、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）、Ia、EL-2、インスリン様成長因子（ILGF）およびILGFレセプター、KS-1、Le(y)、MAGE、壊死抗原、PAM-4、前立腺酸性フォスファターゼ（PAP）、Pr1、前立腺特異的抗原（PSA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、S100、T101、TAC、TAG72、TRAILレセプター、および炭酸脱水酵素IXからなる群より選択されるものである。

40

【0117】

敗血症および免疫機能不全および他の免疫障害に関連する標的としては、MIF、IL-1、IL-6、IL-8、CD74、CD83、およびC5aRが挙げられる。抗体およびC5aRに対するインヒビターは、敗血症を有するげっ歯類（Huber-Lang et al., FASEB J 2002; 16: 1567-1574; Riedem

50

ann et al., J Clin Invest 2002; 110: 101-108) ならびにサルでの敗血症性ショックおよび成人呼吸窮迫症候群 (Hangen et al., J Surg Res 1989; 46: 195-199; Stevens et al., J Clin Invest 1986; 77: 1812-1816) において生存を改善することが見出されている。従って、敗血症については、少なくとも2つの異なる標的のうちの1つが好ましくは、LPS/C5aのような、感染に関連している標的である。他の好ましい標的としては、その各々が敗血症または敗血症性ショックに関連するHMGB-I、TF、CD14、VEGF、およびIL-6が挙げられる。好ましい多特異的アンタゴニストは、MIF/TF、およびHMGB-I/TFのようなHMGB-I、TFおよびMIF由来の2つ以上の標的を標的化するアンタゴニストである。

10

【0118】

さらに他の実施形態では、少なくとも2つの異なる標的のうちの1つが、MIFのような、移植片対宿主病または移植片拒絶に関連する標的であってもよい (Lo et al., Bone Marrow Transplant, 30(6): 375-80 (2002))。この少なくとも2つの異なる標的のうちの1つはまた、IL-8のように急性呼吸窮迫症候群と (Bouros et al., PMC Pulm Med, 4(1): 6 (2004)、MIFのようにアテローム性動脈硬化症または再狭窄と (Chen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24(4): 709-14 (2004)、IL-18のように喘息と (Hata et al., Int Immunol, Oct. 11, 2004、印刷前にEpub (電子公開))、TNF α のように肉芽腫症と (Ulbricht et al., Arthritis Rheum, 50(8): 2717-8 (2004)、カルバミル化EPO (エリスロポエチン) のように神経障害と (Leist et al., Science 305(5681): 164-5 (2004)、またはIL-6およびTNF- α のように悪液質と、関連する標的であってもよい。

20

【0119】

他の標的としては、C5a、LPS、IFN- γ 、B7; CD2、CD4、CD14、CD18、CD11a、CD11b、CD11c、CD14、CD18、CD27、CD29、CD38、CD40L、CD52、CD64、CD83、CD147、CD154が挙げられる。LPSを含む、特定の微生物抗原による単核球の活性化は、CD18、CD11b、またはCD11cに対する抗体によってある程度まで阻害され得、これによって β_2 -インテグリンにかかわる (Cuzzola et al., J Immunol 2000; 164: 5871-5876; Medvedev et al., J Immunol 1998; 160: 4535-4542)。CD83は、中程度および大きいサイズの動脈、主に大動脈弓の頭蓋外枝または大動脈自体に影響する全身性の脈管炎である、巨細胞性動脈炎 (GCA) においてある役割を果たし、これが血管狭窄症および引き続く組織虚血、ならびに重篤な合併症である失明、脳卒中および大動脈弓症候群を生じることが見出されている (Weyand and Goronzy, N Engl J Med 2003; 349: 160-169; Hunder and Valente, In: Inflammatory Diseases of Blood Vessels. G. S. Hoffman and C. M. Weyand, eds, Marcel Dekker, New York, 2002; 255-265)。CD83に対する抗体は、ヒトGCAのSCIDマウスモデルにおける脈管炎を抑止することが見出され (Mar-Krupa et al., J Exp Med 2004; 199: 173-183)、これによって、活性化された場合にCD83を発現する樹状細胞が、GCAにおける重要な抗原処理細胞であるということがこれらの研究者らに示唆された。これらの研究では、彼らは、マウス抗CD83モノクローナル抗体 (Mab) (Research DiagnosticsのIgG1クローンHB15e) を用いた。TNFファミリーのメンバーであるCD154は、CD4-陽性Tリンパ球の表面上で発現され、そしてCD154に対するヒト化モノクローナル抗体は、活発な全身性エリテマトーデス (SLE) を有す

30

40

50

る患者において有意な臨床的利点を生じたということが報告されている (Grammar et al, J Clin Invest 2003; 112: 1506-1520)。この抗体は他の自己免疫疾患で有用であり得ることも示唆される (Kelsoe, J Clin Invest 2003; 112: 1480-1482)。実際に、この抗体はまた、難治性の免疫性血小板減少症を有する患者において有効であることも報告された (Kuwana et al., Blood 2004; 103: 1229-1236)。

【0120】

関節リウマチでは、組み換えインターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、IL-1Raまたはアナキンラ (anakinra) (Kineret (登録商標)) が、活性を示す (Cohen et al., Ann Rheum Dis 2004; 63: 1062-8; Cohen, Rheum Dis Clin North Am 2004; 30: 365-80)。メトトレキサートでの同時の治療が必要なこれらの患者の治療における改善は、抗炎症促進性エフェクターサイトカインまたは抗炎症促進性エフェクターケモカイン (上記に列挙されるような) のうちの1つ以上とアナキンラを組み合わせることである。実際、関節リウマチのための抗体治療の概説において、Taylor (Curr Opin Pharmacol 2003; 3: 323-328) は、TNFに加えて、IL-1、IL-6、IL-8、IL-15、IL-17およびIL-18などのサイトカインに対する他の抗体が有用であることを示唆している。

【0121】

いくつかのさらに好ましい標的組み合わせとしては以下が挙げられる。

10

20

【表 1】

第一標的	第二標的
MIF	第二の炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
MIF	炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
MIF	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
MIF	凝固因子、特に TF または トロンビン
MIF	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
MIF	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
MIF	がん関連抗原またはレセプター
HMGB-1	第二の炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、TNF- α 、IL-1 または IL-6
HMGB-1	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
HMGB-1	炎症促進性エフェクターレセプター、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
HMGB-1	凝固因子、特に TF または トロンビン
HMGB-1	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
HMGB-1	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
HMGB-1	がん関連抗原またはレセプター
TNF- α	第二の炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
TNF- α	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
TNF- α	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
TNF- α	凝固因子、特に TF または トロンビン
TNF- α	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
TNF- α	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
TNF- α	がん関連抗原またはレセプター
LPS	炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
LPS	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
LPS	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
LPS	凝固因子、特に TF または トロンビン
LPS	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
LPS	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
TF または トロンビン	炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
TF または トロンビン	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
TF または トロンビン	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
TF または トロンビン	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
TF または トロンビン	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
TF または トロンビン	がん関連抗原またはレセプター

上記の各々において、多特異的とは、さらなる標的、例えば、第三の標的およびさらなる標的を含み得る。これは、好ましい組み合わせの例の列挙であるが、網羅的であることは意図しない。

【0122】

多特異的アンタゴニストは、少なくとも2つの別個の抗体および／またはレセプターまたは異なる標的に結合するそれらのリガンドを含む混合物であってもよいが、1つの好ま

しい実施形態では、このアンタゴニストは、少なくとも二重特異的である抗体であり、この抗体の異なるアームは、少なくとも2つの異なる標的と特異的に反応し、この標的は、先天的免疫系の炎症促進因子エフェクター、凝固因子、補体因子および補体調節タンパク質、ならびに炎症性または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、病的血管新生もしくははがんと特異的に関連する標的、または感染性疾患と特異的に関連する標的からなる群より選択される。

【0123】

多特異的アンタゴニストが少なくとも二重特異性である抗体である場合、特定の利点が存在し、これには血液からの急速なクリアランスが挙げられる。例えば、二重特異性抗体は、レポーターに対して、またはその標的分子、例えば、LPS、IL-1、IL-10、IL-6、MIF、HMGB1、TNF、IFN、組織因子、トロンビン、CD14、CD27、およびCD134に結合し得る。これらの多くは、レセプターとしておよび可溶性型としての両方で、血液中に存在する。二重特異的な抗体による結合は、血液からの急速なクリアランスを生じ、次いで、細胞、詳細にはリソソームによる輸送および分解のために、マクロファージのような別の細胞に対して融合タンパク質の第二のアームによる標的化を生じる。これは、第二の標的化アームがマクロファージおよび樹状細胞によって発現される、CD74のようなインターナライズする抗原に対する場合に特に有効である。これは、Hansenの発明米国特許第6,458,933号と一致するが、そこでは、炎症性サイトカインおよび他の免疫調節分子および免疫調節不全疾患のレセプター、ならびにこれらのがんの免疫療法のためのがん抗原に集中している。

【0124】

多特異的アンタゴニストは、単独の活性成分を含んでもよいし、または複数の活性成分を含んでもよい。例えば、多特異的アンタゴニストが複数の別個の抗体を含む場合、これらは、複数の活性成分を構成する。あるいは、多特異的アンタゴニストは、単独の活性成分、例えば、多特異的抗体であってもよく、これは可溶性レセプターに融合された少なくとも2つの異なる標的または単一特異的もしくは多特異的な抗体と特異的に反応する。多特異的アンタゴニストはまた、下に記載されるような他の二次的な治療モダリティとともにパッケージされてもよい。活性成分は、1つ以上の不活性成分、例えば、担体または希釈剤と、その成分が組み合わされる方式を説明する説明書とともにパッケージされてもよい。全ての成分は、キット成分の組み合わせおよび投与に関する説明書とともにキット形式で一緒に都合よくパッケージされる。この成分および物質はまた、別々にパッケージされて供給されてもよい。

【0125】

がんの治療のための好ましい多特異的アンタゴニストとしては、CD55に、そして上記のがん抗原のいずれかに対する抗体、CD46にそして上記のがん抗原のいずれかに対する抗体、CD59にそして上記のがん抗原のいずれかに対する抗体、MIFにそして上記のがん抗原のいずれかに対する抗体、NF-κBにそして上記のがん抗原のいずれかに対する抗体、ならびにIL-6にそしてIL-6以外の上記のがん抗原のいずれかに対する抗体が挙げられる。がんを治療するためのこれらの多特異的アンタゴニストは、一緒にまたは別々に与えられる、抗体の組み合わせまたは融合タンパク質であってもよい。

【0126】

多特異的アンタゴニストは、1つ以上の二次治療剤と組み合わせて用いられ得る。この二次治療剤は、先天的免疫系の成分に影響するものであってもよい。あるいは、これは、適応性免疫系の成分に影響し得る。この二次治療剤はまた、細胞傷害性薬物のような、凝固、がん、または自己免疫疾患に影響する成分であってもよい。

【0127】

診断または治療物質を有する多特異的アンタゴニストは、薬学的に許容可能な注射ビヒクル、好ましくはリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)における、生理学的なpHおよび濃度でのヒトまたは哺乳動物の治療および診断用途のためのキットとして提供され得る。調製は好ましくは、特にヒトにおける使用を意図する場合、無菌である。このようなキット

の選択的な構成要素としては、安定化剤、緩衝液、標識試薬、放射性同位体、常磁性化合物、クリアランス向上のための第二の抗体、および従来のシリンジ、カラム、バイアルなどが挙げられる。

【0128】

モノクローナル抗体、ヒト化抗体、霊長類抗体およびヒト抗体の生成

入手可能な抗原に対するげっ歯類モノクローナル抗体は、当業者に既知の方法によって得ることができる。一般には、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)、ならびにColigan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) [「Coligan」]を参照のこと。要するに、モノクローナル抗体は、抗原を含む組成物をマウスに注射するステップと、血清サンプルを取り出して抗体産生の存在を検証するステップと、脾臓を取り出してBリンパ球を得るステップと、このBリンパ球を骨髄細胞と融合してハイブリドーマを生成するステップと、このハイブリドーマをクローニングするステップと、注射された抗原に対する抗体を生成する陽性クローンを選択するステップと、抗原に対する抗体を生じるクローンを培養するステップと、ハイブリドーマ培養物から抗体を単離するステップとによって得ることができる。

10

【0129】

モノクローナル抗体は、種々の周知の技術によって、ハイブリドーマ培養物から単離および精製され得る。このような単離技術としては、Protein-A Sepharoseによるアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。例えば、Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3.を参照のこと。また、Baines et al., 「Purification of Immunoglobulin G (IgG)」METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)も参照のこと。

20

【0130】

抗体の産生のための十分特徴付けられた抗原の適切な量は、標準的な技術を用いて得ることができる。例としては、CD22は、Tedder et al. の米国特許第5, 484, 892号(1996)に記載される沈殿された抗体を用いてBリンパ球タンパク質から免疫沈降され得る。あるいは、抗原タンパク質は、目的の抗原を過剰産生する、トランスフェクトされた培養された細胞から得ることができる。これらのタンパク質の各々をコードするDNA分子を含む発現ベクターは、公開されたヌクレオチド配列を用いて構築され得る。例えば、Wilson et al., J. Exp. Med. 173:137 (1991); Wilson et al., J. Immunol. 150:5013 (1993)を参照のこと。目的の抗原をコードするDNA分子は、長いオリゴヌクレオチドを交互にプライミングすることを用いてDNA分子を合成することによって得ることができる。例えば、Ausubel et al., (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, pages 8.2.8 to 8.2.13 (1990) [「Ausubel」]を参照のこと。また、Wosnick et al., Gene 60:115 (1987); および Ausubel et al. (eds.), SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 3rd Edition, pages 8-8 to 8-9 (John Wiley & Sons, Inc. 1995)も参照のこと。ポリメラーゼ連鎖反応を用いる確立された技術によって、1.8キロダルトンの長さ程度の大きさの遺伝子を合成する能力が得られる。Adang et al., Plant Molec. Biol. 21:1131 (1993); Bambot et al., PCR Methods and Applications 2:266 (1993); Dillon et al., 「Use of the Polymerase Chain Reac

30

40

50

tion for the Rapid Construction of Synthetic Genes」METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 15: PCR PROTOCOLS: CURRENT METHODS AND APPLICATIONS, White (ed.), pages 263-268 (Humana Press, Inc. 1993)。

【0131】

別の実施形態では、本発明の抗体は、ヒト抗体の可変領域がげっ歯類抗体の可変領域によって置き換えられているキメラ抗体である。キメラ抗体の利点としては、免疫原性の低下およびインビボ安定性の増大が挙げられる。

【0132】

キメラ抗体を構築するための技術は、当業者に周知である。例えば、Leung et al., Hybridoma 13:469 (1994) は、LL2モノクローナル抗体のV κ およびV $_H$ ドメインをコードするDNA配列を、それぞれヒト κ およびIgG $_1$ 定常領域ドメインと組み合わせることによってLL2キメラを生成した方法を記載している。この刊行物はまた、LL2の軽鎖および重鎖の可変領域、それぞれ、V κ およびV $_H$ のヌクレオチド配列も提供する。

【0133】

別の実施形態では、本発明の抗体は、人間ではない霊長類の抗体である。ヒトにおいて治療上有用な抗体を惹起させるための一般的技術は、例えば、Goldenberg et al.の国際特許公開No. WO91/11465 (1991) に、そしてLosman et al.のInt J Cancer 46:310 (1990)に見出され得る。

【0134】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体は、「ヒト化」モノクローナル抗体である。すなわち、マウス相補性決定領域(CDR)は、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変鎖からヒト可変ドメインへ移され、その後、マウスの対応物のフレームワーク領域におけるいくつかのヒト残基の置換が続く。本発明によるヒト化モノクローナル抗体は、治療法における使用に適切である。マウス免疫グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般的技術は、例えば、Orlandi et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 86:3833 (1989)の刊行物によって記載される。ヒト化モノクローナル抗体を生成するための技術は、例えば、Jones et al., Nature 321:522 (1986), Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988), Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992), Sandhu, Crit Rev Biotech. 12:437 (1992)、およびSinger et al., J Immun 150:2844 (1993)によって記載される。Leung et al., Mol Immunol 32:1413 (1995)の刊行物は、ヒト化LL2抗体の構築物を記載する。

【0135】

別の実施形態では、本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このような抗体は、抗原のチャレンジに応答して特異的なヒト抗体を生成するように「設計されている(engineered)」トランスジェニックマウスから得られる。この技術では、ヒトの重鎖および軽鎖の遺伝子座のエレメントが、内因性の重鎖および軽鎖の遺伝子座の標的化された分裂を含む胚性幹細胞株由来のマウスの株に導入される。このトランスジェニックマウスは、ヒト抗原に特異的であるヒト抗体を合成し得、このマウスを用いて、ヒト抗体分泌ハイブリドーマを生成し得る。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、Green et al., Nature Genet 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), およびTaylor et al., Int Immun 6:579 (1994)によって記載されてい

10

20

30

40

50

る。

【0136】

完全なヒト抗体はまた、その全てが当分野で既知である遺伝的または染色体トランスフェクション法、そしてファージディスプレイ技術によって構築され得る。例えば、免疫されていないドナー由来の免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーからの、インビトロにおける、ヒト抗体およびそのフラグメントの産生については、McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)を参照のこと。この技術では、抗体可変ドメイン遺伝子は、糸状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーのいずれかのコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上の機能的な抗体フラグメントとして提示される。糸状粒子は、ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的特性に基づく選択によってまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が生じる。この方法では、このファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、種々の形式で行うことが可能で、それらの概説については、例えば、Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology, 3:5564-571 (1993)を参照のこと。

【0137】

異種間の抗体が本発明において用いられ得るが、宿主から免疫応答を誘導する抗体自体の確率を減らすために同種間の抗体を用いることが好ましい。本発明の特定の実施形態では、ヒト抗体が用いられる。ヒト被験体における使用のために完全ヒト抗体を作成するための方法としては、その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする、米国特許第5,969,108号に記載のような、大きいヒト抗体ライブラリーから抗原特異的な抗体を選択するためのファージディスプレイ技術の使用が挙げられる。計画的なヒト抗体ライブラリーからヒト抗体を作成するための他のファージディスプレイ方法は、その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする、米国特許第6,300,064号に記載される。また以下も参照のこと：Marks, et al.「By-Passing Immunization: Building High Affinity Human Antibodies by Chain Shuffling」(Bio/Technology, vol. 10: p. 779-783. (1992)), Hogenboom, et al.「Building Antibodies From Their Genes.」(Rev Fr Transfus Hemobiol, vol. 36: p. 19-47 (1993)); Griffiths, et al.「Isolation of High Affinity Human Antibodies Directly from Large Synthetic Repertoires」, EMBO J, vol. 13: p. 3245-3260 (1994); Winter and Milstein「Man-Made Antibodies.」(Nature, vol. 349: p. 293-299 (1991)); De Kruijf, et al.,「Selection and Application of Human Single Chain Fv Antibody Fragments from a Semi-synthetic Phage Antibody Display Library with Designed CDR3 Regions」, (J Mol Biol, vol. 248, pp. 97-105 (1995))ならびに Barbas et al.,「Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem」, (Proc Natl Acad Sci USA, vol. 89, pp. 4457-4461 (1992))。完全ヒト抗体を作成するための他の方法としては、ヒト抗体レパートリーの大きい部分をコードするトランスジェニックマウスを用いる、いわゆる「ゼノマウス(xenomouse)」技術の使用が挙げられる。これらの方法は、例えば、Abgenix (Fremont CA) および Medarex (Princeton NJ) によって商業的に提供される。また

10

20

30

40

50

、米国特許第6,075,181号;Lonberg,「Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies.」Handbook of Experimental Pharmacology 113(1994):49-101;Lonberg et al.,「Human Antibodies from Transgenic Mice.」Internal Review of Immunology 13(1995):65-93を参照のこと。

【0138】

多特異的抗体の産生

本発明による多特異的アンタゴニストは、多特異的抗体または抗体フラグメント、特に二重特異的抗体(b s A b)または二重特異的抗体フラグメント(b s F a b)であってもよい。これらの多特異的アンタゴニストは、少なくとも2つの異なる標的に特異的に結合するアームを有し、この標的は、先天的免疫系の炎症促進性エフェクター、凝固因子、および炎症性もしくは免疫機能不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生と特異的に関連する標的からなる群より選択され、この後者の標的は、免疫系の炎症促進性エフェクターでも、凝固因子でも、またはがん細胞レセプターでも、またはがん関連抗原でもない。

【0139】

本発明は、プレターゲティングストラテジーを使用し得、ここで多特異的抗体またはフラグメントの1つのアームが標的化可能なコンジュゲートに結合する。アビジンまたはストレプトアビジンおよびビオチンに基づくプレターゲティングストラテジーは、「Detection and Therapy of Lesions with Biotin/Avidin Conjugates.」と題されたGoldenbergの米国特許第5,525,338号に記載されるように用いられ得る。アビジン/ストレプトアビジン系は、高度に多用途であり、そしていくつかの構成で用いられている。抗体は、第一の標的化物質とともに用いられるストレプトアビジンまたはビオチンとカップリングされ得る。この後に、それぞれ、ビオチンとまたはアビジン/ストレプトアビジンとコンジュゲートされている治療物質が時には続く。別の構成は、ビオチンコンジュゲートされた抗体を最初に標的化する3ステップアプローチに依存し、その後にストレプトアビジン/アビジンによる架橋が続き、次いでビオチンコンジュゲートされた治療剤が与えられる。抗体および他の種に対するビオチンおよびアビジン/ストレプトアビジンコンジュゲートの説明は、当分野において周知である。例えば、Griffiths et al., 米国特許第5,846,741号;Griffiths et al., 米国特許第5,965,115号、およびGriffiths et al., 米国特許第6,120,768号を参照のこと。アビジン-ビオチン系は、極めて高い親和性を有し、臨床的な経験によって、約20~30%の患者がアビジンに対して抗体応答をマウントし、そして最大70%までがストレプトアビジンに対する抗体を生成することが示されている。従って、低分子量ハプテンがより好ましい。

【0140】

本実施形態では、多特異的アンタゴニストは、治療剤がコンジュゲートされるかまたは融合される低分子量ハプテンに特異的なアームを含む多特異的抗体である。この場合、抗体は細胞をプレターゲティングし、付着した治療剤を有する低分子量ハプテンは、抗体が標的に結合された後に投与される。認識可能なハプテンの例としては、限定はしないが、キレート剤、例えば、DTPA、DOTA、フルオレセイン・イソチオシアネート、ビタミンB12および特定の抗体が惹起され得る他の部分が挙げられる。引き続いて注射されるハプテンは、異なる診断剤または治療剤を担持し得る。各々が同じハプテンを認識するアームを含む、2つ以上の多特異的抗体も用いられてもよい。多特異的抗体の使用および多特異的抗体の組み合わせは、腫瘍および他の疾患組織における抗原不均一性を克服するのに特に有効である。

【0141】

疾患標的に対する治療剤の局在化のためのハプテンー治療物質コンジュゲートの使用は、いくつかの異なる利点を有する。同じハプテンがいくつかの異なる治療物質に結合されてもよい。さらに、1つの治療物質に対する免疫応答が見られなければならない、これは、ベクターを標的化する開発された非免疫原性抗体がハプテンー治療物質に基づく系において用いられる能力を破壊しない。これによってまた、任意の標的化抗体および治療剤の組み合わせとともに用いられ得る一般的な標的系の使用が可能になる。ハプテン認識系を用いることにおいて、設計する化学者は、ハプテンがどのように治療物質に結合されるかを制御し、そして特定の細胞外もしくは細胞内酵素に対する不安定性、またはわずかに低いpHのような特定のセットの状態に対する不安定性のような特徴を組み込むことができる。

10

【0142】

担体部分は、先天的免疫系の炎症促進性エフェクター、凝固因子、あるいは先天的免疫系の炎症促進性エフェクターでも凝固因子でもない炎症性もしくは免疫機能不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生と特異的に関連する標的に対してコンジュゲートされる。標的可能なコンジュゲートに特異的に結合する少なくとも1つのアームを有する多特異的な抗体およびフラグメントの使用によって、各々の適用について、新規な多特異的な抗体を生じることなく、種々の治療適用を行うことが可能になる。

【0143】

MAbは、当業者に既知のmAbを作製する標準的な方法によって任意のハプテンまたは薬物に対して惹起され得る。例えば、免疫原性刺激因子またはアジュバント、例えば、キーホール・リンペット・ヘモシアニンに対して、HSG（ヒスタミンスクシニルグリシン）のようなハプテンを結合して、免疫応答性の動物にこのコンジュゲートを注射することが可能である。複数の注射がしばしば使用される。このようなアプローチは、HSGのような該当のハプテンに対するわずかに異なる特異性を有するいくつかの異なる抗体をもたらすことが理解されるべきである。MAbは、HSG構造の異なる小部分、または異なる構成を認識し得る。単にHSG分子自体よりもわずかに多く認識するMAb、例えば、リジンのεアミノ基に結合された場合にのみHSG部分を認識するMAbも得ることができるが、必要に応じて、HSGは、後者の免疫原性タンパク質上のεリジルアミノ基に対する結合によってKLH（例えば）に最初に結合された。排他的であることは望まないが、これらの一般的な手順および結果は、当分野で周知である。次いで、これらの免疫された動物から抗体を産生する脾臓細胞の単離、そして抗ハプテン抗体を分泌するハイブリドーマを生成するためのそれらの骨髓細胞株への引き続く融合については周知である。Kohler G. およびMilstein C, Eur J Immunol 6: 511-9 (1976); Kohler G. et al., Eur J Immunol 6: 292-5 (1976); ならびにKohler G. and Milstein C, Nature 256: 495-7 (1975) を参照のこと。

20

30

【0144】

多特異的な標的タンパク質は、周知の反応によって、種々の特異性を有する抗体から化学的に調製され得る。代表的には、1つのMAbは、架橋剤との反応によって活性化され、後に、第一のMAbのリジン、還元されたシステインまたは酸化された炭水化物残基で反応するように選択される。精製後、活性化された第一のMAbは、第二のMAbと混合され、次いでこれが元の架橋剤の第二の官能基と；最も顕著には、第二のMAbのリジン、還元されたシステインまたは酸化された炭水化物残基を介して、特異的に反応する。多特異的な標的タンパク質はまた、クアドローマ技術によって体細胞性に調製され得る。このクアドローマ技術は、二重特異的な抗体の両方のアームを発現する細胞株が生成されて、培養物中で増殖されて、bsMAbを分泌する技術である。最終的にbsMAbはまた、分子生物学の現代の技術によって好都合に生成され得る。例えば、Colman, A., Biochem Soc Symp 63: 141-147 (1998); 米国特許第5, 827, 690号；および公開米国出願第20020006379号を参照のこと。

40

【0145】

50

本発明は、抗体および抗体フラグメントを包含する。抗体は一般に、二価であるか、または頻度は低いが多価であり、そしてこの二価性が、細胞表面に対する抗体の付着の強度を増強する。しかし、この抗体の二価性は時には、標的細胞が抗原性調節を受けるように誘導し、それによって細胞が細胞傷害性物質、エフェクター細胞および細胞-抗体相互作用に参与する補体を回避し得る方法が得られる。このような改変を防止する手段としては、単価抗体または抗体フラグメントが用いられ得る。単価抗体は完全な、機能的な免疫グロブリン分子であって、ここでは軽鎖の一方のみが抗原に結合する。このような抗体を調製する一つの方法は、米国特許第4,841,025に開示される。

【0146】

単価性は、抗体フラグメントを用いることによって達成され得る。これらの実施形態において有用な例示的な単価抗体フラグメントは、Fv、Fab、Fab'などである。単価抗体フラグメントであって、代表的には、約25kD(Fv)~約50kD(Fab, Fab')に及ぶ分子量を示すフラグメントは、抗体全体よりも小さく、従って、一般には、より大きく標的部位に浸透し得る。さらに、単価結合は、標的表面上で結合する担体の制限がより少なくなり(二価抗体の使用の間に生じ、これが強力に結合して、標的細胞部位に結合して、それによって標的組織の副層にさらに出て行くために障壁を作成する)、それによって、標的の均質性が改善される。さらに、分子が小さいほど、レシピエントからより急速に排出され、それによって、投与された低分子コンジュゲートの免疫原性が減少する。抗体全体のコンジュゲートと比較して標的に局在する単価フラグメントコンジュゲートの投与された用量の割合はより低い。しかし、減少された免疫原性によって、単価フラグメントコンジュゲートで投与される最初の用量は大きくなり得る。さらに、単価抗体フラグメントは一般には、標的細胞上に二価抗体または抗体全体がある限り、標的細胞上には存在しない。

【0147】

この抗体フラグメントは、抗体の抗原結合部分、例えば、F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fabなどである。この抗体フラグメントは、インタクトな抗体によって認識される同じ抗原に結合する。例えば、抗CD22モノクローナル抗体フラグメントは、CD22のエピトープに結合する。本発明のbsAbとしては、限定はしないが、IgG×IgG、IgG×F(ab')₂、IgG×Fab'、IgG×scFv、F(ab')₂×F(ab')₂、Fab'×F(ab')₂、Fab'×Fab'、Fab'×scFvおよびscFv×scFv bsMabが挙げられる。また、scFv×IgG×scFvおよびFab'×IgG×Fab'、scFv×F(ab')₂×scFvおよびFab'×F(ab')₂×Fab'のような種も含まれる。

【0148】

上で注記されたとおり、「抗体フラグメント」という用語はまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように機能する任意の合成または遺伝子操作されたタンパク質を含む。例えば、抗体フラグメントとしては、単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる、「Fv」フラグメント、軽鎖および重鎖の可変領域がペプチドリンカーによって接続される組み換え単鎖ポリペプチド分子(「sFvタンパク質」)、および超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位が挙げられる。

【0149】

融合タンパク質の生成

多特異的アンタゴニストを生成するための別の方法は、2つ以上の異なる単鎖抗体または必要な多特異性を有する抗体フラグメントセグメントを連結する組み換え融合タンパク質を操作することである。例えば、Coloma et al., Nature Biotech 15:159-163, 1997を参照のこと。例えば、種々の二重特異性融合タンパク質は、分子操作を用いて生成され得る。1つの形態では、二重特異性融合タンパク質は、単価であって、これは、例えば、一つの抗原について単一の結合部位を有するscFv、および第二の抗原について単一の結合部位を有するFabフラグメントからなる。別の形態では、この二重特異性融合タンパク質は二価であって、これは例えば、1つ

の抗原について2つの結合部位を有するIgGおよび第二の抗原について2つの結合部位を有する2つのscFvからなる。

【0150】

機能的な二重特異性単鎖抗体(bscAb)はまた、二重特異性抗体とも呼ばれ、組み換え方法を用いて哺乳動物細胞において生成され得る。例えば、MacK et al., Proc Natl Acad Sci, 92:7021-7025, 1995を参照のこと。例えば、bscAbは、組み換え方法を用いて、グリシン-セリンリンカーを介して2つの単鎖Fvフラグメントを連結することによって生成される。目的の2つの抗体のV軽鎖(V_L)ドメインおよびV重鎖(V_H)ドメインは、標準的なPCR法を用いて単離される。次に各々のハイブリドーマから得られるこのV_LおよびV_HのcDNAを連結して、2段階の融合PCRにおいて単鎖フラグメントを形成する。この第一のPCR工程は、(Gly4-Ser1)₃リンカーを導入し、そして第二の工程は、V_LおよびV_Hアンプリコンを連結する。次いで、各々の単鎖分子を細菌の発現ベクターにクローニングする。増幅後、単鎖分子の1つを切り出して、目的の第二の単鎖分子を含む、他のベクターにサブクローニングする。得られたbscAbフラグメントを、真核生物の発現ベクターにサブクローニングする。機能的なタンパク質発現は、チャイニーズハムスター卵母細胞にこのベクターを移入することによって得ることができる。組み換え方法を用いて種々の融合タンパク質を生成してもよい。

10

【0151】

免疫コンジュゲートの産生

20

本発明の任意の多特異的アンタゴニストは、1つ以上の治療剤または診断/検出物質とコンジュゲートされ得る。一般には、1つの治療物質または診断/検出物質は、各々の抗体、その融合タンパク質またはフラグメントに結合されるが、2つ以上の治療物質および/または診断/検出物質が、同じ抗体または抗体フラグメントに結合されてもよい。Fc領域が存在しない場合(例えば、免疫コンジュゲートの抗体成分として用いられる抗体が抗体フラグメントである場合)、全長抗体または抗体フラグメントの軽鎖可変領域に炭水化物部分を導入することが可能である。例えば、Leung et al., J Immunol 154:5919(1995); Hansen et al., 米国特許第5,443,953号(1995), Leung et al., 米国特許第6,254,868号を参照のこと。治療物質または診断/検出物質に結合するために、操作された炭水化物部分を用いる。

30

【0152】

抗体の炭水化物部分を介して抗体成分にペプチドを結合するための方法は、当業者に周知である。例えば、Shih et al., Int J Cancer 41:832(1988); Shih et al., Int J Cancer 46:1101(1990); および Shih et al., 米国特許第5,057,313号を参照のこと。この一般的な方法は、少なくとも1つの遊離アミン官能基を有し、そして複数のペプチドを有する担体ポリマーとの、酸化された炭水化物部分を有する抗体成分の反応を包含する。この反応によって、最初のSchiff塩基(イミン)結合が生じ、これが、二級アミンへの還元によって安定化されて、最終的なコンジュゲートが形成され得る。

40

【0153】

治療物質または診断/検出物質は、ジスルフィド結合形成を介して還元された抗体成分のヒンジ領域に結合され得る。代替として、このような物質は、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)のような、異種二官能性架橋を用いて抗体成分に結合され得る。Yu et al., Int J Cancer 56:244(1994)。このようなコンジュゲートのための一般的な技術は、当分野で周知である。例えば、Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upe slacis et al., 「Modification of Antibodies by Chemical Methods」, in MONOCLONAL ANT

50

IBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, 「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)を参照のこと。あるいは、治療物質または診断／検出物質は、抗体のFc領域における炭水化物部分を介してコンジュゲートされ得る。この炭水化物基は、チオール基に結合される同じ物質の負荷を増大するために用いられてもよく、またはこの炭水化物部分は、異なるペプチドに結合するために用いられてもよい。

10

【0154】

脂肪乳剤に対する抗体のカップリング

ポリ（エチレングリコール）修飾ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）で安定化された、長期循環のミクロン未満の脂肪乳剤を、本発明の抗体の薬物担体として用いてもよい。このエマルジョンは、2つの主な部分からなる。油状のコア、例えば、乳化剤、例えば、リン脂質で安定化されたトリグリセリド。リン脂質の乳化に劣る特性は、ポリソルベート80のような生体適合性の共乳化剤を添加することによって増強され得る。好ましい実施形態では、この抗体は、ポリ（エチレングリコール）ベースの、異種二官能性カップリング剤、ポリ（エチレングリコール）-ビニルスルホン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NHS-PEG-VS）と脂肪乳剤小球の表面に対してコンジュゲートされる。

20

【0155】

ミクロン未満の脂肪乳剤を、上記のように調製して、特徴付ける。Lundberg, J Pharm Sci, 83:72 (1993); Lundberg et al., Int J Pharm, 134:119 (1996)。脂肪乳剤の基礎的な組成物はトリオレインである。DPPC:ポリソルベート80, 2:1:0.4 (w/w)。指示される場合、PEG-DPPEを、DPPCで計算された2~8モル%の量で脂質混合物に添加する。

30

【0156】

カップリング手順は、NHS-PEG-VSのNHSエステル基とジステアロイルホスファチジル-エタノールアミン（DSPE）のアミノ基との反応で開始する。25μモルのNHS-PEG-VSを、23μモルのDSPEおよび50μモルのトリエチルアミンと、1mlのクロロホルム中で、40℃で6時間反応させて、ポリ（エチレングリコール）鎖（DSPE-PEG-VS）の遠位端でビニルスルホン基を有するホスファチジル-エタノールアミンのポリ（エチレングリコール）誘導体を生成する。抗体コンジュゲートのために、DSPE-PEG-VSが、2モル%のDPPCの脂肪乳剤に含まれる。この成分を-20℃でストック溶液からバイアルに分散させ、その溶媒をエバポレートさせて、減圧下で乾燥させる。リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を添加して、その混合物を50℃に加熱して、30秒間ボルテックスして、MSEプローブ超音波処理機で1分間超音波処理する。エマルジョンは4℃で保管してもよく、そして好ましくは24時間以内にコンジュゲートに用いる。

40

【0157】

エマルジョン小球に対する抗体のカップリングは、この小球の表面上の遠位PEG末端のビニルスルホン基と、抗体上の遊離チオール基との間の反応を介して行なわれる。ビニルスルホンは、チオール基に対する選択的カップリングのための魅力的な誘導体である。ほぼ中性のpHでは、VSは、チオール基を含有するタンパク質に対して15~20分の半減期でカップリングする。VSの反応性は、マレイミドの反応性よりもわずかに小さいが、VS基は、水中でより安定であって、安定な結合はチオール基との反応から生じる。

50

【0158】

コンジュゲート前に、50 mMの2-メルカプトエタノールによって4℃で10分間、0.2 MのTris緩衝液(pH 8.7)中で抗体を還元する。還元された抗体を、Sephadex G-25 スピンカラムで過剰の2-メルカプトエタノールから分離して、50 mMの酢酸ナトリウム緩衝化0.9%生理食塩水(pH 5.3)中で平衡にする。この生成物を、280 nmでその吸光度を測定すること(そして1 mg/ml抗体溶液で1.4であると仮定する)によって、または¹²⁵I 標識抗体の定量によって、タンパク質濃度についてアッセイする。チオール基は、343 nmの吸光度の変化によるAldrichiol (登録商標)、そして標準としてシステインを用いて決定される。

【0159】

カップリング反応を、アルゴン下で、室温で一晩、HEPES緩衝化生理食塩水(pH 7.4)中で行う。過剰のビニルスルホン基を2 mMの2-メルカプトエタノールを用いて30分間クエンチして、過剰の2-メルカプトエタノールおよび抗体を、Sepharose CL 48 カラム上のゲルクロマトグラフィーによって除去する。この免疫コンジュゲートを、カラムの空隙容量付近で収集して、0.45 μmの滅菌フィルターを通過させることによって滅菌して、4℃で保管する。

【0160】

カップリング効率は、¹²⁵I 標識抗体を用いて算出する。エマルジョンの回復は、平行実験における[¹⁴C] DPPCの測定値から見積もる。表面が移植されたDSPE-PEG-VSのVS基に対する還元LL2のコンジュゲートは、85%近い代表的な効率で極めて再現性である。

【0161】

単一および多様なレジメンにおける多特異的アンタゴニストの治療用途

本発明は、先天的免疫系または適応性(後天的)免疫系の免疫応答に関与する種々の宿主細胞に対して結合するための特定の抗体および抗体異種コンジュゲートを有することによって、そしてアゴニストもしくはアンタゴニスト作用によって重要な細胞およびレセプターの作用を調節することによって、多様な急性および慢性の炎症性および免疫調節不全疾患、ならびに特定のがんの治療に関する。特に有利なのは、これらの細胞/レセプターを標的化する二機能性および多機能性(二重特異性または多特異的)抗体、ならびに疾患の細胞/組織の標的分子の使用である。引用することにより本明細書の一部をなすものとする、Hansenの米国特許第6,458,933号を参照のこと。Hansenは、病原体(感染性生物体およびがん)の宿主をクリアリングすること、治療物質または診断物質、自己抗体、または抗移植片抗体に集中しているが、本発明は、免疫に関与する適切な宿主細胞および疾患の細胞によって発現される標的細胞/レセプターを標的化することによって、特定の疾患に対する宿主免疫の変更を可能にする。

【0162】

多特異的アンタゴニストは、薬学的に有用な組成物を調製するために既知の方法に従って処方され、ここで治療タンパク質は、薬学的に許容可能な担体との混合物に含有される。組成物は、「薬学的に許容可能な担体」と言われ、その投与は、レシピエントの患者によって耐容され得る。滅菌リン酸緩衝化生理食塩水は、薬学的に許容可能な担体の1例である。他の適切な担体は、当業者に周知である。例えば、REMITON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed(1995)および後の版を参照のこと。

【0163】

治療目的のために、多特異的アンタゴニストを、単独で、またはリボソームとコンジュゲートして、患者に、薬学的に許容可能な担体中で治療上有効な量で投与する。これに関しては、「治療上有効な量」とは、生理学的に有意である量である。ある物質は、その存在がレシピエントの患者の生理学において検出可能な変化を生じる場合に、生理学的に有意である。本発明の文脈では、ある物質は、その存在が標的化された細胞の不活性化または殺傷を生じる場合に、生理学的に重要である。

【0164】

裸の多特異的アンタゴニストでの治療を用いる場合、これは単に、このような治療の必要な被験体にこのアンタゴニストを投与すること、およびその標的に対してこのアンタゴニストが結合するために十分な時間を置くことを伴う。治療が、ハプテン結合部位を含む多特異的アンタゴニストを含む場合、この被験体は、最初に多特異的アンタゴニストを投与され、次いでアンタゴニストが局在するために、そして未結合のアンタゴニストが被験体の血流から排出されるのに十分な時間待った後に、治療物質を含む担体分子が、被験体に投与されて、多特異的アンタゴニストのハプテン結合部位に結合する。あるいは、クリアリング剤は、アンタゴニストが標的に結合された後に投与され得る。このようなプレターゲティング方法は、例えば、Gautherot et al., Cancer, 80 (12 Suppl): 2618-23 (1997); Karacay et al., Bioconj Chem, 11: 842-54 (2000); Sharkey et al., Cancer Res, 63: 354-63 (2003); Sharkey et al., Clin Can Res, 9 (10 Pt 2): 3897S-913S; ならびに米国特許出願第20030232011号A1および米国特許出願第20040241158号A1に詳細に記載される。二次的な治療剤が治療レジメンの一部を形成する場合、これは、多特異的アンタゴニストが投与される前、同時または後に投与され得る。

10

【0165】

本明細書に記載される多特異的アンタゴニストは、自己免疫疾患の治療に、詳細にはクラスIII自己免疫疾患の治療に有用であり、この自己免疫疾患としては、免疫媒介性血小板減少症、例えば、急性特発性血小板減少性紫斑病および慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞蹈病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、狼瘡腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アディソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス（類肉腫症）、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、バージャー病（thromboangitis obliterans）、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変症、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発筋炎／皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡（pamphigus vulgaris）、ヴェグナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎／多発筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、および線維化性肺肺炎が挙げられる。

20

30

【0166】

多特異的アンタゴニストはまた、自己免疫疾患以外の炎症性または免疫調節不全障害を治療するのに有用である。本発明による組成物で治療され得るこれらの他の炎症性または免疫調節不全障害の例としては、敗血症または敗血性ショック、感染症、神経障害、移植片対宿主病、移植片拒絶、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫性疾患、喘息、座瘡、汎発性血管内凝固症候群（DIC）、およびアテローム性動脈硬化症が挙げられる。

【0167】

自己免疫疾患を含む、炎症性および免疫調節不全障害の治療における使用に加えて、治療組成物はまた、病的血管新生およびがんを治療するのに有用である。がんとしては、造血性のがん、例えば、白血病、リンパ腫および骨髄腫、ならびに固形癌、例えば、癌腫、黒色腫、神経膠腫などの両方が挙げられる。白血病としては、骨髄性白血病、例えば、AMLおよびCML、リンパ性白血病、例えば、ALLおよびCLL、ならびにT細胞白血病が挙げられる。リンパ腫としては、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫およびT細胞リンパ腫が挙げられる。この治療組成物はまた、がん、感染およびいくつかの自己免疫疾患を伴い得る悪液質を治療するのに有用である。特に、本発明による多特異的アンタゴニストとしては好ましくは、この実施形態における標的としてのIL-6またはTNF- α が挙げられる。

40

【0168】

50

多特異的アンタゴニストはまた、感染性疾患に関連する炎症を治療するのに用いられることがあり、この感染性疾患としては、ウイルス感染、細菌感染、寄生生物感染および真菌感染が挙げられる。例示的なウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、シミアンウイルス40、呼吸器合胞体ウイルス、マウス乳がんウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、疣ウイルス、ブルー・タングウイルスが挙げられる。例示的な細菌としては、*Anthrax bacillus*、*Streptococcus agalactiae*、*Legionella pneumophilia*、*Streptococcus pyogenes*、*Escherichia coli*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Pneumococcus*、*Hemophilis influenzae B*、*Treponema pallidum*、ライム病スピロヘータ、*Pseudomonas aeruginosa*、*Mycobacterium leprae*、*Brucella abortus*、*Mycobacterium tuberculosis*および破傷風毒素が挙げられる。例示的な原生動物は、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium vivax*、*Toxoplasma gondii*、*Trypanosoma rangeli*、*Trypanosoma cruzi*、*Trypanosoma rhodesiense*、*Trypanosoma brucei*、*Schistosoma mansoni*、*Schistosoma japonicum*、*Babesia bovis*、*Elmeria tenella*、*Onchocerca volvulus*、*Leishmania tropica*、*Trichinella spiralis*、*Onchocerca volvulus*、*Theileria parva*、*Taenia hydatigena*、*Taenia ovis*、*Taenia saginata*、*Echinococcus granulosus*または*Mesocystoides corti*である。例示的なマイコプラズマは、*Mycoplasma arthritidis*、*Mycoplasma hyorhinis*、*Mycoplasma orale*、*Mycoplasma arginini*、*Acholeplasma laidlawii*、*Mycoplasma salivarum*、および*Mycoplasma pneumoniae*である。この真菌は、小孢子菌（*Microrosporum*）、白癬菌（*Trichophyton*）、表皮菌（*Epidermophyton*）の種、*Sporothrix schenckii*、*Cryptococcus neoformans*、*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*、*Blastomyces dermatitidis*、または*Candida albicans*由来であり得る。例示的な菌類としては、小孢子菌、白癬菌、表皮菌（*Epidermophyton*）の種、*Sporothrix schenckii*、*Cryptococcus neoformans*、*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*、*Blastomyces dermatitidis*、または*Candida albicans*が挙げられる。例示的な寄生生物としては、マラリア寄生生物、スピロヘータなどが挙げられ、これには蠕虫が含まれる。本発明における使用のために抗体が開発され得る代表的な疾患を引き起こす感染性生物体の列挙は、Davis et al., MICROBIOLOGY (Harper & Row, New York, 1973およびその後)の第二版およびその後の版に含有され、そして当業者に周知である。これらの実施形態では、多特異的抗体は好ましくは、微生物または寄生生物に関連する抗原を標的化する。

【0169】

10

20

30

40

50

敗血症および敗血性ショックは、抗し難い炎症および免疫応答によって特徴付けられ、これが、本発明による多特異的アンタゴニストでの治療に特に感受性にする。本発明によるこれらの条件の治療は、異なる機構を介して、そして好ましくは、この免疫調節不全、炎症性疾患の病原性に関与する2つ以上の標的分子に対して機能するアンタゴニストまたはアゴニストメディエーターまたは抗体の融合タンパク質を投与することによって作用する物質を組み合わせることを要する。Van Amersfoort et al. (前出)によって提唱されるように、「炎症促進性応答と抗炎症促進性応答との間のバランスを回復するようにある試みが行われなければならない」。本発明は、少なくとも2つの異なる標的に特異的な多特異的アンタゴニストを用いることによって、バランスを回復して、敗血症を有する患者におけるTNFまたはIL-1のような炎症促進性サイトカインを中和する、単独の物質の使用を上回る明らかな改良技術を提供し、この標的は、先天的免疫系の炎症促進性エフェクター、凝固因子、および敗血症または敗血性ショックと特異的に関連する標的からなる群より選択される。

10

【0170】

敗血症または敗血性ショックの治療のための一実施形態では、種々の抗炎症性因子が、活性プロテインCと、そして抗凝固因子と組み合わせられて、そしてこの複数の物質による治療の少なくとも1つの成分は、補体経路アンタゴニストを含む、炎症または凝固の少なくとも1つの標的レセプターまたはメディエーターに対するアゴニストまたはアンタゴニスト抗体である。重篤な敗血症および敗血性ショックを有する患者を治療するために用いられる選択された抗炎症性物質および免疫調節性物質の列挙は、Bochud and Calandra (Brit Med J 2003; 326: 262-266)に見出され、そしていくつかの敗血症および敗血性ショックのほとんどのこれらの免疫調節性治療の臨床的トライアルは、Vincent et al., Clin Infect Dis 2002; 34: 1084-93に概説される。

20

【0171】

敗血症および敗血性ショックの治療において有用な特に好ましい物質は、標的の1つとして、MIF、LPS、TNF- α 、C5aレセプター(C5aR)、TLR2またはHMGB-Iを標的化する多特異的アンタゴニストである。他の標的はまた、これらから、そして他の炎症促進性サイトカインまたはレセプター、例えば、インターロイキンIL-1、TSST-1(毒素性ショック症候群毒素1)、NCA-90、NCA-95、およびHLA-DRから選択されてもよい。いくつかの敗血症または敗血性ショックの治療のための物質または融合タンパク質の好ましい組み合わせとしては、MIFとC5aレセプター(C5aR)、MIFとIL-6、LPSとMIF、TNF- α とHMGB-I、TLR2(トール様レセプター-2)とLPS、TLR2とIL-6、TLR2とC5aRを標的化する組み合わせが挙げられる。抗-MIF/抗-NCA-90または抗-MIF/抗-HLA-DRの多特異的アンタゴニストを用いて、毒素性ショックの初期の証拠を有する患者においてMIFを中和する血液/感染性の沈着における顆粒球を標的化してもよい。好ましくは、これらは、ヒト化抗体またはヒト抗体構築物である。これらは、利用可能な抗体から当業者によって、容易に組み合わせられるかまたは構築される。例えば、T2.5 Mabは、TLR2細胞外ドメインを用いてTLR2 neg マウスを免疫することによってTLR-2に対するアンタゴニストとして開発され、そしてこの抗体は、TNF- α のような炎症性メディエーターの遊離を阻害して、マウスにおいて致死性のショック様の症候群を妨げる(Meng et al., J Clin Invest 2004; 113: 1473-1481)。好ましい実施形態では、組み換え活性化プロテインCは、抗体混合物および融合タンパク質と組み合わせて二次的な治療剤として用いられる。

30

40

【0172】

補体調節性因子、例えば、CD46、CDS55および/またはCD59および腫瘍関連抗原の両方を標的化する多特異的アンタゴニスト、そしてさらに詳細には少なくとも二重特異性の抗体であって、1つのアームが補体調節性因子を標的化し、そして第二のアームが腫瘍関連抗原を標的化する抗体が、これらの抗原の1つだけを標的化する抗体よりも

50

がんを治療するのに有効であるということが本発明によってみいだされている。さらに、Sier et al. (前出)の教示に反して、 β グルカンの使用は、抗がん抗体単独の使用を上回る多特異的アンタゴニストのような改善された有効性についてインビボで必須ではないこと、そしてがんおよび補体調節タンパク質(例えば、CD55)を標的化する二重特異性抗体は、特に、補体調節タンパク質の高い発現を有する(これによって、抗体による補体媒介性細胞傷害性をブロックする)腫瘍に対して、それ自体で用いられる抗体よりもがん細胞殺傷を増大することが発見されている。

【0173】

中和抗体について別の好ましい補体関連標的は、補体の別の経路に関与する補体因子H(およびその改変体FHL-1)である。なぜなら特に第H因子は、いくつかのがんで過剰発現され得るからである(Ajona et al., Cancer Res 2004; 64: 6310-6318, およびそこに引用される参考文献)。従って、多特異的アンタゴニスト、および詳細には、補体因子Hおよび因子FHL-1に対する多特異的抗体の使用は、特に重要である。補体因子Hおよびその改変体FHL-1に対する多特異的アンタゴニストはさらに、CD55、CD46および/またはCD59、ならびに他の補体因子を標的化し得る。これらの多特異的アンタゴニストおよび腫瘍関連抗原およびレセプターに対して標的化することは、腫瘍細胞に対する補体抗体の特異的な標的化を増強して、単独の抗原またはエピトープを標的化する抗体の使用を上回る利点を提供することが見出されている。これは、現在までに公開された文献における矛盾を克服している。

【0174】

悪性でない状態では、異なるアプローチが存在する。これは、血管内皮に対する炎症性細胞の接着を媒介し得る、補体由来アナフィラトキシンC5aまたは補体レセプター3(CR3、CD18/11b)を含む他の補体レセプターまたは因子での中和または妨害を含む。このような状況では、CD46、CD55および/またはCD59の発現の増大は、補体媒介性免疫を緩和するために、そしてまた、器官移植片拒絶におけるような超急性拒絶を減弱するために所望される。従って、このような補体調節性因子のアゴニストの使用は有利である。

【0175】

アテローム性動脈硬化症の治療において有用な特に好ましい物質は、MIF、低分子量リポタンパク質(LDL)およびCEACAM6(例えば、NCA-90)を標的化する多特異的アンタゴニストである。他の標的はまた、これらから、そして他の炎症促進性サイトカインから選択されてもよい。アテローム性動脈硬化症の治療のための物質または融合タンパク質の好ましい組み合わせは、MIFと低分子量リポタンパク質修飾エピトープ、NCA-90とMIF、NCA-90と低分子量リポタンパク質(LDL)エピトープ、またはLDLとCD83を標的化すること。これらは、市販の抗体から当業者によって容易に組み合わせられるかまたは構築される。例えば、Mab MDA2、プロトタイプMabは、酸化の豊富なアテローム性動脈硬化病変内で(Tsimikas et al., J Nucl Cardiol 1999; 6: 81-90に記載されるように)、マロンジアルデヒド溶解エピトープ(例えば、マロンジアルデヒド修飾LDL中)を認識する。

【0176】

敗血症およびアテローム性動脈硬化症に加えて、MIFは、アテローム性動脈硬化症を有するウサギで発現されることが報告され(Linet al., Circulation Res 2000; 87: 1202-1208)、このことは、これがこの状態では重要なサイトカインであることを示す。MIFが関与している他の疾患としては、糸球体腎炎、動脈炎、遅延型過敏症、胃炎および急性心筋虚血が挙げられる(Yu et al. によって概説される、J Histochem Cytochem 2003; 62: 5-631)。従って、MIFを標的化する多特異的アンタゴニストはこれらの任意の状態を治療するのに有用である。

【0177】

米国で500,000例ほどの多くの個体が毎年敗血症を発症し、集団の加齢化とともに

10

20

30

40

50

に発症する数は増えている。最高の抗生物質療法および心肺のサポート、そして炎症および敗血症の凝固の理解の進歩にもかかわらず、これらの症例の半分ほどが死に至る。感染の間、炎症促進性サイトカインが放出されて活性化される。これらとしては、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL}-1$ および $\text{IL}-6$ が挙げられる。 $\text{IL}-4$ および $\text{IL}-10$ を含む抗炎症性メディエーターは、重篤な敗血症における炎症促進性サイトカインを調節するのには不十分であるようである。

【0178】

敗血症の応答の顕著な特徴としては、制御されない炎症および凝固が挙げられる。血管内皮の損傷は、内毒素、組織因子、壊死性細胞または羊水のいずれで生じても誘発性の事象であって、誘発性の事象になる。この内皮の損傷によって、組織因子の遊離がもたらされ、これが凝固系を活性化して、過剰なトロンビン生成を生じる。その後の血餅形成は、微小血管内皮の機能不全をもたらし、そしてそのままにされれば、低酸素症、臓器機能不全および続発性の器官不全を生じる。

【0179】

内皮の損傷およびプロトロンビン環境へのシフトによって、トロンビン、すなわち、トロンボモジュリンおよびプロテインC、すなわち、内皮のプロテインCレセプター（ EPCR ）について発現の減少および内皮レセプターの機能障害がもたらされる。トロンボモジュリンおよび EPCR の両方ともプロテインCをその活性化型 APC に変化させるのに必要である。従って、トロンビン形成、血餅増加およびプロテインC活性化の調節の主なシステムは失われる。

【0180】

重篤な敗血症を有するほぼ全ての患者がプロテインCを欠く。低いプロテインCレベルは、ショックおよび予後不良を伴い、これには ICU 滞在、人工呼吸器依存および死亡が挙げられる。重篤な敗血症において外因的に活性化プロテインCを供給することで、ある患者では炎症の調節および凝固の応答が回復され、良好な生存率の利点がもたらされる。しかし、凝血促進応答を軽減し、敗血症の器官損傷を妨げる新規な治療モダリティの明白な必要性が存在する。

【0181】

敗血症前の凝血促進応答のブロック開始は、非ヒト霊長類において死亡を減少することが確認されている。外部の凝固の開始をブロックするために有効な戦略は、 TF に対するモノクローナル抗体、天然の TF 経路インヒビター、および FVIIa の不活性化類似体の使用を含む。ヒビでの近年の研究では、敗血症の発現時に FVIIa を有する TF-FVIIa 複合体のブロックは、敗血症誘発性多臓器損傷を減弱し、そして肺および腎臓を劇的に保護したということが実証された。補体活性化産物、特にアナフィラトキシンを阻害するアンタゴニストはまた、敗血症死亡を減少する見込みがある。 C3a 、 C4a および C5a は、敗血症の間に出現し、そして上昇したアナフィラトキシン血漿レベルは、多臓器不全の発生と高度に相関する。敗血症では、補体は、凝血促進活性を直接促進するか、またはサイトカイン産生を間接的に誘導し得る。インビトロの C5a および補体の末端複合体 C5b-9 は、内皮細胞および単球上での組織因子発現を誘導し、そして血小板の表面上での C5b-9 のアセンブリは、プロトロンビナーゼ活性を刺激することが示されている。本発明は、凝固因子、炎症促進性サイトカイン、および補体活性化産物のうちの2つ以上を標的化する多特異的アンタゴニストを提供することによって、敗血症を治療するための改善された治療剤を提供する。

【0182】

さらなる薬学的方法が、治療適用において抗体の作用期間を制御するために使用され得る。徐放性調製物は、複合体に対するポリマーの使用を経て調製されてもよいし、または抗体を吸収してもよい。例えば、生体適合性ポリマーとしては、ポリ（エチレンーコービニルアセテート）のマトリックス、およびステアリン酸二量体およびセバシン酸のポリアンヒドリドコポリマーのマトリックスが挙げられる。Sherwood et al., Bio/Technology 10:1446 (1992)。このようなマトリックス

からの抗体の放出の速度は、タンパク質の分子量、マトリックス内の抗体の量、および分散した粒子のサイズに依存する。Saltzman et al., Biophys J 55:163 (1989); Sherwood et al, supra. 他の固体剤形は、REMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th ed. (1995)に記載される。

【0183】

本発明による多特異的アンタゴニストは、炎症および他の免疫調節不全疾患（血管内凝固および心筋虚血を含む）の生成に参与する種々の免疫または他の宿主細胞に結合する。それらはまた、がんの治療または防止のためのがんに対する宿主の免疫応答を増強するために用いられてもよい。さらに、炎症促進性サイトカインを中和する、LPSのような、微生物毒素を中和するため、そして凝固の異常を克服するために、組成物および治療方法が提供される。この方法は、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび種々の他の免疫調節不全疾患をもたらすカスケードに参与する種々の因子に対する適切な抗体組成物および融合タンパク質を用いる。

【0184】

一般には、投与された抗体の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、全身の医学的狀態および既往歴のような要因に依存して変化する。代表的には、約1 pg/kg ~ 10 mg/kg（患者の体重あたりの物質の量）の範囲である用量の抗体成分、免疫コンジュゲートまたは融合タンパク質をレシピエントに提供することが所望されるが、それより低いまたは高い用量も状況によっては投与されてもよい。これらの用量は、必要に応じて繰り返されてもよい。

【0185】

患者（ヒトまたは家畜）に対する抗体の投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、くも膜下腔内、局所カテーテルを通じた灌流によって、または直接の病巣内注射によってであってもよい；これはまた、喘息のような特定の疾患における、吸入、エアロゾル、または経鼻適用を含んでもよい。注射によって治療タンパク質を投与する場合、投与は、連続的注入によっても、または単回もしくは複数回のボーラスによってもよい。静脈内注射は、急速に分布する抗体では循環が完全であるおかげで有用な投与方式となる。

【0186】

コンジュゲートされていない多特異的抗体および抗体フラグメント、ならびにコンジュゲートされていない抗体および抗体フラグメントの混合物が本発明による治療のための好ましい一次的な治療組成物であるが、このような治療の有効性は、本明細書に記載される他の治療を多特異的アンタゴニストに追加することによって増強され得る。このような多様式のレジメンでは、補充的な治療組成物は、多特異的アンタゴニストの投与の前、同時または後に投与され得る。例えば、Mクラスの自己免疫疾患の多様な治療は、T細胞、形質細胞またはマクロファージに対して標的化される治療剤、例えば、T細胞エピトープに対する抗体、さらに詳細にはCD4およびCD5エピトープに対する抗体の同時投与を含み得る。γグロブリンも、同時投与されてもよい。ある場合には、副腎皮質ステロイドのような免疫抑制薬物、そしてまた可能性としては細胞傷害性薬物を同時投与することが所望され得る。この場合、従来の治療において用いられる用量に比較した場合、副腎皮質ステロイドおよび細胞傷害性薬物の用量が低くてもよく、これによってこれらの治療剤の負の副作用が軽減される。治療されるべき疾患ががんである場合、種々の化学療法薬物、免疫療法において用いられる裸の抗体、および放射線（外部または内部）の使用が、本発明による治療と組み合わせられてもよい。同様に、感染および／または敗血症または敗血性ショックが治療されている場合、抗菌性薬物を、多特異的アンタゴニストと組み合わせ用いてもよい。

【0187】

別の実施形態では、治療に用いられる多特異的アンタゴニストは、薬物、毒素、酵素、オリゴヌクレオチド、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、免疫調節剤、ホウ素化合物ま

たは治療用放射性同位体にコンジュゲートされる。多特異的アンタゴニストが別の抗体の混合物を含む場合、抗体の1つだけがコンジュゲートされてもよいし、または抗体の2つ以上がコンジュゲートされてもよい。さらに好ましい実施形態では、治療剤がコンジュゲートまたは融合される低分子量ハプテンに特異的であるアームを含む抗体が用いられる。この場合、この抗体は、B細胞をプレターゲットイングし、そして結合された治療剤を有する低分子量ハプテンは、抗体がB細胞標的に結合された後に投与される。認識可能なハプテンの例としては、限定はしないが、キレート剤、例えば、DTPAおよびDOTA、フルオレセイン・イソチオシアネート、ビタミンB12および特定の抗体が惹起され得る他の部分が挙げられ、これにはまたペプチドおよびオリゴヌクレオチドも含む。好ましいペプチドは、ヒスタミン・スクシニル・グリシン (HSG) である。

10

【0188】

治療上有用な免疫コンジュゲートは、抗体融合タンパク質に対して光活性物質または色素をコンジュゲートすることによって得ることができる。フルオレセイン組成物、例えば、蛍光色素および他の色素原、または色素、例えば、可視光に感受性のポルフィリンは、病変に対して適切な光を向けることにより病変を検出し、治療するために用いられている。治療では、これは、光放射、光線療法または光線力学療法と名づけられている (Joriet al. (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Libreria Progettato 1985); van den Bergh, Chem Britain 22:430 (1986))。さらに、モノクローナル抗体は、光線療法を行うために光活性化色素とカップリングされている。Mew et al., J Immunol 130:1473 (1983); idem., Cancer Res 45:4380 (1985); Oseroff et al., Proc Natl Acad Sci USA 83:8744 (1986); idem., Photochem Photobiol 46:83 (1987); Hasan et al., Prog Clin Biol Res 288:471 (1989); Tatsuta et al., Lasers Surg Med 9:422 (1989); Pelegri et al., Cancer 67:2529 (1991)。従って、本発明は、光活性物質または色素を含む免疫コンジュゲートの治療的用途を意図する。

20

【0189】

B細胞、形質細胞および／またはT細胞に作用することが知られている薬物は、多特異的アンタゴニストにコンジュゲートされても、または多特異的アンタゴニストと組み合わせて別の成分として投与されても、本発明によれば特に有用である。これらとしては、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキセート、ドキソルビシン、フェニルブチラート、プリオスタチン、シクロホスファミド、エトポシド、ブレオマイシン、ドキソルビシン、カルムスチン、ビンクリスチン、ダカルバジン、プロカルバジン、タキソール、プラチナ誘導体、デキサメタゾン、ロイコボリン、プレドニゾン、マイタンシノイド、例えばDM1、カリケアマイシン、ラバマイシン、レフルノミド、FK506、イムラン、フルダラビン、アザチオピン (azathiopine)、ミコフェノレート、カンプトテシン (例えば、CPT-11、SN38)、プロテアソームインヒビター (例えば、Velcade (登録商標)) およびシクロスポリンが挙げられる。B細胞上およびT細胞上の両方で作用するイムラン、ドキソルビシン、メトトレキセートおよびフルダラビンのような薬物が特に好ましい。本発明に従って適切に使用される毒素の例は、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、DNase I、Staphylococcusエンテロトキシン-A、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、Pseudomonas外毒素、Pseudomonas内毒素およびRNAse、例えば、オンコナーゼである。例えば、Pastan et al., Cell 47:641 (1986) およびGoldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994)を参照のこと。他の適切な薬物および毒素が当業者に既知である。

30

40

50

【0190】

多特異的アンタゴニストの診断用途

本発明による多特異的アンタゴニストはまた、種々の状態の診断または検出において有用である。本出願の状況では、「診断」または「検出」という用語は、交換可能に用いられ得る。診断とは通常、組織特異的な組織学的状態を規定することをいうが、検出は、特定の抗原を含有する組織、病変または生物体を認識および位置決めする。これらの実施形態では、多特異的アンタゴニストは、診断／検出物質にコンジュゲートされる。この構築物および診断／検出物質の投与は、WO 04094613および米国特許公開出願第2004 0057902号に記載されている。

【0191】

診断／検出物質は、分子または原子であって、これは、多特異的アンタゴニストに対してコンジュゲートされて投与されてもよく、そして本発明による疾患または状態の部位に位置する細胞上の抗原に対する結合によって、診断または検出において有用である。有用な診断／検出物質としては、限定はしないが、放射性同位体、色素（例えば、ビオチン-ストレプトアビジン複合体を有する）、放射線不透過物質（例えば、ヨウ素、バリウム、ガリウムおよびタリウムの化合物など）、造影剤、蛍光化合物または分子および磁気共鳴画像（MRI）の造影剤（例えば常磁性イオン）、ならびにX線、超音波およびコンピューター断層撮影法（CT）が挙げられる。

【0192】

好ましくは、診断／検出物質は、核画像化、内視鏡および血管内検出のための放射性同位体、磁気共鳴画像化におけるまたは超音波検査における使用のための造影剤、X線およびコンピューター断層撮影のための放射線不透過および造影剤、ならびに内視鏡的蛍光透視を含む蛍光透視のための蛍光化合物からなる群より選択される。抗体に対してコンジュゲートされるか、または二重特異性、プレターゲティング法において用いられる蛍光物質および放射性物質は、詳細には、 γ -エミッター、 β -エミッターおよびポジトロンエミッターで、Goldenbergの米国特許第5,716,595号および同第6,096,289号に開示されるように、悪性腫瘍のような、細胞の疾患の組織または塊に関連する標的抗原の内視鏡的な、術中のまたは血管内の検出のために特に有用である。内視鏡適用は、胃腸管を画像化するためにも用いられる経口挿入カメラを含む、結腸のような、内視鏡を可能にする構造に展開される場合に用いられ得る。

【0193】

本発明による多特異的アンタゴニストは、疾患の組織を検出するために有用な1つ以上の放射性同位体を含み得る。特に有用な診断用の放射性核種としては、限定はしないが、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、または他の γ -エミッター、 β -エミッターもしくはポジトロンエミッターであって、好ましくは20~5,000 keVの範囲、より好ましくは25~4,000 keVの範囲、そしてさらにそれより好ましくは25~1,000 keVの範囲、そしてなおそれより好ましくは、70~700 keVの範囲の崩壊エネルギーを有するものが挙げられる。ポジトロンエミッショントモグラフィーのために有用な放射性核種としては以下が挙げられるが、これらには限定されない。 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{110}In 、 ^{120}I 、および ^{124}I 。有用なポジトロンを放射する放射性核種の総崩壊エネルギーは、好ましくは、2,000 keV未満、さらに好ましくは1,000 keV未満、そして最も好ましくは700 keV未満である。 γ 線検出を利用する診断／検出物質として有用な放射性核種としては、以下が挙げられるが、これらには限定されない。 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{97}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、 ^{197}Hg 、および ^{201}Tl 。有用な γ 線照射放射性核種の崩壊エネルギーは好ましくは20~

10

20

30

40

50

2000 keV、より好ましくは60～600 keV、そして最も好ましくは100～300 keVである。放射性同位体は、多特異的アンタゴニストに対して直接または中間の官能基を用いることによって間接的に結合され得る。

【0194】

放射性標識MAbを用いる診断画像化の方法は周知である。免疫シンチグラフィの技術では、例えば、抗体を、 γ 線を放射する放射性同位体で標識して患者に導入する。 γ カメラを用いて、 γ 線放射する放射性同位体の位置および分布を検出する。例えば、Srivastava (eds.), RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY (Plenum Press 1988), Chase, 「Medical Applications of Radioisotopes」, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, Gennaro et al. (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990) および Brown, 「Clinical Use of Monoclonal Antibodies」, in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY pp. 227-49, Pezzuto et al. (eds.) (Chapman & Hall 1993) を参照のこと。患者に送達された放射線量は、検出および正確な測定を可能にする最小の半減期、身体中の最小保持時間、および同位体の最小量の最良の組み合わせについて同位体の選択を通じて、できるだけ低レベルに維持される。

【0195】

金属はまた、磁気共鳴画像化技術のための物質を含む、診断／検出物質において有用である。これらの金属としては、以下が挙げられるが、これらには限定されない。ガドリニウム、マンガン、鉄、クロム、銅、コバルト、ニッケル、ジスプロシウム、レニウム、ユーロピウム、テルビウム、ホルミウムおよびネオジミウム。抗体成分に放射性金属、常磁性イオンまたは他の検出可能部分を装着 (load) するためには、これを長いテールを有する試薬と反応させて、ここにイオンに結合するためのキレート基の多価性を結合する必要がある。このようなテールは、ポリマー、例えば、ポリリジン、ポリサッカライドまたはペンダント基を有する他の誘導体化されるかまたは誘導体化可能な鎖であってもよく、ここにキレート基、例えば、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸 (DOTA)、p-ブプロモアセトアミド-ベンジル-テトラエチルアミン四酢酸 (TETA)、またはNOTAまたは他の適切なペプチド、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシムなどのこの目的に有用であることが既知である基が結合され得る。キレートは、標準的な化学的方法を用いて抗体に結合される。このキレートは、免疫反応性の損失が最小で、凝集および／または内部架橋が最小であって、分子に対する結合の形成を可能にする基によって抗体に通常は結合される。他のさらによくあるものではない、抗体に対してキレートをコンジュゲートするための方法および試薬は、1989年4月25日発行の「Antibody Conjugates」と題されたHawthorneの米国特許第4,824,659号に開示される。特に有用な金属キレートの組み合わせとしては、放射線イメージングのための、60～4,000 keVの一般的エネルギー範囲における診断用同位体、例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{24}I 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{76}Br とともに用いられる、2-ベンジル-DTPAおよびそのモノメチルおよびシクロヘキシル類似体が挙げられる。同じキレートは、マンガン、鉄およびガドリニウムのような非放射性金属と複合体化された場合、本発明の抗体とともに用いられるとき、MRIに有用である。NOTA、DOTAおよびTETAのような大環状キレートは、種々の金属および放射性金属とともに、最も詳細には、それぞれガリウム、イットリウムおよび銅の放射性核種とともに用いられる。このような金属キレート複合体は、目的の金属に対して環のサイズを調整することによって極めて安定にされ得る。RAITのための ^{223}Ra のような、安定に結合する核種のための目的である、大環状ポリエーテルのよう

な他の環型のキレートは、本発明に包含される。

【0196】

造影剤としては、磁気共鳴画像化における使用のための造影剤、ならびにCTの造影剤および超音波造影剤が挙げられる。本発明による検出および診断において安定な常磁性イオンとしては、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(II)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)が挙げられる。好ましい常磁性磁気画像化剤としては、例えば、非放射性金属、例えば、本発明の抗体とともに用いられる場合、2-ベンジル-DTPAおよびそのモノメチルおよびシクロヘキシル類似体を含む金属キレート組み合わせと複合体化されたマンガン、鉄およびガドリニウムが挙げられ、ここでガドリニウムが特に好ましい。米国特許第6,331,175号は、MRI技術およびMRI造影剤にコンジュゲートされた抗体の調製を記載する。好ましい超音波造影剤は、超音波画像における使用のために2つ以上の画像造影剤を含んでもよい。好ましい実施形態では、この造影剤はリポソームである。好ましくは、リポソームは、リポソームの外面に共有結合された二価DTPAペプチドを含む。好ましくはこのリポソームはガス充填される。

10

【0197】

X線画像化のような他の状況で有用なイオンとしては、限定はしないが、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、および特にビスマス(III)が挙げられる。蛍光標識としては、ローダミン、フルオレセインおよびレノグラフィン(renographin)が挙げられる。ローダミンおよびフルオレセインはしばしば、イソチオシアネート中間体を介して結合される。

20

【0198】

放射線不透過物質および造影剤は、X線およびコンピューター断層撮影を強化するために用いられ、そしてこれには、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物、タリウム化合物などが挙げられる。特定の化合物としては、バリウム、ジアトリゾエート、エチオダイズド油(ethiodized oil)、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨードミド、ヨージパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド(iogulamide)、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスルアミドメグルミン(iosulamide meglumine)、イオセメト酸(iosemetic acid)、イオタズル(iotasul)、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオキシトリゾ酸、イボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾアート、プロピリオドンおよび塩化第一タリウムが挙げられる。

30

【0199】

本発明の多特異的アンタゴニストはまた、蛍光化合物で標識されてもよい。蛍光標識MAbの存在は、適切な波長の光に対して抗体を曝すことおよび得られた蛍光を検出することによって決定される。蛍光標識化合物としては、フルオレセイン・イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒドおよびフルオレスカミンが挙げられる。

40

【0200】

治療モダリティにおけるように、診断のための多特異的アンタゴニストの投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、くも膜下腔内、局所カテーテルを通じた灌流、または直接の病巣内注射によって哺乳動物において達成され得る。注射によって抗体を投与する場合、投与は、連続注入によっても、または単独もしくは複数のボラスによってもよい。診断はさらに、既知の技術で、結合したタンパク質を検出する工程を要する。単独の多特異的アンタゴニストは、同時に治療および診断/検出のために用いられ得る。

。

【0201】

診断および検出の目的のために、多特異的アンタゴニストを、患者に対して、診断上有

50

効な量で、薬学的に許容可能な担体中で投与する。これに関して、「診断上有効な量」とは、一旦アンタゴニストが局在して、過剰のアンタゴニストが血流から排除されれば、検出に関連する装置によって検出され得る量である。

【0202】

本発明は、このように一般に記載され、以下の実施例を参照してさらに容易に理解されるが、この実施例は、例として提供され、本発明を限定することは意図しない。この実施例によって、本発明による多特異的アンタゴニストが動物モデルにおいて敗血性ショックを妨ぐことができ、そしてがん関連悪液質、自己免疫疾患、およびアテローム斑を有する患者における徴候および症状を改善することが実証される。

【実施例1】

【0203】

敗血性ショックの治療

J Rは、72歳の白人男性であって、種々の細胞傷害性薬物、副腎皮質、そしてR i t u x a n（登録商標）で過去に治療されている非ホジキンリンパ腫の既往歴を有し、そして長期の抗生物質治療を要する、安定なリンパ腫および過去のいくつかの感染の既往歴を示している。彼の診療医によって、高温（40.7℃）、悪寒、呼吸困難、動悸、動揺、ある程度の混乱および四肢の冷感と診断された後、彼は救急部門に入院させられる。検査によって、頻脈（>90/分）、高血圧（95/60 mm Hg）が特に立位でみられ、そして尿排泄量の減少（800 mL/日）および肺炎の徴候が明らかである。試験によって、低酸素圧およびアシドーシスが示され、血液カウントでは感染は検出されないが、代わりに、好中球減少（3,500 WBC/mL、10%バンドで）、48,000の血小板、6 g/dLのH gが示され、胸部X線によって、全身性の肺炎が明らかになり、血液試験は、腎機能の低下を示し、異常な血清クレアチニン（3 mg/dL）およびBUNレベルを伴い、そして血清乳酸の上昇によって、組織の低灌流が示される。血液培養によって、S. aureusおよびグラム陰性細菌の存在が明らかになり、これによって敗血症の診断が支持される。患者を、重篤な敗血症および敗血性ショックについて集中治療室で治療し、これには一般的な対症療法（酸素）、循環血液量を回復する液体注入による血行動態サポート（500 mLの0.9%塩化ナトリウムおよび乳酸リンゲル溶液であって、最初の2~3時間にわたって最大2 Lまで）、ドーパミンによる昇圧補助療法（I n t r o p i n、3 mcg/kg/分、i v）、およびシプロフロキサシン（C i p r o）の12時間ごとの400 mgのI Vによる抗生物質療法を含む。患者はまた、ドロテコギン・α（d r o t e c o g i n a l f a）（活性化プロテインC）を24 microg/kg/時間で、全部で96時間にわたって与えられる。入院の5日後、患者は安定しているが、徴候も症状も有意な改善は示さず、わずかに尿排泄が良くなり、血圧のわずかな上昇、および39.3℃への温度のわずかな低下のみが示される。次いで患者には、300 mgの抗M I Fおよび400 mgの抗L P S抗体からなる、2つのヒト化モノクローナル抗体の組み合わせが、3週間にわたって毎週2回連続して、両方とも4時間にわたる緩徐な注入によって与えられる。2週間の間、この患者が示す錯乱は少なくなり、体温のさらなる低下、頻脈の減少、呼吸困難および肺炎の軽減が、理学的検査および胸部x線の両方によって示される。三週目の終わりに、彼の腎機能試験によってまた、いくつかの改善（BUNおよび血清クレアチニン値）が示され、そして彼は集中治療室から感染病棟に戻り、対症療法を調節される。2ヵ月後、この患者は、活性プロテインCおよび抗M I Fおよび抗L P S抗体の反復サイクル、ならびに広範なスペクトルの抗生物質の反復コースを受け、次いで、さらなる改善を示し、その結果彼は、退院可能になり、そして実際に正常な精神機能、および肺炎の全体的な80%を超える減少、および38.5℃の熱、そして約80%の正常な尿排泄量になる。

【実施例2】

【0204】

全身性エリテマトーデス（SLE）の治療

S. R. は、32歳のアフリカ系アメリカ人女性であって、5年前に、彼女が、糸球

10

20

30

40

50

体腎炎（WHOの3級）、漿膜炎、多発性関節炎および脈管の発疹（vasculitic rash）を示した時に、SLEと診断された。彼女は、持続性の疾患のせいで、副腎皮質ステロイド（1日あたり15～60mgの範囲）およびヒドロキシクロロキン（200mg/日）、そして後の時点ではまた、アザチオプリン（100mg/日）およびシクロホスファミドのコースによって、以前に治療を受けた。数年間にわたって、彼女は、多発性関節炎、こん睡状態、皮膚発疹および漿膜炎を示す、SLEの悪化を経験している。彼女は、現在、持続性の活動性の疾患を示し、従来の治療に対しては非応答性であるが、毎日40mgのプレドニゾンが維持されている。彼女にはヒト化抗CD22モノクローナル抗体、エブラツズマブ（epratuzumab）をi.v.で400mg、1時間にわたって与え、続いて2週間各々を1回繰り返す。三番目の注入の4週後、彼女の循環するBリンパ球は、治療前にベースラインから40%まで減少されるが、彼女のHgレベルは8g/dLから10g/dLに上昇している。彼女の発疹および多発性関節炎は、ある程度の改善を示すが、彼女は、さらなる治療を要する。彼女の抗CD22抗体治療の8週後、彼女には、抗CD83および抗TNF α 抗体の組み換え異種コンジュゲートからなる二重特異性抗体融合タンパク質の1コースを、毎週500mgのi.v.の用量で4週間与える。2ヵ月後の評価の時点で、彼女は、全ての器官系において、ほとんどBILAG CおよびD状況に対して、顕著な改善を有し、そして彼女のプレドニゾン用量は1日あたり7.5mgまで漸減され得る。3ヶ月の追跡時には、彼女の器官の症状のほとんどが安定なままで、彼女は、悪化なしにこの低用量のプレドニゾン続ける。

【実施例3】

【0205】

非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療

SLEは、66歳齢の白人男性であって、CHOPおよびリツキシマブでの治療後に再発されたびまん性大細胞NHLの既往歴があり、現在は、発熱、肺および縦隔の浸潤物、頸のリンパ節および腋窩リンパ節の拡張、ならびに吸引および細胞学に基づく骨髄障害の証拠を示している。彼は、2つのヒト化抗体であって、1つはTNF α に対するもの、そしてもう1つはMIFに対するものであって、各々が同じ日に連続して与えられる抗体を、各々について3～4時間の注入にわたって、各々450mgの用量で、6週間毎週注入される。最後の注入の24時間後、彼の試験によって、彼はこの治療に対して大きな毒性を有さないこと、そして彼の頸のリンパ節および腋窩リンパ節のある程度の明らかな軟化が示される。8週間の次の追跡試験では、ほぼ全ての彼の頸のリンパ節そして約半分のこれらの腋窩リンパ節が消失し、そして彼の胸部X線およびCTスキャンによって、彼の肺および縦隔の浸潤物の約60%収縮という証拠が示される。約4ヵ月後、彼の試験によって、彼のリンパ節および肺の障害は安定であるが、骨髄障害の増大および彼のHgの8g/dLへの低下が示唆されることが明らかになる。次いで、彼に、MIFに対するそしてIL-6に対する融合されたヒト化抗体からなる二重特異性抗体を与え、これは、緩徐なi.v.注入あたり500mgの用量で3週間にわたって毎週2回与えた。3ヶ月の評価の時点で、彼のHgは、11g/dLへの上昇を示し、骨髄吸引物中でNHL細胞の顕著な減少があり、そして明白なリンパ節も放射線学的試験によって胸部で可視の疾患もない。患者の応答はさらに6ヶ月にわたって安定なままである。

【実施例4】

【0206】

がん関連悪液質の治療

NRは、58歳齢のアフリカ系アメリカ男性であって、重度の喫煙歴ならびに左肺にそして両側の傍大動脈および傍気管支リンパ節に罹患している手術不能な非小細胞性肺がんの既往歴を有する。彼は、併用化学療法を受け、これは、骨髄毒性、および全ての測定可能な容積の40%未満である、ある程度のわずかな腫瘍収縮の証拠を示している。彼は、かなりの体重減少を示し、ほぼ2mの身長で現在の体重は68kgであり、がん関連の悪液質に罹患している。彼は、IL-6およびTNF α の両方を標的化するヒト化二重特異性融合抗体構築物を毎週600mgの用量で8週間にわたって毎週注入される。最後の3

週間の間、彼の食欲は改善して、彼は、治療後7週間で75kgまで体重増加を示し、筋肉がさらに強くなり、そして全般的に活力が改善され、次に、彼が悪性疾患の進行を示し始めたとき、次の2ヶ月間にわたって75kg～80kgで安定なままである。彼のサイクルの化学療法以外では、抗体療法の間に副腎皮質ステロイドは与えられず、彼は、悪液質についてこの治療に対して応答したとみなされる。

【実施例5】

【0207】

腎細胞癌の治療

JRは、45歳例の白人女性であって、彼女の左腎臓に塊を、そして左側の傍動脈リンパ節の障害、そして左肺上部に3×4cmの疾患病巣を示している。彼女は、左腎臓の完全な切除を受け、隣接するリンパ節の排除を受けている。6週後、彼女には、IL-2サイトカインと融合されたヒト化IL-6抗体の7週毎週のi.v.注入を、500mg（抗体タンパク質）の用量で与え、これを後に4ヶ月繰り返す。最後の治療後3ヶ月の彼女の追跡試験では、彼女の試験によって、彼女の肺転移の60%低下が明らかになり、新規な疾患はどこにも証明されない。

10

【実施例6】

【0208】

腎癌の治療

PSは、70歳齢の白人女性であって、直腸腺癌（T3N2）の直腸腸間膜全摘出およびアジュバント化学放射線療法（連続的な注入の5-フルオロウラシルおよび細分された1.8Gyの用量、5週半の期間にわたって1週あたり5日間、総線量45Gyの外放射線療法）の既往歴を有する。彼女には、術後化学療法を行っておらず、6ヵ月後に、肝臓の右葉下部に2～4cmの直径に及ぶ3つの転移を、そして16.4ng/mLの血清CEA力価を示す。原発性直腸癌は、免疫組織学によって評価され、そしてCD59およびCEACAM6の両方の高い発現を示す。次いで、彼女は、組み換え的に融合されたヒト化抗CD59抗体およびヒト化抗CEACAM6抗体からなる二重特異性抗体の350mgを、投与され、これは、8週間にわたって毎週1回、5週間の期間にわたって、平行してフルオロウラシルの連続注入を与えられる。最後の抗体注入後2ヶ月の追跡時点で、患者の血液CEA力価は、12ng/mLまで低下し、ただし肝臓の転移のサイズではCTスキャンによる変化はない。さらに3ヶ月後、血液CEAは7ng/mLであり、そしてCTスキャンによって最小の肝臓転移が消失し、他の2つは約50%まで縮小している。この疾患は、さらに2ヶ月間安定なままであって、その時点で血液のCEAレベルは、10ng/mLまで上昇するが、肝臓転移のサイズではまだ変化はない。

20

30

【0209】

このように、本発明による炎症および免疫調節不全疾患およびがんの免疫療法の方法および組成物が記載されている。多くの改変およびバリエーションが、本明細書において記載および例示された技術および構造に対して、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなくなされ得る。従って、本明細書に記載される組成物および方法は、例示のみであって、本発明の範囲に基づいて限定されないことが理解されるべきである。

【0210】

上記の全ての文書、参考文献および引用文献であって、その参考文献を含むものの内容は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなすものとする。

40

【手続補正書】

【提出日】平成24年12月12日(2012.12.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも2つの異なる標的と特異的に反応する多特異的アンタゴニストであって、該標的が、(A) 先天性免疫系の炎症促進性エフェクターと、(B) 凝固因子と、(C) 補体因子および補体調節タンパク質と、(D) 炎症性障害または免疫調節不全障害と特異的に関連する標的、または病的血管新生もしくははがんと特異的に関連する標的であって、後者の標的が(A)でも、(B)でも、(C)でもない標的とからなる群より選択され、

(i) 前記標的の少なくとも1つが(A)、(B)または(C)であり、

(ii) 前記多特異的アンタゴニストが、単一の多特異的抗体を含む場合は、CD74が前記アンタゴニストの標的として排除され、そして

(iii) 前記多特異的アンタゴニストが、別個の抗体の組み合わせを含む場合、前記抗体の1つがB細胞抗原を標的化し、かつもう一方の抗体がT細胞、形質細胞、マクロファージまたは炎症性サイトカインを標的化する組み合わせが排除され、前記抗体の1つがCD20を標的化し、かつもう一方の抗体がCD3bまたはCD40を標的化する組み合わせも排除される、多特異的アンタゴニスト。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
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	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/02 A
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00 A
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	37/48
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	37/24
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
G 0 1 N	33/533	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 J
G 0 1 N	33/534	(2006.01)	G 0 1 N	33/533
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G 0 1 N	33/534
			C 1 2 N	15/00 A

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(72)発明者 ゴールデンバーグ, デイヴィッド・エム

アメリカ合衆国ニュージャージー州07945, メンダム, シャロレイ・ファーム・ロード 1

(72)発明者 ハンセン, ハンス・ジェイ

アメリカ合衆国ミシシッピ州39466, ピカユーン, アングラ・ドライブ 6014

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA13 BA53 CA07 DA02 DA05 DA11 EA02 EA04

FA01 GA11 HA03 HA11

4C084 AA02 AA22 BA05 BA41 MA02 NA05 NA14 ZA362 ZA541 ZA542

ZB081 ZB082 ZB111 ZB261 ZC032 ZC202

4C085 AA13 AA15 EE03 EE06 HH01 HH03 HH11 KA27 KA29 KB82

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	用于免疫疗法和检测炎症性疾病和免疫失调疾病，感染性疾病，病理性血管生成和癌症的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2013079240A	公开(公告)日	2013-05-02
申请号	JP2012248395	申请日	2012-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司 IMMUNOMEDICS , INC		
申请(专利权)人(译)	李宙卢武铉梅迪库斯公司		
[标]发明人	ゴールデンバーグデイヴィッドエム ハンセンハンスジェイ		
发明人	ゴールデンバーグ,デイヴィッド・エム ハンセン,ハンス・ジェイ		
IPC分类号	A61K39/395 C07K19/00 C07K16/46 A61P29/00 A61P37/06 A61P35/00 A61K38/00 A61P7/02 A61K45/00 A61P31/04 A61P11/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P17/00 A61P9/00 A61K51/00 A61K49/00 A61K38/43 A61K38/22 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/534 C12N15/09		
CPC分类号	A61K49/0002 A61K2039/505 A61K2039/507 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/1203 C07K16/24 C07K16/241 C07K16/248 C07K16/2803 C07K16/2896 C07K16/30 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/734 A61K31/513 A61K38/193 A61K38/2013 A61K38/4866 A61K39/3955 A61K39/40 A61K45/06		
FI分类号	A61K39/395.D C07K19/00 C07K16/46 A61P29/00 A61P37/06 A61P35/00 A61K37/02 A61P7/02 A61K45/00 A61P31/04 A61P11/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P17/00 A61P9/00 A61K49/02.A A61K49/00.A A61K37/48 A61K37/24 G01N33/53.D G01N33/53.J G01N33/533 G01N33/534 C12N15/00.A A61K38/00 A61K38/22 A61K38/43 A61K49/00 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/08.200 C12N15/13 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/BA53 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4C084/AA02 4C084/AA22 4C084/BA05 4C084/BA41 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA541 4C084/ZA542 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZC032 4C084/ZC202 4C085/AA13 4C085/AA15 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/HH01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB82 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	河村 英文 中村 綾子		
优先权	60/634076 2004-12-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供针对炎症和免疫调节疾病的免疫治疗的方法和组合物，使用靶向至少两种不同标志物的多特异性拮抗剂。溶解：不同的靶标包括 (i) 先天免疫系统的促炎效应物， (ii) 凝固因子，和 (iii) 与炎症或免疫失调病症，病理性血管生成或癌症或传染病特异性相关的靶标。多特异性拮抗剂含有至少一种与所治疗的病变细胞或病症相关的结合特异性，以及对免疫系统组分，凝血调节剂或促炎细胞因子的至少一种特异性。多特异性拮抗剂用于治疗由先天免疫系统或凝血因子的促炎效应物产生或加剧或以其他方式涉及的各种疾病。

第一標的	第二標的
MIF	第二の炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
MIF	炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
MIF	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
MIF	凝固因子、特に TF または トロンビン
MIF	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
MIF	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
MIF	がん関連抗原またはレセプター
HMGB-1	第二の炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、TNF- α 、IL-1 または IL-6
HMGB-1	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
HMGB-1	炎症促進性エフェクターレセプター、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
HMGB-1	凝固因子、特に TF または トロンビン
HMGB-1	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
HMGB-1	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
HMGB-1	がん関連抗原またはレセプター
TNF- α	第二の炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
TNF- α	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
TNF- α	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
TNF- α	凝固因子、特に TF または トロンビン
TNF- α	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
TNF- α	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
TNF- α	がん関連抗原またはレセプター
LPS	炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
LPS	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
LPS	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
LPS	凝固因子、特に TF または トロンビン
LPS	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
LPS	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
TF または トロンビン	炎症促進性エフェクターサイトカイン、特に MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 または IL-6
TF または トロンビン	炎症促進性エフェクターケモカイン、特に MCP-1、RANTES、MIP-1A または MIP-1B
TF または トロンビン	炎症促進性エフェクターレセプター、特に IL-6R、IL-13R および IL-15R
TF または トロンビン	補体因子、特に C3、C5、C3a または C5a
TF または トロンビン	補体調節性タンパク質、特に CD46、CD55、CD59 および mCRP
TF または トロンビン	がん関連抗原またはレセプター