

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 540764

(P2002 - 540764A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/436	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/436		31/519	4 B 0 6 5
31/519		31/573	4 C 0 8 4
31/573		35/14	4 C 0 8 5
35/14		35/28	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 (全158数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 598540(P2000 - 598540)

(86)(22)出願日 平成12年2月9日(2000.2.9)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月10日(2001.8.10)

(86)国際出願番号 PCT/US00/03303

(87)国際公開番号 W000/47625

(87)国際公開日 平成12年8月17日(2000.8.17)

(31)優先権主張番号 09/249,011

(32)優先日 平成11年2月12日(1999.2.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/339,596

(32)優先日 平成11年6月24日(1999.6.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ジェネティックス・インスチチュート・インコーポレーテッド
GENETICS INSTITUTE
INCORPORATED
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02140,
ケンブリッジ,ケンブリッジパーク・ドライブ 87

(72)発明者 マン・スン・コ
アメリカ合衆国95014カリフォルニア州クペ
ルティノ、ウィルキンソン・アベニュー10
952番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B 7分子と反応するヒト化免疫グロブリンおよびそれを用いた治療方法

(57)【要約】

本発明は、ヒト化抗 - B 7 - 2 および抗 - B 7 - 1 抗体に関し、各抗体は非ヒト起源の可変領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む。また本発明は、ヒト化抗 - B 7 - 2 および抗 - B 7 - 1 抗体を投与することによる種々の自己免疫疾患、移植拒絶反応、炎症性疾患および感染症の治療方法にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む、B7分子に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン。

【請求項2】 B7分子がB7-1および/またはB7-2である請求項1のヒト化免疫グロブリン。

【請求項3】 ヒト化B7-1抗体およびヒト化B7-2抗体を含む医薬組成物。

【請求項4】 ヒト化B7-1抗体および/またはヒト化B7-2抗体をコードする核酸を含む宿主細胞。

【請求項5】 非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む、B7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン。

【請求項6】 ヒト起源の免疫グロブリンの部分がヒト不変領域に由来するものである請求項5のヒト化免疫グロブリン。

【請求項7】 ヒト不変領域がIgG不変領域を含むものである請求項6のヒト化免疫グロブリン。

【請求項8】 ヒト不変領域が免疫グロブリンのエフェクター機能を低下させる変異を含むものである請求項7のヒト化免疫グロブリン。

【請求項9】 ヒト化不変領域がIgG2不変領域を含み、位置234のバリンアミノ酸がアラニンで置換されており、そして/あるいは位置237のグリシンアミノ酸がアラニンで置換されている請求項8のヒト化免疫グロブリン。

【請求項10】 IgG不変領域が、IgG4不変領域およびIgG2不変領域からなる群より選択されるものである請求項7のヒト化免疫グロブリン。

【請求項11】 抗原結合領域がげっ歯類起源である請求項5のヒト化免疫グロブリン。

【請求項12】 抗原結合領域がげっ歯類起源の相補性決定領域を含み、ヒト起源の免疫グロブリンの部分がヒトフレームワーク領域に由来するものである請求項5のヒト化免疫グロブリン。

【請求項13】 相補性決定領域が1F1モノクローナル抗体に由来するものである請求項12のヒト化免疫グロブリン。

【請求項14】 ATCC受託番号PTA-263として寄託された細胞系に由来するB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン。

【請求項15】 ネズミ1F1抗体の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3、ならびにヒト軽鎖フレームワーク領域を含む、B7-1に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン軽鎖。

【請求項16】 軽鎖が配列番号：28の可変領域を含むものである請求項15のヒト化免疫グロブリン軽鎖。

【請求項17】 a) 配列番号：27、
b) 配列番号：28のアミノ酸配列をコードする核酸、
c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でa)またはb)に記載の核酸とハイブリダイゼーションする核酸、および
d) a)またはb)に記載の核酸の相補物である核酸
からなる群より選択される核酸を含む単離核酸。

【請求項18】 1F1抗体の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3、ならびにヒト重鎖フレームワーク領域を含む、B7-1に対して特異的なヒト化免疫グロブリン重鎖。

【請求項19】 重鎖が配列番号：26の可変領域を有するものである請求項18のヒト化免疫グロブリン重鎖。

【請求項20】 a) 配列番号：25、
b) 配列番号：26のアミノ酸配列をコードする核酸、
c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でa)またはb)に記載の核酸とハイブリダイゼーションする核酸、および
d) a)またはb)に記載の核酸の相補物である核酸
からなる群より選択される核酸を含む単離核酸。

【請求項21】 請求項5のヒト化免疫グロブリンをコードする核酸を含む宿主細胞。

【請求項22】 a) ネズミ1F1モノクローナル抗体に由来する抗原結合

領域をコードする第1の核酸配列；および

b) ヒト起源の免疫グロブリンの不変領域の少なくとも一部分をコードする第2の核酸配列

を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードする融合遺伝子。

【請求項23】 B7-1受容体を担持する第1の細胞と、B7-1を担持する第2の細胞との相互作用を阻害する方法であって、該第1の細胞を有効量の請求項5のヒト化免疫グロブリンと接触させることを特徴とする方法。

【請求項24】 移植された器官、組織または細胞を有する個体の治療方法であって、治療上有効量の請求項5のヒト化抗体を投与することを特徴とする方法。

【請求項25】 B7-1によりモジュレートされる疾病の治療方法であって、治療上有効量の請求項5のヒト化抗体を投与することを特徴とする方法。

【請求項26】 (a) B7-1に対する結合特異性を有する非ヒト起源の抗体の相補性決定領域を決定し；

(b) (a)で決定した相補性決定領域の移植に適したフレームワーク領域アミノ酸を有するヒト抗体を得て、ついで

(c) (a)の相補性決定領域を(b)のヒト抗体のフレームワーク領域中に移植すること

を特徴とする、B7-1に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造方法であって、該免疫グロブリンが非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むものであり、B7-1に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンが得られる方法。

【請求項27】 試料中のB7-1の存在または不存在を決定する方法であって、下記工程を特徴とする方法：

a) 該試料をB7-1に対して特異的なヒト化抗体と接触させて、B7-1と抗-B7-1抗体との間の複合体形成を十分に可能とし、ついで

b) 該複合体形成の存在または不存在を検出する。

【請求項28】 非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む、B7-2に対する結合特異性を有するヒト化免疫

グロブリン。

【請求項29】 ヒト起源の免疫グロブリンの部分がヒト不変領域に由来するものである請求項28のヒト化免疫グロブリン。

【請求項30】 ヒト不変領域がI g G不変領域を含むものである請求項29のヒト化免疫グロブリン。

【請求項31】 ヒト不変領域が免疫グロブリンのエフェクター機能を低下させる変異を含むものである請求項30のヒト化免疫グロブリン。

【請求項32】 ヒト化不変領域がI g G 2不変領域を含み、位置234のバリンアミノ酸がアラニンで置換されており、そして/あるいは位置237のグリシンアミノ酸がアラニンで置換されている請求項31のヒト化免疫グロブリン。

【請求項33】 I g G不変領域が、I g G 4不変領域およびI g G 2不変領域からなる群より選択されるものである請求項30のヒト化免疫グロブリン。

【請求項34】 抗原結合領域がげっ歯類起源である請求項28のヒト化免疫グロブリン。

【請求項35】 抗原結合領域がげっ歯類起源の相補性決定領域を含み、ヒト起源の免疫グロブリンの部分がヒトフレームワーク領域に由来するものである請求項28のヒト化免疫グロブリン。

【請求項36】 相補性決定領域が3D1モノクローナル抗体に由来するものである請求項35のヒト化免疫グロブリン。

【請求項37】 ATCC受託番号CRL-12524として寄託された細胞系に由来するB7-2に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン。

【請求項38】 ネズミ3D1抗体の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3、ならびにヒト軽鎖フレームワーク領域を含む、B7-2に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン軽鎖。

【請求項39】 軽鎖が配列番号：8の可変領域を含むものである請求項38のヒト化免疫グロブリン軽鎖。

【請求項40】 a) 配列番号：7、

b) 配列番号：8のアミノ酸配列をコードする核酸、

c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で a) または b) に記載の核酸とハイブリダイゼーションする核酸、および

d) a) または b) に記載の核酸の相補物である核酸からなる群より選択される核酸を含む単離核酸。

【請求項41】 3D1抗体の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3、ならびにヒト重鎖フレームワーク領域を含む、B7-2に対して特異的なヒト化免疫グロブリン重鎖。

【請求項42】 重鎖が配列番号：6の可変領域を有するものである請求項41のヒト化免疫グロブリン重鎖。

【請求項43】 a) 配列番号：5、

b) 配列番号：6のアミノ酸配列をコードする核酸、

c) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で a) または b) に記載の核酸とハイブリダイゼーションする核酸、および

d) a) または b) に記載の核酸の相補物である核酸からなる群より選択される核酸を含む単離核酸。

【請求項44】 請求項28のヒト化免疫グロブリンをコードする核酸を含む宿主細胞。

【請求項45】 a) ネズミ3D1モノクローナル抗体に由来する抗原結合領域をコードする第1の核酸配列；および

b) ヒト起源の免疫グロブリンの不変領域の少なくとも一部分をコードする第2の核酸配列を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードする融合遺伝子。

【請求項46】 B7-2受容体を担持する第1の細胞と、B7-2を担持する第2の細胞との相互作用を阻害する方法であって、該第1の細胞を有効量の請求項28のヒト化免疫グロブリンと接触させることを特徴とする方法。

【請求項47】 移植された器官、組織または細胞を有する個体の治療方法であって、治療上有効量の請求項28のヒト化抗体を投与することを特徴とする方法。

【請求項48】 B7-2によりモジュレートされる疾病の治療方法であっ

て、治療上有効量の請求項28のヒト化抗体を投与することを特徴とする方法。

【請求項49】 (a) B7-2に対する結合特異性を有する非ヒト起源の抗体の相補性決定領域を決定し；

(b) (a)で決定した相補性決定領域の移植に適したフレームワーク領域アミノ酸を有するヒト抗体を得て、ついで

(c) (a)の相補性決定領域を(b)のヒト抗体のフレームワーク領域中に移植すること

を特徴とする、B7-2に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造方法であって、該免疫グロブリンが非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むものであり、B7-2に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンが得られる方法。

【請求項50】 試料中のB7-2の存在または不存在を決定する方法であって、下記工程を特徴とする方法：

a) 該試料をB7-2に対して特異的なヒト化抗体と接触させて、B7-2と抗-B7-2抗体との間の複合体形成を十分に可能とし、ついで

b) 該複合体形成の存在または不存在を検出する。

【請求項51】 a) ドナーから細胞を得て、

b) 細胞を、B7-1に対して特異的な免疫グロブリン、B7-2に対して特異的な免疫グロブリンおよび個体由来のレシピエント細胞と、寛容性の誘導に十分な時間接触させて、そのことにより混合物を得て、ついで

c) 混合物を個体に導入する

ことを特徴とする、細胞移植を必要とする個体への細胞移植方法。

【請求項52】 ドナーからの細胞が骨髄または血液由来である請求項51の方法。

【請求項53】 レシピエント細胞がリンパ球である請求項51の方法。

【請求項54】 時間が約12時間ないし約96時間である請求項51の方法。

【請求項55】 時間が約36時間ないし約48時間である請求項54の方法。

【請求項56】 個体が、増殖性疾患、貧血、先天性代謝異常、先天性免疫欠損疾患、骨髄形成不全症候群からなる群より選択される疾病を有するものである請求項55の方法。

【請求項57】 増殖性疾患が白血病、リンパ腫およびガンからなる群より選択されるものである請求項56の方法。

【請求項58】 貧血が、鎌形赤血球貧血、サラセミア、および再生不良性貧血からなる群より選択されるものである請求項57の方法。

【請求項59】 免疫応答をモジュレートするために使用される薬剤を個体に投与することを特徴とする請求項51の方法。

【請求項60】 薬剤がメトレキセート、ラパマイシン、シクロスポリン、ステロイド類、CD40経路阻害剤、移植片サルベージ経路阻害剤、IL-2受容体アンタゴニストおよびそれらのアナログからなる群より選択されるものである請求項59の方法。

【請求項61】 B7-1に対して特異的な有効量の免疫グロブリンおよびB7-2に対して特異的な有効量の免疫グロブリンをレシピエントに投与することを特徴とする、移植片レシピエントの治療あるいは移植片レシピエントにおける移植片拒絶反応を防止する方法。

【請求項62】 カルシニューリン阻害剤、ステロイド類、および免疫細胞の増殖を停止させる免疫抑制剤、メトレキセート、CD40経路阻害剤、移植片サルベージ経路阻害剤、IL-2受容体アンタゴニストおよびそれらのアナログからなる群より選択される成分を投与することをさらに特徴とする請求項61の方法。

【請求項63】 カルシニューリン阻害剤がシクロスポリンAまたはFK506である請求項62の方法。

【請求項64】 ステロイドがメチルプレドニソンまたはプレドニソンである請求項62の方法。

【請求項65】 免疫細胞の増殖を停止させる免疫抑制剤がラパマイシンである請求項62の方法。

【請求項66】 B7-1に対して特異的な免疫グロブリンが約1mg/k

がないし25mg/kgの量で投与され、B7-2に対して特異的な免疫グロブリンが約1mg/kgないし25mg/kgの量で投与される請求項61の方法。

【請求項67】 B7-1に特異的な免疫グロブリンおよびB7-2に特異的な免疫グロブリンが、レシピエントが移植を受ける日に投与される請求項66の方法。

【請求項68】 B7-1に対して特異的なヒト化免疫グロブリンが約1mg/kgないし25mg/kgで、B7-2に対して特異的なヒト化免疫グロブリンが約1mg/kgないし25mg/kgで、レシピエントが移植を受ける日に投与される請求項67の方法。

【請求項69】 B7-1に対して特異的なヒト化免疫グロブリンおよびB7-2に対して特異的なヒト化免疫グロブリンが、さらに、レシピエントが移植を受ける後、定期的に投与される請求項68の方法。

【請求項70】 B7-1に対して特異的なヒト化免疫グロブリンおよびB7-2に対して特異的なヒト化免疫グロブリンが、さらに、レシピエントが移植を受ける後、少なくとも毎週投与される請求項69の方法。

【請求項71】 B7-1に対して特異的なヒト化免疫グロブリンが約1mg/kgないし5mg/kgで、B7-2に対して特異的なヒト化免疫グロブリンが約1mg/kgないし5mg/kgで、レシピエントが移植を受ける後、少なくとも毎週投与される請求項70の方法。

【請求項72】 自己免疫疾患、感染性疾患、炎症性疾患、全身性エリトマトーデス、糖尿病、喘息、膵臓炎、関節炎、炎症性腸疾患、炎症性皮膚炎、および多発性硬化症からなる群より選択される疾病を有する個体の治療方法であって、B7-1に対して特異的な治療上有効量のヒト化免疫グロブリンおよび/またはB7-2に対して特異的な治療上有効量のヒト化免疫グロブリンを投与することを特徴とする方法。

【請求項73】 移植された器官、組織、細胞等を有する個体の免疫応答をモジュレートする方法であって、担体中のB7-1に対して特異的な有効量のヒト化免疫グロブリンおよび/またはB7-2に対して特異的な有効量のヒト化免

疫グロブリンを投与することを特徴とする方法。

【請求項74】 移植された器官、組織、細胞等を有する個体の免疫応答をモジュレートするために使用される薬剤を投与することを特徴とし、薬剤がメトレキセート、ラパマイシン、シクロスポリン、ステロイド類、CD40経路阻害剤、移植片サルベージ経路阻害剤、IL-2受容体アンタゴニストおよびそれらのアナログからなる群より選択されるものである請求項73の方法。

【請求項75】 B7-1に対して特異的な有効量のヒト化免疫グロブリンおよび/またはB7-2に対して特異的な有効量のヒト化免疫グロブリンを、抗原の存在下において、個体に投与することを特徴とする、哺乳動物における抗原に対する抗体の応答を減少させる方法。

【請求項76】 抗原を個体に投与することをさらに特徴とする請求項75の方法。

【請求項77】 抗体が、破傷風トキソイド、因子VIIII、因子IX、インスリン、成長ホルモン、および遺伝子デリバリーベクターからなる群より選択されるものである請求項75の方法。

【請求項78】 請求項1の組成物を含む、例えば、自己免疫疾患、感染性疾患、炎症性疾患、全身性エリトマトーデス、糖尿病、喘息、膵臓炎、関節炎、炎症性腸疾患、炎症性皮膚炎、および多発性硬化症の治療におけるB7-1および/またはB7-2に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの使用。

【請求項79】 細胞、組織または器官を個体に移植するための医薬の製造のための、B7-1および/またはB7-2に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの使用。

【請求項80】 哺乳動物における抗原に対する抗体応答を減少させるための医薬の製造のための、抗原の存在下におけるB7-1および/またはB7-2に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

関連出願

本願は、1999年2月12日出願の第09/249011号の一部継続出願である1999年6月24日出願の第09/339596号の一部継続出願である。

【0002】

発明の背景

抗原特異的T細胞活性化および免疫応答開始は、まず、T細胞受容体(TCR)複合体と、抗原提示細胞(APC)上に存在するペプチド/主要組織適合性複合体(MHC)との相互作用に依存する。B7分子であるB7-1およびB7-2は、APC上に存在する分子である。APC上のB7-1およびB7-2と、それらのリガンドCD28およびT細胞上のCTLA4との相互作用により提供される「共刺激」シグナルは、T細胞活性化およびその後の免疫応答調節に必要である。B7-1およびB7-2経路(B7:CD28/CTLA4経路とも呼ばれる)を調節する必要がある。さらに、この経路により影響を受ける疾病の治療を開発することも必要である。

【0003】

発明の概要

本発明は、B7分子に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する。詳細には、本発明は、B7-2またはB7-1に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関し、ここに免疫グロブリンは非ヒト起源(例えば、げっ歯類)の抗原結合領域およびヒト起源の少なくとも一部分(例えば、IgG不変領域のごときヒト不変領域および/またはヒトフレームワーク領域)を有するものである。1の具体例において、ヒト化抗-B7-2免疫グロブリンまたはヒト化抗-B7-1免疫グロブリンのいずれかのヒト不変領域は、ヒト化免疫グロブリンのエフェクター機能を減じる変異を含むことができる。本明細書記載のヒト化B7-2免疫グロブリンは、B7-2への結合に関してネズミ3D1と競合しうる。同様に、本明細書記載のヒト化B7-1免疫グロブリンはB7-1への

結合に関してネズミ1F1と競合しうる。特定の具体例において、ヒト化B7-2免疫グロブリンの抗原結合領域は3D1モノクローナル抗体由来であり、ヒト化B7-1免疫グロブリンの抗原結合領域は1F1モノクローナル抗体由来である。

【0004】

本発明のヒト化免疫グロブリンはヒト起源の不変領域および抗原結合領域を含み、ここに非ヒト起源の抗原結合領域は、B7-2に結合するげっ歯類由来（例えば、3D1モノクローナル抗体由来）の1またはそれ以上の相補性決定領域（CDR）、あるいはB7-1に結合するげっ歯類由来（例えば、1F1モノクローナル抗体由来）の1またはそれ以上のCDRを含み、ヒト免疫グロブリンの一部はヒトフレームワーク領域（FR）由来である。

【0005】

ヒト化B7-2抗体の抗原結合領域は、さらに1本の軽鎖および1本の重鎖を含むことができ、ここに軽鎖および重鎖はそれぞれ3D1抗体由来の3つのCDRを有する。ヒト化B7-2抗体に関して、軽鎖のFRは、例えば、ヒトH2F抗体の軽鎖由来であってもよく、重鎖は、例えば、ヒトI2R抗体の重鎖由来であってもよい。特別な具体例において、本発明は、American Type Culture Collection (ATCC)受託番号CRL-12524として寄託された細胞系由来のB7-2に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンである。

【0006】

ヒト化B7-1抗体の抗原結合領域は1本の軽鎖および1本の重鎖を含むことができ、ここに軽鎖および重鎖はそれぞれ1F1抗体由来の3つのCDRを有する。ヒト化B7-1軽鎖および重鎖のFRは、例えば、ヒトIII-2R抗体の軽鎖および重鎖由来であってもよい。特別な具体例において、本発明は、American Type Culture Collection (ATCC)受託番号PTA-263として寄託された細胞系由来のB7-1に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンである。

【0007】

また本発明は、B7-1またはB7-2に対して結合特異性を有するヒト化免

疫グロブリンに関するものであり、該免疫グロブリンは1本の重鎖および/または1本の軽鎖を有する。1の具体例において、ヒト化免疫グロブリンはB7-2に対する結合特異性を有し、軽鎖は、B7-2に結合する非ヒト起源の抗体由来の少なくとも1つのCDR(例えば、CDR1、CDR2およびCDR3)およびヒト起源(例えば、H2F抗体)の軽鎖由来のFRを含み、重鎖は、B7-2に結合する非ヒト起源の抗体由来の少なくとも1つのCDR(例えば、CDR1、CDR2およびCDR3)およびヒト起源(例えば、I2R抗体)の軽鎖由来のFRを含む。もう1つの具体例において、ヒト化免疫グロブリンはB7-1に対する結合特異性を有し、軽鎖および/または重鎖は、B7-1に結合する非ヒト起源の抗体由来の少なくとも1つのCDR(例えば、CDR1、CDR2およびCDR3)およびヒト起源(例えば、III-2R)の軽鎖および/または重鎖由来のFRを含む。免疫グロブリンは、軽鎖および/または重鎖に関して、本明細書に示すアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸を有するCDR1、CDR2およびCDR3をさらに含むことができ、その結果、当該抗体はB7-2またはB7-1に特異的に結合する。本発明は、ヒト化免疫グロブリン軽鎖およびヒト化免疫グロブリン重鎖にも関する。さらに本発明は、本発明のヒト化免疫グロブリン(例えば、1本鎖抗体)をコードする配列を含む単離核酸にも関し、さらに本発明は、B7-2またはB7-1ヒト化免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードする配列を含む単離核酸にも関する。

【0008】

本発明の1の具体例は、ネズミ3D1抗体の軽鎖のCDR1、CDR2および/またはCDR3ならびにヒト軽鎖FR(例えば、H2F抗体)を含む、B7-2に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン軽鎖である。同様に、本発明は、ネズミ1F1抗体の軽鎖のCDR1、CDR2および/またはCDR3ならびにヒト軽鎖FR(例えば、III-2R抗体)を含む、B7-1に対して結合特異性を有するヒト化B7-1免疫グロブリン軽鎖を包含する。もう1つの具体例は、図2B(配列番号:8)に示す可変領域または図7B(配列番号:28)に示す可変領域を含むヒト化B7-2またはB7-1免疫グロブリン軽鎖である。また本発明は、B7-2またはB7-1に対して特異的なヒト化可変軽鎖をコ

ードする単離核酸配列にも関し、該単離核酸配列は、図2B（配列番号：7）または図7B（配列番号：27）にそれぞれ示す核酸配列、図2B（配列番号：8）または図7B（配列番号：28）にそれぞれ示すアミノ酸配列をコードする核酸配列、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でそれらにハイブリダイゼーションする核酸配列、あるいはそれらに対する相捕物である核酸配列を含む。

【0009】

本発明の1の具体例は、ネズミ3D1抗体の重鎖のCDR1、CDR2および/またはCDR3ならびにヒト重鎖FR（例えば、I2R抗体）を含む、B7-2に対して特異的なヒト化免疫グロブリン重鎖である。同様に、本発明は、ネズミ1F1抗体の重鎖のCDR1、CDR2および/またはCDR3ならびにヒト軽鎖FR（例えば、III-2R抗体）を含む、B7-1に対して特異的なB7-1ヒト化免疫グロブリン重鎖に関する。本発明は、図2A（配列番号：6）または図7A（配列番号：26）に示す可変領域を含むヒト化免疫グロブリン重鎖に関する。また本発明は、B7-2に対して特異的なヒト化可変重鎖をコードする単離核酸配列にも関し、該単離核酸配列は、図2A（配列番号：5）に示す核酸配列、図2A（配列番号：6）に示すアミノ酸配列をコードする単離核酸配列、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でそれらにハイブリダイゼーションする核酸配列、あるいはそれらに対する相補物である核酸配列を含む。本発明は、B7-1に対して特異的なヒト化可変重鎖をコードする単離核酸配列に関し、該単離核酸配列は、図7A（配列番号：25）に示す核酸配列、図7A（配列番号：26）に示すアミノ酸配列をコードする単離核酸配列、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でそれらにハイブリダイゼーションする核酸配列、あるいはそれらに対する相補物である核酸配列を含む。

【0010】

詳細には、本発明の具体例は、B7-2に特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであり、該免疫グロブリンは、マウス3D1抗体由来の3つの軽鎖CDRを含むヒト化軽鎖、およびヒト免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列、およびマウス3D1抗体由来の3つの重鎖CDRを含むヒト化重鎖、

およびヒト免疫グロブリン重鎖由来の重鎖可変領域フレームワーク配列を含む。マウス3D1抗体は、成熟軽鎖可変ドメイン、例えば、図1B（配列番号：4）に示す成熟軽鎖可変ドメインならびに成熟重鎖可変ドメイン、例えば、図1A（配列番号：2）に示す成熟重鎖可変ドメインをさらに含んでいてもよい。

【0011】

本発明のもう1つの具体例は、特異的にB7-1に結合するヒト化免疫グロブリンであり、該免疫グロブリンは、マウス1F1抗体由来の3つの軽鎖CDRを含むヒト化軽鎖、およびヒト免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列、およびマウス1F1抗体由来の3つの重鎖CDRを含むヒト化重鎖、およびヒト免疫グロブリン重鎖由来の重鎖可変領域フレームワーク配列を含む。同様に、マウス1F1抗体は、成熟軽鎖可変ドメイン、例えば、図6B（配列番号：24）に示す成熟軽鎖可変ドメインならびに成熟重鎖可変ドメイン、例えば、図6A（配列番号：22）に示す成熟重鎖可変ドメインをさらに含んでいてもよい。

【0012】

本発明は、ヒト化B7-1および/またはB7-2免疫グロブリン軽鎖および/または重鎖をコードする融合遺伝子を含む発現ベクターを包含する。該遺伝子は、B7-2および/またはB7-1に対して結合特異性を有する非ヒト抗体（例えば、それぞれネズミ3D1または1F1）の軽鎖および/または重鎖に由来するCDRならびにヒト起源の軽鎖および/または重鎖に由来するFRをコードする核酸配列を含む。

【0013】

また本発明は、本発明の核酸を含む宿主細胞にも関し、該細胞は、本発明の核酸を含む1またはそれ以上の構築物を含む。1の具体例において、本発明は、ヒト化B7-2免疫グロブリン軽鎖をコードする第1のB7-2組み換え核酸およびヒト化B7-2免疫グロブリン重鎖をコードする第2のB7-2組み換え核酸を含む宿主細胞を包含する。第1のB7-2核酸は、ネズミ3D1抗体の軽鎖由来の少なくとも1つのCDRおよびヒト起源の軽鎖由来のFRをコードするヌクレオチド配列を含む。第2のB7-2核酸は、ネズミ3D1抗体の重鎖由来の少

なくとも1つのCDRおよびヒト起源の重鎖由来のFRをコードするヌクレオチド配列を含む。もう1つの具体例において、本発明は、ヒト化B7-1免疫グロブリン軽鎖をコードする第1のB7-1組み換え核酸およびヒト化B7-1免疫グロブリン重鎖をコードする第2のB7-1組み換え核酸を含む宿主細胞を包含する。第1のB7-1核酸は、ネズミ1F1抗体の軽鎖由来の少なくとも1つのCDRおよびヒト起源の軽鎖由来のFRをコードするヌクレオチド配列を含む。第2のB7-2核酸は、ネズミ1F1抗体の重鎖由来の少なくとも1つのCDRおよびヒト起源の重鎖由来のFRをコードするヌクレオチド配列を含む。さらに本発明は、本明細書において説明するヒト化B7-1および/またはB7-2免疫グロブリンをコードするベクターまたは核酸を含む宿主細胞に関する。

【0014】

さらに本発明は、本明細書に説明するように、B7-2またはB7-1の特異的なヒト化免疫グロブリンをコードする宿主細胞を、ヒト化免疫グロブリンの発現に適した条件下にて維持することを特徴とする、ヒト化免疫グロブリンの製造方法に関し、該方法において、ヒト化免疫グロブリン鎖(1本またはそれ以上)が発現され、ヒト化ヒト化免疫グロブリンが製造される。該方法は、ヒト化B7-1またはB7-2免疫グロブリンを単離する工程をさらに特徴とする。

【0015】

本発明は、B7-2受容体を有する第1の細胞と、B7-2を有する第2の細胞との相互作用を阻害する方法を包含し、該方法は、本明細書において説明するように、第2の細胞を有効量のヒト化B7-2免疫グロブリンと接触させることを特徴とする。また本発明は、B7-1受容体を有する第1の細胞と、B7-1を有する第2の細胞との相互作用を阻害する方法を包含し、該方法は、本明細書において説明するように、第2の細胞を有効量のヒト化B7-1免疫グロブリンと接触させることを特徴とする。したがって、本発明は、B7-1およびB7-2リガンドを用いてB7-1およびB7-2受容体を阻害することに関し、該阻害は、B7-1およびB7-2受容体を有する細胞を一定量のヒト化抗-B7-1およびB7-2免疫グロブリンと接触させることを特徴とする。よって、本発明は種々の治療方法に関する。本発明は、担体(例えば、医薬担体)を伴った、

あるいは担体を伴わない本明細書記載の有効量のヒト化B7-1および/またはB7-2免疫グロブリンを投与することを特徴とする、個体(例えば、患者)の免疫応答のモジュレート方法、あるいは移植器官、組織、細胞等を有する個体の治療方法に関する。本発明は、例えば、急性および/または慢性の移植拒絶反応を、長期(例えば、数日、数ヶ月、あるいは数年)にわたり治療することに関する。また本発明は、B7-2および/またはB7-1分子のモジュレーションに関連した疾病(例えば、自己免疫疾患、感染性疾患、炎症性疾患、全身性エリトマトーデス、糖尿病、喘息、膵臓炎、関節炎、炎症性腸疾患、炎症性皮膚炎、および多発性硬化症)の治療方法にも関し、該方法は、有効量の(例えば、治療上有効量の)B7-2および/またはB7-1ヒト化免疫グロブリン(本明細書にて説明)を担体とともに、あるいは担体を伴わずに、個体に投与することを特徴とする。したがって、本発明は、本明細書記載のように、B7-1および/またはB7-2ヒト化免疫グロブリンを含有する医薬組成物に関する。

【0016】

また本発明は、B7-2に特異的なネズミ抗体からのB7-2に特異的なヒト化免疫グロブリンの製造方法、および/またはB7-1に特異的なネズミ抗体からのB7-1に特異的なヒト化免疫グロブリンの製造方法にも関する。該方法は、B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有する非ヒト起源(例えば、ネズミ起源)の抗体のCDRを決定または確認し;そのCDRの移植に適したフレームワーク領域アミノ酸配列を有するヒト抗体を得て;ついで、非ヒト起源の抗体のCDRをヒト抗体のFR中に移植することを特徴とする。

【0017】

また本発明は、試料中のB7-2および/またはB7-1の存在または不存在を決定する方法にも関する。該方法は、試験すべき試料を得て、B7-2および/またはB7-1に特異的なヒト化抗体またはそのフラグメントに試料を接触させ、B7-2および/またはB7-1と、抗-B7-2および/またはB7-2抗体との間において十分に複合体を形成させ、ついで、複合体形成の存在または不存在を検出することを特徴とする。複合体の存在は試料中のB7-2および/またはB7-1の存在を示す。

【0018】

本発明は、B7-1に特異的な一定量（例えば、治療上有効量）のヒト化免疫グロブリンおよび/またはB7-2に特異的な一定量（例えば、治療上有効量）のヒト化免疫グロブリンを投与することを特徴とする、疾病を有する個体の治療方法に関する。本明細書に記載の疾病は、例えば、自己免疫疾患、感染性疾患、炎症性疾患、全身性エリトマトーデス、糖尿病、喘息、膵臓炎、関節炎、炎症性腸疾患、炎症性皮膚炎、および多発性硬化症を包含する。この方法は、移植器官、組織、細胞等を有する個体の免疫応答のモジュレーションにも関し、該モジュレーションは、B7-1に結合する有効量のヒト化免疫グロブリンおよび/またはB7-2に結合するヒト化免疫グロブリンを投与することを特徴とする。さらにこの方法は、移植器官、組織、細胞等を有する個体の免疫応答モジュレートするために使用される薬剤を投与することも包含する。薬剤は、例えば、メトトレキセート、ラパマイシン、シクロスポリン、ステロイド類、抗-CD40経路阻害剤（例えば、抗-CD40抗体、抗-CD40リガンド抗体およびCD40経路の小型分子阻害剤）、移植片サルベージ経路阻害剤（例えば、マイコフェノレートモフェチル（MMF））、IL-2受容体アンタゴニスト（例えば、Hoffmann-La Roche IncのZeonpax（登録商標）、およびNovartis, IncのSimulect）ならびにそれらのアナログであってもよい。ヒト化免疫グロブリンの投与前、投与とともに、あるいは投与後にこれらの薬剤を投与することができる。

【0019】

また本発明は、細胞移植を要する個体に細胞（例えば、骨髄、血液細胞、血液成分および他の細胞）を移植する方法にも関し、該方法は、ドナーから細胞（例えば、骨髄、または血液細胞もしくは成分）を得て、その細胞をB7-1に特異的な免疫グロブリンおよび/またはB7-2に特異的な免疫グロブリンならびにレシピエント細胞に接触させ、そのことにより混合物を得ることを特徴とする。免疫グロブリンおよびレシピエント細胞は、寛容性誘導に十分な時間、維持される。ついで、該混合物（骨髄組成物または血液細胞組成物という）を個体中に導入する。レシピエント細胞はリンパ球（例えば、クラスI抗原（MHC I）を発現するリンパ球または抹消血リンパ球）であってもよい。レシピエント細胞を用

いるかわりに、該方法は、MHCクラスI抗原、B7-1および/またはB7-2を発現する組織、器官または細胞を使用することを特徴とする。レシピエント分子を発現するように細胞を加工することができる。ドナー由来の細胞は骨髄細胞、または血液由来の細胞/成分(例えば、幹細胞または未成熟細胞)であってもよい。寛容性誘導に十分な時間(例えば、約1ないし96時間、好ましくは約36-48時間)、B7免疫グロブリンをドナー骨髄およびレシピエント細胞に接触させる。かかる移植を必要とする個体は、骨髄移植により利益を受け、あるいは治療可能な者である。かかる疾病は、例えば、増殖性疾患(例えば、白血病、リンパ腫およびガン)、貧血(例えば、鎌形赤血球貧血、サラセミア、および再生不良性貧血)、先天性代謝異常、先天性免疫欠損疾患、骨髄形成不全症候群(MDS)である。該方法は、免疫応答をモジュレートするために使用される薬剤(例えば、メトトレキサート、ラパマイシン、シクロスポリン、ステロイド類、抗-CD40経路阻害剤(例えば、抗-CD40抗体、抗-CD40リガンド抗体およびCD40経路の小型分子阻害剤)、移植片サルベージ経路阻害剤(例えば、マイコフェノレートモフェチル(MMF))、IL-2受容体アンタゴニスト(例えば、Hoffmann-La Roche IncのZeonpax(登録商標)、およびNovartis IncのSimulet、あるいはそれらのアナログ)を個体に投与することも包含する。

【0020】

詳細には、本発明は、骨髄移植により治療される疾病(白血病、リンパ腫およびガンのごとき増殖性疾患、鎌形赤血球貧血、サラセミア、および再生不良性貧血のごとき貧血、先天性代謝異常、先天性免疫欠損疾患、骨髄形成不全症候群)を有する個体に対して骨髄移植を行う方法を包含し、該方法は、ドナーから骨髄を得て、該骨髄をB7-1に特異的な免疫グロブリンおよび/またはB7-2に特異的な免疫グロブリンならびにレシピエント細胞(例えば、リンパ球)に接触させることを特徴とする。寛容性誘導に十分な時間(例えば、約1ないし96時間、好ましくは約36-48時間)、骨髄、免疫グロブリンおよびレシピエント細胞を接触させる。ついで、該方法は、処理した骨髄を個体に再導入することを包含する。該方法は、免疫応答をモジュレートするために使用される薬剤(例え

ば、メトトレキサート、ラパマイシン、シクロスポリン、ステロイド類、抗 - C D 4 0 経路阻害剤（例えば、抗 - C D 4 0 抗体、抗 - C D 4 0 リガンド抗体および C D 4 0 経路の小型分子阻害剤）、移植片サルベージ経路阻害剤（例えば、マイコフェノレートモフェチル（MMF））、I L - 2 受容体アンタゴニスト（例えば、Hoffmann-la Roche IncのZeonpax（登録商標）、およびNovartis, IncのSimulet、あるいはそれらのアナログ）を個体に投与することも包含する。

【0021】

また本発明は、B 7 - 1 に対する有効量の免疫グロブリンおよび / または B 7 - 2 に対する有効量の免疫グロブリンを投与することによる、移植片レシピエントの治療方法あるいは移植片レシピエントにおける移植拒絶反応の防止方法も包含する。B 7 - 1 に特異的な免疫グロブリンは約 1 m g / k g ないし約 1 0 0 m g / k g の間の量で投与し、B 7 - 2 に特異的な免疫グロブリンは約 1 m g / k g ないし約 1 0 0 m g / k g の間の量で投与する。B 7 - 1 および B 7 - 2 に特異的な免疫グロブリンを、レシピエントが移植を受ける日に投与し（例えば、約 1 m g / k g ないし約 2 5 m g / k g の間の量）、レシピエントが移植を受けた後、定期的に投与することができる（例えば、毎日、毎週または毎月）（例えば、約 1 m g / k g ないし約 5 m g / k g の間の量）。該方法は、さらに、カルシニューリン（calcineurin）阻害剤（例えば、シクロスポリン A または F K 5 0 6）、ステロイド類（例えば、メチルプレドニソンまたはプレドニソン）、または免疫細胞の成長を停止させる免疫抑制剤（例えば、ラパマイシン）、抗 - C D 4 0 経路阻害剤（例えば、抗 - C D 4 0 抗体、抗 - C D 4 0 リガンド抗体および C D 4 0 経路の小型分子阻害剤）、移植片サルベージ経路阻害剤（例えば、マイコフェノレートモフェチル（MMF））、I L - 2 受容体アンタゴニスト（例えば、Hoffmann-la Roche IncのZeonpax（登録商標）、およびNovartis, IncのSimulet、あるいはそれらのアナログのごとき移植拒絶反応治療において使用される成分の投与を包含する。また本発明は、本明細書に記載するように、細胞、組織または器官を移植し、ついで、個体に B 7 - 1 に対する有効量の免疫グロブリンおよび / または B 7 - 2 に対する有効量の免疫グロブリンを投与することによる、移植を要する個体への細胞、組織または器官の移植方法にも関する。

【0022】

また本発明は、抗原の存在下において、有効量のB7-1特異的ヒト化免疫グロブリンおよび/または有効量のB7-2特異的ヒト化免疫グロブリンを個体に投与することによる、哺乳動物における抗原に対する抗体応答を減じる方法も包含する。該方法は、さらに、抗原(例えば、破傷風トキソイド、因子VIIII、因子IX、インスリン、成長ホルモン、または遺伝子デリバリーベクター)を個体に投与することを包含する。抗原はポリペプチド形態または核酸形態として投与(例えば、アデノ-関連ウイルス(AAV)、レトロウイルス、裸のDNAベクター等によるデリバリーを用いる遺伝子治療)することができる。

【0023】

本発明の利点は、B7共刺激経路を調節またはモジュレートする能力を包含する。この共刺激経路をヒト化抗-B7-2および/または抗-B7-1抗体で処理することにより、種々の疾病の治療方法が提供される。ヒト化抗-B7-1および抗-B7-1抗体は、対応ネズミ抗体とほぼ同じである、個々のB7分子に対する特異性を維持するが、ネズミカウンターパートと比較すると、ヒトにおいて免疫原性が低く、半減期が長い。したがって、本発明は、免疫関連疾病/障害、あるいはB7-2および/またはB7-1分子が重要な役割を果たしている疾病の治療に有利に用いることができる。特に、本発明は、自己免疫性疾患の治療方法、および移植器官、組織または細胞を有する個体の免疫応答をモジュレートする方法に関する。

【0024】

本発明の上記および他の具体例、特徴および利点は、添付図面において説明されているように、以下の本発明の好ましい具体例のより詳細な説明から明らかであろう。

【0025】

発明の詳細な説明

本発明は、B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関し、該ヒト化免疫グロブリンは、非ヒト由来の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む。好ましくは、ヒト化免疫

グロブリンはB7-2またはB7-1に結合し、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは約 $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^9 M^{-1}$ のアフィニティーを有する。1の具体例において、ヒト化免疫グロブリンは、B7-2またはB7-1に結合する非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト不変領域由来の不変領域を含む。ヒト不変領域はフレームワーク領域(FR)中に非ヒト残基を有していてもよい。もう1つの具体例において、B7-2またはB7-1に結合するヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の相補性決定領域(1つまたはそれ以上)およびヒト起源の可変フレームワーク領域(1つまたはそれ以上)、ならびに所望によりヒト起源の不変領域を含む。所望により、免疫グロブリンのFR領域は非ヒト起源の残基を含んでいてもよい。例えば、ヒト化免疫グロブリンは重鎖および軽鎖を含むことができ、軽鎖は、B7-2に結合する非ヒト起源の抗体由来の相補性決定領域およびヒト起源の軽鎖由来のフレームワーク領域を含み、重鎖は、B7-2に結合する非ヒト起源の抗体由来の相補性決定領域およびヒト起源の重鎖由来のフレームワーク領域を含む。もう1つの例において、ヒト化免疫グロブリンは重鎖および軽鎖を含むことができ、軽鎖は、B7-1に結合する非ヒト起源の抗体由来の相補性決定領域およびヒト起源の軽鎖由来のフレームワーク領域を含み、重鎖は、B7-1に結合する非ヒト起源の抗体由来の相補性決定領域およびヒト起源の重鎖由来のフレームワーク領域を含む。また、本発明は、個々にあるいは機能的組み合わせにおいて、軽鎖、重鎖、可変領域、可変軽鎖および可変重鎖にも関する。

【0026】

本発明は、ネズミB7-2抗体(これよりヒト化抗体が得られる)と実質的に同じ結合特異性を有するが、霊長類(例えば、ヒト)において減じられた免疫原性を有するヒト化B7-2抗体に関する。同様に、本発明は、ネズミB7-1抗体(これよりヒト化抗体が得られる)と実質的に同じ結合特異性を有するが、霊長類(例えば、ヒト)において減じられた免疫原性を有するヒト化B7-1抗体に関する。ヒト化B7-2またはB7-1抗体はネズミカウンターパートよりも低い、実質的に同じ、あるいは高いアフィニティーを有する。図3、4、8、9Aおよび9B参照。

【0027】

天然に存在する免疫グロブリンは共通のコア構造を有し、その中において2つの同じ軽鎖(約24kD)および2つの同じ重鎖(約55または70kD)がテトラマーを形成している。各鎖のアミノ-末端部分は可変(V)領域として知られ、「抗原結合」領域とも称され、各鎖の残りのより保存された不変(C)領域とは区別される。軽鎖の可変領域中には、J領域として知られるC末端部分がある。重鎖の可変領域中には、J領域のほかにD領域がある。免疫グロブリン中の大部分のアミノ酸配列変化は、直接抗原結合に關与する超可変領域または相補性決定領域(CDR)として知られるV領域中の3つの別個の位置に限定されている。可変領域は抗原に結合する抗体の部分である。不変領域は、食細胞、胎盤細胞、肥満細胞等上のFc受容体に結合する能力のごとき種々の機能を發揮させる。軽鎖および重鎖はそれぞれ可変領域および不変領域を有する。したがって、本発明は、B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する。ヒト化B7-1またはB7-2免疫グロブリンは、2本の軽鎖および2本の重鎖がテトラマーを形成している軽鎖および重鎖を含んでいる。

【0028】

可変領域はさらに2つのタイプの領域を含み、それらはフレームワーク領域(FR)および相補性決定領域(CDR)である。CDRは、免疫グロブリン間の大部分のアミノ酸配列変化を含む超可変領域である。アミノ-末端から、これらの領域はそれぞれCDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれる。図1A-1B、2A-2B、6A-6Bおよび7A-7B参照。CDRはより保存されたFRによって連結されている。アミノ-末端から、これらの領域はそれぞれFR1、FR2、FR3およびFR4と呼ばれる。CDRおよびFR領域の位置ならびに番号付けシステムは、Kabatら(Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office (1991); Kabat, E. A. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, Second Edition, Holt, Reinhart and Winston, New York (1976); Kabat, E. A. Sequences of Immunoglobulin Chains: Tabulation and Analysis of Amino Acid Sequences of Pr

ecursors, V-regions, C-regions, J-Chain and beta2-Microglobulins, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, (1979); Kabat, E. A. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, Holt, Reinhart and Winston, New York (1968); Kabat, E. A. Experimental Immunochemistry, Second Edition, Springfield, Thomas (1967)) により定められている。免疫グロブリンをヒト化させるプロセス中において、非ヒト由来の、B7-2またはB7-1に特異性を有する抗体に由来する1またはそれ以上のCDRを、ヒト抗体のFR中に移植する。さらに、本明細書記載の方法に従って、ある種の非ヒトフレームワーク置換を行うこともできる。得られるヒト化抗体は、マウスのごとき非ヒト由来のCDRおよびヒト抗体由来のFRを有し、そのことにより、ヒト化抗体はそのB7-1またはB7-2に対する抗原特異性およびアフィニティーを保持している。

【0029】

また本発明は、B7-1またはB7-2ヒト化免疫グロブリン軽鎖、あるいはB7-1またはB7-2ヒト化免疫グロブリン重鎖にも関する。1の具体例において、本発明は、非ヒト起源の1またはそれ以上の軽鎖CDR（例えば、CDR1（配列番号：16）、CDR2（配列番号：18）および/またはCDR3（配列番号：20））およびヒト軽鎖フレームワーク領域を含むヒト化B7-2軽鎖に関する（図2B参照）。もう1つの具体例において、本発明は、非ヒト起源の1またはそれ以上の重鎖CDR（例えば、CDR1（配列番号：10）、CDR2（配列番号：12）および/またはCDR3（配列番号：14））およびヒト重鎖フレームワーク領域を含むヒト化B7-2重鎖に関する（図2A参照）。CDRは、B7-2に特異的な3D1抗体のネズミ重鎖（例えば、配列番号：1、図1A）および軽鎖（例えば、配列番号：3、図1B）可変領域鎖のごとき非ヒト免疫グロブリン由来であってもよい。

【0030】

もう1つの具体例において、本発明は、1またはそれ以上の非ヒト起源の軽鎖CDR（例えば、CDR1（配列番号：36）、CDR2（配列番号：38）および/またはCDR3（配列番号：40））およびヒト軽鎖フレームワーク領域

を含むヒト化B7-1軽鎖に関する(図7B参照)。また本発明は、1またはそれ以上の非ヒト起源の重鎖CDR(例えば、CDR1(配列番号:30)、CDR2(配列番号:32)および/またはCDR3(配列番号:34))およびヒト重鎖フレームワーク領域を含むヒト化B7-1重鎖に関する(図7A参照)。CDRは、B7-1に特異的な1F1抗体のネズミ重鎖(例えば、配列番号:21、図6A)および軽鎖(例えば、配列番号:23、図6B)可変領域鎖のごとき非ヒト免疫グロブリン由来であってもよい。

【0031】

また本発明は、ATCC University Boulevard, Manassas, VA 02110-2209に1998年5月5日にATCC番号CRL-12524として寄託された細胞系により発現されるヒト化抗-B7-2抗体にも関する。ATCCに寄託された当該ヒト化抗-B7-2抗体を発現する細胞系は、IgG2.M3タイプのヒト化抗-ヒトB7-2(CD86)モノクローナル抗体(#HF2-3D1)を発現する組み換えCHO細胞系(PA-CHO-DUKX-1538)と命名されている。

【0032】

また本発明は、ATCC University Boulevard, Manassas, VA 02110-2209に1999年6月22日にATCC番号PTA-263として寄託された細胞系により発現されるヒト化抗-B7-1抗体にも関する。ATCCに寄託された当該ヒト化抗-B7-1抗体を発現する細胞系は、ヒト化抗-ヒトB7-1(CD80)モノクローナル抗体(#1F1)を発現する組み換えCHO細胞系(PA-CHO-DUKX-1538)と命名されている。

【0033】

ヒト免疫グロブリンは、重鎖のイソタイプによりクラスおよびサブクラスに分けられる。クラスはIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを含み、その中で重鎖にはそれぞれガンマ()、ミュー(μ)、アルファ()、デルタ()またはエプシロン()タイプがある。サブクラスはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2を包含し、その中で重鎖にはそれぞれ 1、 2、 3、 4、 1および 2タイプがある。選択されたクラス

またはサブクラスのヒト免疫グロブリン分子はカップ()またはラムダ()
軽鎖のいずれかを含みうる。例えば、Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co, Philadelphia, PA (1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)参照。

【0034】

用語「HF2.3D1」および「3D1」は、B7-2に特異的なネズミ免疫グロブリンをいう。用語「ヒト化HF2.3D1」、「hu3D1」、「h3D1」、「B7-2ヒト化免疫グロブリン」または「ヒト化B7-2免疫グロブリン」は、ヒトB7-2に特異的なヒト化免疫グロブリンをいう(例えば、マウス抗-ヒトB7-2抗体)。用語「1F1」または「マウス1F1」は、B7-1に特異的なネズミ免疫グロブリンをいう。用語「ヒト化1F1」、「hu1F1」、「h1F1」、「B7-1ヒト化免疫グロブリン」または「ヒト化B7-1免疫グロブリン」は、ヒトB7-1に特異的なヒト化免疫グロブリンをいう(例えば、マウス抗-ヒトB7-1抗体)。用語「B7分子」はB7-1およびB7-2分子をいう。用語「B7抗体」は抗-ヒトB7-1および抗-ヒトB7-2抗体をいう。

【0035】

用語「免疫グロブリン」または「抗体」は、抗体全体および生物学的に機能的なそのフラグメントをいう。かかる生物学的に機能的なフラグメントは、対応全長抗体の少なくとも1つの抗原結合機能を保持しており、好ましくは、B7-2またはB7-1とその1またはそれ以上の受容体(例えば、CD28、CTLA4)との相互作用を阻害する能力を保持している。好ましい具体例において、生物学的に機能的なフラグメントは、共刺激経路の処理に関してB7-2および/またはB7-1の結合を阻害することができる。使用可能な生物学的に機能的な抗体フラグメントの例は、1本鎖抗体、Fv、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントのごときB7-2またはB7-1に結合できるフラグメントを包含する。かかるフラグメントは酵素による開裂あるいは組み換え法により製造

できる。例えば、パパインまたはペプシン開裂を用いて、それぞれF a bまたはF (a b ')₂フラグメントを得ることができる。1またはそれ以上の停止コドンが本来の停止部位の上流に導入された抗体遺伝子を用いて、抗体を種々の末端切断形態として得てもよい。例えば、重鎖のC H₁ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列を含むようにF (a b ')₂フラグメントの重鎖をコードするキメラ遺伝子を設計することができる。本発明は、重鎖および軽鎖両方の部分を含む1本鎖抗体(例えば、1本鎖F V)を包含する。

【0036】

本明細書の用語「ヒト化免疫グロブリン」は、異なる起源の免疫グロブリンの部分を含む免疫グロブリンをいい、少なくとも1の部分がヒト起源である。例えば、ヒト化抗体は、必要な特異性を有する非ヒト(マウスのごとき)起源の免疫グロブリン由来の部分、およびヒト起源の免疫グロブリン配列由来の部分を含んでいてもよい(例えば、キメラ免疫グロブリン)。慣用的方法(例えば、合成)によりこれらの部分を化学的に結合し、あるいは遺伝子工学的手法を用いて(例えば、キメラ抗体の蛋白部分をコードするDNAを発現させて連続したポリペプチド鎖を得る)、連続したポリペプチドとして調製することができる。本発明のヒト化免疫グロブリンのもう1つの例は1またはそれ以上の免疫グロブリン鎖を含む免疫グロブリンであり、非ヒト起源の抗体由来のC D Rおよびヒト起源の軽鎖および/または重鎖由来のフレームワーク領域を含むものである(例えば、フレームワーク変化を有するあるいは有しない、C D Rを移植された抗体)。キメラまたはC D R - 移植1本鎖抗体も、用語「ヒト化免疫グロブリン」に包含される。1本鎖抗体に関しては、例えば、Cabillyらの米国特許第4816567号; Cabillyらの欧州特許第0125023B1号; Bossらの米国特許第4816397号; Bossらの欧州特許第0120694B1号; Neuberger, M. S.らのWO86/01533; Neuberger, M. S.らの欧州特許第0194276B1号; Winterの米国特許第5225539号; Winterの欧州特許第0239400B1号; Padlan, E. A.らの欧州特許出願第0519596A1号参照。さらにLadnerらの米国特許第4946778号Huatonの米国特許第5476786号; およびBird, R. E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)参照。

【0037】

本発明の典型的な抗体において体现されるように、用語「ヒト化免疫グロブリン」は、ヒトフレームワーク、非ヒト抗体由来の少なくとも1つのCDRを含む免疫グロブリンをもいい、存在するいずれかの不変領域がヒト免疫グロブリン不変領域と実質的に同じものであり、少なくとも約60-90%、好ましくは少なくとも95%同一のものである。それゆえ、おそらくCDRを除くヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、1またはそれ以上の本来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同じである。いくつかの例において、ヒト化免疫グロブリンは、非ヒト抗体由来のCDRのほかに、ヒトフレームワーク領域中のさらなる非ヒト残基を含むであろう。

【0038】

下記のようにしてヒト化免疫グロブリンの設計を行うことができる。アミノ酸が下記カテゴリーに属する場合には、使用すべきヒト免疫グロブリン（アクセプター免疫グロブリン）のフレームワークアミノ酸は、CDR提供非ヒト免疫グロブリン（ドナー免疫グロブリン）由来のフレームワークアミノ酸により置換される：

(a) アクセプター免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸が、その位置においてヒト免疫グロブリンにおいて普通でないものであり、一方、ドナー免疫グロブリン中の対応アミノ酸がその位置においてヒト免疫グロブリンにおいて典型的なものである：

(b) アミノ酸の位置がCDRの1つに隣接している：あるいは

(c) 三次構造免疫グロブリンモデルにおいてアミノ酸がCDRと相互作用しうる (Queen et al., 上記文献および Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991))。

【0039】

ヒト化免疫グロブリンの製造に関する詳細な説明については、Queen et al., 上記文献および Co et al., 上記文献ならびに米国特許第5585089号、第5693762号、第5693761号および第5530101号参照。

【0040】

通常には、ヒト化抗体中のCDR領域は、マウス抗体（それよりヒト化抗体が得られる）中の対応CDR領域と実質的に同一であり、より通常には、同一である。通常には好ましくないが、得られるヒト化免疫グロブリンの結合アフィニティーに有意な影響を与えることなくCDR残基の1またはそれ以上の保存されたアミノ酸の置換を行うことが、時々可能である。場合によっては、CDR領域の置換により結合アフィニティーが増大することもある。

【0041】

上記の特定のアミノ酸置換のほかに、ヒト化免疫グロブリンのフレームワーク領域は、通常には、ヒト抗体（それよりヒト化免疫グロブリンが得られる）のフレームワーク領域と実質的に同一であり、より通常には、同一である。もちろん、フレームワーク領域中の多くのアミノ酸は抗体の特異性またはアフィニティーにほとんど貢献せず、あるいは直接貢献しない。よって、多くのフレームワーク残基の個々の保存的置換は、得られるヒト化免疫グロブリンの特異性またはアフィニティーの有意な変化を起こさずに許容されうるものである。

【0042】

ヒト化B7-2免疫グロブリンの抗原結合領域（非ヒト部分）は非ヒト起源の免疫グロブリン（ドナー免疫グロブリンともいう）由来であってもよく、B7-2（例えば、3D1）またはB7-1（例えば、1F1）に対して特異性を有するものである。例えば、ヒト化B7-2抗体に関して適当な抗原結合領域は、ネズミ抗-ヒトB7-2抗体であるHF2・3D1モノクローナル抗体由来であってもよい。1993年7月26日出願の米国出願第08/101624号、1993年8月19日出願の第08/109393号および「B7-2:CTLA4/CD28カウンター受容体」と題された1993年11月3日出願の第08/147773号参照。さらに「B7-2:CTLA4/CD28カウンター受容体」と題された1995年2月2日公開のFreemanらのWO95/03408参照。ヒト化B7-1抗体に関して適当な抗原結合領域は、ネズミ抗-ヒトB7-1抗体である1F1モノクローナル抗体由来であってもよい。他の起源は、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、ウサギ、ブタ、ヤギまたは非ヒト霊長類（例えば、サル）またはラクダ科（ラクダおよび라마）のごとき非ヒト起源から得

られるB7-2またはB7-1特異的抗体を包含する。

【0043】

さらに、ネズミHF2.3D1または1F1抗体が結合するのと同じまたは類似のエピトープに結合する抗体のような、他のポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作成することもできる(例えば、Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975); Harlow et al., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, NY); およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, Summer '94), Ausbel et al., Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11 (1991)参照)。例えば、適当な免疫原に対して、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、またはラクダ科のごとき適当な哺乳類において抗体を生起させることができる。B7-2またはB7-1を有する細胞、B7-2またはB7-1を含む膜フラクション、B7-2またはB7-1の免疫原性フラグメント、および適当な担体に結合されたB7-2またはB7-1ペプチドは、適当な免疫原の例である(例えば、DNAまたはペプチド免疫原)。抗体産生細胞(例えば、リンパ球)を、例えば、免疫動物のリンパ節または脾臓から単離することができる。ついで、細胞を適当な不死化細胞(例えば、ミエローマ細胞系)と融合させ、それによりハイブリドーマを得ることができる。選択培養法を用いて融合細胞を単離することができる。所望特異性を有する抗体を産生する細胞を、ELISAのごとき適当なアッセイにより選択することができる。B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有する非ヒト起源の免疫グロブリンを、非ヒトFab分子を含むファージライブラリーのごとき抗体ライブラリーから得ることもできる。他の方法を用いてヒト化免疫グロブリンを作成することもできる。

【0044】

1の具体例において、ヒト化免疫グロブリンの抗原結合領域は非ヒト起源のCDRを含む。この具体例において、B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の少なくとも1つのCDRを含む。例えば、CDRは非ヒト起源の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖可変領域由来であってもよく、その結果、ヒト化B7-2免疫グロブリンが、非ヒト起源の1

またはそれ以上の免疫グロブリンに由来する重鎖CDR1（例えば、配列番号：10）、CDR2（例えば、配列番号：12）および/またはCDR3（例えば、配列番号：14）のアミノ酸配列、および/または軽鎖CDR1（例えば、配列番号：16）、CDR2（例えば、配列番号：18）および/またはCDR3（例えば、配列番号：20）のアミノ酸配列を実質的に含み、得られるヒト化免疫グロブリンがB7-2に対する結合特異性を有するものであってもよい。CDRはB7-1に特異的な非ヒト起源の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖可変領域由来のものであってもよい。ヒト化B7-1免疫グロブリンが、非ヒト起源の1またはそれ以上の免疫グロブリンに由来する重鎖CDR1（例えば、配列番号：30）、CDR2（例えば、配列番号：32）および/またはCDR3（例えば、配列番号：34）のアミノ酸配列、および/または軽鎖CDR1（例えば、配列番号：36）、CDR2（例えば、配列番号：38）および/またはCDR3（例えば、配列番号：40）のアミノ酸配列を実質的に含み、得られるヒト化免疫グロブリンがB7-1に対する結合特異性を有するものであってもよい。選択された鎖の3つのすべてのCDRがドナーの対応鎖のCDRと実質的に同一であってもよく、好ましくは、軽鎖および重鎖の3つのCDRすべてがドナーの対応鎖のCDRと実質的に同一である。B7-2重鎖CDR1（例えば、配列番号：9）、CDR2（例えば、配列番号：11）およびCDR3（例えば、配列番号：13）および/またはB7-2軽鎖のCDR1（例えば、配列番号：15）、CDR2（例えば、配列番号：17）およびCDR3（例えば、配列番号：19）の核酸配列を、ヒトフレームワーク中にCDRを移植する際に使用することもできる。さらに、B7-1重鎖CDR1（例えば、配列番号：29）、CDR2（例えば、配列番号：31）およびCDR3（例えば、配列番号：33）および/またはB7-1軽鎖のCDR1（例えば、配列番号：35）、CDR2（例えば、配列番号：37）およびCDR3（例えば、配列番号：39）の核酸配列を、ヒトフレームワーク中にCDRを移植する際に使用することもできる。

【0045】

もう1つの具体例において、本発明は、重鎖および軽鎖を含むB7-2またはB7-1のいずれかに対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する

。軽鎖は、B7-2またはB7-1に結合する非ヒト起源の抗体由来のCDRおよびヒト起源の軽鎖由来のFRを含んでいてもよい。例えば、軽鎖は、下記アミノ酸配列または下記アミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2および/またはCDR3を含み、その結果、抗体が特異的にB7-2に結合するものであってもよい：CDR1 KSSQSLLSRTRENYLA（配列番号：16）、CDR2 WASTRES（配列番号：18）、およびCDR3 TQSYNLYT（配列番号：20）。重鎖は、B7-2に結合する非ヒト起源の抗体由来のCDRおよびヒト起源の重鎖由来のFRを含んでいてもよい。例えば、重鎖は、下記アミノ酸配列または下記アミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2および/またはCDR3を含み、その結果、抗体が特異的にB7-2に結合するものであってもよい：重鎖：CDR1 DTAIQ（配列番号：10）、CDR2 VINIY YDNTKYNQKFKG（配列番号：12）、CDR3 AAWYMDY1（配列番号：14）。

【0046】

B7-1に特異的な軽鎖は、下記アミノ酸配列または下記アミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2および/またはCDR3を含み、その結果、抗体が特異的にB7-1に結合するものであってもよい：CDR1 SVSSSISSSNLH（配列番号：30）、CDR2 GTSNLAS（配列番号：32）およびCDR3 QQWSSYPLT（配列番号：34）。重鎖は、B7-1に結合する非ヒト起源の抗体由来のCDRおよびヒト起源の重鎖由来のFRを含んでいてもよい。B7-1に特異的な重鎖は、下記アミノ酸配列または下記アミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2および/またはCDR3を含み、その結果、抗体が特異的にB7-1に結合するものであってもよい：CDR1 DYYMH（配列番号：36）、CDR2 WIDPENGNTLYDPKFQG（配列番号：38）、およびCDR3 EGLFFAY（配列番号：40）。

【0047】

本発明の1の具体例は、B7-2に特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであり、該ヒト化免疫グロブリンは、マウス3D1抗体由来の3つの軽鎖CDRおよびヒト免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列を含むヒト化軽鎖を含む。さらに本発明は、マウス3D1抗体由来の3つの重鎖CDRおよ

びヒト免疫グロブリン重鎖由来の重鎖可変領域フレームワーク配列を含むB7-2ヒト化重鎖を包含する。マウス3D1抗体はさらに図1Bに示す成熟軽鎖可変ドメイン(配列番号:4)および図1Aに示す成熟重鎖可変ドメイン(配列番号:2)を有していてもよい。

【0048】

本発明のもう1つの具体例は、B7-1に特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであり、該ヒト化免疫グロブリンは、マウス1F1抗体由来の3つの軽鎖CDRおよびヒト免疫グロブリン軽鎖由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列を含むヒト化軽鎖を含む。さらに本発明は、マウス1F1抗体由来の3つの重鎖CDRおよびヒト免疫グロブリン重鎖由来の重鎖可変領域フレームワーク配列を含むB7-1ヒト化重鎖を包含する。マウス1F1抗体はさらに図6Bに示す成熟軽鎖可変ドメイン(配列番号:24)および図6Aに示す成熟重鎖可変ドメイン(配列番号:22)を有していてもよい。

【0049】

ヒト起源であるヒト化免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖の部分(ヒト部分)は、いずれの適当なヒト免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖であってもよい。例えば、ヒト不変領域またはその一部が存在する場合には、これが対立遺伝子変種を包含するヒト抗体の または 軽鎖、および/または (例えば、1、2、3、4)、 μ 、(例えば、1、2)、または 重鎖由来であってもよい。IgG2またはIgG4あるいはそれらの一部分のごとき特定の不変領域を選択して、エフェクター機能に適合させることができる。例えば、変異した不変領域(「変種」ともいう)を融合蛋白中に含ませて、Fc受容体への結合および/または補体固定能を最小化することができる(例えば、Winterらの米国特許第5648260号および第5624821号;GB2209757B;MorrisonらのWO89/07142号;MorganらのWO94/29351号(1994年12月22日公開)参照)。さらに、変異したIgG2Fcドメインを創生して、本来のFc領域よりもマイトジェン応答を減じることできる(米国特許第5834597号も参照、その教示を出典明示により本明細書に一体化させる)。ヒト化抗-B7-2抗体に対して行われる変異に関しては実施例3参照、

ヒト化抗 - B 7 - 1 抗体に対して行われる変異に関しては実施例 10 参照。

【0050】

ヒトFRが存在する場合には、好ましくは、FRは、抗原結合ドナーの類似または同等の領域に対する配列類似性を有するヒト抗体可変領域由来である。ヒト化免疫グロブリンのヒト領域の一部とされるRFの他の源はヒト可変コンセンサス配列を包含する (Kettenborough, C. A. et al., Protein Engineering 4: 773-783 (1991); Queenらの米国特許第5585089号、第5693762号および第5693761号参照)。例えば、非ヒト部分を得るための使用される抗体または可変領域の配列を、Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office (1991)に記載されたヒト配列と比較することができる。好ましい具体例において、ヒト化免疫グロブリン鎖のFRは、非ヒトドナー (例えば、ネズミHF2.3D1または1F1抗体)の可変領域を伴った、少なくとも約60%の正味の配列同一性、好ましくは、少なくとも約80%の正味の配列同一性を有するヒト可変領域に由来するものである。例えば、マウスHF2.3D1とヒトH2F軽鎖可変フレームワーク領域との間の正味の配列同一性は82.5%であり、マウスHF2.3D1とヒトI2R重鎖可変フレームワーク領域との間の正味の配列同一性は62.5%である。B7-1抗体に関しては、ネズミ1F1とヒト化III-2R軽鎖可変フレームワーク領域との間の正味の配列同一性は69%であり、ネズミIII-2R重鎖可変フレームワーク領域との間の正味の配列同一性は79%である。

【0051】

「実質的に同一」なる語句は、2つの核酸またはポリペプチドのに関して (例えば、ヒト化免疫グロブリンをコードするDNAあるいはヒト化免疫グロブリンのアミノ酸配列に関して)、最大の対応が得られるように比較し、並置して、下記の配列比較法および/または視覚的検査を用いて測定した場合に少なくとも約80%、最も好ましくは90-95%またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基同一性を有する2つまたはそれ以上の配列をいう。かかる「実質的に同一」である「配列は、典型的には、相同であると考えられる。好ましくは、「実質

的に同一」であることは、少なくとも約50残基の長さの配列の領域、より好ましくは少なくとも約100残基の長さの配列の領域において存在し、最も好ましくは、配列は少なくとも約150残基にわたり実質的に同一であるか、あるいは2つの比較される配列の全長にわたり実質的に同一である。後で説明するように、Kabatにおける番号付けスキームを用いることにより2つの配列を1の方法のみにおいて並置することができる。それゆえ、抗体に関しては、同一性%はユニークかつ十分に定義された意味を有する。

【0052】

免疫グロブリンの成熟重鎖および軽鎖の可変領域由来のアミノ酸を、それぞれHxおよびLxと命名し、xはKabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)のスキームに従うアミノ酸位置を示す番号である。Kabatは、各サブグループの抗体に関する多くのアミノ酸配列をリストしており、さらにサブグループ中の各残基の位置に関して最も通常に存在するアミノ酸をリストしている。Kabatはリストされた配列中の書くアミノ酸に対する残基番号を割り当てる方法を用いている。Kabatのスキームは、Kabatにおけるコンセンサス配列の1つに関して問題となっている抗体を並置することによる要約中に包含されない他の抗体に拡張できるものである。Kabat番号付けシステムの使用により、異なる抗体中の同等の位置におけるアミノ酸を容易に同定できる。例えば、ヒト抗体のL50位置のアミノ酸はマウス抗体のアミノ酸位置L50に対する同等の位置を占める。

【0053】

基本的な抗体構造単位はテトラマーから構成されることが知られている。各テトラマーはポリペプチド鎖の2つの同一ペアから構成されており、各ペアは1つの「軽」鎖(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50-70kDa)を有している。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主に関与する約100ないし110あるいはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する不変領域を決定する。各軽鎖/重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。よって、インタクトな抗体は2つの結合部位を有する。

【0054】

軽鎖はカッパまたはラムダのいずれかとして同定される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはエプシロンとして同定され、それぞれI g G、I g M、I g A、I g D、およびI g Eのような抗体のイソタイプを決定する。軽鎖および重鎖中において、可変および不変領域が約12個またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域により結合されており、重鎖は約10個またはそれ以上のアミノ酸の「D」領域も含む。一般的には、Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 3rd ed. Raven Press, NY., 1993, Ch. 9参照。

【0055】

N末端からC末端に至るまで、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は交互のフレームワークおよびCDR、すなわち、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4を含む。各領域のアミノ酸の割り当ては、Kabat (1987) and (1991), 上記文献および/またはChothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989)の定義に従う。

【0056】

1の具体例において、ヒト化免疫グロブリンは、ヒト起源の抗体の1またはそれ以上の鎖に由来する少なくとも1つのFRを含む。よって、FRは、ヒト起源の1またはそれ以上の抗体に由来するFR1、FR2、FR3、および/またはFR4を含みうる。好ましくは、選択されたヒト化鎖のヒト部分は、ヒト起源の(例えば、ヒト免疫グロブリン鎖由来、ヒトコンセンサス配列由来)可変領域に由来するFR1、FR2、FR3、および/またはFR4を含む。好ましい具体例において、B7-2軽鎖可変領域のFRはH2Fヒト抗体由来であり、B7-2重鎖可変領域のFRはI2Rヒト抗体由来である。B7-1重鎖および軽鎖可変領域のFRはIII-2R抗体由来である。

【0057】

本発明に使用する非ヒトおよびヒト起源の免疫グロブリン部分は、それらが由来する免疫グロブリンまたは免疫グロブリン部分と同一の配列、またはその変種を有する。かかる変異体は、1個またはそれ以上の残基の付加、欠失または置換により異なっている変異体を包含する。上記のごとく、非ヒト起源のCDRは実

質的に非ヒトドナーと同じであり、好ましくは、非ヒトドナーのCDRと同一である。本明細書にて説明するように、ヒト起源のFRの残基をドナーの対応位置の残基で置換する変化のようなFRにおける変化を作成することができる。FR中に1またはそれ以上の変異を作成してもよく、1個またはそれ以上のアミノ酸の欠失、挿入および置換を包含する。いくつかのかかる置換は、実施例2のヒト化HF2.3D1抗体の設計において、そして実施例9のヒト化1F1に関して説明されている。選択されたヒト化抗体または鎖に関して、フレームワークの変異を本明細書に記載されたように設計することができる。好ましくは、B7-2およびB7-1ヒト化免疫グロブリンは、非ヒトドナーのアフィニティーと同等またはそれ以上のアフィニティーをもって、それぞれB7-2およびB7-1に結合する。非ヒトドナーまたはアクセプター抗体の突然変異を包含する種々の適当な方法により変異体を製造することができる。

【0058】

本発明のヒト化免疫グロブリンは、ヒトB7-2またはB7-1に対する結合特異性を有し、B7-2またはB7-1の決定基に結合しうるヒト化免疫グロブリン(フラグメントを包含)を包含する。好ましい具体例において、本発明のヒト化免疫グロブリンは、結合機能(例えば、B7-2またB7-1に対する特異性を有する)および/または阻害機能(例えば、B7-2またはB7-1リガンドに対するCD28またはCTLA4担持細胞の結合を阻害する能力)のごとき、少なくとも1のネズミHF2.3D1D1または1F1抗体の機能的特徴を有する。よって、好ましいヒト化免疫グロブリンは、ネズミHF2.3D1または1F1抗体の結合特異性、ネズミHF2.3D1または1F1抗体のエピトープ特異性(例えば、それぞれB7-2またはB7-1に対する結合に関して、ネズミHF2.3D1D1または1F1、キメラ米良HF2.3D1または1F1抗体、あるいはヒト化HF2.3D1または1F1と競合しうる)および/または阻害機能を有しうる。

【0059】

B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの結合機能を、例えば、ヒト化免疫グロブリンとB7-2またはB7-1との間の

複合体の形成をモニターするアッセイのごとき標準的な免疫学的方法により、検出することができる（例えば、B7-2またはB7-1を含む膜フラクション、あるいはB7-2またはB7-1を発現する核酸を含むヒトリンパ球または組み換え宿主細胞を用いる）。

【0060】

結合および/または接着アッセイあるいは他の適当な方法を手順に使用して、必要な特異性を有するヒト化免疫グロブリンを同定および/または単離することもできる（例えば、B7-2またはB7-1受容体を担持する細胞とB7分子との間の接着をモニターするアッセイ、あるいは他の適当な方法による）。

【0061】

本発明に使用する非ヒトおよびヒト起源の免疫グロブリン部分は、軽鎖、重鎖ならびに軽鎖および重鎖の部分を含む。これらの免疫グロブリン部分は免疫グロブリンから得られ、あるいは由来するものであってよく（例えば、部分のデノボ合成による）、あるいはまた所望特性を有する免疫グロブリンまたはその鎖（例えば、B7-2またはB7-1に結合する、あるいは配列類似性を有する）をコードする核酸を製造し、発現させてもよい。ヒトおよび非ヒト起源の所望部分（例えば、抗原結合領域、CDR、FR、C領域）を有するヒト化免疫グロブリンを、所望ヒト化鎖をコードする遺伝子（例えば、cDNA）を調製するための合成および/または組み換え核酸を用いて製造することができる。鎖の一部を調製するために、1またはそれ以上の停止コドン在所望位置に導入することができる。例えば、新たに設計されたヒト化可変領域をコードする核酸配列を、PCR突然変異法を用いて構築して、DNA配列を変化させることができる（例えば、Kammam, M., et al., Nucl. Acids Res. 17: 5404 (1989)参照）。新たなCDRをコードしているPCRプライマーを、同じあるいは非常に類似したヒト可変領域に基づいてすでにヒト化されている可変領域のDNA鋳型にハイブリダイゼーションさせることができる（Sato, K., et al., Cancer Research 53: 581-856 (1993)）。類似のDNA配列が鋳型として利用できない場合には、可変領域をコードする配列を含む核酸を合成オリゴヌクレオチドから構築することができる（例えば、Kolbinger, F., Protein Engineering 8:

971-980 (1993)参照)。シグナルペプチドをコードする配列を核酸中に含ませてもよい(例えば、合成時、ベクター挿入時に)。天然シグナルペプチド配列が利用できない場合には、別の抗体由来のシグナルペプチド配列を用いることができる(例えば、Kettleborough, C. A., Protein Engineering 4: 773-783 (1991)参照)。これらの方法、本明細書記載の方法または他の適当な方法を用いて、変異体を製造することができる。1の具体例において、クローン化可変領域を突然変異させ、所望特異性を有する変異体をコードする配列を選択することができる。ることができる(例えば、ファージライブラリーから;例えば、Krebber et al., 米国特許第5514548号;1993年4月1日公開のHoogengoom et al., W093/06213参照)。

【0062】

核酸およびそれを含む構築物:

また本発明は、本発明のヒト化B7-1またはB7-2免疫グロブリン、あるいはヒト化B7-1またはB7-2免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードする配列を含む単離および/または組み換え核酸(例えば、本質的に純粋なものを包含)に関する。

【0063】

本明細書にて「単離された」といわれる核酸は、その起源のゲノムDNAまたは細胞RNAの核酸から分離された核酸であり(例えば、細胞中またはライブラリーのごとき核酸混合物中に存在する)、本明細書記載の方法または他の適当な方法により得られる核酸を包含し、必然的に純粋な核酸、化学合成により得られる核酸、生物学および化学的方法の組み合わせにより得られる核酸を包含する(例えば、Daugherty, B. L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A. P. and J. S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)参照)。

【0064】

本明細書にて「組み換え」といわれる核酸は、組み換えDNA法により製造される核酸であり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および/または制限酵素を用いるベクター(例えば、プラスミド)中へのクローニングのごとき人為的な組み換えによる方法により得られる核酸を包含する。「組み換え」核酸は、細胞本来

の機構により引き起こされる組み換えイベントにより生じる核酸であるが、所望組み換えイベントを可能ならしめて引き起こすように設計されている核酸を細胞に導入した後に選択される。

【0065】

より詳細には、本発明は、それぞれ「ヒト化3D1」または「ヒト化1F1」ともいわれるヒト化HF2・3D1または1F1免疫グロブリン（例えば、非ヒト部分がネズミHF2・3D1または1F1モノクローナル抗体に由来するもの）またはその鎖をコードするヌクレオチド配列を含む単離および/または組み換え核酸にも関する。1の具体例において、軽鎖は、HF2・3D1または1F1抗体の軽鎖に由来する3つの相補性決定領域を含み、重鎖は、HF2・3D1または1F1抗体の重鎖に由来する3つの相補性決定領域を含む。かかる核酸は、例えば、(a)ヒト化HF2・3D1または1F1免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸（例えば、配列番号：5、図2Aまたは配列番号：25参照、図7A参照）(b)ヒト化HF2・3D1または1F1免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸（例えば、配列番号：7、図2Bまたは配列番号：27参照、図7B参照）、(c)ヒト化HF2・3D1または1F1免疫グロブリンの軽鎖または重鎖可変領域の少なくとも1の機能的部分（例えば、鎖を含むヒト化免疫グロブリンの抗原結合に十分な部分）をコードする配列を含む核酸とする。遺伝学的コードの縮重により、選択されたポリペプチドをコードする種々の核酸を作成することができる。1の具体例において、核酸は、図2Aおよび/または図2Bあるいは図7Aおよび/または図7Bに実質的に示される可変領域のヌクレオチド配列を含み、2本鎖または1本鎖ポリヌクレオチドを包含する。これらの判断基準を満たす単離および/または組み換え核酸は、上記のヒト化HF2・3D1または1F1抗体またはその変異体と同じ配列をコードする核酸を含みうる。

【0066】

本発明の核酸を、B7-2またはB7-1に対して結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造に使用することができる。例えば、本発明のヒト化免疫グ

ロプリンをコードする核酸（例えば、DNA）を適当な構築物中に含ませて、さらに配列を処理し、あるいは適当な宿主細胞中においてコードされたポリペプチドを産生させることができる。

【0067】

B7-2および/またはB7-1に対して特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造方法

本発明のもう一つの態様は、B7-2またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造方法に関する。例えば、B7-2および/またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンをコードする1またはそれ以上の組み換え核酸を適当な宿主細胞中で発現させることによりヒト化免疫グロブリンを得ることができる。

【0068】

B7-2および/またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの発現に適した構築物または発現ベクターも提供される。構築物を適当な細胞中に導入し、本発明のヒト化免疫グロブリンを発現する細胞を得て、培養中に維持することができる。適当な宿主細胞は原核細胞であってもよく、*E. coli*、*B. subtilis*および他の適当な細菌を包含し、あるいは真菌または酵母細胞のごとき真核細胞（例えば、*Pichia pastoris*、*Aspergillus*種、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Neurospora crassa*）であってもよく、あるいは他の下等真核細胞、ならびに昆虫由来の細胞（例えば、Sf9昆虫細胞（1994年11月24日公開のO'Connerのもの））のごとき高等真核細胞であってもよい。適当な宿主細胞は植物、トランスジェニック動物または哺乳動物からも得られる（例えば、COS細胞、NSO細胞、SP2/0、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）78細胞、293細胞）（例えば、Ausbel, F. M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., (1993)参照）。

【0069】

B7-2および/またはB7-1に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンを産生する宿主細胞を、以下のようにして得ることができる。例えば、所

望ヒト化免疫グロブリンのコーディング配列の全部または一部をコードする核酸を核酸ベクター、例えば、プラスミドのごときDNAベクター、ウイルスまたは他の適当な発現単位中に挿入することができる。種々のベクターが利用可能であり、単一コピーまたは多コピーとして維持されるベクター、あるいは宿主細胞染色体中に組み込まれるベクター等がある。

【0070】

適当な発現ベクターは多くの成分を含むことができ、成分としては1またはそれ以上の下記のものが挙げられるが、これらに限らない：複製開始点、選択可能マーカー遺伝子、転写制御エレメントのごとき1またはそれ以上の制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター)および/または1またはそれ以上の翻訳シグナル、膜を標的とする、あるいは分泌のためのシグナル配列またはリーダー配列。構築物中において、シグナル配列はベクターまたは他の源から提供されてもよい。例えば、免疫グロブリンの転写および/またはシグナルを用いて発現を指令することができる。

【0071】

適当な宿主において発現させるためにプロモーターを提供することができる。プロモーターは構成的であっても誘導性のものであってもよい。例えば、ヒト化免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖をコードする核酸にプロモーターを作動可能に連結して、それがコードされたポリペプチドの発現を指令するようにすることができる。原核宿主用(例えば、E. coli用のlac、tac、T3、およびT7プロモーター)および真核宿主用(例えば、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)およびSV40、CMV)の種々の適当なプロモーターが利用可能である。

【0072】

さらに、典型的には、発現ベクターは、ベクター担持細胞を選択するための選択可能マーカー、さらに複製可能ベクターの場合には複製開始点を含む。抗生物質または薬剤耐性を付与する生成物をコードする遺伝子は共通の選択可能マーカーであり、原核細胞(例えば、 β -ラクタマーゼ遺伝子(アンピシリン耐性)およびTet遺伝子(テトラサイクリン耐性))および真核細胞(例えば、ネオマ

イシン (G418 または ジェネティシン)、gpt (ミコフェノリックアシッド)、アンピシリン、およびヒグロマイシン耐性遺伝子) に使用可能である。ジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子は、種々の宿主においてメトトレキセートを用いる選択を可能にする。宿主のオキソトロフマーカーの遺伝子産物をコードする遺伝子 (例えば、LEU2、URA3 および HIS3) はしばしば酵母における選択マーカーとして使用される。ウイルス (例えば、バキュロウイルス) または ファージベクター、ならびにレトロウイルスベクターのごとき宿主細胞のゲノム中に組み込み可能なベクターの使用も企図される。また本発明は、これらの発現ベクターを担持している細胞にも関する。

【0073】

例えば、B7-2 または B7-1 に対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする核酸 (例えば、1 またはそれ以上の核酸)、あるいはかかる核酸を含む構築物 (1 またはそれ以上の構築物) を、選択宿主細胞に適した方法 (例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染) により適当な宿主細胞中に導入することができ、その結果、核酸を 1 またはそれ以上の発現制御エレメントに作動可能に連結するようにし (例えば、ベクター中に、細胞プロセスにより生成した構築物中に、宿主ゲノム中に組み込む)、そのことによりコードされるポリペプチドが生成されるようにすることができる。所望ならば、コードされる蛋白 (例えば、ヒト化 HF2.3D1 または 1F1 抗体) を、例えば、宿主細胞、培地または乳から単離することができる。このプロセスはトランスジェニック動物の宿主細胞における発現を含む (例えば、1992年3月19日公開のWO92/03918, GenPharm International 参照)。

【0074】

融合蛋白のN末端位置、C末端位置または内部においてヒト化免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖が非免疫グロブリン部分 (例えば、天然見出されるような免疫グロブリンには存在しない部分) に連結されている融合蛋白を得ることができる。例えば、いくつかの具体例は、免疫グロブリン配列をコードする核酸を、pETベクター (例えば、pET-15b, Novagen)、ファージベク

ター(例えば、pCANTAB5E, Pharmacia)のごとき適当な発現ベクター中に挿入することにより得ることができる。得られた構築物を適当な宿主細胞中に導入して発現させることができる。発現されたならば、アフィニティーマトリックスを用いることにより精製することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausbel, F. M. et al., eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991)参照)。

【0075】

治療方法および組成物：

2タイプのT細胞が存在する：ヘルパーT細胞は、主要組織適合性複合体(MHC)に結合した抗原を認識することができる。抗原提示細胞は抗原をインターナリゼーションし、MHC分子とともに抗原を再発現する。抗原が認識されたならば、サイトカインの分泌が起こる。サイトカイン分泌はBリンパ球、細胞毒性T細胞、マクロファージおよび他の細胞を活性化する。しかしながら、サイトカイン分泌および細胞増殖には抗原認識よりも多くのことが必要である。完全なT細胞活性化には「共刺激シグナル」といわれる第2のシグナルが必要である。こえららの共刺激シグナルは活性化カスケードの開始、維持および調節に役立つ。重要な共刺激経路はB7:CD28/CTLA4経路と呼ばれる。

【0076】

B7:CD28/CTLA4経路は2つの共刺激リガンドB7-1(CD80)およびB7-2(CD86)を含む。抗原提示細胞上に存在するB7-1およびB7-2リガンドはそれぞれT細胞上の2つの受容体(CD28およびCTLA4と呼ばれる)に結合する。

【0077】

B7ポリペプチド、B7-1(CD80)およびB7-2(CD86)の発現は堅固に調節されている(Linsley, PS et al., Immunity 1: 793-801 (1994))。未刺激抗原提示細胞は、樹状細胞を除いて、一般的に、B7-1およびB7-2を発現しない。活性化後、樹状細胞、上皮ランゲルハンス細胞、B細胞、およびマクロファージはB7-2およびB7-1の発現をアップレギュレーションする。さらに、B7-2は顆粒球およびT細胞分子上にも発現されうるし、B7-

1は線維芽細胞およびT細胞分子上に発現される(Reiser, et al., Ner Englan
d J. of Med., 335: 18, 1369-1377, 1371 (1996))。

【0078】

大部分の免疫応答において、B7-2はB7-1よりも早く誘導され、高レベルに達する。B7-2はインターロイキン-4(IL-4)の産生およびタイプ2ヘルパー細胞の発生にも影響する。B7分子(B7-1およびB7-2)はT細胞の不存在下においてT細胞を共刺激し、そのことはメラノーマに対するワクチン生成において有益である。B7分子は天然キラー細胞および/T細胞を共刺激する。それゆえ、B7分子のモジュレーションは抗腫瘍および抗微生物免疫において有益である。

【0079】

B7:CD28/CTLA4経路は、感染症、喘息、自己免疫疾患、炎症性疾患、宿主対移植器官および移植片拒絶反応による疾患の病因論を包含する種々の疾病状態に関与している。この経路は免疫系を刺激する予防および機構にも関与している。B7のごとき共刺激剤をコードする遺伝子を用いるトランスフェクションは抗腫瘍および抗ウイルスワクチンに適用可能である。また、B7分子は全身性エリトマトーデス、糖尿病、喘息、インスリン血症、関節炎、炎症性腸疾患、炎症性皮膚炎(尋常性乾癬およびアトピー性皮膚炎)、ならびに多発性硬化症のごとき自己免疫性疾患にも関与している(Reiser, et al., Ner England J. of Med., 335(18):1369 (1996))。したがって、本発明は、B7-1および/またはB7-2に結合する免疫グロブリンを投与することを特徴とする、ここに記載した疾病の治療方法を包含する。治療上有効量の免疫グロブリンを投与すべきであり、免疫グロブリンは担体中であってもよい。

【0080】

疾病を有する個体の治療は、疾病に関連した1またはそれ以上の徴候を最小化または緩和することをいう。移植拒絶反応を有する個体の治療は、移植拒絶反応に関連した1またはそれ以上の徴候(例えば、発熱、腎機能喪失、膨張した腎臓、T細胞/APC細胞攻撃拒絶反応)を最小化または緩和することを意味する。個体における疾病の予防は、疾病の1またはそれ以上尾の徴候の発生を防止する

ことをいう。移植拒絶反応の予防は、かかる移植拒絶反応に関連した1またはそれ以上の免疫応答を減じることを意味する。

【0081】

それゆえ、B7分子の役割をモジュレートまたはこれに影響を及ぼすことは、ここに記載した疾病を有する個体の治療において有用でありうる。B7のモジュレーションは、免疫関連または自己免疫疾患ならびにB7-2および/またはB7-1が関与する疾病を有する個体の治療においても有用である。B7-2またはB7-1のモジュレーションを、IL-4および/またはタイプ2ヘルパー細胞の発生に関連あるいは影響される疾病にも使用することができる。好ましくは、抗体はB7-2またはB7-1に特異的なヒト化抗体である。キメラおよびヒト化バージョンを包含する抗B7-2抗体、抗B7-1抗体、および/または対応受容体CD28およびCTLA4に対する抗体を同じ投与することによりこれらの疾病の治療を容易ならしめることができる。

【0082】

ここで説明した疾病のほかに、B7-1および/またはB7-2に結合する免疫グロブリンを、移植組織、器官または細胞を有する人に投与することができる。B7経路を阻害することは、移植組織、器官または細胞の拒絶反応を防止または減少させる。本発明は、急性および/または慢性の移植拒絶反応を長期（例えば、数日、数ヶ月、数年）にわたり治療することに関する。一般的には、急性移植拒絶反応は移植から最初の23週間以内に起こり、慢性拒絶反応は最初の23週間経過後に起こる。投与される抗B7-1および抗B-2抗体の量をここに説明する。

【0083】

詳細には、本発明は、移植片レシピエントの治療または移植拒絶反応の予防方法に関する。好ましくは方法は、移植拒絶反応を防止するに十分な量のヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体を投与することを特徴とする。移植片は細胞、組織または器官であってよい。移植の前および/または後、あるいは移植時に抗体を投与することができる。抗体を一定用量投与する（例えば、約1mg/kgないし約100mg/kg）。詳細には、移植日に高用量の抗体を投与

し(例えば、約1mg/kgないし約25mg/kg)、ついで、移植後は比較的低用量で定期的に投与する(例えば、約1mg/kgないし約5mg/kg)。明らかに、かかる投与は、移植拒絶反応に指向された免疫応答を低下させ、あるいは完全に防止する。実施例22および23参照。

【0084】

治療方法は、ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体と、他の知られた標準的なケア薬剤(例えば、移植器官、組織または細胞等を有する個体の免疫応答をモジュレートするための使用される薬剤)との共投与も包含する。かかる薬剤は、例えば、メトトレキサート、免疫細胞の成長を停止させ、あるいは細胞サイクル進行を阻害する免疫抑制剤(例えば、ラパマイシン)、ステロイド類(例えば、プレドニソンまたはその誘導体)、カルシネリウム阻害剤(例えば、シクロスポリンまたはFK506)、抗-CD40経路阻害剤(例えば、抗-CD40抗体、抗-CD40リガンド抗体およびCD40経路の小型分子阻害剤)、移植片サルベージ経路阻害剤(例えば、ミコフェノレートモフェチル(MMF))、IL-2受容体アンタゴニスト(例えば、Hoffman-La Roche Inc.のZeonpax(登録商標)およびNovartis, Inc.のSimulet)ならびにそれらのアナログ、あるいは将来的に開発される移植拒絶反応治療薬を包含する。本明細書に記載されたデータは、ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体とともに投与した場合、特に、シクロスポリンA、プレドニソンおよびラパマイシンが移植拒絶反応防止に十分なものであることを示す。これらの化合物の投与量は様々である。投与量は個体中のそれらの血清濃度に依存する。高い血清濃度は低い用量の根拠となり、低い血清濃度は高い用量の根拠となる。例えば、ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体とともに投与する場合、シクロスポリンAを約150ng/mlないし約100mg/ml(例えば、200-300ng/ml)の量で投与することができ、プレドニソンを約0.2mg/mlないし約2.0mg/mlの量で投与することができ、メチルプレドニソンを約0.2mg/mlないし約2.0mg/mlの量で投与することができ、ラパマイシンを約0.5mg/mlないし約2.0mg/mlの量で投与することができる。

【0085】

本発明は、細胞移植を必要とする個体への細胞（例えば、血液細胞または成分、あるいは骨髄）のエキスピボ移植方法を包含する。細胞移植を要する子やいは、例えば、かかる移植により治療される疾病（例えば、白血病、リンパ種、ガンのごとき増殖性疾患；鎌形赤血球、タラセミアおよび再生不良性分決のごとき貧血；先天性代謝異常；先天性免疫不全疾患；ならびに骨髄形成不全症候群）を有するものである。該方法はドナーから細胞を得ることを特徴とする。一般的には、ドナー骨髄は未成熟および成熟リンパ球を含む。ドナーからの血液細胞は、骨髄細胞のほかに幹細胞または未成熟血液細胞であってもよい。好ましくは、ドナーの細胞は、患者／レシピエントとしての特徴が類似した人からのものであるが（例えば、ドナーの骨髄が患者の骨髄とマッチしている）、そのような細胞には限られない。ドナーが患者にマッチするかどうかを決定するために分析される特徴はMHCクラス1および2である（例えば、HLA-A、HLA-B、および／またはHLA-DR）。該方法は、B7-1に特異的な免疫グロブリンおよび／またはB7-2に特異的な免疫グロブリンおよびレシピエント細胞（例えば、患者由来のリンパ球）に細胞を接触させて、「処理細胞」と呼ばれる混合物を得ることを特徴とする。使用抗体量は存在する細胞数に依存する。より大量の細胞はより多くの抗体を必要とし、より少ない細胞はより少ない抗体を必要とする。本明細書記載の実験は10mg/mlの各抗体を使用し、10-100倍過剰である。この具体例における抗-B7-1および／または抗-B7-2抗体の使用量はアネルギーを誘発するに十分な量とすべきであり、例えば、約0.01ないし約10mg/mlである。ドナー細胞、免疫グロブリンおよびレシピエント細胞を、寛容性誘導に十分な時間接触させる（例えば、約1-96時間、好ましくは約36-48時間）。寛容性誘導（例えば、アネルギー）とは、B7-1および／またはB7-2抗体での処理により誘導された抗原に対する応答性が欠如して、T細胞はもはや十分にあるいは完全には当該抗原に应答することができないことをいう（実施例18）。レシピエント細胞（例えば、末梢血リンパ球（PBL）またはクラスI抗原（MHC-I）を発現するリンパ球）に放射線照射して細胞分裂を防止する。レシピエント細胞の置換物は、MHCクラスI抗原ならびにB7-1および／またはB7-2分子を発現する組織、器官または処理された細胞であってよ

い。ついで、該方法は、混合物（例えば、処理細胞）または処理骨髄を患者に導入することを包含する。例えば、処理骨髄中の細胞はレシピエントのアロ抗原に寛容となり、そのことにより、宿主対移植片疾患を減少あるいは除去し、ドナー骨髄（例えば、幹細胞）の定着を改善する。したがって、本発明の方法は、宿主対移植片疾患の防止における治療、予防または補助を包含する。抗 - B 7 - 1 および抗 - B 7 - 2 抗体は、ドナー骨髄またはドナー細胞によるレシピエントの拒絶反応を減少させる。しかしながら、該方法は、他の外来細胞および抗原に対する免疫応答を検出し発展させる患者の能力を有意に損なうことなく拒絶反応を減少させることができる。それゆえ、これらの方法は移植をレシピエント特異的なものとすることができ、移植片を損なうことなく外来抗原の拒絶反応を可能にする。実施例のセクション参照。

【0086】

また本発明は、ヒト化抗 - B 7 - 1 および / またはヒト化抗 - B 7 - 2 抗体を個体に投与することにより個体における抗原に対する抗体応答を減少させる方法にも関する。抗原存在下において抗体を投与することができる。抗原は成長因子、凝血因子、サイトカイン、ケモカイン、遺伝子治療ビヒクルまたはホルモンであってもよい。詳細には、抗原は、例えば、破傷風トキソイド、因子VIII、因子IX、インスリン、成長ホルモン、または遺伝子デリバリーベクターであってもよい。抗原をポリペプチド形態として、あるいは核酸形態として（例えば、アデノ - 関連ウイルス、レトロウイルス、裸のDNAベクター等による遺伝子デリバリー）投与することができる。これらの抗原に対する抗体応答の抑制は、多くの疾病の治療において有用であり、例えば、血友病患者は投与された因子VIIIIまたは因子IXに対する抗体応答を発生させ、そのことにより血液凝固の問題に至る。本明細書記載のデータは、有効量のヒト化抗 - B7-1および / またはヒト化抗 - B 7 - 2 抗体をモデル抗原である破傷風トキソイドとともに投与すると、破傷風トキソイドに対する抗体応答が阻害されることを示す。抗体を抗原とともに、あるいは時間的に十分近い時に（例えば、直前または直後）投与して、所望効果、例えば、抗体応答の抑制を得ることができる。ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 抗体を、抗原投与後約3週間以内（抗体の半減期の1 / 2）に

投与する（例えば、抗原投与の約14日前から約2日後の間に投与）。ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体を、約0.01mg/kgないし約10mg/kgの間で投与する。

【0087】

本発明は、担体を伴った、あるいは伴わない、ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体を含む医薬組成物に関する。好ましい具体例は、B7-1および/またはB7-2免疫グロブリンを注射可能またはカプセル形態として投与することである。詳細には、注射可能形態は静脈内または皮下注射である。用語「医薬上許容される担体」または「担体」は、比較的不活性で無毒の通常許容される賦形剤またはデリバリー組成物をいう。典型的な担体としては、炭酸カルシウム、ショ糖、ブドウ糖、マンノース、アルブミン、デンプン、セルロース、シリカゲル、ポリエチレングリコール(PEG)、乾燥スキムミルク、米粉、ステアリン酸マグネシウム等がある。適当な処方および付加的担体はRemington's Pharmaceutical Sciences, (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA)に記載されている。

【0088】

適当な担体（例えば、医薬担体）としては、滅菌水、塩溶液（リンゲル溶液のごとき）、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、マタハデンプンのごとき炭水化物、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリシクアシッド、粘性パラフィン、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等もあるが、これらに限らない。かかる調合物を滅菌し、所望ならば、免疫グロブリンと有害な反応をしない補助的な薬剤、例えば滑沢剤、保存料、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響する塩類、バッファー、着色料、および/または香料等と混合することができる。所望ならば、それらを他の活性物質、例えば、酵素阻害剤と混合して、代謝分解を抑制することもできる。担体（例えば、医薬上許容される担体）が好ましいが、必ずしも免疫グロブリンを投与するために必要というわけではない。

【0089】

非経口投与には、注射可能な滅菌溶液、好ましくは油性もしくは水性溶液、な

らびに懸濁液、エマルジョン、または坐薬を包含するインプラントが特に好ましい。詳細には、非経口投与用担体としては、ブドウ糖水溶液、セイライン、純水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ピーナッツ油、ゴマ油、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックポリマー等がある。アンプル、バイアルおよびシリンジは便利な1回分である。

【0090】

本発明の免疫グロブリンを静脈内、筋肉内、皮下、経口、鼻腔内投与でき、吸入により、インプラントにより、注射によりあるいは坐薬により投与できる。一定期間において組成物を1回または1回以上投与して所望効果を得ることができる。

【0091】

免疫グロブリンの実際の有効量は、例えば、使用する個々の免疫グロブリン、処方される個々の組成物、投与モード、患者の年齢、体重、症状、ならびに失敗または疾患の重さにより様々である。本明細書において「有効量のB7-1および/またはB7-2免疫グロブリン」は、B7/CD28/CTLA4経路をモジュレートまたは阻害する量である。個々の患者に対する用量は本明細書にて説明されるが、慣用的な考慮（例えば、適切な慣用的薬理学的プロトコルにより）を用いて当業者が決定しうる。

【0092】

ヒト化B7-1抗体、ヒト化B7-2抗体、および/または他の薬剤の投与は同時にあるいは逐次行うことができる。これらの化合物または組成物を、前後して、あるいは同時に投与することができる。よって、用語「共投与」は、ヒト化B7-1抗体、および/またはヒト化B7-2抗体、および/または他の薬剤を適時投与して本明細書記載の疾病を治療し、あるいは耐性を誘導することを意味する（例えば、メトトレキサート、ラパマイシン、シクロスポリン、ステロイド類、抗-CD40経路阻害剤（例えば、抗-CD40抗体、抗-CD40リガンド抗体およびCD40経路の小型分子阻害剤）、移植片サルベージ経路阻害剤（例えば、マイコフェノレートモフェチル（MMF））、IL-2受容体アンタゴニスト（例えば、Hoffmann-La Roche IncのZeonpax（登録商標）、およびNovart

is, IncのSimulet)ならびにそれらのアナログ)。本発明の方法は、抗体または組成物が十分に時間的に近い時点で投与されて所望効果が得られるかぎり、抗体または組成物が投与される順序に限定されない。

【0093】

また本発明は、ヒト化抗-B7-2またはB7-1抗体をそれぞれ用いてB7-2またはB7-1の存在、不存在またはレベルを決定する方法にも関する。アッセイ(例えば、ELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACSまたは免疫組織化学)においてB7-2またはB7-1の存在または不存在を検知することができる。アッセイを、直接検出または間接的検出(例えば、競合アッセイ)に指向させることができる。

【0094】

例えば、適当な試料においてELISAアッセイを用いてB7-2またはB7-1の存在または不存在を決定するために、該方法は、ディテクターとしてのヒト化またはネズミ抗-B7-2またはB7-1抗体(例えば、ビオチン化抗mAbおよびHRP-ストレプトアビジン、あるいはHRP-結合抗mAb)および抗-B7-2またはB7-1捕捉抗体が結合している固体支持体(例えば、マイクロタイタープレート)を含む組成物と適当な試料とを混合することを特徴とする。抗-B7-2またはB7-1抗体と、B7-2またはB7-1のそれぞれとの間での複合体形成に適した条件下において、ディテクター抗体は、捕捉抗体により認識されるものとは異なるB7-2またはB7-1エピトープに結合できる。該方法は、試料中の複合体形成を決定することをさらに特徴とする。

【0095】

B7-2またはB7-1の存在をラジオイムノアッセイまたは蛍光アッセイにおいても決定することができる。例えば、試料を得て、ついで、好ましくはB7-2またはB7-1への結合に必要な量よりも過剰量の抗-B7-2またはB7-1抗体(例えば、放射活性または蛍光標識を含むヒト化またはネズミ抗-B7-2またはB7-1抗体;あるいは放射活性または蛍光標識を含む二次抗体への結合部位を含むヒト化またはネズミ抗-B7-2またはB7-1抗体)を含む組成物に試料を接触させることを特徴とする免疫結合アッセイにおいてB7-2ま

たはB7-1の存在を評価することができる。該方法は、試料中の複合体の形成を決定する(検出あるいは測定する)ことをさらに特徴とする。同様に、蛍光活性化セルソーティング(FACS)分析あるいは組織化学的分析を用いて、本発明のヒト化抗-B7-1またはB7-2抗体を用いて、B7-2またはB7-1の存在、不存在またはレベルを決定することができる。

【0096】

実施例

何ら限定的でない下記実施例により本発明をさらに説明する。

実施例1: マウス3D1可変領域cDNAのクローニングおよび配列決定:

アンカードPCR (Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992))を用いて、マウス3D1 (HF2.3D1ともいう)重鎖および軽鎖可変領域cDNAを、ハイブリドーマ細胞から単離されたmRNAからクローン化した。使用5'プライマーをcDNAに付加したポリdGテイルにアニールさせ、3'プライマーを不変領域にアニールさせた。ついで、増幅された遺伝子フラグメントをプラスミドpUC18中に挿入した。V_LおよびV_H両方のcDNAに関し、数個の独立したクローンからヌクレオチド配列を決定した。重鎖に関しては、単一のユニークな配列が同定され、マウス重鎖可変領域に典型的なものであった。軽鎖に関しては、2個のユニークな配列が同定され、いずれもネズミ軽鎖可変領域配列に相同的であった。しかしながら、1の配列は、V-Jジャンクションにおいてフレームシフトを引き起こすヌクレオチド消失によって機能的でなく、非生産的アレルと同定された。他方の配列は機能的なマウスカッパ鎖可変領域に典型的なものであった。重鎖および機能的軽鎖の可変領域cDNA配列ならびに翻訳されたアミノ酸配列を図1A-1Bに示す。マウスV_L配列はKababのマウスカッパ鎖サブグループIに属する。マウスV_HはKababの重鎖サブグループII(A)に属する。

【0097】

実施例2: ヒト化3D1可変領域の設計:

ヒト化抗体中にマウス抗体の結合アフィニティーを保持させるために、Queenらの一般的手順 (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 (

1989)、米国特許第5585089号および第5693762号、これらの教示を出典明示により本明細書に一体化させる)に従った。フレームワーク残基の選択は高い結合アフィニティを保持させることにおいて重要でありうる。原理的には、ヒト抗体由来のフレームワーク配列はCDR移植のための鋳型として役立つが、かかるフレームワーク中への直鎖状CDR置換は抗原に対する結合アフィニティの有意な損失を導く可能性があることが示されている(Tempest et al., *Biotechnology* 9: 266 (1992); Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 17: 217 (1992))。ヒト抗体は元のネズミ抗体に対して相動的であればあるほど、ヒトフレームワークはマウスCDRに歪み(この歪みがアフィニティを低下させうる)を導入する可能性が低くなる。配列相同性に基づいて、ヒト化3D1重鎖のためのフレームワークを用意するためにI2Rを選択し、ヒト化3D1軽鎖可変領域のためのフレームワークを用意するためにH2Fを選択した。Manheimer-Lory, A. et al., *J. Exp. Med.* 174(6): 1639-52 (1991)。他の非常に相動的なヒト抗体鎖は、ヒト化抗体フレームワーク、特に、Kabataにより定義されたヒトサブグループ4からのカッパ軽鎖ならびにヒトサブグループ1からの重鎖を用意することにも適しているであろう。

【0098】

通常には、同じヒト抗体由来の重鎖および軽鎖を選択してフレームワーク配列を用意し、2本の鎖のアセンブリーにおける不適合成の可能性を減少させる。I2R抗体は3D1重鎖および軽鎖に対して高い相同性を示すので、最初のヒト化抗体モデルのフレームワークを用意するために選択された。しかしながら、3D1軽鎖可変領域は、I2Rを含む他の抗体と比較して、H2Fフレームワークに対して有意に高い相同性を示す。それゆえ、ヒト化3D1軽鎖可変領域のフレームワークを用意するためにH2Fを選択し、その一方で、重鎖可変領域のフレームワークを用意するためにI2Rを選択した。

【0099】

コンピュータープログラムABMODおよびENCODE(Levitt et al., *J. Mol. Biol.* 168: 595 (1983))を用いて3D1可変ドメインの分子モデルを構築し、これを用いて3D1フレームワーク中にアミノ酸を配置し、それらがCD

Rに十分に近接して潜在的にCDRがそれらと相互作用するようにした。ヒト化3D1重鎖および軽鎖可変領域を設計するために、マウス3D1重鎖由来のCDRをヒトI2R重鎖のフレームワーク領域中に移植し、マウス3D1軽鎖由来のCDRをヒトH2F軽鎖のフレームワーク領域中に移植した。コンピューターモデルがCDRとの有意な接触を示唆したフレームワーク位置において、マウス抗体由来のアミノ酸を元のヒトフレームワークアミノ酸のかわりに用いた。ヒト化3D1に関し、このことを、重鎖の残基27、30、48、67、70および72ならびに軽鎖の残基22において行った。そのうえ、ヒト抗体のデータベース中のそれらの位置においてまれにしか存在しないフレームワーク残基を、それらの位置のヒトコンセンサスアミノ酸により置換した。ヒト化3D1に関して、このことを、重鎖の残基113ならびに軽鎖の残基3において行った。

【0100】

ヒト化3D1抗体重鎖および軽鎖可変領域の配列を図2A - 2Bに示す。しかしながら、多くの潜在的にCDRと接触する残基が他のアミノ酸で置換可能であり、やはり抗体は抗原に対する実質的なアフィニティーを保持しうる。表1は、別のアミノ酸が適当でありうるフレームワーク中の位置番号を掲載する(LC = 軽鎖、HC = 重鎖)。表に示した位置は成熟鎖の最初のアミノ酸からのアミノ酸数であり、それを二重下線により示す(図2A - 2B)。例えば、位置LC - 22は、二重下線アスパラギン酸Dから数えて22番目のアミノ酸である(あるいはスタートコドンから42番目のアミノ酸)。

表1. アミノ酸置換体および/または代替物

位置	ヒト化3D1	代替物
LC - 22	S	N
HC - 27	Y	G
HC - 30	T	S
HC - 48	I	M
HC - 67	K	R
HC - 68	A	V
HC - 70	M	I

H C - 7 2 V A

【0101】

同様に、ヒト化抗体の有意なアフィニティー損失または無免疫原性を生じさせることなく、ヒト化3D1重鎖および軽鎖中のCDRと接触していない多くのフレームワーク残基を、I2RおよびH2Fフレームワークの対応位置、他のヒト抗体、マウス3D1抗体、あるいは他のマウス抗体からのアミノ酸の置換に役立てることができる。表2は、別のアミノ酸が適当でありうるフレームワーク中のさらなる位置の番号を掲載する。

表2．フレームワーク猟奇アミノ酸置換体および/または代替物

位置	ヒト化3D1	代替物
LC - 3	V	Q
HC - 113	T	I

【0102】

種々の別のアミノ酸の選択を用いて、アフィニティー、特異性、無免疫原性、製造容易性、および他の所望特性の種々の組み合わせを有するヒト化3D1のバージョンを製造してもよい。よって、上表中の例は説明のために提供されるものであり、限定を目的とするものではない。

【0103】

実施例3：ヒト化3D1の構築：

上で説明したようにヒト化可変領域アミノ酸配列を設計したならば、それらをコードするように遺伝子を構築し、該遺伝子にはシグナルペプチド、スプライスドナーシグナルおよび適当な制限部位を含ませた(図2A-2B)。軽鎖および重鎖可変領域遺伝子を構築し、長さ約65ないし80塩基の範囲の8つの重複合成オリゴヌクレオチドを用いて増幅した(He et al., L. Immunol. 160: 1029 (1998)参照)。オリゴをペアーにしてアニールさせ、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントを用いて伸長させた。得られたフラグメントを変性させ、アニールさせ、ついで、クレノウフラグメントで伸長させて、2つのフラグメントを得た。これらのフラグメントを変性させ、ペアーにしてアニールさせ、ついで、再度伸長させて、全長遺伝子を得た。Taqポリメラーゼを用いる連鎖反応(

PCR)により、得られた生成物を増幅し、ゲル精製し、XbaIで消化し、再度ゲル精製し、ついで、軽鎖の発現のためにpVkのXbaI部位中にサブクローニングし、重鎖の発現のためにpVg4またはpVg2.M3中にサブクローニングした。カップ軽鎖発現用のpVkベクターはすでに記載されている(Coet al., J. Immunol. 148:1149 (1992)参照)。4重鎖発現用のpVg4ベクターは、1不変領域遺伝子を含むpVg1のXbaI-BamHIフラグメント(Coet al., J. Immunol. 148:1149 (1992)参照)をヒトg4不変領域遺伝子の約2000bpのフラグメント(4遺伝子のCH1エクソンに先行するHindIII部位から、当該遺伝子のCH4エクソンの後に続くNsiI部位よりも270bp後ろまで)(Ellison and Hood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1984 (1982))で置換することにより構築された。2重鎖発現用のpVg2.M3ベクターはCole et al., J. Immunol. 159:3613 (1997)に記載されている。pVg2.M3は、位置234および237におけるValおよびGlyをAlaで置換することにより、ヒト野生型IgG2から変異させられたものである。この変異体は、そのFc受容体との相互作用が減じられており、よって、最小の抗体エフェクター活性を有する。

【0104】

ヌクレオチド配列決定および制限マッピングにより最終プラスミドの構造を確かめた。当業者によく知られた標準的方法によりすべてのDNA操作を行った。

【0105】

比較研究のために2つのヒト化3D1、1つのIgG4および1つのIgG.M3を得た。ヒト化3D1(IgG4またはIgG2.M3)を産生する細胞系を構築するために、軽鎖およびそれぞれの重鎖プラスミドをマウスミエローマ細胞系Sp2/0-Ag14(ATCC CRL 1581)中にトランスフェクションした。当該分野において知られた方法を用いてプラスミドをCHO細胞中にもトランスフェクションした。トランスフェクション前に、制限エンドヌクレアーゼを用いて重鎖および軽鎖含有プラスミドを直鎖状にした。FspIを用いてカップ鎖および2鎖を直鎖状にした。BstZ17Iを用いて4鎖を直鎖状にした。約20μgの軽鎖および重鎖プラスミドを、PBS中の 1×10^7 個の細

胞中にトランスフェクションした。製造者の説明書に従って360V、25 μ F DとしてGene Pulser apparatus (BioRad)を用いるエレクトロポレーションによりトランスフェクションを行った。各トランスフェクションから得た細胞を4枚の96ウェル組織培養プレートに撒き、2日後に選択培地(DMEM, 10% FCS, 1xHT補足(Sigma), 0.25mg/mlキサンチン, 1 μ g/mlミコフェノリックアシッド)を適用した。

【0106】

約2週間後、出現したクローンをELISAにより抗体産生に関してスクリーニングした。通常培地(10%FCS含有DMEM)にて集密になるまで細胞を増殖させることにより高生産性クローンから抗体を調製し、ついで、培地を無血清培地(Hybridoma SMF; Gibco)に置換し、培養において最大抗体力価が得られるまで培養した。培養上清をプロテインA-セファロースカラム(Pharmacia)にかけ、0.1MグリシンNaCl, pH3で抗体を溶離させ、中和し、ついで、リン酸塩緩衝化セイライン(PBS)に交換した。アクリルアミドゲルで分析することにより抗体純度を確認、OD₂₈₀の読み(1.0mgの抗体蛋白はOD280の読みが1.4であると仮定)からその濃度を決定した。

【0107】

実施例4：ヒト化抗-B7-2抗体のアフィニティー：

競合結合アッセイ：

競合結合アッセイにより、ネズミおよびヒト化3D1抗体のB7-2抗原に対する相対アフィニティーを決定した。未標識ヒト化またはネズミ3D1抗体の3倍系列希釈物を、一定量の放射性ヨウ素化ネズミ3D1抗体(1回のテストにつき40000-50000cpm、2%牛胎児血清含有PBS中)と混合した。

【0108】

その後、細胞表面にrhB7-2を発現する 1×10^5 個のCHO細胞(CHO/hB7-2)を添加し、混合物(全体積200 μ l)を4 $^\circ$ Cでおだやかに振盪しながら2時間インキュベーションした。ついで、細胞-抗体懸濁液を、100 μ lの80%フタル酸ジブチル-20%オリーブ油を入れたSarstedt Micro Tubes (part #72.702)に移した。微量遠心機にて遠心分離した後、Sarstedtチュ

ープをドライアイスに数分間浸した。各チューブ(細胞ペレット含有)の端をシンチレーションバイアル中に留め、ガンマカウンターでカウントすることにより細胞結合¹²⁵Iを決定した。結合および遊離カウントを決定し、BerzofskyおよびBerkowerの方法(J. A. Berzofsky and I. J. Berkower, in *Fundamental Immunology* 9ed. W. E. Paul, Raven Press (New York), 595 (1984))に準じてコールド競合抗体濃度に対してその比をプロットした。

【0109】

細胞系：

hB7-2をその膜表面に発現する組み換えチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系を、hB7-2 cDNA配列およびG418耐性にてトランスフェクションした細胞からクローン化した。何回も継代した後のCHO細胞表面上のhB7-2の発現を、ネズミ抗-B7抗体およびFACS分析を用いて確認した。

【0110】

¹²⁵I標識抗-hB7 mAbの調製および特徴づけ：

製造者の説明書に従って¹²⁵I-ビオチン-Hunter試薬(Amersham Corp., Arlington Hts, IL)との反応により、抗-hB7抗体を¹²⁵Iで標識した。NAP-25カラムを用いて蛋白を遊離試薬から分離した。HPLC-サイズ-排除カラムを用いて、抗体がインタクトのままであり、凝集していないことを確認し、未標識抗体から調製した標準物質に対する蛋白濃度を測定した。典型的には、標識は1マイクログラムの蛋白あたり4ないし8マイクロキュリーであり、あるいは約30ないし60%の抗体分子が標識された。

【0111】

結果：

競合結合グラフを図3に示す。各データポイントは三系の測定値の平均を示す。結果は、ヒト化IgG4およびヒト化IgG2.3抗-ヒトB7-2抗体の両方が、ネズミ抗-ヒトB7-2抗体と同様の高い結合アフィニティー(約 $1 \times 10^9 M^{-1}$)を有し、3D1のヒト化中にB7-2に対するアフィニティーを失わなかったことを示した。ネズミおよびヒト化抗-B7-2は細胞表面に発現さ

れたhB7-2を高いアフィニティーをもって認識する。

【0112】

実施例5 CHO/hB7細胞へのヒト化抗-B7 mAbの直接結合：

細胞結合アッセイ：

96ウェル組織培養プレートのウェル1個につき10000個のCHO/hB7-2細胞を撒くことにより結合アッセイを開始した。2日後、脱脂乾燥乳蛋白（非特異的結合をブロックするために）およびアジ化ナトリウム（細胞による抗体のインターナリゼーションを防止するために）を含有するアッセイバッファーにて付着細胞をおだやかに洗浄した。直接結合アッセイのために、 ^{125}I 標識抗-B7抗体（ ^{125}I -ネズミ抗-ヒトB7-2, 826cpm/fmol；ヒト化抗-ヒトB7-2, 883cpm/fmol）をアッセイバッファー中に系列希釈し、細胞上にて一晚インキュベーションし、抗体を細胞表面B7に結合させ、平衡に達せしめた。未結合抗体を細胞からおだやかに洗浄し、 ^{125}I シンチラントおよびフォトディテクターシステムを用いて結合 ^{125}I -標識抗体を検出した。同じやり方で各希釈物に関してCHO細胞に対する非特異的結合を決定したが、試験すべき抗体により認識されないB7-1分子を発現する細胞に関しては決定しなかった。

【0113】

結果：

直接結合のグラフを図4に示す。非特異的結合を三系のウェルから得た平均値から差し引いたデータを、Graphpad Prismソフトウェアを用いて双曲線飽和曲線に適合させた。最大結合の半分に対応する濃度として決定された抗体の K_D 値は、ネズミおよびヒト化抗-B7-2 mAbがB7-2に対して同様の高い結合アフィニティー（約 10^{-9}m ）を有することを示した。ネズミおよびヒト化両方の抗-B7-2抗体は細胞表面に発現されたhB7-2を高いアフィニティーで認識する。

【0114】

実施例6：蛋白リガンドに対するヒト化抗-B7 mAbの結合：

BIA CORE（登録商標）によるアフィニティー決定：

B I A C O R E (登録商標) バイオセンサー (B I A C O R E (登録商標) ; U p p s a l l a , S w e d e n) を用いてヒト B 7 - 2 I g に対するネズミおよびヒト化抗 - B 7 - 2 ヒト抗体の結合動特性を決定した。ヒト B 7 - 2 I g (h B 7 - 2 I g) を B I A C O R E (登録商標) センサーチップのデキストランマトリックス上に固定化した。ヒト化およびネズミ抗 - ヒト B 7 - 2 を、200、100、50および20 nM において試験した。各希釈物を1ラン (run) あたり4回試験し、全部で3つの別個のランを行った。表面プラズモン共鳴 (S P R) により抗 - ヒト B 7 - 2 抗体結合をリアルタイムで測定し、B I A 評価ソフトウェア (バージョン3.1) 中の2価結合モデルを用いて全体的な分析を行った。各試料につき、結合定数 (k_a)、解離定数 (k_d)、および平衡解離定数 (K_D) を決定した。

【0115】

h B 7 - 2 I g の調製 :

可溶性形態の h B 7 - 2 I g を分泌するように処理された C H O 細胞の培地から、この蛋白を回収した。B 7 - 2 遺伝子の細胞外ドメインに対応する D N A コーディング配列をヒト I g G 1 重鎖のヒンジ - C H 2 - C H 3 ドメインに融合させることにより、組み換え h B 7 - 2 I g を得た。プロテイン A により培地から組み換え h B 7 - 2 I g を精製した。

【0116】

結果 :

表3は、ネズミおよびヒト化両方の抗 - ヒト m A b に関して得られた平均値を示す。S P R により決定されたネズミおよびヒト化抗 B 7 - 2 m A b に関する結合定数は、ネズミおよびヒト化形態の抗 - B 7 - 2 m A b は類似しており、ネズミ抗 - B 7 - 2 m A b は、固定化 h B 7 - 2 I g に対してヒト化抗 - B 7 - 2 よりもわずかに高い結合定数を有することを示す。ネズミ抗 - B 7 - 2 m A b に関して計算された約2.8倍高いアフィニティーは真の値であるが、ヒト化プロセス中に導入されたネズミおよびヒト化抗 - B 7 - 2 m A b 間のわずかな相違を示す可能性がある。もう1つの可能性は、これらの抗体の調製、プロセッシングおよび分析時の技術的ばらつきによるものである可能性がある。実施

例4, 5および7に示すように、細胞ベースのアッセイにおいてヒト化hB7-2結合アフィニティーにおける相違は観察されなかった。

表3. BIACORE (登録商標) により決定された抗-B7-2 mAbのアフィニティー

mAb	平均 K_D
ネズミ抗-B7-2	$1.8 \times 10^{-9} M$
ヒト化抗-B7-2	$5.1 \times 10^{-9} M$

【0117】

実施例7 ヒト化抗-B7-2によるT細胞共刺激の阻害

CD28⁺T細胞/CHO-B7増殖アッセイ

ここで説明するようにして単離されたCD28⁺細胞を、2 ng/mlのPMA (Calbiochem) を補足したRPMI完全培地で1回洗浄し、同培地に再懸濁して細胞密度 5×10^5 個/mlとした。CD28⁺T細胞(100 μ L、 5×10^4 個)を抗体/CHO/hB7-2混合物(下記参照)に添加し、37 $^{\circ}$ Cで3日間、5% CO₂下でインキュベーションし、ついで、培養の最後の6時間において1 μ Ciの[³H]-チミジン(NEN, Boston, MA)をパルスすることによりT細胞増殖を測定した。細胞をフィルター上に集め、取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターにて測定した。

【0118】

材料:

記載された(June et al., Mol. Cell. Biol. 7:4472-4481 (1987))免疫吸着を用いるネガティブセレクションにより、ヒト末梢血リンパ球からCD28⁺ヒトT細胞を単離した。健康なヒトドナーのロイコフォレシス(Leukopheresis)によりバフィーコートを得て、密度勾配遠心分離により末梢血リンパ球(PBL)を単離した。プラスチック吸着によりPBLから単球を枯渇させた。CD11、CD20、CD16およびCD14(このセットの抗体はすべてのB細胞、単球、大顆粒リンパ球、およびCD28⁺T細胞を被覆するであろう)に対する抗体を用いるネガティブセレクションならびにヤギ抗-マウス免疫グロブリン-被覆磁性粒子を用いる磁性ビーズ分離により非付着細胞からCD28

* T細胞を単離した。

Ca²⁺およびMg²⁺不含かつ0.5 mM EDTA含有リン酸塩緩衝化セ
イライン中でインキュベーションすることによりCHO/hB7-2細胞を組織
培養プレートからはがし、洗浄し、新たに調製したパラホルムアルデヒドを用い
て固定した。

種々の濃度の抗-B7-2抗体(二系)を、マイクロタイタープレート(平底
、96ウェル、Costar, Cambridge, MA)にて、 1×10^4 個
のCHO/hB7-2細胞とともに100 μ lのRPMI完全培地(RPMI 1
640培地、10%ウシ胎児血清(FBS)、100 U/mlペニシリン、10
0 μ g/mlストレプトマイシン)中、CO₂下、37℃にて1時間ブレイク
インキュベーションした。

【0119】

結果：

図5は、ネズミおよびヒト化抗-hB7-2 mAbによるヒトCD28⁺細
胞増殖の阻害の結果を示す。両方の抗体は、類似のIC₅₀値(阻害濃度50%
；最大T細胞増殖の50%を阻害するのに必要な抗体量)(ネズミ抗-hB7-
2については72 pm、ヒト化抗-hB7-2については50 pm)でB7-2
によりドライブされるT細胞増殖の用量依存的な阻害を示し、両方の抗体が類似
しており、B7-2によるT細胞刺激シグナルの阻害において非常に有効である
ことが示される。このことは、高アフィニティー抗-B7-2 mAbは、ヒト
T細胞の活性化および/または増殖を阻害(例えば、防止)することによりB7
-2機能をブロックできることを示すものである。これらのmAbは、T細胞応
答を阻害するためにインビボにおいて使用することにおいて同様の能力を示すと
考えられる。

【0120】

実施例8：マウス1F1可変領域cDNAのクローニングおよび配列決定

マウス1F1重鎖および軽鎖可変領域cDNAを、アンカードPCR(Co et
al., J. Immunol. 148: 1149 (1992))を用いて、ハイブリドーマ細胞から単離さ
れたmRNAからクローン化した。cDNAに付加されたポリ-dGテイルに5

’ プライマーをアニールさせ、不異変領域に3’ プライマーをアニールさせた。ついで、増幅遺伝子フラグメントをプラスミド pUC19 中に挿入した。V_H および V_L cDNA に関するいくつかの独立したクローンからヌクレオチド配列を決定した。重鎖に関して、マウス重鎖可変領域に典型的な1つのユニークな配列を同定した。軽鎖に関して、マウス軽鎖可変領域に相同的な2つのユニークな配列を同定した。しかしながら、1つの配列は、V-Jジャンクションにおいてフレームシフトを引き起こすヌクレオチド消失のために機能的でなく、非生産性アリアルと同定された。他方の配列は機能的なマウスカッパ鎖可変領域に典型的であった。重鎖および機能的軽鎖の可変領域 cDNA 配列、ならびに翻訳されたアミノ酸配列を図6Aおよび6Bにそれぞれ示す。マウスV_Hはk a b a tの重鎖サブグループII(C)に属する。マウスV_K配列はk a b a tのマウスカッパ鎖サブグループIVに属する。

【0121】

実施例9：ヒト化1F1可変領域の設計

ヒト化抗体中にマウス抗体の結合アフィニティーを保持させるために、Queenらの一般的手順(Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 (1989)、米国特許第5585089号および第5693762号、これらの教示を出典明示により本明細書に一体化させる)に従った。フレームワーク残基の選択は高い結合アフィニティーを保持させることにおいて重要でありうる。原理的には、ヒト抗体由来のフレームワーク配列はCDR移植のための鋳型として役立つが、かかるフレームワーク中への直鎖状CDR置換は抗原に対する結合アフィニティーの有意な損失を導く可能性があることが示されている(Tempest et al., Biotechnology 9: 266 (1992); Shalaby et al., J. Exp. Med. 17: 217 (1992))。ヒト抗体は元のネズミ抗体に対して相同的であればあるほど、ヒトフレームワークはマウスCDRに歪み(この歪みがアフィニティーを低下させうる)を導入する可能性が低くなる。K a b a t抗体配列データベース(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., U.S. Department of Health and Human Services (1991))に対する配列相同性検索に基づいて、ヒト化1F1重鎖可変領域およびヒト化1F1軽鎖d可変領域のためのフ

フレームワークを用意するために I I I - 2 R (Manheimer-Lory, A. et al., J. Exp. Med. 176: 309 (1992)) を選択した。他の非常に相同的なヒト抗体鎖は、ヒト化抗体フレームワーク、特に、K a b a t により定義されたヒトサブグループ 1 からのカッパ軽鎖ならびにヒトサブグループ 1 からの重鎖を用意することにも適しているであろう。

【 0 1 2 2 】

通常には、同じヒト抗体由来の重鎖および軽鎖を選択してフレームワーク配列を用意し、2本の鎖のアセンブリーにおける不適合成の可能性を減少させる。I I I - 2 R 抗体は 1 F 1 重鎖および軽鎖に対して高い相同性を示すので、最初のヒト化抗体モデルのフレームワークを用意するために選択された。ヒト化 1 F 1 重鎖可変ドメインは、マウス 1 F 1 重鎖フレームワークの残基と同じである 87 個のフレームワーク残基のうち 69 残基を有し、あるいは 79% の配列同一性を有する。ヒト化 1 F 1 軽鎖可変ドメインはマウス 1 F 1 軽鎖可変ドメインと同じである 80 個のフレームワーク残基のうち 55 個の残基を有し、あるいは 69% の配列同一性を有する。

【 0 1 2 3 】

コンピュータープログラム A B M O D および E N C O D E (Levitt et al., J. Mol. Biol. 168: 595 (1983)) を用いて 1 F 1 可変ドメインの分子モデルを構築し、これを用いて 1 F 1 フレームワーク中にアミノ酸を配置し、それらが C D R に十分に近接して潜在的に C D R がそれらと相互作用するようにした。ヒト化 3 D 1 重鎖および軽鎖可変領域を設計するために、マウス 1 F 1 重鎖由来の C D R をヒト I I I - 2 R 重鎖のフレームワーク領域中に移植し、マウス 1 F 1 軽鎖由来の C D R をヒト I I I - 2 R 軽鎖のフレームワーク領域中に移植した。コンピューターモデルが C D R との有意な接触を示唆したフレームワーク位置において、マウス抗体由来のアミノ酸を元のヒトフレームワークアミノ酸のかわりに用いた。ヒト化 1 F 1 に関し、このことを、重鎖の残基 1、24、27、28、29、30、48、67、および 68 ならびに軽鎖の残基 47 および 72 において行った。そのうえ、ヒト抗体のデータベース中のそれらの位置においてまれにしか存在しないフレームワーク残基を、それらの位置のヒトコンセンサスアミノ酸

により置換した。ヒト化1F1に関して、このことを、重鎖の残基16、74、および113ならびに軽鎖の残基44において行った。全体として、ヒト化1F1重鎖可変ドメインは、ヒトIII-2R重鎖可変ドメインと同じである88個の残基を有し、ヒト化1F1軽鎖可変ドメインは、ヒトIII-2R軽鎖可変ドメインと同じである88個の残基を有する。

【0124】

ヒト化1F1抗体重鎖および軽鎖可変領域の配列を図7Aおよび7Bに示す。しかしながら、多くの潜在的にCDRと接触する残基が他のアミノ酸で置換可能であり、やはり抗体は抗原に対する実質的なアフィニティーを保持しうる。表4は、別のアミノ酸が適当でありうるフレームワーク中の位置番号を掲載する（LC = 軽鎖、HC = 重鎖）。

表4 .

位置	ヒト化1F1	代替物
HC - 1	E	Q
HC - 24	P	A
HC - 27	F	G, Y
HC - 28	N	T
HC - 29	I	F
HC - 30	K	S, T
HC - 48	I	M
HC - 67	K	R
HC - 68	A	V
LC - 72	Y	F

【0125】

同様に、ヒト化抗体の有意なアフィニティー損失または無免疫原性を生じさせることなく、ヒト化1F1重鎖および軽鎖中のCDRと接触していない多くのフレームワーク残基を、III-2Rフレームワークの対応位置、他のヒト抗体、マウス1F1抗体、あるいは他のマウス抗体からのアミノ酸の置換に役立てることができる。表5は、別のアミノ酸が適当でありうるフレームワーク中のさらなる

位置の番号を掲載する。

表 5

位置	ヒト化1F1	代替物
HC - 16	A	S
HC - 74	T	K
HC - 113	T	I
LC - 44	A	S, V

【0126】

種々の別のアミノ酸の選択を用いて、アフィニティー、特異性、無免疫原性、製造容易性、および他の所望特性の種々の組み合わせを有するヒト化3D1のバージョンを製造してもよい。よって、上表中の例は説明のために提供されるものであり、限定を目的とするものではない。

【0127】

実施例10：ヒト化1F1の構築

上で説明したようにヒト化可変領域アミノ酸配列を設計したならば、それらをコードするように遺伝子を構築し、該遺伝子にはシグナルペプチド、スプライスドナーシグナルおよび適当な制限部位を含ませた(図7Aおよび7B)。軽鎖および重鎖可変領域遺伝子を構築し、長さ約65ないし80塩基の範囲の8つの重複合成オリゴヌクレオチドを用いて増幅した(He et al., L. Immunol. 160: 1029 (1998)参照)。オリゴをペアーにしてアニールさせ、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントを用いて伸長させた。得られたフラグメントを変性させ、アニールさせ、ついで、クレノウフラグメントで伸長させて、2つのフラグメントを得た。これらのフラグメントを変性させ、ペアーにしてアニールさせ、ついで、再度伸長させて、全長遺伝子を得た。Taqポリメラーゼを用いる連鎖反応(PCR)により、得られた生成物を増幅し、ゲル精製し、XbaIで消化し、再度ゲル精製し、ついで、重鎖の発現のためにpVg2.M3のXbaI部位中にサブクローニングし、軽鎖の発現のためにpVk中にサブクローニングした。ヒト2重鎖発現用のpVg2.M3ベクターはすでに記載されている(Cole et al., J. Immunol. 159:3613 (1997))。pVg2.M3プラスミド中のヒト

2不変領域は、位置234および237のアミノ酸ValおよびGlyをAlaで置換することにより、野生型ヒト2不変領域から変異させられたものである。この変異体は、そのFc受容体との相互作用が減じられており、よって、最小の抗体エフェクター活性を有する。ヒトカップ軽鎖発現用のpVkベクターはすでに記載されている (Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)参照)。

【0128】

ヌクレオチド配列決定および制限マッピングにより最終プラスミドの構造を確かめた。当業者によく知られた標準的方法によりすべてのDNA操作を行った。

【0129】

結合の研究のためにヒト化1F1抗体のIgG2.M3形態を得た。ヒト化1F1を産生する細胞系を構築するために、軽鎖およびそれぞれの重鎖プラスミドをマウスミエローマ細胞系Sp2/0-Ag14(ATCC CRL 1581)中にトランスフェクションした。当該分野において知られた方法を用いてプラスミドをCHO細胞中にもトランスフェクションした。トランスフェクション前に、制限エンドヌクレアーゼを用いて重鎖および軽鎖含有プラスミドを直鎖状にした。FspIを用いて2重鎖プラスミドおよびカップ軽鎖プラスミドを直鎖状にした。約40µgの重鎖プラスミドおよび約20µgの軽鎖プラスミドを、PBS中の 1×10^7 個の細胞中にトランスフェクションした。製造者の説明書に従って360V、25µFDとしてGene Pulser apparatus (BioRad)を用いるエレクトロポレーションによりトランスフェクションを行った。各トランスフェクションから得た細胞を4枚の96ウェル組織培養プレートに撒き、2日後に選択培地(DMEM, 10% FCS, 1xHT補足(Sigma), 0.25mg/mlキサンチン, 1µg/mlミコフェノリックアシッド)を適用した。

【0130】

約2週間後、出現したクローンをELISAにより抗体産生に関してスクリーニングした。通常培地(10%FCS含有DMEM)にて集密になるまで細胞を増殖させることにより高生産性クローンから抗体を調製し、ついで、培地を無血清培地(Hybridoma SMF; Gibco)に置換し、培養において最大抗体力価が得られるまで培養した。培養上清をプロテインA-セファロースカラム(Pharmacia)

にかけ、0.1 M g リシン NaCl, pH 3 で抗体を溶離させ、中和し、ついで、リン酸塩緩衝化セリン (PBS) に交換した。アクリルアミドゲルで分析することにより抗体純度を確認、OD₂₈₀ の読み (1.0 mg の抗体蛋白は OD 280 の読みが 1.4 であると仮定) からその濃度を決定した。

ヒト化 1 F 1 抗体の IgG 4 形態も得て、上記方法に従って精製した。

CHO細胞における高レベル発現を可能にするために、完全ヒト化ヒト 1 F 1 (h 1 F 1) およびヒト 3 D 1 (h 3 D 1) 軽鎖および重鎖遺伝子をそれぞれ独立に、選択可能、増幅可能発現ベクター pED (Kaufman R. J., et al., Nucl. Acids Res., 19:4485-4491 (1991)) 中にサブクローンした。pED由来の発現プラスミドを配列決定して、それらが適当な h 1 F 1 および h 3 D 1 軽鎖および重鎖をコードしていることを確認した。IgG 2 m 3 C H 3 ドメインの最後から 2 番目のアミノ酸は、すべての公表された IgG 2 および IgG 1 配列のこの位置において報告されているグリシン残基とは対照的に、セリンであることがわかった。このセリンをより通常のグリシンで置換して pED 発現構築物とした。h 1 F 1 軽鎖および重鎖発現プラスミド (pED. 1 F 1 v 2 K A および pED. 1 F 1 v 2 G 2 m 3 g l y) を直鎖状にし、無血清培養中における増殖に前もって順応させられた CHO PA-DUKX. 153.8 細胞系 (Sinacore M.S. et al., Biotechnol. Bioeng. 52:518-528 (1996)) 中に同時トランスフェクションした。直鎖状プラスミド pED. 3 D 1 K A および pED. 3 D 1 G 2 m 3 g l y での同時トランスフェクションにより、同じ方法で h 3 D 1 を発現する細胞系を得た。各場合において、軽鎖および重鎖遺伝子の CHO 細胞ゲノム中への安定な組み込み後に、メトトレキセート選択および増幅を行って、組み換え h 1 F 1 m または h 3 D 1 細胞系を得た。抗-B7-1 または抗-B7-2 を発現する CHO 細胞系を無血清増殖培地にて培養し、プロテイン A セファロースによるクロマトグラフィーにより、ならし培地上清から分泌抗体を精製した。酸性バッファーにて結合抗体を溶離させ、ついで、中和して pH 7.0 とした。精製抗体のバッファーを PBS に交換し、滅菌濾過した。

【0131】

実施例 11 : ヒト化 1 F 1 の特性

放射性ヨウ素化ヒト化1F1抗体を用いる競合結合アッセイにより、ネズミおよびヒト化1F1抗体のB7-1抗原に対するアフィニティーを決定した。未標識ヒト化またはネズミ1F1抗体の3倍系列希釈物を、一定量の放射性ヨウ素化ヒト化抗体(1回のテストにつき40000-50000cpm、2%牛胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム含有PBS中)と混合した。その後、細胞表面にrhB7-1を発現する 3×10^4 個のCHO細胞を添加し、混合物(全体積200 μ l)を4でやさしく振盪しながら2時間インキュベーションした。ついで、細胞-抗体懸濁液を、100 μ lの80%フタル酸ジブチル-20%オリーブ油を入れたSarstedt Micro Tubes (part #72.702)に移した。微量遠心機にて遠心分離した後、Sarstedtチューブをドライアイスに数分間浸した。各チューブ(細胞ペレット含有)の端をシンチレーションバイアル中に留め、ガンマカウンターでカウントすることにより細胞結合 125 Iを決定した。結合および遊離カウントを決定し、BerzofskyおよびBerkowerの方法(J. A. Berzofsky and I. J. Berkower, in *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, Raven Press (New York), 595-644 (1984))に準じてコールド競合抗体濃度に対してその比をプロットした。

競合結合グラフを図8に示す。各データポイントは三系の測定値の平均を示す。結果は、ヒト化IgG2.M3抗体がマウス抗体と同様の高い結合アフィニティー(約 $1 \times 10^9 M^{-1}$)を有し、1F1のヒト化中にアフィニティーを失わなかったことを示した。

放射性標識抗体の結合についてのScatchard分析により、マウスおよびヒト化1F1抗体のB7-1抗原に対するアフィニティーを確認した。放射性標識マウスまたはヒト化1F1抗体の2倍系列希釈物を、2%FCS、0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBS中(全体積200 μ l)にて、細胞表面にrhB7-1を発現する 5×10^4 個のCHO細胞とともにインキュベーションした。混合物(全体積200 μ l)を4でやさしく振盪しながら2時間インキュベーションした。ついで、細胞-抗体懸濁液を、100 μ lの80%フタル酸ジブチル-20%オリーブ油を入れたSarstedt Micro Tubes (part #72.702)に移した。微量遠心機にて遠心分離した後、Sarstedtチューブをドライアイスに数分間

浸した。各チューブ（細胞ペレット含有）の端をシンチレーションバイアル中に留め、ガンマカウンターでカウントすることにより細胞結合¹²⁵Iを決定した。結合および遊離カウントを決定し、その割合を、Scatchardの方法（Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660 (1949)）に従って、結合抗体濃度に対してプロットした。最小二乗法を用いて直線をデータにフィットさせ、直線の勾配から見かけの K_a を決定した。

Scatchardプロットを図9Aおよび9Bに示す。各データポイントは二系の決定の平均値を示す。結果は、IgG2.M3抗体はマウス抗体と類似の結合アフィニティー（約 $1 \times 10^9 M^{-1}$ ）を有することを示し、1F1のヒト化中のアフィニティー損失がないことが確認された。

【0132】

実施例12：ヒト化抗-B7-1モノクローナル抗体のアフィニティー競合結合アッセイ：

競合結合アッセイにより、ネズミおよびヒト化抗-B7-1（1F1）抗体のB7-1抗原に対する相対アフィニティーを決定した。未標識ヒト化またはネズミ抗-B7-1抗体の3倍系列希釈物を、一定量の放射性ヨウ素化ネズミ抗-B7-1 mAb（¹²⁵I-抗-B7-1、2800 cpm/fmol；1回のテストにつき40000-50000 cpm、2%牛胎児血清含有PBS中）と混合した。その後、表面にrhB7-1を発現する 1×10^5 個のCHO/hB7-1細胞を添加し、混合物（全体積200 μ l）を4℃でおだやかに振盪しながら2時間インキュベーションした。ついで、細胞-抗体懸濁液を、100 μ lの80%フタル酸ジブチル-20%オリーブ油を入れたSarstedt Micro Tubes（part #72.702）に移した。微量遠心機にて遠心分離した後、Sarstedtチューブをドライアイスに数分間浸した。各チューブ（細胞ペレット含有）の端をシンチレーションバイアル中に留め、ガンマカウンターでカウントすることにより細胞結合¹²⁵Iを決定した。結合および遊離カウントを決定した。コールド競合mAb濃度に対して結合カウントをプロットした。

【0133】

CHO/hB7-1細胞系：

h B 7 - 1 をその膜表面に発現する組み換えチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞系を、h B 7 - 1 c D N A 配列およびG 4 1 8 耐性にてトランスフェクションした細胞からクローン化した。何回も継代した後のC H O細胞表面上のh B 7 - 1 の発現を、ネズミ抗 - B 7 m A b およびF A C S 分析を用いて確認した。

【0134】

¹²⁵I 標識抗 - h B 7 - 1 m A b の調製および特徴づけ：

製造者の説明書に従って¹²⁵I - ビオチン - H u n t e r 試薬 (Amersham C o r p . , A r l i n g t o n H t s , I L) との反応により、抗 - h B 7 - 1 m A b を¹²⁵I で標識した。N A P - 2 5 カラムを用いて蛋白を遊離試薬から分離した。H P L C - サイズ - 排除カラムを用いて、抗体がインタクトのままであり、凝集していないことを確認し、未標識抗体から調製した標準物質に対する蛋白濃度を測定した。典型的には、標識は1マイクログラムのm A b あたり4ないし8マイクロキュリーであり、あるいは約30ないし60%の抗体分子が標識された。ネズミおよびヒト化抗 - B 7 - 1 m A b は、それぞれ2800 c p m / f m o l および950 c p m / f m o l の比活性を有していた。

【0135】

結果：

競合結合グラフを図10に示す。各データポイントは三系の測定値の平均を示す。結果は、ヒト化抗 - B 7 - 1 m A b およびネズミ抗 - B 7 - 1 m A b (それよりヒト化抗 - B 7 - 1 m A b が由来する) はB 7 - 1 に対して類似の高アフィニティー (約 $1 \times 10^{-9} M$) を有することを示し、抗 - B 7 - 1 m A b のヒト化中にアフィニティー損失がなかったことを示す。ネズミおよびヒト化抗 - B 7 - 1 は両方とも、細胞表面に発現されたB 7 - 1 への結合に関して、同様に有効に標識ネズミ抗 - B 7 - 1 m A b と競合する。

【0136】

実施例13 B 7 - 1 へのヒト化抗 - B 7 - 1 m A b の直接結合：

細胞結合アッセイ：

96ウェル組織培養プレートのウェル1個につき10000個のC H O / h B

7 - 1細胞を撒くことにより結合アッセイを開始し、プレートを37℃で2日間インキュベーションした。アッセイバッファー（脱脂乾燥乳およびアジ化ナトリウムを含有するPBS）にて付着細胞をおだやかに洗浄した。¹²⁵I標識したネズミおよびヒト抗-B7-1 mAbをアッセイバッファー中に系列希釈し、細胞とともに4℃で一晩インキュベーションして結合させ、平衡に達せしめた。アッセイバッファーにて連続しておだやかに洗浄することにより未結合抗体を細胞からおだやかに洗浄し、¹²⁵Iシンチラントおよびフォトディテクターシステムを用いて結合¹²⁵I-標識抗体を検出した。標的CHO細胞が、ネズミまたはヒト化いずれかの抗-B7-1 mAbにより結合されないhB7-2を発現した以外は、上記と同じやり方で標識抗体の各希釈物に関して非特異的結合を決定した。

【0137】

結果：

直接結合実験のグラフを図11に示す。非特異的結合を三系のウェルから得た平均値から差し引いた値を、Graphpad Prismソフトウェアを用いて双曲線飽和曲線に適合させた。結合部位の最大飽和量の半分に対応する濃度として決定された結合定数 K_D 値は、ネズミおよびヒト化抗体がいずれもB7-1に対して同様の高い結合アフィニティー（約 10^{-9} M）を有することを示した。ネズミおよびヒト化両方の抗-B7-1抗体は細胞表面に発現されたヒトB7-1を認識する。

【0138】

実施例14：蛋白リガンドに対するネズミおよびヒト化抗-B7-1 mAbの結合：

BIACORE（登録商標）によるアフィニティー決定：

BIACORE（登録商標）バイオセンサー（BIACORE（登録商標）；Uppsalla, Sweden）を用いてヒトB7-1 Ig（hB7-1 Ig）に対するネズミおよびヒト化抗-B7-1モノクローナル抗体の結合動特性を決定した。ヒトB7-1 IgをBIACORE（登録商標）センサーチップのデキストランマトリックス上に固定化した。ヒト化およびネズミ抗-B7-1 m

Abを200、100、50および20 nMにおいて、固定化hB7-1 Igに関して試験した。各mAb希釈物を1ラン(run)あたり4回試験し、全部で3つの別個のランを行った。表面プラズモン共鳴(SPR)により抗-hB7-1 Ig結合をリアルタイムで測定し、BIA評価ソフトウェア(バージョン3.1)中の2価結合モデルを用いて全体的な分析を行った。各試料につき、結合定数(k_a)、解離定数(k_d)、および平衡解離定数(K_D)を決定した。

表6は、ネズミおよびヒト化両方の抗-B7-1 mAbに関して決定された平均値を示す。SPRにより決定されたネズミおよびヒト化抗-B7-1 mAbに関する結合定数は、ネズミおよびヒト化形態の抗-B7-1 mAbは類似しており、ネズミ抗-B7-1 mAbは、hB7-1 Igに対してヒト化抗-B7-1よりもわずかに高い結合定数を有することを示す。ネズミ抗-B7-1 mAbに関して計算された5倍高いアフィニティーは真の値であるが、ヒト化プロセス中に導入されたネズミおよびヒト化抗-B7-1 mAb間のわずかな相違を示す可能性がある。あるいはまた、個々のmAbの調製、プロセッシングおよび分析時の技術的ばらつきも、これらのわずかな相違の説明となりうる。実施例12、14および19に示すように、細胞結合または機能アッセイにおいてヒト化抗-B7-1 mAb間において相違は観察されなかった。

表6. BIA CORE (登録商標)により決定された抗-B7-1 mAbのアフィニティー

mAb	平均KD	標準偏差
ネズミ抗-B7-1	$5.6 \times 10^{-10} \text{ M}$	$1.9 \times 10^{-10} \text{ M}$
ヒト化抗-B7-1	$2.8 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1.2 \times 10^{-9} \text{ M}$

【0139】

hB7-1 Igの調製:

可溶性形態のhB7-1 Igを分泌するように処理されたCHO細胞の培地から、この蛋白を回収した。B7-1遺伝子の細胞外ドメインに対応するDNAコーディング配列をヒトIgG1重鎖のヒンジ-CH2-CH3ドメインに融合させることにより、組み換えhB7-1 Igを得た。プロテインAにより培地から組み換えhB7-1 Igを精製した。

【0140】

実施例15 ヒト化B7-1 mAbによるT細胞共刺激の阻害

CD28⁺T細胞/CHO-B7増殖アッセイ

ここで説明するようにして単離されたCD28⁺細胞を、2 ng/mlのPMA (Calbiochem)を補足したRPMI完全培地で1回洗浄し、同培地に再懸濁して細胞密度 5×10^5 個/mlとした。CD28⁺T細胞(100 μ L、 5×10^4 個)を抗体/CHO/hB7-1混合物(下記参照)に添加し、37^oCで3日間、5% CO₂下でインキュベーションし、ついで、培養の最後の6時間において1 μ Ciの[³H]-チミジン(NEN, Boston, MA)をパルスすることによりT細胞増殖を測定した。細胞をフィルター上に集め、取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターにて測定した。

【0141】

材料:

記載された(June et al., Mol. Cell. Biol. 7:4472-4481 (1987))免疫吸着を用いるネガティブセレクションにより、ヒト末梢血リンパ球からCD28⁺ヒトT細胞を単離した。簡単に説明すると、健康なヒトドナーのロイコフォレシス(leukopheresis)によりバフィーコートを得て、密度勾配遠心分離により末梢血リンパ球(PBL)を単離した。プラスチック吸着によりPBLから単球を枯渇させた。CD11、CD20、CD16およびCD14(このセットの抗体はすべてのB細胞、単球、大顆粒リンパ球、およびCD28⁺T細胞を被覆するであろう)に対する抗体を用いるネガティブセレクションならびにヤギ抗-マウス免疫グロブリン-被覆磁性粒子を用いる磁性ビーズ分離により非附着細胞からCD28⁺T細胞を単離した。

Ca²⁺およびMg²⁺不含かつ0.5 mM EDTA含有リン酸塩緩衝化セイレイン中でインキュベーションすることによりCHO/hB7-1細胞を組織培養プレートからはがし、洗浄し、新たに調製したパラホルムアルデヒドを用いて固定した。

種々の濃度の抗-B7-1抗体(二系)を、マイクロタイタープレート(平底、96ウェル、Costar, Cambridge, MA)にて、 1×10^4 個

のCHO/hB7-2細胞とともに100 μ lのRPMI完全培地(RPMI 1640培地、10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン)中、CO₂下、37 $^{\circ}$ Cにて1時間プレインキュベーションした。

【0142】

結果：

図5は、ネズミおよびヒト化抗-hB7-2 mAbによるヒトCD28⁺細胞増殖の阻害の結果を示す。両方の抗体は、類似のIC₅₀値(阻害濃度50% ; 最大T細胞増殖の50%を阻害するのに必要な抗体量)(ヒト化抗-B7-1については110 pm、ネズミ抗-hB7-1については220 pm)でB7-1によりドライブされるT細胞増殖の用量依存的な阻害を示し、両方の抗体が類似しており、B7-1によるT細胞刺激シグナルの阻害において非常に有効であることが示される。このことは、高アフィニティー抗-B7-1 mAbは、ヒトT細胞の活性化および/または増殖を阻害(例えば、防止)することによりB7-1機能をブロックできることを示すものである。これらのmAbは、T細胞応答を阻害するためにインビボにおいて使用することにおいて同様の能力を示すと考えられる。

【0143】

実施例16：抗-B7-1および抗-B7-2 mAbによる混合リンパ球反応の阻害

混合リンパ球反応(MLR)：ヒト正常末梢血リンパ球(PBL)(レスポンドー)を、照射(2500 cGy)された正常ドナーPBL(ステイミュレーター)とともに、5%熱不活性化ヒトAB結成を含有するRPMI 1640中で、5%CO₂存在下、37 $^{\circ}$ Cにおいて培養し、最終濃度10⁶個/mlとした。示された場合には、ネズミ抗-hB7-1またはネズミ抗-hB7-2抗体を単独(10 μ g/ml)で、組み合わせて(各10 μ g/ml)、ならびにCTLA4 Ig(10または20 μ g/ml)と比較して添加した。マイクロタイタープレート中、最終体積200 μ lとして細胞を三系で培養し、培養の最後の16時間における[³H]-チミジン取り込みにより増殖をアッセイした。一次MLRか

ら誘導された細胞をレスポンドーとして用いて二次MLRを行った。これらの細胞を洗浄し、一晚培養し、同じまたは異なる、あるいは第三パーティーのスティミュレーターPBLを用いて上記のごとく再刺激した。二次MLRには阻害剤を添加しなかった。

【0144】

結果：

図13に示す決定は、B7阻害剤(抗-B7、CTLA4Ig)の不存在または存在下において一次ワンウェイMLRを行うことによりなされた。培養3、4または5日目に増殖を測定した。

一次MLRにおいて、さらなる抗-B7-1 mAbは単独では阻害効果を有しておらず、レスポンドーT細胞の増殖をドライブすることにおいて、B7-1は単独ではほとんど役割を果たさないことが示された。試験したすべての日において、抗-B7-2は単独でT細胞増殖を阻害し、そのレベルはヒトCTLA4Ig(hCTLA4Ig)(B7-1およびB7-2の両方に結合することが知られている組み換え蛋白)に匹敵するものであった。抗-B7-1および抗-B7-2の組み合わせは、T細胞増殖の最も効果的な阻害剤であり、試験したすべての日においてこの応答を完全に阻害した。組み合わせられた抗-B7-1および抗-B7-2の、hCTLA4Igと比較して優れたT細胞増殖阻害能は、抗-B7 mAbの、B7-1およびB7-2に対するhCTLA4よりも高いアフィニティーを反映するものである。組み合わせられた抗B7-1および抗B7-2 mAbは、抗B7-2単独よりも良好なT細胞増殖阻害剤であり、両方の刺激性受容体をブロックしてT細胞応答を完全に阻害することの必要性が示される。これらの結果は、B7-1およびB7-2共スティミュレーターの完全なブロックは、MLRにおけるアロ応答性をより完全に無くすことを示す。したがって、これらの結果は、抗-B7-1および抗-B7-2抗体を用いる治療方法は、特に、両方の共刺激分子が機能的である場合には、いずれかの抗体単独よりもはるかに効果的であることを示す。本明細書記載のレスポンドー/スティミュレーターのペアーは、抗-B7-1単独による阻害には感受性がないが、いくつかのレスポンドー/スティミュレーターのペアーは中程度の抗-B7-1感受性を示す。

【0145】

一次MLRにおいて抗 B7 mAbでの処理がT細胞の低応答性またはアレルギーの発生を引き起こすかどうかを決定するために、ステミュレーターが一次MLRと同じドナー由来であるかあるいは第三パーティー由来のものである二次MLRにおいて、一次MLRからのレスポンドーT細胞を試験した。図14は、一次MLRから得られ、抗B7-1のみで処理されたレスポンドーT細胞は、免疫抑制のない二次MLRにおいて試験された場合には、元の感作性(sensitizing)細胞および第三パーティーの細胞の両方に対する完全な増殖応答を示すことを示すものであり、抗-B7-1 mAbでの処理によりB7-1受容体のみをブロックすることは、これらの応答性T細胞に対して寛容化効果を有しないことが示される。このことは、一次MLRが抗-B7-2のみで処理された場合に、二次MLRにおいて見られる一次ステミュレーターに対する応答の欠如とは対照的である。図15の結果は、抗-B7-2のみで処理された一次MLRからのレスポンドーT細胞は、一次MLRにおいて使用したのと同じステミュレーターには応答しないが、無関係なステミュレーターである第三パーティーに対する正常な増殖応答を保持していることを示すものであり、抗-B7-2での処理によりこれらのレスポンドーT細胞が元のステミュレーターPBLに対して寛容化され、寛容化が一次MLRに存在したステミュレーター抗原に対して特異的であることが示される。このレスポンドー/ステミュレーターのペアに関して、抗-B7-2のみでの処理はステミュレーター細胞に対する寛容性を生じさせたが、他のレスポンドー/ステミュレーターのペアに関しては、寛容性の誘導は完全ではない可能性がある。

【0146】

図16は、抗-B7-1および抗-B7-2で処理された一次MLRからのレスポンドーT細胞は一次MLRに使用したのと同じステミュレーターには応答しなかったが、無関係なステミュレーターである第三パーティーに対しては正常な増殖応答を保持していたことを示す。このことは、組み合わせられた抗-B7-1および抗-B7-2での処理によりこれらのレスポンドーT細胞が元のステミュレーターPBLに対して寛容化されたことを示す。このレスポンドー/ス

ティミュレーターのパアーを用いて得られた結果は、寛容性の誘導が規則となっている点において、他のレスポンドー/スティミュレーターのパアーに関して典型的なものである。

【0147】

実施例17：ヒト化抗-B7-1および抗-B7-2での処理による一次および二次MLRの阻害

要約：

一次MLRを阻害し、特異的な持続性のある高応答性または「寛容性」ならびに二次MLRを誘導する抗-B7 mAbの能力を調べた。個々の抗-B7 mAbあるいは組み合わされた抗-B7 mAbあるいはCTLA4 Igで一次MLRを処理し、3、4および5日目に増殖を測定した。組み合わされた抗-B7-1 mAb+抗-B7-2 mAbならびにCTLA4 Igは増殖を阻害したが、個々の抗-B7 mAbはあまり効果がなかった。ついで、一次MLRからの細胞（処理後48時間）を、阻害剤のない二次MLR中に入れた。組み合わされた抗-B7 mAbまたはCTLA4 Igのいずれかで処理された一次MLRからの細胞は、二次MLRにおいて元のスティミュレーターに対して最小の応答を示したが、培地または個々の抗-B7 mAbで処理された細胞はよく応答した。すべての条件から得られた細胞は第3パーティーのスティミュレーターに対する良好な応答を与え、そのことにより、組み合わされた抗-B7 mAbまたはCTLA4 Igで処理された細胞に関して一次MLRにおいて見られた高応答性は特異的かつ持続的なものであったことが示される。

【0148】

材料および方法：

実験の設計：

細胞：

レスポンドー" A "細胞は、新たに採血された血液から調製されたPBLであった。フィコール勾配遠心分離によりPBLを精製し、細胞を培地で二回洗浄し、ついで、 1×10^6 個/mlとして培地に懸濁した。元のスティミュレーター" B "細胞はロイコフェレシスから調製されたPBLであった。フィコール勾配

遠心分離により細胞を精製し、細胞を培地で二回洗浄した。一次MLR用には細胞を 2×10^6 個/mlとして培地に懸濁し、二次MLR用には 1×10^6 個/mlとして懸濁した。第3パーティーのスティミュレーター”C”細胞はロイコフェレシスから調製されたPBLであった。フィコール分離により細胞を精製し、培地で二回洗浄した。 1×10^6 個/mlとして細胞を培地に懸濁した。”B”および”C”スティミュレーターは二種の遺伝学的に異なったヒトドナーから得たPBLである。

【0149】

培地：

2mMグルタミン、10mM HEPES、10%熱不活性化ヒトAB血清、100U/mlペニシリン、100 μ g/ml硫酸ストレプトマイシン、および5 μ g/ml硫酸ゲンタマイシンを含有するRPMI1640。

【0150】

試験物品：

対照Igは、ネズミ抗-HIVエンベロープ蛋白mAb由来の変域ドメインおよびヒトIgG1由来の不変ドメインを有するキメラmAbである。すべての抗体、CTLA4Ig、および対照Ig溶液は培地において調製され、下記濃度であった：抗-B7-1(40 μ g/ml)、抗-B7-2(40 μ g/ml)、抗-B7-1+抗-B7-2(各40 μ g/ml)、CTLA4Ig(40 μ g/ml)、CTLA4Ig(80 μ g/ml)、および対照Ig(40 μ g/ml)。

【0151】

一次MLRの方法：

下記のことを行った：

- ・3.5Gyにて”B”細胞に照射する。
- ・96ウェルU字底マイクロタイタープレート中にて、50 μ lの照射された”B”細胞+50 μ lの抗体、CTLA4Ig、対照Ig、または培地を混合する。1 $\times 10^5$ 個のB細胞(スティミュレーター)および2X最終濃度の阻害試薬を含んで全体積=100 μ l。氷上で30分インキュベーションする。

- ・ 100 μ l の " A " 細胞 (レスポンドー) を添加する。
- ・ 5% CO₂ 下、37 °C でインキュベーションする。
- ・ 2、3 および 4 日目に、1 μ Ci の [³H] - チミジン を添加し、インキュベーションを一晩継続する。
- ・ 細胞を集め、取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンティングにより決定する。3、4、および 5 日目に結果を報告する。

【0152】

カップリングされた一次/二次MLRの方法：

下記のことを行った：

- ・ 3.5 Gy にて " B " 細胞に照射する。
- ・ バルク一次MLR。T - 25 フラスコ中で、2.5 ml の照射 " B " 細胞 (2 x 10⁶ 個/ml) + 2.5 ml の抗体、CTLA4 Ig、対照 Ig、または培地を混合する。1 x 10⁶ 個/ml の " B " 細胞 (ステイミュレーター) および 2 X 最終濃度の阻害試薬を含んで全体積 = 5 ml。氷上で 30 分インキュベーションする。
- ・ 100 μ l の " A " 細胞 (レスポンドー) を添加する。
- ・ フィコール勾配遠心分離により細胞を集め、氷冷培地で細胞を 2 回洗浄し、培地に 1 x 10⁶ 個/ml として懸濁する。氷上に 8 時間置く。氷冷バッファーで細胞を 2 回洗浄し、培地に 1 x 10⁶ 個/ml として懸濁する。
- ・ 3.5 Gy にて " C " 細胞 (第 3 パーティーのステイミュレーター) に照射する。3.5 Gy にて " B " 細胞 (元のステイミュレーター) に照射する。" B " 細胞および " C " 細胞は両方とも 1 x 10⁶ 個/ml である。
- ・ 96 ウェル U 字底マイクロタイタープレート中にて、100 μ l の照射された " B " 細胞または照射された " C " 細胞およびバルクMLRからの 100 μ l の細胞を混合する。
- ・ 5% CO₂ 下、37 °C でインキュベーションする。
- ・ 2、3、4 および 5 日目に、1 μ Ci の [³H] - チミジン を添加し、インキュベーションを一晩継続する。
- ・ 細胞を集め、取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンティングにより

決定する。3、4、5および6日目に結果を報告する。

【0153】

結果：

1のレスポンドラーを用いて行った一次MLRおよび2の異なるステイミュレーターを、個々の抗-B7 mAb、組み合わされた抗-B7 mAb、CTLA4 Ig、あるいは対照Igで処理し、培養物の増殖を3、4および5日目に測定した。抗-B7-1単独では増殖に対して最小の阻害的影響があった(1-35%)。抗-B7-2単独では増殖に対して中程度の阻害的影響があった(30-50%)。組み合わされた抗-B7 mAbまたはCTLA4 Igは増殖に対して最大の阻害を示した(86-92%、抗-B7; 82-91%、CTLA4 Ig; 図17および18)。

1のステイミュレーターを用い、阻害剤を含有する一次MLRにおけるインキュベーションから48時間後に、細胞を洗浄し、休止させ、阻害剤を欠く培養において元のステイミュレーターおよび第3パーティーのステイミュレーターを用いる二次MLRに付した。培養物の増殖を3、4、5および6日目に測定した(図19および20)。二次MLR実験からのデータの編集を図21に示す。

ピーク増殖応答の日にかかわらず、ピーク増殖応答からのデータを用いた場合には、抗-B7-1単独で処理された一次MLRからの細胞に関する元のステイミュレーターおよび第3パーティーのステイミュレーターに対する応答は次のようであった：

表7

一次MLRにおける処理	元のステイミュレーター に対する応答(%)	第3パーティーの ステイミュレーター に対する応答(%)
培地	100	100
抗-B7-1	70	89
抗-B7-2	47	89
抗-B7-1+抗-B7-2	15	89
CTLA4 Ig 10	19	90

CTLA4 Ig 20	17	95
対照 Ig	99	105

【0154】

組み合わされた抗-B7 mAbまたはCTLA4 Igのいずれかで処理された一次MLRは、二次MLRにおいて同じスティミュレーターに対する増殖をあまりしなかった。抗-B7 mAbいずれか単独での処理はあまり効果的でなかった。一次MLRにおける処理にかかわらず、すべての処理条件で得た細胞は、通常には、第3のパーティーの細胞に応答し、組み合わされた抗-B7 mAbまたはCTLA4 Igでの処理は特異的かつ持続的な低応答性またはアネルギーを引き起こすことが示された。

【0155】

結論：

組み合わせて使用されるヒト化抗-B7 mAbであるh1F1および3D1は一次MLRを阻害する。この阻害は特異的かつ持続的であり、組み合わされた抗-B7 mAbで処理された一次MLRからのレスポンドーは、阻害剤なしで行われた二次MLRにおいて同じスティミュレーターに対してほとんど応答しない。組み合わされた抗-B7 mAbで処理された一次MLRからのレスポンドーは、通常には、二次MLRにおいて第3のパーティーのスティミュレーターに応答する。組み合わされた抗-B7 mAbは、一次および二次応答を阻害することにおいて、CTLA4 Igと同じほど効果的である。個々の抗-B7 mAbは、一次MLRを阻害することにおいてあまり効果的でなく、個々の抗-B7 mAbでの処理は二次MLRにおいてアネルギー発生を導かなかった。

【0156】

実施例18：非ヒト霊長類における抗-B7 mAbによる免疫応答の阻害；抗-破傷風応答の阻害

要約：

一次および二次（リコール）抗体応答を阻害する抗-B7 mAbの能力を、非ヒト霊長類破傷風免疫モデルにおいて調べた。4群のカニクイザル（*cynomolgus monkey*）（ $n = 3$ ）を0日目および6週間後（42日目）に破傷風トキソイド

で免疫した。抗 - 破傷風力価を毎週評価した。10 mg / kg 用量のヒト抗 - B 7 - 1 抗体 (h 1 F 1) およびヒト抗 - B 7 - 2 抗体 (h 3 D 1) の両方を組み合わせて 0 日目に一回投与された群において、抗 - 破傷風抗体応答が劇的に抑制され、処理された 6 匹の動物はいずれも免疫から 6 週間以内に有意な力価を生じなかった。さらに、0 日目に抗体の組み合わせで処理された動物は、セイラインまたはさらなる h 1 F 1 および h 3 D 1 を 42 日目に投与されたか否かにかかわらず、42 日目の破傷風抗原での攻撃には応答しなかった。0 日目にセイラインそして 42 日目のみに h 1 F 1 および h 3 D 1 を投与された動物の群において、破傷風に対する二次抗体応答の平均力価は、セイライン対照群において観察された平均力価よりも低かった。h 1 F 1 および h 3 D 1 で処理されたすべての動物群を、h 1 F 1 および h 3 D 1 の血清レベルが検出可能限界未満となっている場合には、最後の投与から 112 日目に 3 回目の破傷風抗原を投与することにより再免疫した。この時点において、動物は、抗 - 破傷風抗体を生成することにより応答し、一次または二次抗体応答と類似であるようなキネティクスを伴っていた。これらのデータは、抗 - B 7 - 1 および抗 - B 7 - 2 抗体で B 7 - 1 および B 7 - 2 をブロックすることによる共刺激の阻害は、破傷風に対する一次抗体応答を劇的に抑制し、さらに二次抗体応答をも減少させることを示す。さらに、これらの結果は免疫抑制からの回復を示すものであり、この研究において破傷風に対する長期の寛容性は達成されなかったことが示される。

【 0 1 5 7 】

材料および方法：

試験および対照物品：

抗 - B 7 - 1 (h 1 F 1)：

ゆっくりとした静脈輸液により抗 - B 7 - 1 抗体を非ヒト霊長類に投与した。研究 0 日目および / または 42 日目に処理群中の各動物に 10 mg / kg を投与した。

抗 - B 7 (h 3 D 1)：

ゆっくりとした静脈輸液により抗 - B 7 - 2 抗体を非ヒト霊長類に投与した。研究 0 日目および / または 42 日目に処理群中の各動物に 10 mg / kg を投与

した。

セイライン対照：

ゆっくりとした静脈輸液によりセイライン（注射用9%塩化ナトリウム）を非ヒト霊長類に投与した。研究0日目および/または42日目に、セイライン対照群ならびに群BおよびCの動物に15mlを投与した。

精製破傷風トキソイド抗原：

破傷風トキソイド抗原（University of Massachusetts Medical Center, Biologic Laboratories）を0日目に投与した。セイラインまたは抗体から90分後に10リミットのフロクレーション単位（LfU）を筋肉内（IM）注射し、1Lf単位を皮内（ID）注射することによりすべての動物を免疫した。42日目に、セイラインまたは抗体から90分後に10Lf単位をIM注射することによりすべての動物を免疫した。84日目に、すべての動物に1Lf単位をID注射して、破傷風特異的遅延型高感受性（DTH）について調べた。群B、C、およびDの動物に、最終投与（2回目の免疫）から112日後に3回目の10Lf単位をIM注射により免疫した。

【0158】

実験の設計：

12匹の破傷風にかかっていない体重4-6kgのオスのシノモルグス・マカク（*Macaca fascicularis*）を、4つの実験群に分け、1群につき3匹とした。

群A；0および42日目に破傷風トキソイドを10Lf単位（フロクレーション単位）を筋肉内注射により2回免疫した。

群B；0日目の10Lfの破傷風トキソイドの筋肉内注射の少なくとも90分前に10mg/kgの各ヒト化抗-B7-1（1F1）および抗-B7-2（3D1）を静脈内投与し；42日目および112日目に破傷風トキソイド免疫のみ（mAb前処理なし）を行った。

群C；0日目に破傷風トキソイド免疫のみ（mAb前処理なし）を行い；42日目および154日目の10Lfの破傷風トキソイドの筋肉内注射の少なくとも90分前に10mg/kgの各ヒト化抗-B7-1（1F1）および抗-B7-2（3D1）を静脈内投与した（二次免疫での共刺激ブロック）。

群D；0日目の10Lfの破傷風トキソイドの筋肉内注射の少なくとも90分前に10mg/kgの各ヒト化抗-B7-1(1F1)および抗-B7-2(3D1)を静脈内投与し；42日目の破傷風トキソイド10Lf単位筋肉内注射の少なくとも90分前および154日目の破傷風トキソイド免疫のみ(mAb前処理なし)の少なくとも90分前に10mg/kgの各ヒト化抗-B7-1(1F1)および抗-B7-2(3D1)を静脈内投与した(一次および二次免疫での共刺激ブロック)。

0日目および42日目にすべての群を破傷風免疫した。群B、C、Dには、抗-B7投与後112日目に3回目の破傷風免疫を行った(表8)。

表8 治療群

群	1回目の	2回目の	3回目の
N = 3 / 群	破傷風免疫	破傷風免疫	破傷風免疫
A	セイライン	セイライン	なし
セイライン対照			
B	抗B7-1/B7-2	セイライン	112日目
1回目の免疫後に	10mg/kg IVボラス		
抗-B7			
C	セイライン	抗B7-1/B7-2	154日目
2回目の免疫後に		10mg/kg IVボラス	
D	抗B7-1/B7-2	抗B7-1/B7-2	154日目
1回目および	10mg/kg IVボラス	10mg/kg IVボラス	
2回目の			
免疫後に抗-B7			

0日目および42日目にすべての群に破傷風免疫を行った。抗-B7投与から112日後に群B、CおよびDに3回目の免疫を行った。

【0159】

抗 破傷風抗体ELISA：

96ウェルのELISAプレートを4μg/mlの破傷風トキソイドで被覆した。1:100から始めて血清試料の4-log滴定を行った。モノクローナル

抗 - ヒト I g G および ポリクローナル ヤギ 抗 - レサス (rhesus) I g M - H R P
- 結合抗体の組み合わせを用いて破傷風への A b 結合を検出し、T N B 基質を用
いて発色させた。

【 0 1 6 0 】

結果および議論：

図 2 2 は、破傷風トキソイドで免疫され、組み合わせられた抗 - B 7 - 1 および
抗 - B 7 - 2 m A b で処理されたサルにおける抗 - 破傷風 I g M + I g G 応答
を示す。

セイラインまたは 1 0 m g / k g の抗 - B 7 - 1 抗体 (h 1 F 1) および抗 -
B 7 - 2 抗体 (h 3 D 1) の組み合わせのいずれかを静脈内 (I V) 輸液により
カニクイザルに投与した。抗体またはセイライン輸液から 9 0 分後に、1 0 L f
単位の精製破傷風トキソイドの I M 注射および 1 L f 単位の I D 注射により各動
物を免疫した。抗 - 破傷風抗体力価を毎週測定した。セイライン対照群において
、抗 - 破傷風抗体力価の対数の平均値が 1 4 日目までにはベースラインよりも上
昇し、4 9 日目にピークとなり、研究中ずっとベースラインを上回ったままであ
った (図 2 2) 。 h 1 F 1 および h 3 D 1 の組み合わせを 0 日目に与えられた群
(群 B および D) において、処理された 6 匹の動物のうち、4 2 日目までに有意
な抗 - 破傷風抗体力価を有するものはいなかった。4 2 日目に破傷風トキソイド
で再攻撃したところ、群 B 中の動物は、さらに抗 - B 7 抗体を投与されなかつた
にもかかわらず、有意な抗体応答を有していなかった。(図 2 2) 。血清の分析
により、4 2 日目の血清中に有意なレベルの h 1 F 1 および h 3 D 1 が残存して
いたことが示された (平均血清濃度 > 1 0 m g / m l) 。群 D 中の動物は、破傷
風トキソイドでの再免疫に先立って 4 2 日目にさらに h 1 F 1 および f 3 D 1 の
両方を輸液された。この群中の 3 匹の動物はすべて、研究中ずっと検出可能限界
未満の抗 - 破傷風力価を有していた。群 C において、0 日目にセイラインを、そ
して 4 2 日目においてのみ h 1 F 1 および h 3 D 1 を投与された動物は、セイラ
イン対照群 (群 A) と類似の一次抗 - 破傷風抗体応答を有していた。しかしなが
ら、群 C の二次応答において観察された平均抗体力価は、群 A の二次応答におい
て観察された平均抗体力価よりも低かった (図 2 2) 。

研究中ずっとh1F1およびh3D1の血清濃度をモニターし、それらが検出可能限界未満である場合には、群B、C、およびDについて破傷風トキソイドにて3回目の免疫を行った。最後の抗-B7抗体輸液から112日後に各群を再免疫し、さらに抗-B7抗体処理を行わなかった。この時点において、すべての群の動物は抗-破傷風抗体を産生することにより応答し、一次抗体応答と類似と思われるキネティクスを有していた(図22)。

【0161】

結論：

これらのデータは、抗-B7-1および抗-B7-2抗体でのB7-1およびB7-2のブロックによる共刺激の阻害は、破傷風に対する一次抗体応答を劇的に抑制し、さらに二次抗体応答をも減少させることを示す。さらに、これらの結果は免疫抑制からの回復を示すものであり、この研究において破傷風に対する長期の寛容性は達成されなかったことが示される。

それゆえ、新たな抗原への曝露(破傷風免疫)に伴う抗-B7抗体の投与により、新たな抗体応答の発生を防止でき、同じ抗体に対する二次応答の強度を低下させることができる。かかる抗体の発生により多くの疾病状態が激化されるので、組み合わされた抗-B7 mAbでの治療はかかる抗体の発生を防止するであろう。1のかかる疾病状態は、血友病患者において投与された因子VIIIIまたは因子IXに対するインヒビター抗体の発生であり、そのことにより、これらの救命化合物の有効性が低下する。抗-B7 mAbでの血友病患者の治療はインヒビター抗体の生成を防止または減少させる。

【0162】

実施例19：破傷風トキソイド攻撃カニクイザルモデルにおける0.01、0.1、1、または10mg/kgの用量の組み合わせまたは個々の抗-B7-1(h1F1)および抗-B7-2(h3D1)の薬物動態

要約：

種々の用量の、個々の抗-B7-1または抗-B7-2抗体、あるいは組み合わされた抗-B7-1または抗-B7-2抗体の、破傷風に対する一次および二次(リコール)応答を阻害する能力を、カニクイザル免疫モデルにおいて調べた

。0.01、0.1、1、または10 mg / kgの組み合わせられたh1F1およびh3D1、10、1または0.1 mg / kgのh1F1またはh3D1のみ、あるいは担体対照をカニクイザル(全部でn = 33)に1回静脈内投与した。h1F1およびh3D1投与から1時間後に精製破傷風トキソイドですべての動物を免疫した。h1F1およびh3D1レベルが検出可能レベル未満に下がった場合には、破傷風トキソイドで動物を再度免疫して、正常な免疫機能が回復しているかどうかを調べた。

【0163】

10または1 mg / kgの組み合わせられたh1F1およびh3D1を1回静脈内投与した後に一次抗 - 破傷風抗体応答の完全な抑制が観察されたが、0.1 mg / kgの用量では不完全な抑制が生じただけであった。抗 - 破傷風抗体応答の抑制において、h1F1またはh3D1のみでの処理は、同じ用量の組み合わせられたh1F1およびh3D1ほどには有効でなかった。h1F1およびh3D1濃度が検出可能限界未満(< 50 ng / ml)に低下した後に、破傷風トキソイドで2回目の免疫を行った後において、すべての群のすべての動物は高い抗 - 破傷風抗体力価を生じた。このことは、h1F1およびh3D1での処理後に正常な免疫機能が回復し、この研究において破傷風に対する長期の寛容が達成されなかったことが示された。

【0164】

材料および方法：

表9に従って、0日目に試験または対照(担体)物質を動物に1回静脈内投与した。0.1 ml / 分 / kgにセットしたシリンジポンプを用いて試験または対照物質を末梢静脈から輸液した(最大投与速度1 mg / 分 / kg)。0日目のt = 1時間において、10 Lf(フロクレーションの限界)単位の精製破傷風トキソイド(Massachusetts Biologic Laboratories, UMass, Jamaica Plain, MA)をすべての動物にID注射により与えた。t = 14週目にIM注射により10 Lf単位およびID注射により10 Lf単位の精製破傷風トキソイドをすべての動物に2回目として与えた。投与後3024時間(126日)まで特定の時点において静脈せん刺により血液試料を集めた。抗 - 破傷風抗体(IgMおよびIg

G) の血清レベルをELISAにより決定した。

表9 群分けおよび用量レベル

群	動物数	抗体用量レベル (mg/kg)	投与された試験薬剤
1	3	0	担体
2	3	10	h1F1
3	3	1	h1F1
4	3	0.1	h1F1
5	3	10	h3D1
6	3	1	h3D1
7	3	0.1	h3D1
8	3	10 ^a	h1F1およびh3D1
9	3	1 ^a	h1F1およびh3D1
10	3	0.1 ^a	h1F1およびh3D1
11	3	0.01 ^a	h1F1およびh3D1

【0165】

抗 - 破傷風抗体生成：

担体で処理されたすべての動物は、免疫してから14日目より検出可能な抗 - 破傷風抗体力価を生じた(表10、図23、24および25)。2種の高用量(10または1mg/kg)の組み合わせられたh1F1およびh3D1での処理により、すべての動物において、14週間の観察期間中、検出可能な抗体力価の発生は完全に抑制された。0.1mg/kgで処理された動物において抗体応答の不完全な抑制が観察され、3匹のうち1匹が検出可能な抗体力価を生じた。0.01mg/kgの組み合わせられたh1F1およびh3D1で処理されたすべての動物は検出可能な抗体力価を生じたが、担体対照群において観察された力価と比較すると、この力価は強度において低く、いくぶんかの抗体応答抑制が達成されていた。

表10

破傷風トキソイドでの一次攻撃後、h1F1およびh3D1での治療中に検出可

能な抗 - 破傷風抗体力価を生じたカニクイザル数

群	治療	検出可能な抗体を生じた動物数
1	担体対照	3
2	10mg/kg h1F1	1
3	1mg/kg h1F1	3
4	0.1mg/kg h1F1	2
5	10mg/kg h3D1	1
6	1mg/kg h3D1	1
7	0.1mg/kg h3D1	3
8	10mg/kg h1F1 およびh3D1	0
9	1mg/kg h1F1 およびh3D1	0
10	0.1mg/kg h1F1 およびh3D1	1
11	0.01mg/kg h1F1 およびh3D1	3

【0166】

0.1、1、および10mg/kg投与群をひとまとめにして考えると、h1F1のみ(図24)またはh3D1のみ(図25)いずれかでの処理は、組み合わせたh1F1およびh3D1での処理(図23)ほど有効でない。h1F1のみでの処理(群2、3、および4)では9匹中6匹(66%)の動物が検出可能な抗-破傷風抗体応答を有していた。h3D1のみでの処理(群5、6、および7)では9匹中5匹(55%)の動物が検出可能な抗体を有していたが、9匹中1匹の動物のみ(11%)がh1F1およびh3D1の組み合わせでの処理後に検出可能な抗体を有していた(群8、9、および10)。0.01mg/kgのh1F1およびh3D1を個々に投与しなかったため、群11はこれらの比較に含めなかった。

1および10mg/kgにおいて、h1F1およびh3D1の組み合わせで処

理されたいずれの動物においても検出可能な抗体応答はなかったが、これらの用量の両方において、h 1 F 1のみまたはh 3 D 1のみで処理された動物において検出可能な抗体破存在した。動物を0.1 mg / kgで処理した場合、3つのすべての処理群からの動物において検出可能な抗 - 破傷風抗体が存在したが、組み合わせ処理群においてはh 1 F 1 (2 / 3) またはh 3 D 1 (3 / 3) 群よりも低い存在確率であった。

【 0 1 6 7 】

図 2 6 は、各処理群に関する抗 - 破傷風抗体力価曲線下の面積 (A U C) を示す。これらのAUC値は0ないし14週において計算された。各群の応答動物数を説明するために、検出可能な抗体力価を生じた各群の動物数の分数によりAUC値を秤量した。このプロットは、14週間の観察期間中の抗体力価の積算強度または抗体応答強度を示す。10または1 mg / kgの組み合わせたh 1 F 1およびh 3 D 1にてあほりされた動物 (群 8 および 9) は、対照群に対して、100%の抗体応答抑制を示した (A U C = 0)。0.1または0.01 mg / kgの組み合わせたh 1 F 1およびh 3 D 1での処理 (群 1 0 または 1 1) では、対照群と比較して抗体応答はそれぞれ78%または86%抑制された (A U C = 4 0 2 または 2 5 3 L o g 力 価 ・ 時)。h 1 F 1のみまたはh 3 D 1のみで処理された動物 (群 2 - 7) においては、対象と比較して抗体応答は8.6%ないし99%抑制された (A U C = 1 6 4 0 ないし 5 . 0 4 L o g 力 価 ・ 時)。これらのデータは、抗 - 破傷風抗体応答の抑制において、h 1 F 1またはh 3 D 1での処理は、同じ用量の組み合わせられたh 1 F 1およびh 3 D 1ほどには有効でなかったことを示す。

【 0 1 6 8 】

h 1 F 1およびh 3 D 1の投与から14週間後の破傷風トキソイドでの再免疫後に、すべての群のすべての動物は高い抗 - 破傷風 抗体力価 (> 3 l o g 力 価) を生じ、h 1 F 1およびh 3 D 1での処理を中止した語に正常な免疫機能が回復し、この研究において破傷風に対する長期の寛容性は達成されなかったことが示される。10 mg / kgの組み合わせたh 1 F 1およびh 3 D 1にて処理された動物は遅れた抗体応答を示し、一次抗体応答と同様に免疫から14日後に検出

可能な抗体力価が存在し、最初の免疫に対する応答が完全にブロックされたことが示される。他のすべての動物は免疫後7日目に増加した抗体力価を示し、一次応答よりもむしろメモリー応答に似ていた。

【0169】

結論：

10または1mg/kgのh1F1およびh3D1組み合わせを1回静脈投与した後に、一次抗-破傷風抗体応答の完全な抑制が観察されたが、0.1mg/kgの用量では不完全な抑制のみが生じた。抗-破傷風抗体応答の抑制において、h1F1またはh3D1単独での処理は、同じ用量のh1F1およびh3D1組み合わせほどには有効でなかった。h1F1およびh3D1濃度が検出可能限界未満に下がった後に破傷風トキソイドで2回目の免疫が行われた後に、すべての群のすべての動物は高い抗-破傷風抗体力価を生じた。このことは、h1F1およびh3D1での処理を中止した後に正常な免疫機能が回復したことを示す。

【0170】

実施例20：非ヒト霊長類における抗-B7抗体の血清半減期

非ヒト霊長類において血清半減期および標的細胞飽和に関してネズミ抗-hB7-1およびネズミ抗-hB7-2 mAbを試験した。2、8または20mgの各用量のmAb/kg体重の抗-hB7-1および抗-hB7-2 mAbの組み合わせを3匹のカニクイザルに投与した。PBMC（増殖性血液単核細胞）へのmAb結合、血清mAb濃度、および霊長類抗-マウス抗体（PAMA）応答に関してサルを分析した（表11）。mAbを投与された霊長類の血液から単離されたPBMCがヤギ抗-ネズミIg-PEで染色（%インビボ）されるか、あるいは先ずPBMCが抗-hB7-1および抗-hB7-2と反応し、ついで、ヤギ抗-ネズミIg-PEを用いて検出（%エクスピボ）されるフローサイトメトリー（FACS）によりPBMC飽和を調べた。種々の時点におけるPBMC飽和のレベルを、（%インビボ/%エクスピボ）×100により計算した。この研究は、抗hB7-1および抗-B7-2 mAbに関するPBMC飽和が、mAb用量に依存して、4ないし6日目（各2mg/kgのmAb）、6ないし8日目（各8mg/kgのmAb）、および13ないし20日目（各20mg/kg

gのmAb)に80%未満に低下することを示す。直接測定しなかったが、循環B7⁺細胞の明らかで劇的な減少はなかった。

【0171】

hB7-1 IgまたはhB7-2 Igを標的として用い、ヤギ抗-ネズミ Ig HRP/ABTSを検出用として、各mAbに特異的なELISAを用いて抗hB7-1および抗-B7-2 mAbの血清半減期を測定した。これらのアッセイはそれぞれ400 ng/mlおよび200 ng/mlの抗-hB7-1および抗-hB7-2に対して感度がある。市販キットを用いてPAMA応答を測定した。2種の抗-hB7 mAbの血清濃度およびPAMA応答を、各mAbの個々の用量レベルにおいて示す。3種のすべての用量レベルにおいて測定した場合、両方のmAbは約48時間の同様の血清半減期を示す。20 mg/kgの用量で投与した場合、30 µg/mlよりも高い循環mAbレベルが、投与から6日後に各mAbに関して見られた。

抗-hB7-1および抗-hB7-2 mAbに対するPAMA応答は低く、血清mAbレベルが10 µg/ml未満に低下してから10日後にはじめて測定可能となった。

【0172】

10 mg/kgのヒト化抗-B7-2抗体を1回投与されたカニクイザル(n=6)においてヒト化抗-ヒトB7-2およびB7-1抗体の血清半減期も調べた。HRP-抗ヒトIgG2およびABTSを用いる各抗体に関する特異的ELISAアッセイにより血清濃度をモニターした。

図27は、投与から42日後までのカニクイザルにおける化B7-2およびヒト化B7-1 mAbの血清濃度を示す。

同じレベルで投与された場合、ネズミ抗-ヒトB7-2および抗-ヒトB7-1 mAbに関する約2日という値と比較すると、ヒト化抗-ヒトB7-2および抗-ヒトB7-1 mAbはカニクイザルにおいて延長された血清半減期を示し、ヒト化抗-ヒトB7 mAbはネズミ抗-B7 mAbよりもずっと長く循環中に保持されたことが示される。

【表1】

表11. 臨床前の霊長類での研究結果

時間 時	用量 @ 2 mg 各		mAb/kg		PBL 飽和 %		用量 @ 8 mg 各		mAb/kg		PBL 飽和 %		用量 @ 20 mg 各		mAb/kg		PBL 飽和 %		
	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	抗-hB7-2 µg/mL	PAMA ng/mL	
(H, D)																			
0	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	0
.167	61	NT	206	NT	206	NT	206	NT	206	NT	206	NT	206	NT	580	NT	580	NT	0
.5	59	NT	229	NT	229	NT	229	NT	229	NT	229	NT	229	NT	570	NT	570	NT	65
1	52	NT	227	NT	227	NT	227	NT	227	NT	227	NT	227	NT	527	NT	527	NT	65
3	52	NT	230	NT	230	NT	230	NT	230	NT	230	NT	230	NT	548	NT	548	NT	100
5	50	NT	139	NT	139	NT	139	NT	139	NT	139	NT	139	NT	464	NT	464	NT	100
8	44	NT	169	NT	169	NT	169	NT	169	NT	169	NT	169	NT	412	NT	412	NT	100
24 (1D)	26	NT	103	NT	103	NT	103	NT	103	NT	103	NT	103	NT	286	NT	286	NT	80
48 (2D)	15	NT	59	NT	59	NT	59	NT	59	NT	59	NT	59	NT	196	NT	196	NT	100
96 (4D)	2.4	NT	18	NT	18	NT	18	NT	18	NT	18	NT	18	83	NT	83	NT	100	
144 (6D)	BQL	NT	3.9	NT	3.9	NT	3.9	NT	3.9	NT	3.9	NT	3.9	32	NT	32	NT	100	
192 (8D)	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	13	NT	13	NT	100	
240 (10D)	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	NT	BQL	3.9	NT	3.9	NT	100	
312 (13D)	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	陰性	BQL	BQL	BQL	BQL	陰性	陰性	80
480 (20D)		2908																	20
684 (27D)		1260																	
816 (34D)																			

BQL = 定量限界未満 ; NT = 試験せず

【0173】

実施例21: 超抗原(毒性ショック症候群トキシン-1; TSSST-1) に対す

る特異的T細胞応答の阻害

10⁸個のヒトPBLを投与することによりNODscidマウスにヒトリンパ球を移入した。28日後、ヒトB7-1およびB7-2の組み合わせ抗体(500mg、静脈内投与)での処理をおこなって、あるいは行わずに、TSSST-1(10mg、腹腔内投与)でマウスを処理した。さらに14日後、ヒトリンパ球、T細胞、およびTSSST-1特異的T細胞(V₂-TCR細胞)の腹腔における存在を、ヒトCD45、CD4、およびヒトV₂-TCRに特異的な抗体を用いるFACSにより測定した。

表12

添加		ヒトT細胞(%)	
TSSST-1	抗-B7-1+抗-B7-2	全体	V ₂ ⁺
-	-	10.2	3.9
+	-	27.4	12.0
+	+	23.4	3.8

【0174】

結果:

表12は、hu-NODscidマウスの腹腔中に見出された全ヒトT細胞およびV₂⁺-TCRヒトT細胞(TSSST-1特異的)の割合を示す。TSSST-1での処理は、huNODscidマウスにおけるヒトT細胞およびTSSST-1特異的ヒトT細胞(V₂⁺)のパーセンテージを大幅に上昇させた。抗-ヒトB7-1およびB7-2 mAbでの処理は、全ヒトT細胞応答を中程度に減少させ、ヒトT細胞特異的TSSST-1の増殖を完全に阻害し、抗-B7 mAbはヒトT細胞超抗原により媒介される応答を効果的に阻害しうることが示された。

【0175】

実施例22: カニクイザルの生命維持的腎臓移植モデルにおける抗-B7抗体h1F1(抗-B7-1)およびh3D1(抗-B7-2)の評価

要約:

カニクイザルの生命維持的腎臓移植モデルにおけるモノクローナル抗体h1F

1 (抗 - B 7 - 1) および h 3 D 1 (抗 - B 7 - 2) の有効性および適合性を評価するためにこの研究を行った。モノセラピーならびにシクロスポリン A (CsA)、ラパマイシン、およびステロイド類のごとき慣用的な免疫抑制剤との組み合わせとして投与した場合の、これらの抗体の有効性および適合性を評価した。

24匹のカニクイザルに、血液型適合性かつ混合リンパ球反応 (MLR) 不適合の腎臓異種移植片を移植した。レシピエントを一連の6つの処理群として研究し、それらの群は、術後の最初の56日間は下記の免疫抑制剤の組み合わせを用い、ついで、さらに65 - 66日間は追加の処置を行わなかった (最長フォローアップ期間は119 - 120日) :

・スケジュールAに従って、組み合わせた抗 - B 7 抗体を群1に与えた :

術前に h 1 F 1 20 mg / kg + h 3 D 1 20 mg / kg、ついで、術後に h 1 F 1 5 mg / kg + h 3 D 1 5 mg / kg、そして術後56日までに7日ごとに9投与時点において h 1 F 1 5 mg / kg + h 3 D 1 5 mg / kg を投与。

・スケジュールBに従って、組み合わせた抗 - B 7 抗体を群2に与えた :

術前に h 1 F 1 5 mg / kg + h 3 D 1 5 mg / kg、ついで、手術直後および術後3日目に h 1 F 1 10 mg / kg + h 3 D 1 10 mg / kg、そして術後7日目から始めて術後56日までに毎週8投与時点において各5 mg / kg の抗体を投与。

・群3には、スケジュールAに加えて24時間トラフレベル (trough level) 濃度が200ないし300 ng / ml となるように設計された用量のマイクロエマルジョンCsAを術後0日目から術後14日目まで投与し、ついで、24時間CsAトラフレベルが150ないし250 ng / ml となるように減少させた用量で術後15日目から術後56日目の最終投与まで投与した。

・群4には、スケジュールAに従って組み合わせた抗 - B 7 抗体 (h 1 F 1 および h 3 D 1) を投与するとともにステロイドを徐々に用量を低下させつつ投与した : 術後に、ついで術後2日目から毎日メチルプレドニソロン2 mg / kg IV、その後、3日ごとに0.5 mg / kg から0.05 mg / kg ずつ減少させて0.2 mg / kg とし、ついで、術後56日目まで0.2 mg / kg を継続した

。

・群5には、スケジュールAに従って組み合わせ抗-B7抗体(h1F1およびh3D1)を投与するとともにラパマイシンを術後に、ついで、術後13日目まで毎日1mg/kg、ついで、術後56日目まで毎日0.5mg/kgを投与。

・群6には、24時間トラフレベル濃度が200ないし300ng/mlとなるように設計された用量のマイクロエマルジョンCsAを術後0日目から術後14日目まで投与し、ついで、24時間CsAトラフレベルが150ないし250ng/mlとなるように減少させた用量で術後15日目から術後56日目の最終投与まで投与した。

・群7には、術後0日目から術後13日目までラパマイシン1mg/kg、ついで、術後14日目から術後56日目までラパマイシン0.5mg/kgを投与。

【0176】

クレアチニンレベルが約8.0mg/dLに上昇した場合には、術後120日前に動物を安楽死させ、末端腎臓拒絶反応の証拠であると解釈した。

移植され、治療されたカニクイザルの生存率を表13に示す。

表13. 移植され、治療されたカニクイザルの生存時間および診断

治療群	治療スケジュール	生存時間(術後日数)*
	抗-B7-1+	
	抗-B7-2/他の治療薬	
履歴対照	行わず	10
1	スケジュールA/なし	9、48、119、119
2	スケジュールB/なし	12、14、18、120
3	スケジュールA/CsA	96、119、119、119
4	スケジュールA/ステロイド	6、77、111、119
5	スケジュールA/ラパマイシン	69、73、81、114
6	mAbなし/CsA	22、25、38、71
7	mAbなし/ラパマイシン	11、18、27、35

【0177】

この研究の結果は、B7-1およびB7-2モノクローナル抗体の組み合わせ

での非ヒト霊長類腎臓異種移植片レシピエントの治療は、長期の移植片生存を導く可能性があることを示す。群1の動物の50%において治療終了後66日目までの間の移植片生存が観察された。対照的に、群2に使用された、スケジュールBに従って投与された抗体は、4匹の治療動物中3匹において早期の急性拒絶反応を克服するには十分でなく、この群では一匹の動物みが120日間生存した。スケジュールAをマイクロエマルジョンCsAと組み合わせた場合、すべての動物は長期生存し、すでに示された抗体の有効性に対するCsAのアンタゴニスト性免疫抑制効果の証拠はなかった。群4において、高用量のステロイド類と抗体との共投与は、この非ヒト霊長類モデルにおいて抗体の免疫抑制効果に拮抗しなかった。群5において、ラパマイシンと抗体との共投与は、この非ヒト霊長類モデルにおいて抗体の免疫抑制効果に拮抗しなかった。群6において、CsAのみでの治療は大部分の腎臓レシピエントにおいて早期の拒絶反応を引き起こした。この治療群に関する結果は、抗-B7抗体の組み合わせのみ(群1)または抗体+CsAの組み合わせ(群4)での組み合わせ治療で得られた結果よりも劣っていた。群7において、ラパマイシンのみでの治療はすべての腎臓レシピエントにおいて早期の拒絶反応を引き起こした。この治療群における結果は、抗-B7抗体の組み合わせのみ(群1)または組み合わせ抗体とラパマイシン(群5)との組み合わせ治療で得られた結果よりも劣っていた。

よって、モノクローナル抗体h1F1およびh3D1は、非ヒト霊長類における生命維持的腎臓移植モデルにおける早期の末端拒絶反応の回避に有効である。抗体は他の免疫抑制剤と適合性があり、それらの有効性はマイクロエマルジョンCsAラパマイシンまたはステロイド類との組み合わせにより増大すると思われる。

【0178】

次の研究は2つのフェーズに分けられた。第1フェーズの目的は、生命維持的モデルにおいて腎臓移植を受けたカニクイザルに対するモノセラピー(monotherapy)として投与された場合の、新規免疫抑制的抗体h1F1およびh3D1の有効性を決定することであった。同時に免疫抑制治療を受けなかった移植された動物は、移植から10日以内に移植片を拒絶した。2つの異なる抗体治療のスケ

ジュールを試験するために研究を設計した。両方のスケジュールにおいて56日目に抗体治療を中止し、ついで、移植片拒絶反応があるまで、あるいは119 - 120日目まで動物を追跡調査した。

この研究の第2フェースは、a) h1F1およびh3D1が、CsA、ラパマイシン、またはステロイド類と組み合わせて投与された場合に、CsA、ラパマイシン、またはステロイド類の免疫抑制効果に拮抗し、かくして、移植片生存時間を短縮するかどうか、あるいはb) 治療を同時に行った場合(0日目から56日目まで)あるいはすべての免疫抑制治療の終了後(56日目以降)のいずれかの場合に、CsA、ラパマイシン、またはステロイド類がh1F1およびh3D1の免疫抑制有効性に拮抗するかどうかを試験するために設計された。

【0179】

材料および方法：

動物：

体重5ないし8kgのカニクイザル、*Macaca fasciculans*をこの研究に使用した。動物の血液型検査を行った。ABO血液型合致、ネガティブクロス-マッチ、およびツーウェイ(two way)MLRにおける少なくとも2.5の刺激指数に基づいて、ドナーおよびレシipientのサルをペアにした。

【0180】

試験および対照物質：

h1F1およびh3D1：

シリンジポンプに接続したシリンジで抗-B7抗体を投与した。h1F1およびh3D1を常に組み合わせて与え、末梢静脈カテーテルを通して最大輸液速度1mg/kg/分で投与した。

各群について決定された異なるプロトコルに従って抗体を投与した。

マイクロエマルジョンCsA(ネオラル、Neoral)：

マイクロエマルジョンCsA(Neoral; 100mg/ml(Novartis))を室温に維持し、遮光した。必要な用量(mg/kg)に基づいて計算したネオラルの体積を最小の適当なシリンジ中に入れ、希釈せずに、経鼻胃管を通して胃中に入れた。

メチルプレドニソロンおよびプレドニソン：

メチルプレドニソロン (Solus-Medrol, Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI) は別添の復元用滅菌水を付けたバイアルに入れて提供され、製造者の説明書に従って復元された。復元後薬剤を冷蔵保存し、48時間後に捨てた。

プレドニソン (Mutual Pharmaceutical Co., Inc., Philadelphia, PA) は錠剤 (5 mg) として提供された。5 ml の水に1錠の割合で錠剤を滅菌水に溶解し、得られた溶液濃度は1 mg / mlであった。毎日の投与の終了時に残りの薬剤を捨てた。

【0181】

実験の設計：

合計24匹のサルに、生命維持的モデルにおいて片側の腎臓を移植した。

群1：h1F1およびh3D1モノセラピー (monotherapy) (スケジュールA)：

スケジュールAに従って、抗-B7-1 + 抗-B7-2抗体組み合わせモノセラピーを群1に与えた：術前にh1F1 20 mg / kg + h3D1 20 mg / kg、ついで、術後にh1F1 5 mg / kg + h3D1 5 mg / kg、そして術後56日までに7日ごとにh1F1 5 mg / kg + h3D1 5 mg / kgを投与。

群2：h1F1およびh3D1モノセラピー (スケジュールB)：

スケジュールAとスケジュールBとの間の主な相違は、術前の最初の用量が20 mg / kgから5 mg / kgに減じられ、術後直後の用量が5 mg / kgから10 mg / kgに増加させられ、術後3日目にさらに10 mg / kgの用量が与えられることであった。術後の残りの投与はスケジュールAと同じであった。それゆえ、術後に各動物に与えられた抗体合計量はスケジュールAおよびスケジュールBにおいて同じであった。

群3：h1F1およびh3D1 (スケジュールA) プラスCsA：

群3において、抗体治療 (スケジュールA) を、マイクロエマルジョンCsAの毎日の経口投与と組み合わせた。群3には、スケジュールAに従って抗体を投与することに加え、24時間トラフレベル濃度が200ないし300 ng / ml

となるように設計された用量のマイクロエマルジョンCsAを術後0日目から術後14日目まで投与し、ついで、24時間CsAトラフレベルが150ないし250 ng/mlとなるように減少させた用量で術後15日目から術後56日目の最終投与まで投与した。

胃管によるケタミン鎮静化から短時間経過後、胃管によりマイクロエマルジョンCsAを毎日投与した。CsAの24時間トラフレベルを週に3回測定し、毎日の用量を調節して目的のCsAトラフレベルに合うようにした。さらにCsA用量調節を行って過剰な体重低下を防止し、あるいは腎臓機能損傷がCsAトラフレベルに関連すると考えられる場合にもさらにCsA用量調節を行った。

群4：h1F1およびh3D1（スケジュールA）プラスステロイド類：

群4において、h1F1およびh3D1をスケジュールAに従って投与するとともにステロイドを徐々に用量を低下させつつ投与した：術後に、ついで術後2日目から毎日メチルプレドニソロン2 mg/kg IV、その後、3日ごとに0.5 mg/kgから0.05 mg/kgずつ減少させて0.2 mg/kgとし、ついで、術後56日目まで0.2 mg/kgを継続した。

術後の最初の3日間（術後0日目から2日目まで）において、2 mg/kgの用量でメチルプレドニソロンをボラスとして動物に静脈内投与した。術後3日目から術後56日目まで、0.5 mg/kgから開始して0.2 mg/kgの用量で終了する、プレドニソンを除々時用量を減少させるスケジュールで、胃管によるケタミン鎮静化動物に与えた（図4参照）。

群5：h1F1およびh3D1（スケジュールA）プラスラパマイシン：

群5において、スケジュールAに従ってh1F1およびh3D1を投与するとともにラパマイシンを術後に、ついで、術後13日目まで毎日1 mg/kg、ついで、術後56日目まで毎日0.5 mg/kgを投与。

群6：CsAのみ：

群6においては、24時間トラフレベル濃度が200ないし300 ng/mlとなるように設計された用量のマイクロエマルジョンCsAを術後0日目から術後14日目まで投与し、ついで、24時間CsAトラフレベルが150ないし250 ng/mlとなるように減少させた用量で術後15日目から術後56日目の

最終投与まで投与した。

胃管によるケタミン鎮静化から短時間後に胃管によりマイクロエマルジョンCsAを毎日投与した。CsAの24時間トラフレベルを週に3回測定し、毎日の用量を調節して目的のCsAトラフレベルに合うようにした。さらにCsA用量調節を行って過剰な体重低下を防止し、あるいは腎臓機能損傷がCsAトラフレベルに関連すると考えられる場合にもさらにCsA用量調節を行った。

群7：ラパマイシン：

胃管によるケタミン鎮静化から短時間後に胃管によりラパマイシンを毎日投与した。群7には、術後0日目から術後13日目までラパマイシン1mg/kg、ついで、術後14日目から術後56日目までラパマイシン0.5mg/kgを投与。

【0182】

結果および議論：

履歴対照群 (historical control group)：治療を施さない腎臓移植：

履歴データは、腎臓移植を受け、治療を施されなかったカニクイザルはいずれも、移植10日後までに、移植された腎臓を拒絶した。

群1：スケジュールAによるh1F1およびh3D1モノセラピー：

スケジュールAによる組み合わせられた抗-B7-1+抗-B7-2 mAbで治療された4匹の動物のうち2匹は、研究期間終了まで(120日間)機能的な異種移植片を保持していたが、他の2匹は治療期間中(9日目および48日目)に移植腎臓を拒絶した。それゆえ、スケジュールAにより治療された4匹の腎臓レシピエントのうち3匹が、履歴対照よりもずっと長期にわたり移植腎臓を保持しており、移植腎臓の拒絶反応の防止における抗-B7治療の有効性が示された。

【0183】

群2：スケジュールBによるh1F1およびh3D1でのモノセラピー

群1とは対照的に、スケジュールBにより抗-B7抗体で治療された4匹の動物のうちわずか1匹が、術後18日以降も機能的な腎臓異種移植片を保持していた。しかしながら、この動物は研究期間終了まで(120日間)移植腎臓を保持

していた。このデータは、スケジュールAによる抗-B7 mAbでの治療は、スケジュールBにより治療された動物よりも良好な腎臓拒絶反応に対する免疫抑制を生じたことを示唆する。この結果は、スケジュールAにより治療された動物において移植後早期に高濃度の抗-B7 mAbが提供されたことによるものかもしれない。

【0184】

群3：スケジュールAによるh1F1およびh3D1プラスマイクロエマルジョンCsAでの治療：

CsAと組み合わせてスケジュールAにより抗-B7 mAbで治療されたすべての動物は大幅に遅延された移植腎臓の拒絶反応を示し、4匹のうち3匹の動物が研究終了まで（術後119日間）機能的な異種移植片を保持していた。これらの結果は、抗-B7 mAb単独（群1）あるいはCsA単独（群6）での治療後に得られた結果よりも優れており、抗-B7 mAb + CsAでの治療においては拮抗作用が見られず、これらの薬剤による同時治療は遅延された器官拒絶反応というさらなる利益を提供することが示された。

【0185】

群4：スケジュールAによる1F1およびh3D1プラスメチルプレドニソン/プレドニソンでの治療：

組みあわされた抗-B7 mAb + ステロイド類で治療された4匹の動物のうち1匹は、研究期間終了まで（術後119日）移植腎臓を保持していた。残りの3匹の腎臓レシピエントのうち2匹は遅延された移植腎臓の拒絶反応を示した。3匹目のサルは、高用量のステロイドの投与に関連すると考えられる尿管壊死により早期（術後6日目）に移植腎臓を拒絶した。まとめると、これらのデータは、抗-B7 mAb + ステロイドの組み合わせは移植腎臓の拒絶反応防止において効果的であり、これらの薬剤の組み合わせ使用は矛盾したものではないことを示唆する。

【0186】

群5：スケジュールAによるh1F1およびh3D1プラスラパマイシンでの治療：

スケジュールAによる抗-B7mAb+ラパマイシンの組み合わせで治療された4匹すべての動物は、術後の治療期間を超えて69ないし114日目まで機能的な腎臓異種移植片を保持していた。このことは、抗-B7mAb+ラパマイシンの組み合わせでの治療は期間拒絶反応の遅延において有益であり、抗-B7mAb単独での治療に拮抗しないことを示した。

【0187】

群6：CsA単独での治療：

CsA単独で治療された4匹すべての動物はそれらの移植腎臓を拒絶し、4匹の動物のうち3匹がCsAでの治療期間中に拒絶した。これらの結果は組み合わせられた抗-B7mAb+CsAで治療された動物に関して得られた結果よりも劣る。

【0188】

群7：ラパマイシン単独での治療：

ラパマイシン単独で治療された4匹すべての動物はそれらの移植腎臓を治療期間中に拒絶した。

【0189】

結論：

研究の目的は、生命維持的非ヒト霊長類腎臓移植モデルにおいて、新規モノクローナル抗体h1F1およびh3D1の有効性および適合性を評価することであった。末端急性拒絶反応の発生および最終的な異種移植片(動物)の生存を評価することにより有効性を評価した。未治療動物における末端拒絶反応は、当該モデルを用いた場合、移植後10日以内に生じると考えられた。全部で7つの異なる治療群において適合性および有効性を試験した。後者の群に使用した治療規則は進歩した研究として用いられ、以前の群の結果に基づくものであった。

【0190】

有効性の評価：

群1：h1F1およびh3D1モノセラピー(スケジュールA)：

最初の治療群中の動物を、56日間にわたり毎週投与されたh1F1またはh3D1のみで治療し、付加的な免疫抑制剤治療を行わなかった。結果は、h1F1

1またはh3D1でのモノセラピーは、この群の4匹の動物のうち2匹において末端急性拒絶反応を防止でき、ほかのサルにおいても術後48日目まで末端拒絶反応の発生を遅延できることを示した。一匹のサルにおいては、抗体の投与は履歴対照群において見られたよりも移植片生存を延長させなかった。

【0191】

群2：h1F1およびh3D1モノセラピー（スケジュールB）：

群1で見られた術後5ないし7日目の早期の急性拒絶反応を防止しようとして、治療群2において抗体投与の規則およびスケジュールを変更した。この群の各mAbの術前用量を20mg/kgから5mg/kgに減じ、最初の各mAbの術後用量を5mg/kgから10mg/kgに増加させた。それゆえ、手術直前および直後に投与された全抗体量は25mg/kgから15mg/kgに減少した。10mg/kgの付加的な用量を術後3日目に与えた。その後、群1および2における投与スケジュールは同じであった。

4匹の動物のうち3匹はこの最初の拒絶反応から回復しなかった。1匹のみが全フォローアップ期間中生き延びた。このことは、手術直前および直後の期間中の抗体投与タイミングおよび用量の重要な様相を示す。手術直前および直後における用量の減少は、より激しい拒絶応答を引き起こす可能性が最も高く、術後3日目の付加的な用量の抗体の投与はこの結果に影響しなかった。

群1および2の両方において、さらに免疫抑制治療を施さなくても長期間生存する動物が存在した。

スケジュールA（群1）およびスケジュールB（群2）を行った後に移植片の結果を直接比較したところ、スケジュールAのほうが好ましかった。スケジュールAに従って、次の2つの群に抗体の組み合わせを投与した。

【0192】

群3：h1F1およびh3D1（スケジュールA）プラスCsA：

200ないし300ng/mlの範囲の24時間トラフレベルをデルバリーすることを目的としたマイクロエマルジョンCsAの用量を群3において投与した。この群中のすべての動物は長期間生存し（>56日）、4匹の動物のうち3匹がフォローアップ期間終了時まで末端急性拒絶反応の証拠を示さなかった。それ

ゆえ、抗-B7抗体もCsAも、互いにネガティブに影響しなかった。この群において生存日数のメジアン値は119日で、生存日数の平均値は113日であり、群1（メジアン：84日；平均：74日）における生存日数の長さよりも良くないとしても、少なくとも同等に良好であった。レシピエントをマイクロエマルジョンCsAのみで治療したさらなる治療群（群6）には群3におけるのと同様のトラフレベル（56日）を達成するように投与したが、4匹すべての移植片レシピエントがそれらの移植腎臓を拒絶し、4匹のうち3匹が治療期間中に拒絶したことが示された。

モノクローナル抗体とマイクロエマルジョンCsAとの組み合わせは、早期の急性拒絶反応を回避するに十分なものであった。

【0193】

群4：h1F1およびh3D1（スケジュールA）プラスステロイド類：

群4において、用量を徐々に減らしながらh1F1およびh3D1を投与した。一般的には、ステロイド類でのモノセラピーだけではこのモデルにおける末端異種移植片拒絶反応を防止するには十分ではない。高用量のステロイド類をこの群のために選択して、ステロイド類および抗体が互いの有効性に影響するかどうかを調べた。抗-B7 mAb + ステロイド類の組み合わせで治療した4匹の動物のうち一匹は、研究期間終了（術後119日目）まで移植された腎臓を維持した。残り3匹の腎臓レシピエントのうち2匹は移植された腎臓の拒絶反応が遅れた。3匹目のサルは、高用量のステロイドの投与に関連していると考えられる尿管壊死のため、早期に移植腎臓を拒絶した。

この群において高用量のステロイド類の共投与は抗体の有効性に負の影響を及ぼすとは思われなかった。非ヒト霊長類腎臓移植モデルにおけるモノセラピーとして使用された類似のステロイド投与規則の有効性に関して利用可能なデータがないので、抗体投与がステロイド類の免疫抑制効果に影響するかどうかは不明である。

【0194】

群5：スケジュールAによるh1F1およびh3D1プラスラパマイシンでの治療：

スケジュールAによる抗-B7 mAb+ラパマイシンの組み合わせで治療された4匹すべての動物は、治療期間を超えて術後69日から114日目までの間、機能的な腎臓異種移植片を維持した。このことは、抗-B7 mAb+ラパマイシンの組み合わせでの治療は器官拒絶反応の遅延において有益であり、抗-B7 mAb単独での治療に拮抗しないことを示す。レシピエントが群5と同様のレベルになるように投与されたラパマイシンのみで治療されたさらなる治療群は、4匹すべての移植片レシピエントは治療期間中にそれらの移植腎臓を拒絶したことを示した。

【0195】

群6：CsA単独での治療

CsA単独で治療された4匹すべての動物は移植腎臓を拒絶し、4匹の動物のうち3匹がCsA治療期間中に拒絶した。これらの結果は、抗-B7 mAb+CsAの組み合わせで治療された動物において得られた結果よりも劣っている。

【0196】

群7：ラパマイシン単独

ラパマイシン単独で治療された4匹すべての動物は治療期間中に移植腎臓を拒絶した。これらの結果は、抗-B7 mAbおよびラパマイシンの組み合わせで治療された動物において得られた結果よりも劣っている。

【0197】

実施例23：B7-1およびB7-2に対するモノクローナル抗体での誘導治療は非ヒト霊長類における異種移植片拒絶反応の発生を遅延させる

要約：

この研究において、抗-B7-1(h1F1)および抗-B7-2(h3D1)の単独投与および組み合わせ投与を、アカゲザル(rhesus monkey)における急性腎臓異種移植片拒絶反応の発生遅延能に関して試験した。最大の遅延効果は両方のB7リガンドの同時ブロックにより得られた。作用機構はTまたはB細胞の全体的な枯渇を用いるものではなかった。

【0198】

材料および方法：

実験の設計：

MHC タイピングおよびドナーレシピエント選択：

主要組織適合性複合体 (MHC) クラス II における遺伝学的非同一性に基づいてドナー - レシピエントの組み合わせを選択した。主要組織適合性抗原 HLA - DRB の変性グラジエントゲル電気泳動および直接配列決定により、これを確認した。ドナーに対するレシピエントの T 細胞応答性を、混合リンパ球反応 (MLR) アッセイを用いて、インビトロにおいてすべてのドナーレシピエントペアーに関して確認した。すべての潜在的ドナーに対して各動物を試験して、移植のための最高のレスポンドペアーを確認した。

【0199】

腎臓異種移植片：

すでに記載されているようにして腎臓異種移植を行った (Knechtle SU, et al., Transplantation, 63:1-6 (1997); Kirk AD, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 94: 8789-8794 (1997); Kirk AD, et al., Nature Medicine, 5: 686-693 (1999))。簡単に説明すると、サル免疫不全ウイルスおよびヘルペス B ウイルスに関してセロネガティブな異系交配若齢アカゲザル (生後 18 ないし 36 ヶ月、オス) を LABS of Virginia, Inc. (Yemassee, SC) から得た。

全身麻酔下ですべての手順を行った。MHC 分析により決定された遺伝学的に異なるドナー - レシピエントペアー間で腎臓移植を行った。器官採取および移植中、動物をヘパリン処理 (100 ユニット / kg) した。標準的な微小血管法を用いて異種移植片を移植して、ドナー腎動脈とレシピエント遠位大動脈との間、ならびにドナー腎静脈とレシピエント大静脈との間の側吻合に対して末端を作成した。ついで、最初の尿管膀胱吻合を作成した。縫合前に左右の原在性腎切除を行った。7 ないし 10 日後に皮膚縫合糸を除去した。

抗 - B7 - 1 および / または抗 - B7 - 2 抗体を以下に詳述する用量で静脈内投与した。血清クレアチニンレベルの上昇により腎不全が決定された時点で、あるいは AALAC 標準に従って体重減少が移植前の 15% となった時点で動物を安楽死させた。殺したすべての動物に関してネクロプシーの際に完全な全体的および組織病理学的分析を行った。

【0200】

結果および議論：

群1：対照動物：

拒絶反応防止治療をすることなく腎臓異種移植片を5匹の動物に与えた。5匹はすべて8日以内にそれらの移植片を失い、急性拒絶反応を起こした(表14、図28)。

群II：h1F1単独でのモノセラピー：

2匹の動物をh1F1のみで治療した(表14、図28)。移植片灌流前から20mg/kgの用量で抗体を与えた。次の用量5mg/kgを拒絶反応が起こるまで7日ごとに与えた。これらの2匹の動物はわずかにそれらの移植片生存時間を延長し、8および9日目に拒絶反応を起こした。

群III：h3D1単独でのモノセラピー(表14、図28)：

2匹の動物をh1F1のみで治療した(表14、図28)。移植片灌流前から20mg/kgの用量で抗体を与えた。次の用量5mg/kgを拒絶反応が起こるまで7日ごとに与えた。これらの2匹の動物はわずかにそれらの移植片生存時間を延長し、8および28日目に拒絶反応を起こした。

群IV：h1F1およびh3D1での組み合わせ治療：

h1F1およびh3D1の両方で4匹の動物を処理した(表14、図28)。移植片灌流の前から20mg/kgの用量で抗体を与えた。1匹の動物(AT48)において、5mg/kgの用量を移植直後に与えた。すべての動物において、一定期間あるいは拒絶反応まで、7日ごとに5mg/kgの用量を与えた。群IV中の4匹の動物のうち3匹において60日後に停止するように抗体投与を計画した。1匹の動物は80日まで投与した(AC2B)。すべての動物は移植片生存時間を延長し、47、67、227、および>365日であった。1匹の動物は生存しつつ健康であり、移植から1年後の時点において拒絶反応がなかった。この動物を殺さなかったが、この研究の目的からして、モニタリングを中止した。拒絶した動物においては、殺す約1週間前にクレアチニンがベースラインから上昇しはじめた。

h1F1およびh3D1の両方での組み合わせ治療を受けた動物は、群Iと比

較して有意に延長された異種移植片機能を有していた ($p = 0.016$)。両方のモノセラピー群と比較すると、組み合わせ群での生存時間の延長も著しかった。

表14 アカゲザルの成人時間および診断

移植日	群	治療	レシピエント	生存時間 (術後日数)
12 / 1 / 96	I	なし	X9X	5
11 / 30 / 96	I	なし	1FE	7
11 / 15 / 96	I	なし	T4T	7
4 / 2 / 97	I	なし	95052	8
5 / 3 / 99	I	なし	AT5H	8
11 / 2 / 98	II	h1F1	AC74	9
2 / 10 / 99	II	h1F1	2WN	8
2 / 3 / 99	III	h3D1	AT5J	8
2 / 16 / 99	III	h3D1	2WF	28
10 / 26 / 98	IV	h1F1+h3D1	AC2B	> 365 ^a
10 / 28 / 98	IV	h1F1+h3D1	AC8V	47
3 / 1 / 99	IV	h1F1+h3D1	AT5P	67 ^b
3 / 2 / 99	IV	h1F1+h3D1	AT48	227 ^b

^a 術後80日間の治療

^b 術後60日間の治療

【0201】

本明細書で引用した上記文献、特許および/または特許出願の教示を、出典明示により本明細書に一体化させる。

本発明を、その好ましい具体例を参考にして詳細に示し、説明したが、添付した請求の範囲により包含される本発明の範囲から逸脱することなく、本発明において形態および詳細における種々の変更を行ううることを、当業者は理解するであらう。

【0202】

出願人または代理人のファイル番号

国際出願番号

1290.1019003

寄託微生物または他の生物学的材料に関する表示（PCT規則13の2）

A. 以下の表示は寄託微生物に関するものであり、あるいは他の微生物材料が、
2, 22, 112, 117ページの22, 30; 3, 10; 20, 8行目に記載
されている。

B. 寄託の確認 別の寄託物が追加頁に記載されている

寄託機関の名称

American Type Culture Collection

寄託機関の宛名

10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209

寄託日 受託番号

1998年5月5日 CRL - 12524**

1999年6月22日 PTA - 263**

C. 追加の指示（不要の場合は空欄） この情報は添付別紙に続く x x

欧州特許が出願されている指定国においては、寄託微生物は、欧州特許付与宣言の公告まで、あるいは出願日から20ヶ月間においては、出願が拒絶され、あるいは取り下げられ、取り下げ擬制された場合を除き、受託番号（**上記参照）としてAmerican Type Culture Collectionに寄託された生物学的材料は、

D. 指示がなされた指定国（全指定国でない場合）

E. 別途指示

下記指示が追って国際事務局に提出される（指示の一般的性質を記載、例えば「寄託物の受託番号」）

受理官庁記載欄

国際事務局記載欄

この頁は国際出願とともに受理した。

（署名）

（認証官）

（認証官）

寄託微生物に関する指示（別紙）

C. 追加の指示（続き）

EPC規則28(3)に従って試料の請求人により任命された専門家に対する

試料分譲の場合にのみ入手可能である（EPC規則28（4））。

このPCT出願におけるオーストラリアの指定に関しては、オーストラリア特許法規則3.25（3）に従って、出願人は、American Type Culture Collectionにおいて上記受託番号（1頁の**）として寄託された生物学的試料の分譲が、特許付与前においては、あるいは出願の放棄、拒絶または取り下げの前においては、本発明に関係がなく、かつ試料分譲の請求において任命されている専門家に対して行われるだけであるという注意を与える。

このPCT出願におけるカナダの指定に関しては、出願人は、出願に基づいて特許付与されるまで、あるいは出願が拒絶されるまで、あるいは放棄されてもはや回復しなくなるまで、あるいは取り下げられるまでは、特許庁長官により任命された無関係な専門家に対し、American Type Culture Collectionにおいて上記受託番号（1頁の**）として寄託された生物学的試料の分譲が特許庁長官によりなされるだけであることを希望する旨を国際事務局に通告する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1Aは、ネズミ3D1抗体の重鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列（それぞれ配列番号：1および2）の配列を示し、CDR（CDR1、CDR2およびCDR3）に一重下線を付し、成熟重鎖の第1のアミノ酸に二重下線を付した。図1Bは、ネズミ3D1抗体の軽鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列（それぞれ配列番号：3および4）の配列を示し、CDR（CDR1、CDR2およびCDR3）に一重下線を付し、成熟軽鎖の第1のアミノ酸に二重下線を付した。

【図2】 図2Aは、ヒト化3D1抗体の重鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列（それぞれ配列番号：5および6）の配列を示し、CDR（CDR1、CDR2およびCDR3）に一重下線を付し、成熟重鎖の第1のアミノ酸に二重下線を付した。図2Bは、ヒト化3D1抗体の軽鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列（それぞれ配列番号：7および8）の配列を示し、CDR（CDR1、CDR2およびCDR3）に一重下線を付し、成熟軽鎖の第1のアミノ酸に二重下線を付した。

【図3】 図3は、競合アッセイの結果を示すグラフである。グラフは、r

h B 7 - 2 を表面に発現している C H O 細胞 (C H O / h B 7 - 2) に対するネズミまたはヒト化抗 - ヒト m A B の競合結合アッセイの結果を示す。放射性標識トレーサーネズミ抗 - ヒト m A B の存在下において未標識競合抗体の濃度を増加させて C H O / h B 7 - 2 細胞とともにインキュベーションし、結合 / 遊離抗体比を決定した。

【図4】 図4は、C H O / h B 7 - 2 細胞へのネズミまたはヒト化抗 - ヒト B 7 - 2 m A B の直接結合アッセイの結果を示すグラフである。放射性標識抗体濃度を増加させて C H O または C H O / h B 7 - 2 細胞とともにインキュベーションし、C H O または C H O / h B 7 - 2 細胞への特異的結合量を決定した。

【図5】 図5は、T細胞増殖アッセイの結果を示すグラフである。ネズミまたはヒト化抗 - ヒト B 7 - 2 m A b 濃度を増加させて、P M A で刺激された C D 2 8 + ヒト T 細胞および C H O / h B 7 - 2 細胞に添加し、これらの m A b による T 細胞増殖阻害を調べた。

【図6】 図6 A は、ネズミ 1 F 1 抗体の重鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 : 2 1 および 2 2) であり、C D R (C D R 1、C D R 2 および C D R 3) に一重下線を付し、成熟重鎖の第 1 のアミノ酸に二重下線を付した。図6 B は、ネズミ 1 F 1 抗体の軽鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 : 2 3 および 2 4) であり、C D R (C D R 1、C D R 2 および C D R 3) に一重下線を付し、成熟軽鎖の第 1 のアミノ酸に二重下線を付した。

【図7】 図7 A は、ヒト化 1 F 1 抗体の重鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 : 2 5 および 2 6) であり、C D R (C D R 1、C D R 2 および C D R 3) に一重下線を付し、成熟重鎖の第 1 のアミノ酸に二重下線を付した。図7 B は、ヒト化 1 F 1 抗体の軽鎖可変領域核酸およびアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 : 2 7 および 2 8) であり、C D R (C D R 1、C D R 2 および C D R 3) に一重下線を付し、成熟軽鎖の第 1 のアミノ酸に二重下線を付した。

【図8】 図8は、競合アッセイの結果を示すグラフである。グラフは、r

hB7-1でトランスフェクションされたCHO (CHO/hB7-1) に対するネズミまたはヒト化抗-ヒト mAbの競合結合アッセイの結果を示す。放射性標識トレーサーヒト化1F1の存在下において未標識競合抗体の濃度を増加させてCHO/hB7-1細胞とともにインキュベーションし、結合/遊離抗体比を決定した。

【図9】 図9Aは、rhB7-1でトランスフェクションしたCHO細胞に対するマウス1F1抗体の結合についてのScatchard分析を示す。放射性標識マウス1F1抗体を、rhB7-1でトランスフェクションしたCHO細胞とともにインキュベーションし、結合/遊離放射活性比を調べた。図9Bは、rhB7-1でトランスフェクションしたCHO細胞に対するヒト化1F1抗体の結合についてのScatchard分析を示す。放射性標識ヒト化1F1抗体を、rhB7-1でトランスフェクションしたCHO細胞とともにインキュベーションし、結合/遊離放射活性比を調べた。

【図10】 図10は、rhB7-1を表面に発現しているCHO細胞 (CHO/hB7-1) に対するネズミまたはヒト化抗-ヒト B7-1 mAbの競合結合アッセイの結果を示す。放射性標識トレーサーネズミ抗-ヒト B7-1 mAbの存在下において未標識競合抗体の濃度を増加させてCHO/hB7-1細胞とともにインキュベーションし、結合/遊離抗体比を決定した。

【図11】 図11は、CHO/hB7-1細胞へのネズミまたはヒト化抗-ヒトB7-1 mAbの直接結合アッセイの結果を示すグラフである。放射性標識抗体濃度を増加させてCHOまたはCHO/hB7-1細胞とともにインキュベーションし、CHOまたはCHO/hB7-1細胞への特異的結合量を決定した。

【図12】 図12は、T細胞増殖アッセイの結果を示すグラフである。ネズミまたはヒト化抗-ヒトB7-1 mAb濃度を増加させて、PMAで刺激されたCD28+ヒトT細胞およびCHO/hB7-1細胞に添加し、これらのmAbによるT細胞増殖阻害を調べた。

【図13】 図13は、ワンウェイ混合リンパ球反応 (MLR) アッセイの結果を示すグラフである。一定濃度のネズミまたはヒト化抗-ヒトB7-2 (I

g G 2 . M 3 イソタイプ) またはヒト C T L A 4 I g を、ヒトレスポンダーおよびスティミュレーター P B L の混合物に添加し、レスポンダー P B L の増殖を、3、4、および5日目に、放射性標識チミジンを添加することにより調べた。

【図14】 図14は、一次 M L R 由来の P B L をレスポンダーとして用い、一次 M L R における同じまたは異なる個体由来の P B L をスティミュレーターとして用いたワンウェイ二次 M L R アッセイの結果を示すグラフである。ヒト化抗 - ヒト B 7 - 1 m A b を一次 M L R のみに添加した。二次 M L R におけるレスポンダー P B L の増殖を、3、4、および5日目に、放射性標識チミジンを添加することにより調べた。

【図15】 図15は、一次 M L R 由来の P B L をレスポンダーとして用い、一次 M L R における同じまたは異なる個体由来の P B L をスティミュレーターとして用いたワンウェイ二次 M L R アッセイの結果を示すグラフである。ヒト化抗 - ヒト B 7 - 2 m A b (I g G 2 . M 3 イソタイプ) を一次 M L R のみに添加した。二次 M L R におけるレスポンダー P B L の増殖を、3、4、および5日目に、放射性標識チミジンを添加することにより調べた。

【図16】 図16は、一次 M L R 由来の P B L をレスポンダーとして用い、一次 M L R における同じまたは異なる個体由来の P B L をスティミュレーターとして用いたワンウェイ二次 M L R アッセイの結果を示すグラフである。ヒト化抗 - ヒト B 7 - 1 および B 7 - 2 m A b (I g G 2 . M 3 イソタイプ) を一次 M L R のみに添加した。二次 M L R におけるレスポンダー P B L の増殖を、3、4、および5日目に、放射性標識チミジンを添加することにより調べた。

【図17】 図17は、P B L をレスポンダーとして用い、照射された " B " P B L をスティミュレーターとして用いるワンウェイ一次 M L R アッセイの結果を示すグラフである。レスポンダーおよびスティミュレーターをヒト化抗 B 7 - 2 抗体、ヒト化抗 - B 7 - 1 m A b、ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 m A b 混合物、10 μ C T L A 4 I g、20 μ g / m l C T L A 4 I g、または対照 I g で処理した。3、4、および5日目に、放射性標識チミジンを添加することにより培養物の増殖を測定した。

【図18】 図17は、P B L をレスポンダーとして用い、照射された " C

” P B L をスティミュレーターとして用いるワンウェー一次 M R L アッセイの結果を示すグラフである。レスポンダーおよびスティミュレーターをヒト化抗 B 7 - 2 抗体、ヒト化抗 - B 7 - 1 m A b、ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 m A b 混合物、 10μ C T L A 4 I g、 20μ g / m l C T L A 4 I g、または対照 I g で処理した。3、4、および5日目に、放射性標識チミジンを添加することにより培養物の増殖を測定した。

【図19】 図19は、” B ” スティミュレーター一次 M L R (図17参照) および新鮮 ” B ” スティミュレーターからのレスポンダーを用いるワンウェイ二次 M R L アッセイの結果を示すグラフである。レスポンダーおよびスティミュレーターをヒト化抗 B 7 - 2 抗体、ヒト化抗 - B 7 - 1 m A b、ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 m A b 混合物、 10μ C T L A 4 I g、 20μ g / m l C T L A 4 I g、または対照 I g で一次 M L R においてのみ処理した。二次 M L R には何も添加しなかった。3、4、5 および 6 日目に、放射性標識チミジンを添加することにより培養物の増殖を測定した。

【図20】 図20は、” B ” スティミュレーター一次 M L R (図17参照) および新鮮 ” C ” スティミュレーターからのレスポンダーを用いるワンウェイ二次 M R L アッセイの結果を示すグラフである。レスポンダーおよびスティミュレーターをヒト化抗 B 7 - 2 抗体、ヒト化抗 - B 7 - 1 m A b、ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 m A b 混合物、 10μ C T L A 4 I g、 20μ g / m l C T L A 4 I g、または対照 I g で一次 M L R においてのみ処理した。二次 M L R には何も添加しなかった。3、4、5 および 6 日目に、放射性標識チミジンを添加することにより培養物の増殖を測定した。

【図21】 図21は、” B ” スティミュレーター一次 M L R (図17参照) および新鮮 ” B ” または ” C ” スティミュレーターからのレスポンダーを用いるワンウェイ二次 M R L アッセイの結果を示すグラフである。レスポンダーおよびスティミュレーターをヒト化抗 B 7 - 2 抗体、ヒト化抗 - B 7 - 1 m A b、ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 m A b 混合物、 10μ C T L A 4 I g、 20μ g / m l C T L A 4 I g、または対照 I g で一次 M L R においてのみ処理した。二次 M L R には何も添加しなかった。3、4、および5日目に

に、放射性標識チミジンを添加することにより培養物の増殖を測定した。図21は図19および図20の編集である。

【図22】 破傷風トキソイドで免疫した非ヒト霊長類における抗-破傷風応答（対数力価）を示すグラフである。カニクイザル（*Cynomolgus monkey*）を精製破傷風トキソイドで免疫し、ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体で処理した。血清抗-破傷風抗体力価（IgMおよびIgG）を26週間にわたり毎週測定した。

【図23】 図23は、破傷風トキソイドで免疫された非ヒト霊長類における抗-破傷風応答（対数力価）を示すグラフである。0日目にカニクイザルを精製破傷風トキソイドで免疫し、ヒト化抗-B7-1およびヒト化抗-B7-2抗体混合物または担体を0日目に1回静脈内投与して処置した。14週目に動物に対して破傷風トキソイドで2回目の免疫を行ったが、ヒト化抗-B7-1またはヒト化抗-B7-2抗体での処置は行わなかった。血清抗-破傷風抗体力価（IgMおよびIgG）を18週間にわたり毎週測定した。

【図24】 図24は、破傷風トキソイドで免疫された非ヒト霊長類における抗-破傷風応答（対数力価）を示すグラフである。0日目にカニクイザルを精製破傷風トキソイドで免疫し、ヒト化抗-B7-1抗体のみまたは担体を0日目に1回静脈内投与して処置した。14週目に動物に対して破傷風トキソイドで2回目の免疫を行ったが、ヒト化抗-B7-1またはヒト化抗-B7-2抗体での処置は行わなかった。血清抗-破傷風抗体力価（IgMおよびIgG）を18週間にわたり毎週測定した。

【図25】 図25は、破傷風トキソイドで免疫された非ヒト霊長類における抗-破傷風応答（対数力価）を示すグラフである。0日目にカニクイザルを精製破傷風トキソイドで免疫し、ヒト化抗-B7-2抗体のみまたは担体を0日目に1回静脈内投与して処置した。14週目に動物に対して破傷風トキソイドで2回目の免疫を行ったが、ヒト化抗-B7-1またはヒト化抗-B7-2抗体での処置は行わなかった。血清抗-破傷風抗体力価（IgMおよびIgG）を18週間にわたり毎週測定した。

【図26】 図26は、各処理群（群分け：群1：担体対照；群2-4：1

0、1、または0.1 mg / kg の h 1 F 1 のみ；群 5 - 7 : 1 0、1、または 0.1 mg / kg の h 3 D 1 のみ；群 8 - 1 1 : 1 0、1、0.1 または 0.0 1 mg / kg の h 1 F 1 および h 3 D 1 混合物) に関する抗 - 破傷風抗体力価曲線 (対数力価) 下の面積を示す棒グラフである。0 日目にカニクイザルを破傷風トキソイドで免疫し、ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 抗体混合物、ヒト化抗 - B 7 - 1 抗体またはヒト化抗 - B 7 - 2 抗体のみ、あるいは担体を 1 回静脈内投与した (1 群あたり 3 匹)。0 週目から 1 4 週目まで曲線下の面積 (AUC) の値を計算した。すべての破傷風力価をゼロのベースラインに対して正規化し、ついで、破傷風力価の AUC を計算した。各群の応答動物数を説明する検出可能な抗体力価を生じた各群の動物数のフラクションによりこれらの AUC 値を秤量した。

【図 2 7】 図 2 7 は、1 0 mg / kg の静脈内投与後の種々の時点における抗 - B 7 - 1 および抗 - B 7 - 2 (I g G 2 . M 3 イソタイプ) m A b の血清濃度を示すグラフである。

【図 2 8】 腎臓同種移植を受けたアカゲザルの約 1 年後の生存率 (%) を示すグラフである。ヒト化抗 - B 7 - 1 およびヒト化抗 - B 7 - 2 抗体混合物、ヒト化抗 - B 7 - 1 またはヒト化抗 - B 7 - 2 抗体のみ、あるいは担体でサルを処置した。ヒト化抗体を最初は 2 0 mg / kg で、ついで、5 mg / kg で、ついで、6 0 - 8 0 日間毎週 5 mg / kg で投与した。

【図1(A)】

3D1重鎖可変領域配列

```

                                30                                60
ATG GGT TGG AAC TGT ATC ATC TTC TTT CTG GTT ACA ACA GCT ACA GGT GTG CAC TCC CAG
M  G  W  N  C  I  I  F  F  L  V  T  T  A  T  G  V  E  S  Q

                                90                                120
GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGG CCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GAA TCA GTG AAG ATT TCC
V  Q  L  Q  Q  S  G  P  E  L  V  R  P  G  E  S  V  K  I  S

                                150                                180
TGC AAG GGT TCC GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATA CAG TGG GTG AAG CAG AGT CAT
C  K  G  S  G  Y  T  F  T  D Y A I O W V K Q S H
                                CDR1

                                210                                240
GCA AAG AGT CTA GAG TGG ATT GCA GTT ATT AAT ATT TAC TAT GAT AAT ACA AAC TAC AAC
A  K  S  L  E  W  I  G  V I N I Y Y D N T N Y N
                                CDR2

                                270                                300
CAG AAG TTT AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAT ATG
Q X F K G K A T M T V D K S S S T A Y M

                                330                                360
GAA CTT GCC AGA TTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA AGA GCG GCC TGG
E  L  A  R  L  T  S  E  D  S  A  I  Y  Y  C  A  R  A A W
                                CDR3

                                390
TAT AEG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
V M D Y W G Q G T S V T V S S

```

Figure 1 (A)

【図1(B)】

3D1 軽鎖可変領域配列

30 60
 ATG GAT TCA CAG GCC CAG GTT CTT ATA TTG CTG CTG CTA TGG GTA TCT GGT ACC TGT GGG
 M D S Q A Q V L I L L L L W V S G T C G

90 120
 GAC ATT GTG CTG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACT
D I V L S Q S P S S L A V S A G E K V T

150 180
 ATG AGC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG CTC AAC AGT AGA ACC CGA GAG AAC TAC TTG GCT
 M S C K S S O S L L N S R T R E N Y L A

CDR1

210 240
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG
 W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R

CDR2

270 300
 GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T

320 350
 ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGC ACG CAA TCT TAT AAT CTT
 I S S V Q A E D L A V Y Y C T O S Y N L

CDR3

390
 TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA
Y T F G G G T K L E I R

Figure 1 (B)

【図2(A)】

ヒト化3D1重鎖可変領域配列

```

                                     30                                     60
ATG GGT TGG AAC TGT ATC ATC TTC TTT CTG GTT ACC ACA GCT ACA GGT GTG CAC TCC CAG
M  G  W  N  C  I  I  F  F  L  V  T  T  A  T  G  V  H  S  Q

                                     90                                     120
GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG AGC TCA GTG AAG GTG TCC
V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V  S

                                     150                                     180
TGC AAA GCT TCC GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATA CAG TGG GTG AGA CAG GCT CCT
C  K  A  S  G  Y  T  F  T  D Y A I Q W  V  R  Q  A  P
                                     CDR1

                                     210                                     240
GGA CAG GGC CTC GAG TGG ATT GGA GTT ATT AAT ATT TAC TAT GAT AAT ACA AAC TAC AAC
G  Q  G  L  E  W  I  G  V I N I Y Y D N T N Y N
                                     CDR2

                                     270                                     300
CAG AAG TTT AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAG TCG ACG AGC ACA GCC TAT ATG
Q K F K G  K  A  T  M  T  V  D  K  S  T  S  T  A  Y  M

                                     330                                     360
GAA CTT AGT TCT TTG AGA TCT GAG GAT ACG GCC GGT TAT TAC TGT GCA AGA GCG GCC TGG
E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  A A W
                                     CDR3

                                     390
TAT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA
Y M D Y W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S

```

Figure 2 (A)

【図2(B)】

ヒト化3D1軽鎖可変領域配列

30 60
 ATG GAT TCA CAG GCC CAG GTT CTT ATA TTG CTG CTG CTA TGG GTA TCT GGC ACC TGT GGG
 M D S Q A Q V L I L L L L W V S G T C G

90 120
 GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCA GAT TCC CTG GCT GTA AGC TTA GGA GAG AGG GCC ACT
D I V L T Q S P D S L A V S L G E R A T

150 180
 ATT AGC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG CTC AAC AGT AGA ACC CGA GAG AAC TAC TTG GCT
 I S C K S S Q S L L N S R T R E N Y L A
 CDR1

210 240
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG CCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACF AGG
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R
 CDR2

270 300
 GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCF GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T

330 360
 ATC AGC AGT CTG CAG GCT GAA GAC GTG GCA GTT TAT TAC TGC ACG CAA TCT TAT AAT CTT
 I S S L Q A E D V A V Y Y C T O S Y N L
 CDR3

390
 TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA
Y T F G Q G T K V E I K

Figure 2 (B)

【図3】

抗-B7.2mAbsの競合結合アッセイ

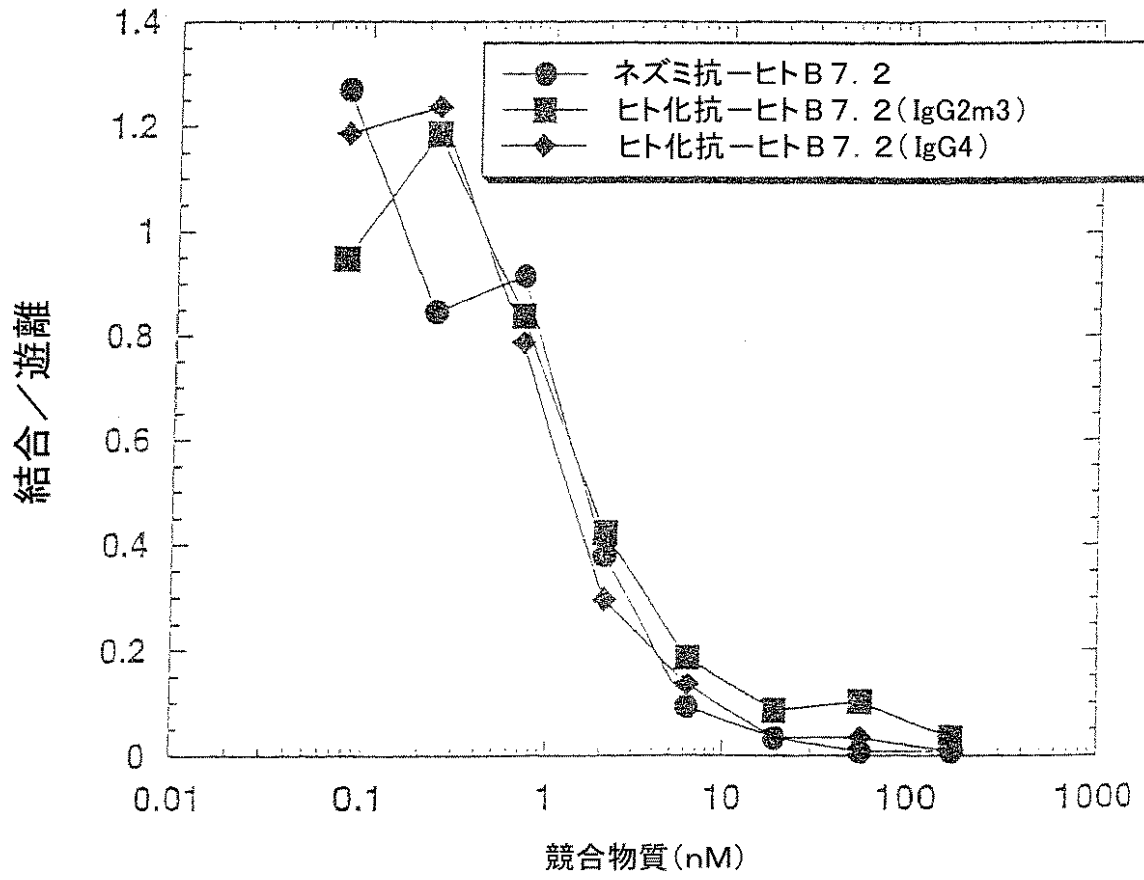


Figure 3

【図4】

抗-B7.2mAbsの直接結合アッセイ

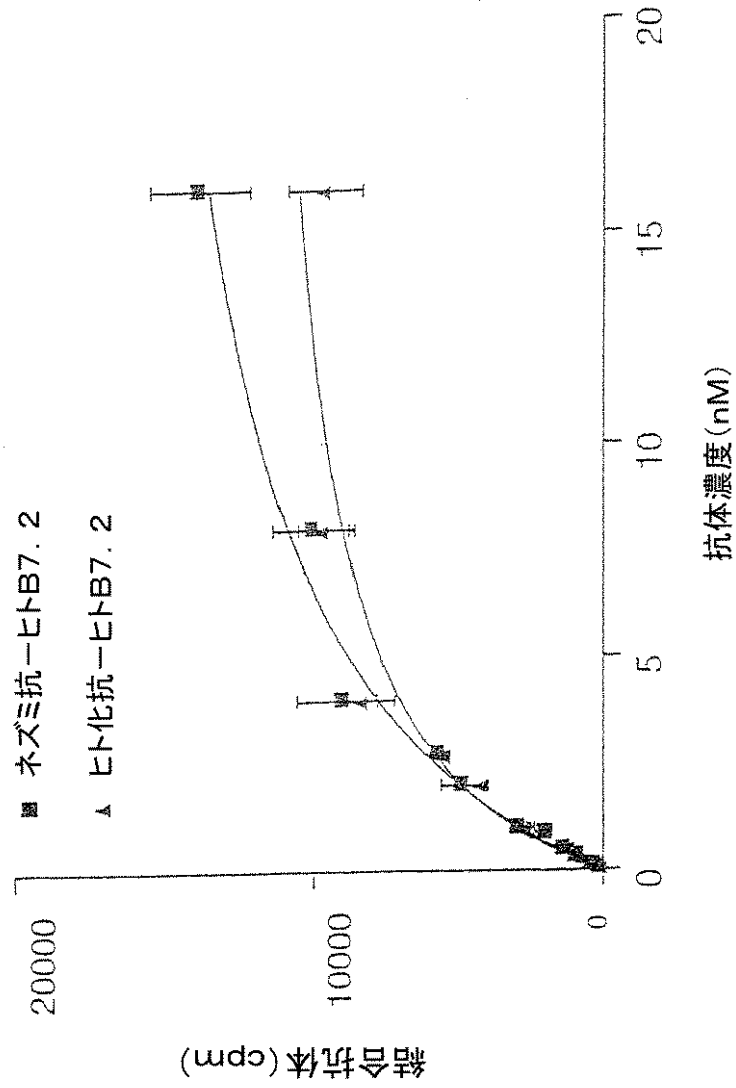


Figure 4

【図5】

抗-B7.2 mAbsによるCD28⁺T細胞増殖の阻害

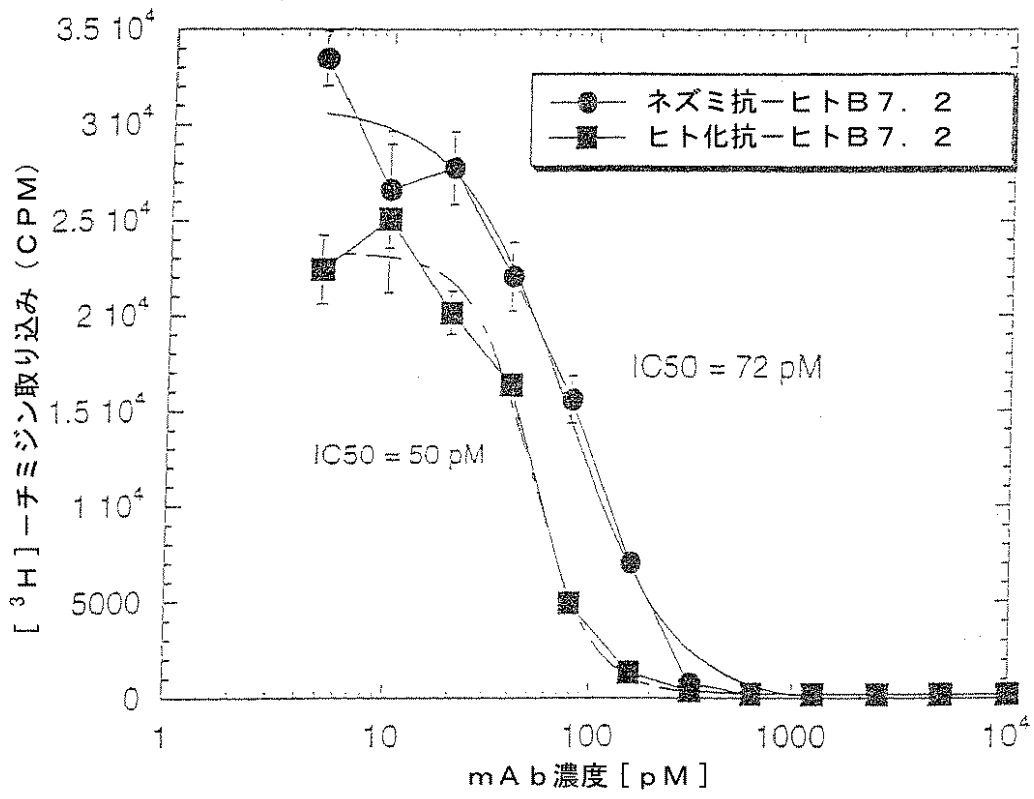


Figure 5

【圖6A】

1F1重鎖可變領域配列

```

ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATC TTC TTC          30          60
M  K  C  S  W  V  I  F  F  L  M  A  V  V  T  G  V  N  S  E
          90          120
GTT CAC CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTT GTG AGG CCA GGG GCC TTA GTC AAG TTG TCC
V  H  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V  R  P  G  A  L  V  K  L  S
          150          180
TGC AAA CCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT
C  K  P  S  G  F  N  I  K  D  Y  Y  M  H  W  V  K  Q  R  P
          210          240
GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT AAT ACT CTA TAT GAC
E  Q  G  L  E  W  I  G  W  I  D  P  E  N  G  N  T  L  Y  D
          270          300
CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC AGT ATA ACA GCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC CTG
P  K  F  Q  G  K  A  S  I  T  A  D  T  S  S  N  T  A  Y  L
          330          360
CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCT AGA GAG GGG CTT
Q  L  S  S  L  T  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  E  G  L
          390
TTT TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CCG GTC ACT GTC TCT GCA
F  F  A  Y  W  G  Q  G  T  P  V  T  V  S  A

```

CDR1

CDR2

CDR3

Figure 6A

【圖6B】

1F1輕鎖可變領域配列

```

ATG GAT TTT CAT GTG CAG ATT TTC AGC          30          60
M  D  F  H  V  Q  I  F  S  F  M  L  I  S  V  T  V  I  L  S
          90          120
AGT GGA GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA CTC ATG GCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG
S  G  E  I  V  L  T  Q  S  P  A  L  M  A  A  S  P  G  E  K
          150          180
GTC ACC ATC ACC TGC AGT GTC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AGC AAC TTG CAC TGG TAC CAG
V  T  I  T  C  S  V  S  S  S  I  S  S  S  N  L  H  W  Y  Q
          210          240
CAG AAG TCA GAA ACC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA
Q  K  S  E  T  S  P  K  P  W  I  Y  G  T  S  N  L  A  S  G
          270          300
GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC AGC AGC
V  P  V  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I  S  S
          330          360
ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT TAC CCA CTC ACG
M  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  S  Y  P  L  T
          390
TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA
F  G  A  G  T  K  L  E  L  K

```

CDR1

CDR2

CDR3

Figure 6B

【図7A】

ヒト化1F1重鎖可変領域配列

```

          30                                     60
ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATC TTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA GGG GTC AAT TCA GAG
M   K   C   S   W   V   I   F   F   L   M   A   V   V   T   G   V   N   S   E

          90                                     120
GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG CCA GGG GCC TCA GTC AAG GTG TCC
V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S   V   K   V   S

          150                                     180
TGC AAA CCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AGG CAG GCG CCT
C   K   P   S   G   F   N   I   K   D   Y   Y   M   H   W   V   R   Q   A   P
                                     CDR1

          210                                     240
GGA CAG GGC CTC GAG TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT AAT ACT CTA TAT GAC
G   Q   G   L   E   W   I   G   W   I   D   P   E   N   G   N   T   L   Y   D
                                     CDR2

          270                                     300
CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACT GCA GAC ACA TCC ACC AGC ACA GCC TAC ATG
P   K   F   Q   G   K   A   T   I   T   A   D   T   S   T   S   T   A   Y   M

          330                                     360
GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCT AGA GAG GGG CTT
E   L   S   S   L   R   S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   G   L
                                     CDR3

          390
TTT TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACT GTC TCT TCA
F   F   A   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S

```

Figure 7A

【図7B】

ヒト化1F1軽鎖可変領域配列

```

          30                                     60
ATG GAT TTT CAT GTG CAG ATT TTC AGC TTC ATG CTA ATC AGT GTC ACA GTC ATA TTG TCC
M   D   F   H   V   Q   I   F   S   F   M   L   I   S   V   T   V   I   L   S

          90                                     120
AGT GGA GAT ATT CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCA TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGG GAT AGG
S   G   D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R

          150                                     180
GTC ACC ATC ACC TGC AGT GTC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AGC AAC TTG CAC TGG TAC CAG
V   T   I   T   C   S   V   S   S   S   I   S   S   S   N   L   H   W   Y   Q
                                     CDR1

          210                                     240
CAG AAG CCA GGC AAG GCC CCC AAA CCC TTG ATT TAT GGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA
Q   K   P   G   K   A   P   K   P   L   I   Y   G   T   S   N   L   A   S   G
                                     CDR2

          270                                     300
GTC CCT AGT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC GAT TAT ACT CTC ACA ATC AGC AGC
V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   Y   T   L   T   I   S   S

          330                                     360
TTG CAG CCT GAA GAT GTT GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT TAC CCA CTC ACG
L   Q   P   E   D   V   A   T   Y   Y   C   Q   Q   W   S   S   Y   P   L   T
                                     CDR3

          390
TTC GGT CAA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K

```

Figure 7B

【図8】

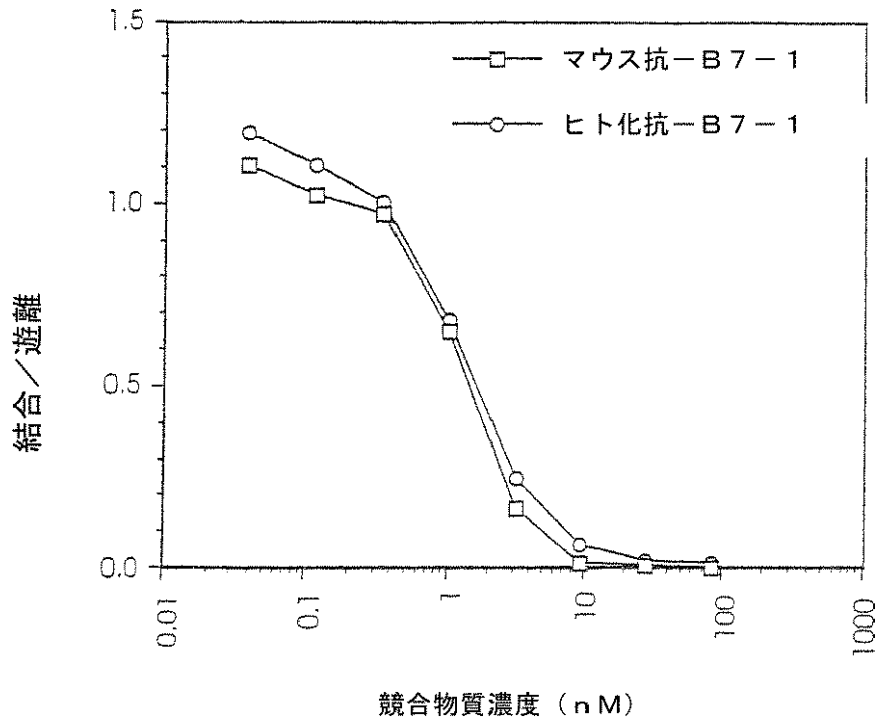


Figure 8

【図9A】

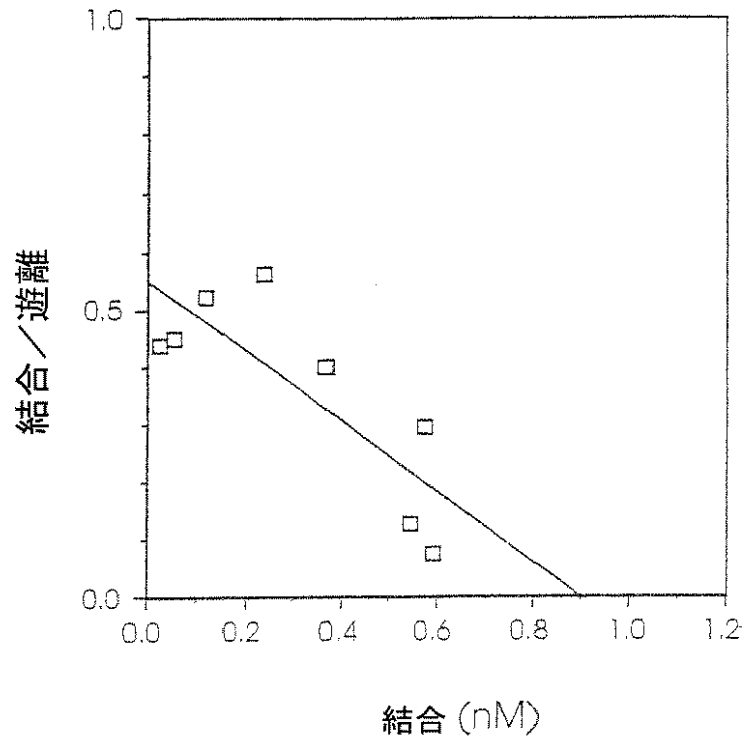


Figure 9 A

【図9B】

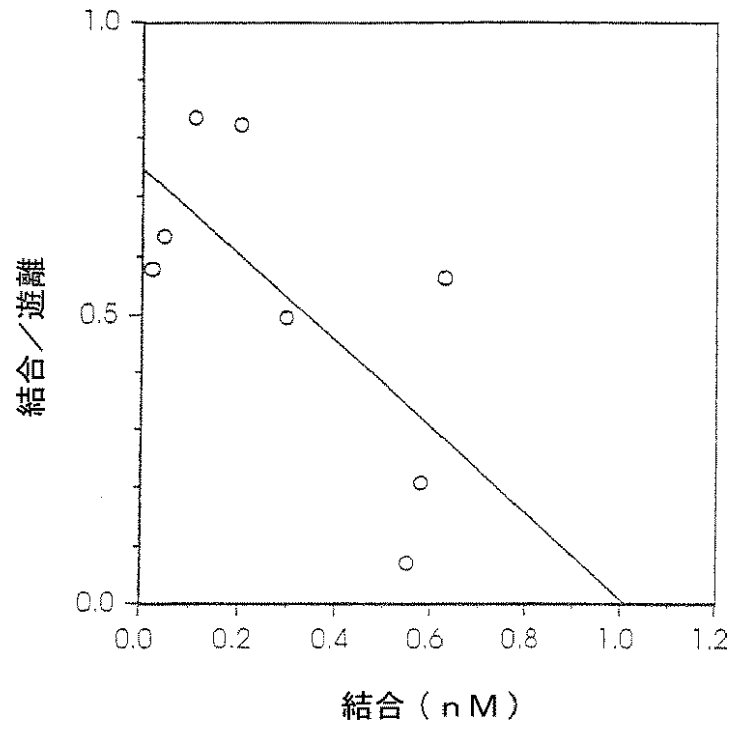
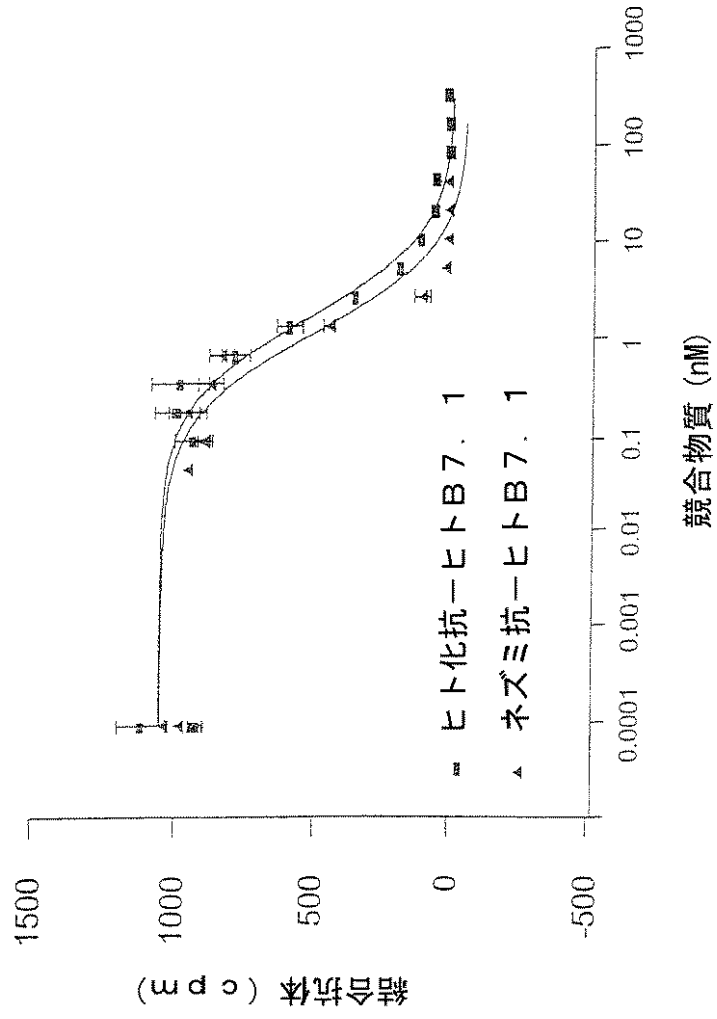


Figure 9B

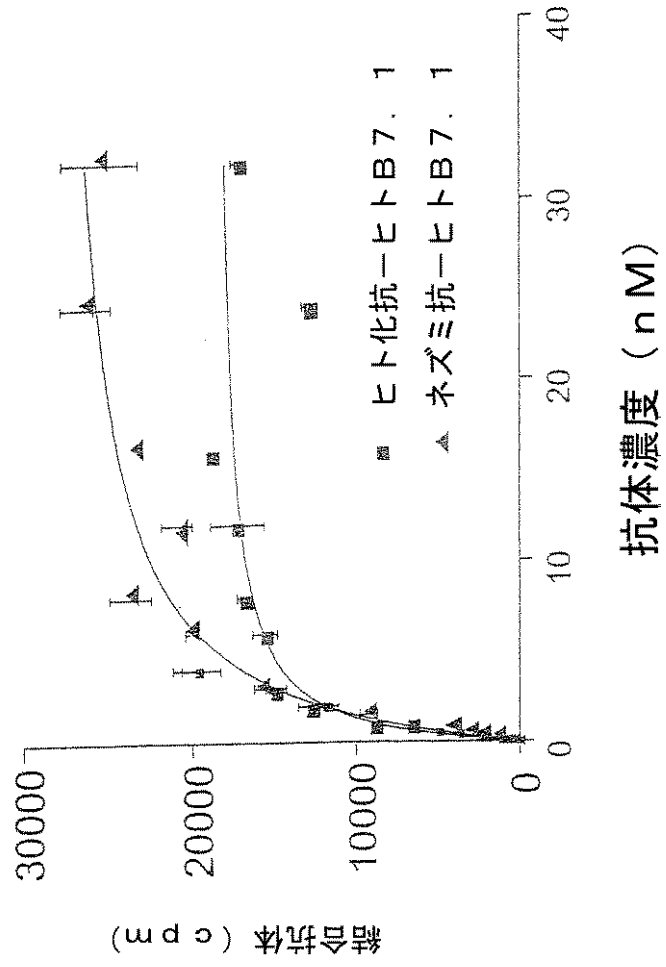
【図10】

Figure 10



【図11】

Figure 11



【図12】

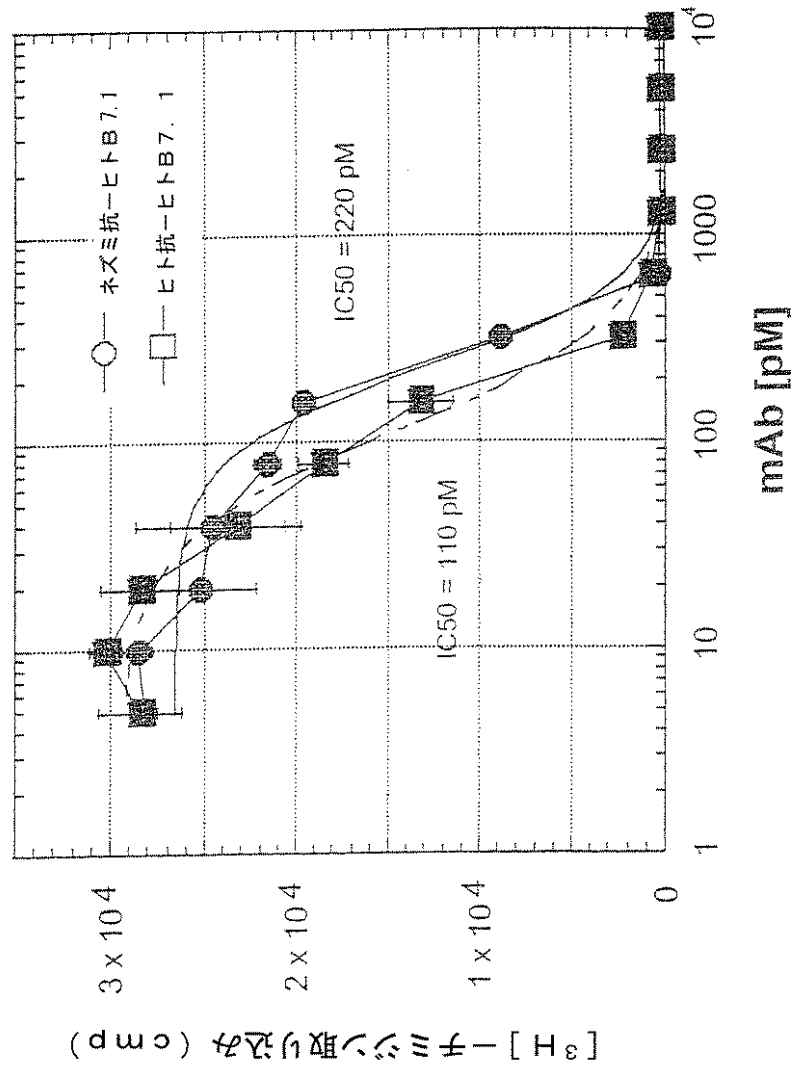


Figure 12

【図13】

抗-B7抗体およびCTLA4Igによる 混合リンパ球反応の阻害

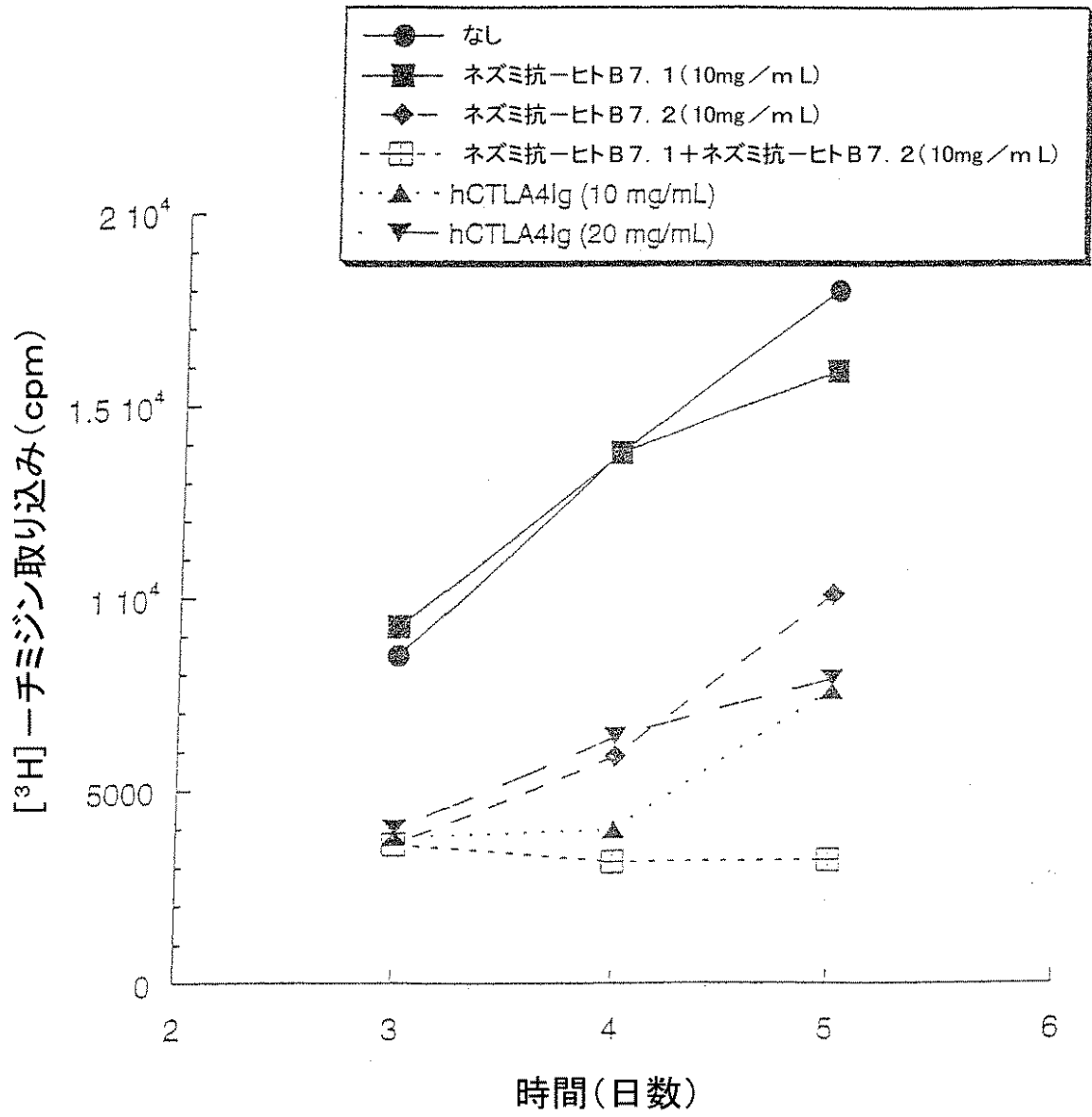


Figure 13

【図14】

二次 MLR
ネズミ抗一ヒト B7.1 で処理された一次 MLR

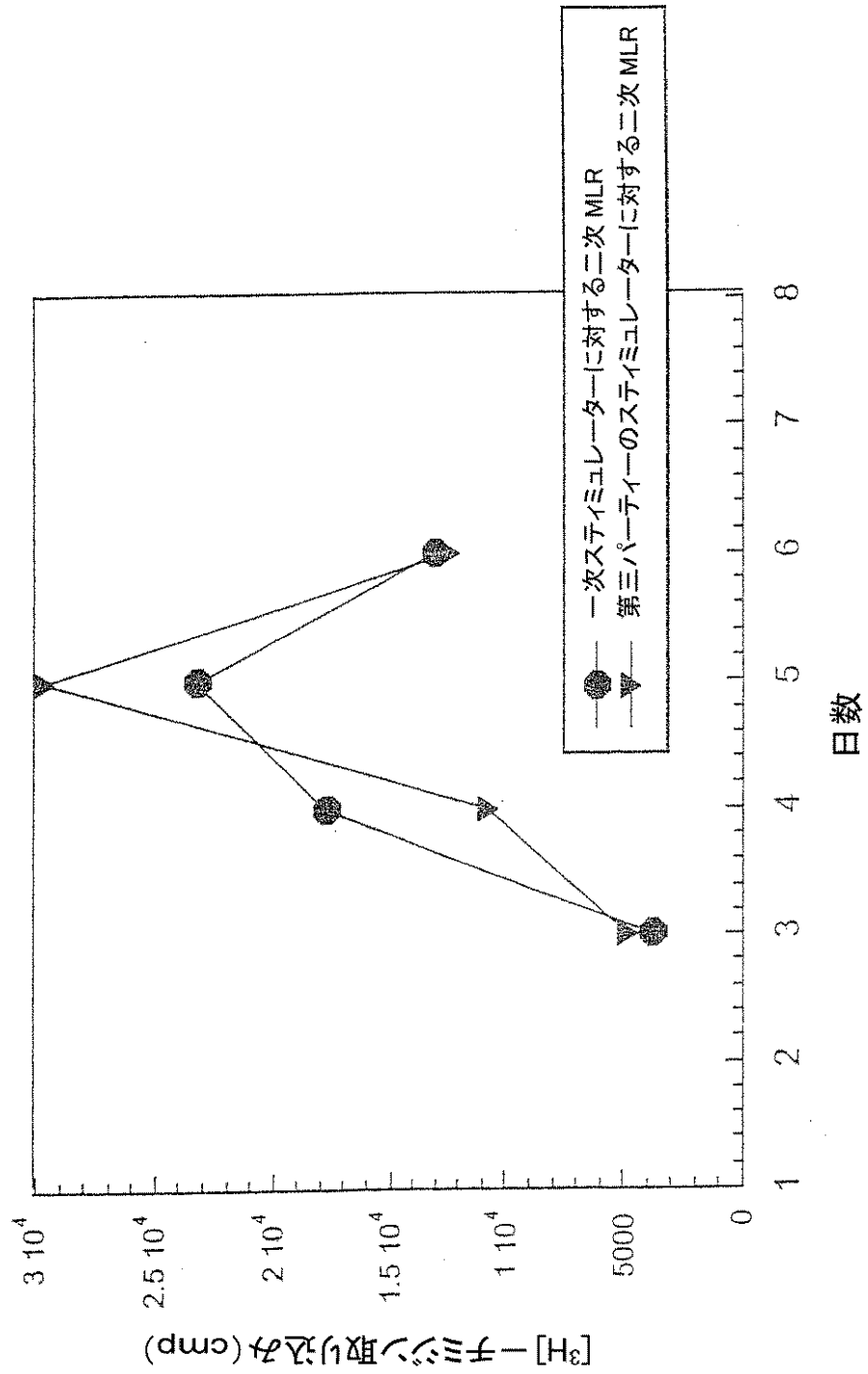


Figure 14

【図15】

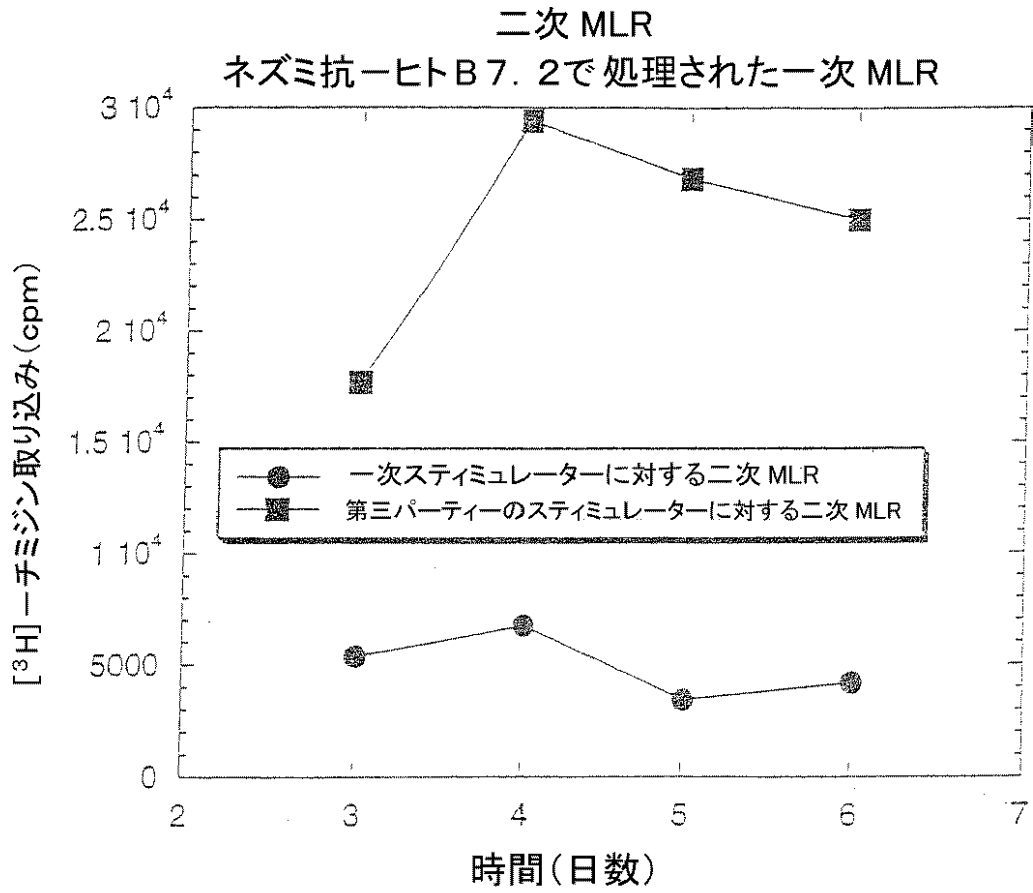


Figure 15

【図16】

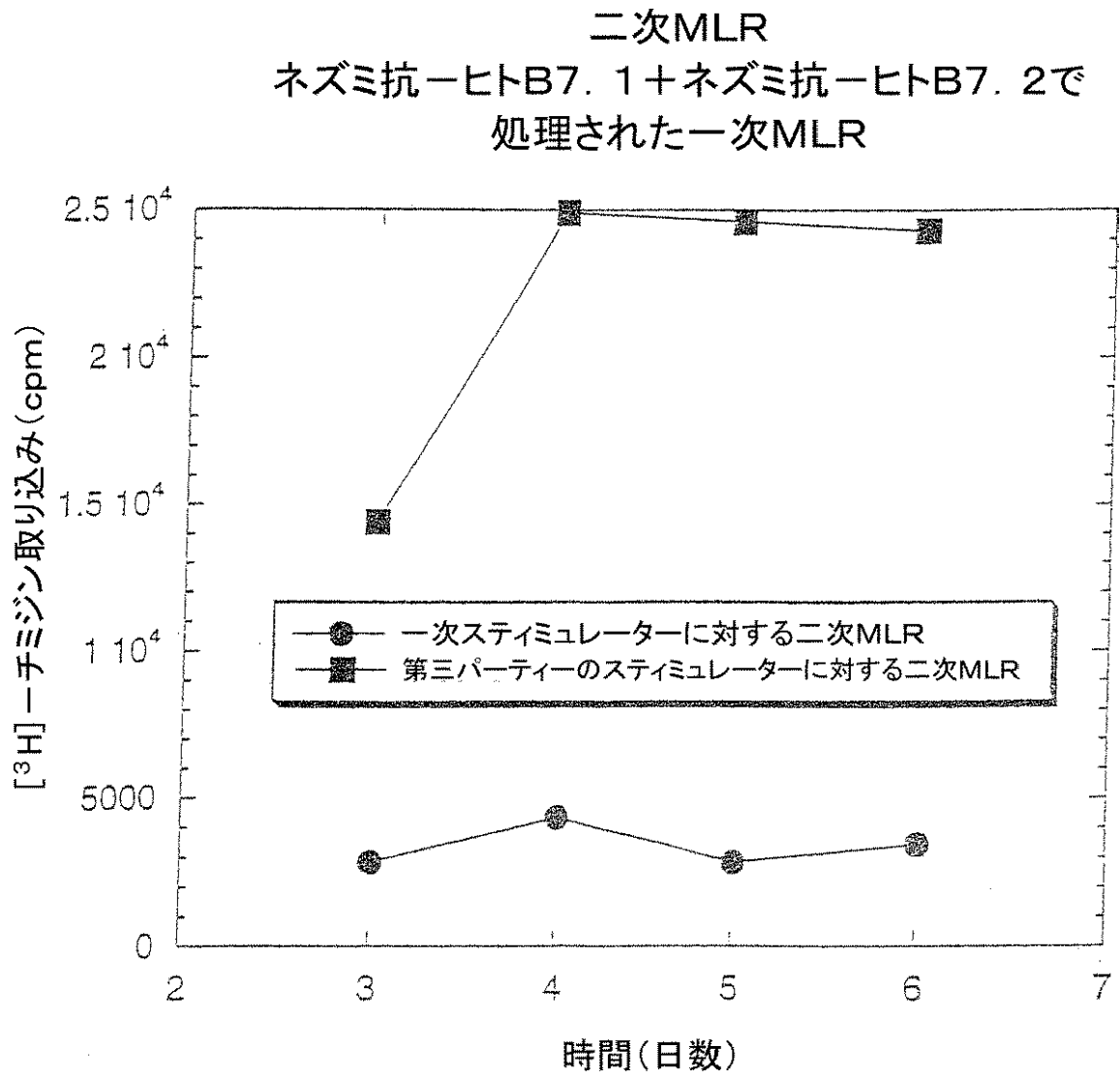
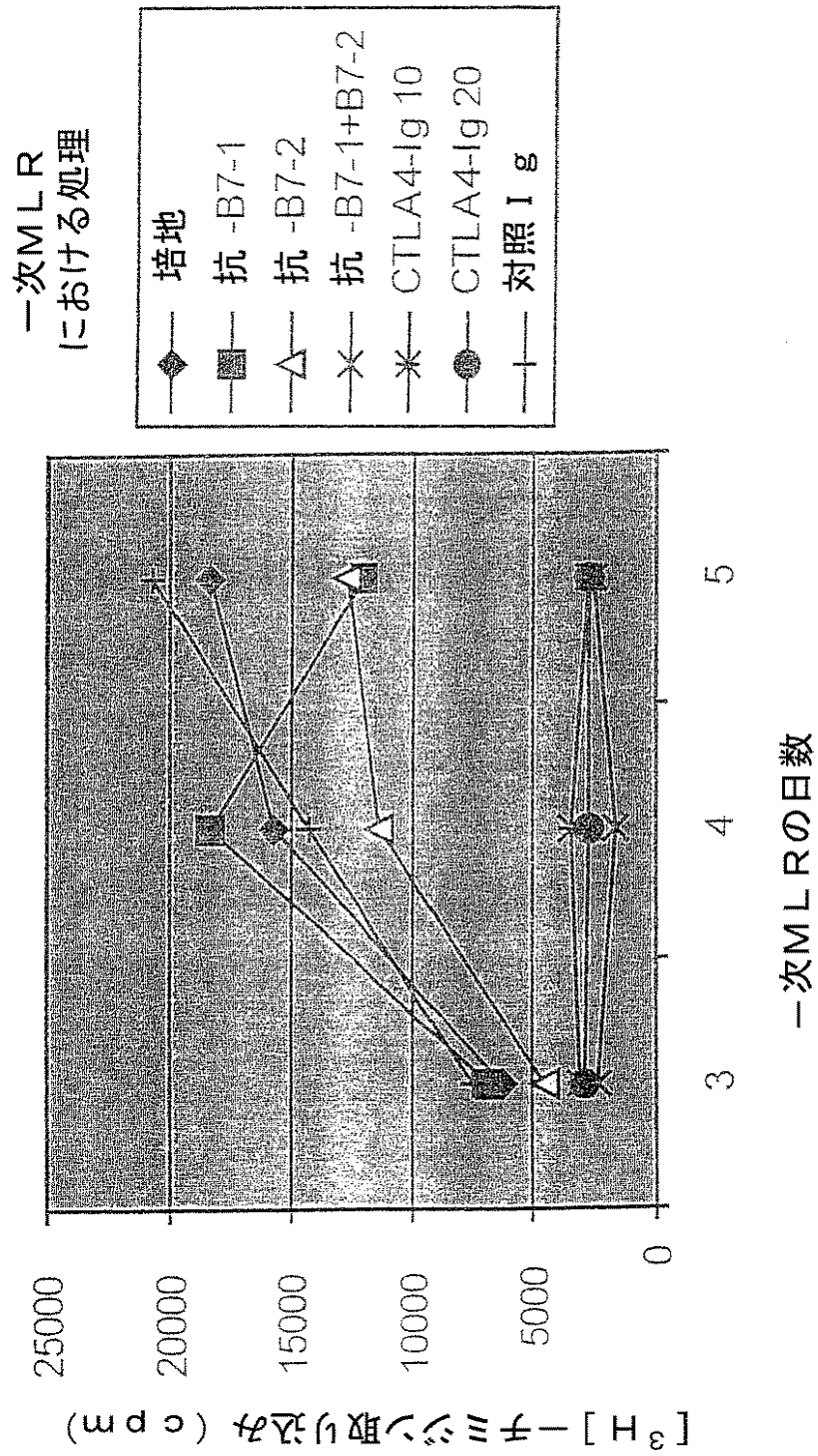


Figure 16

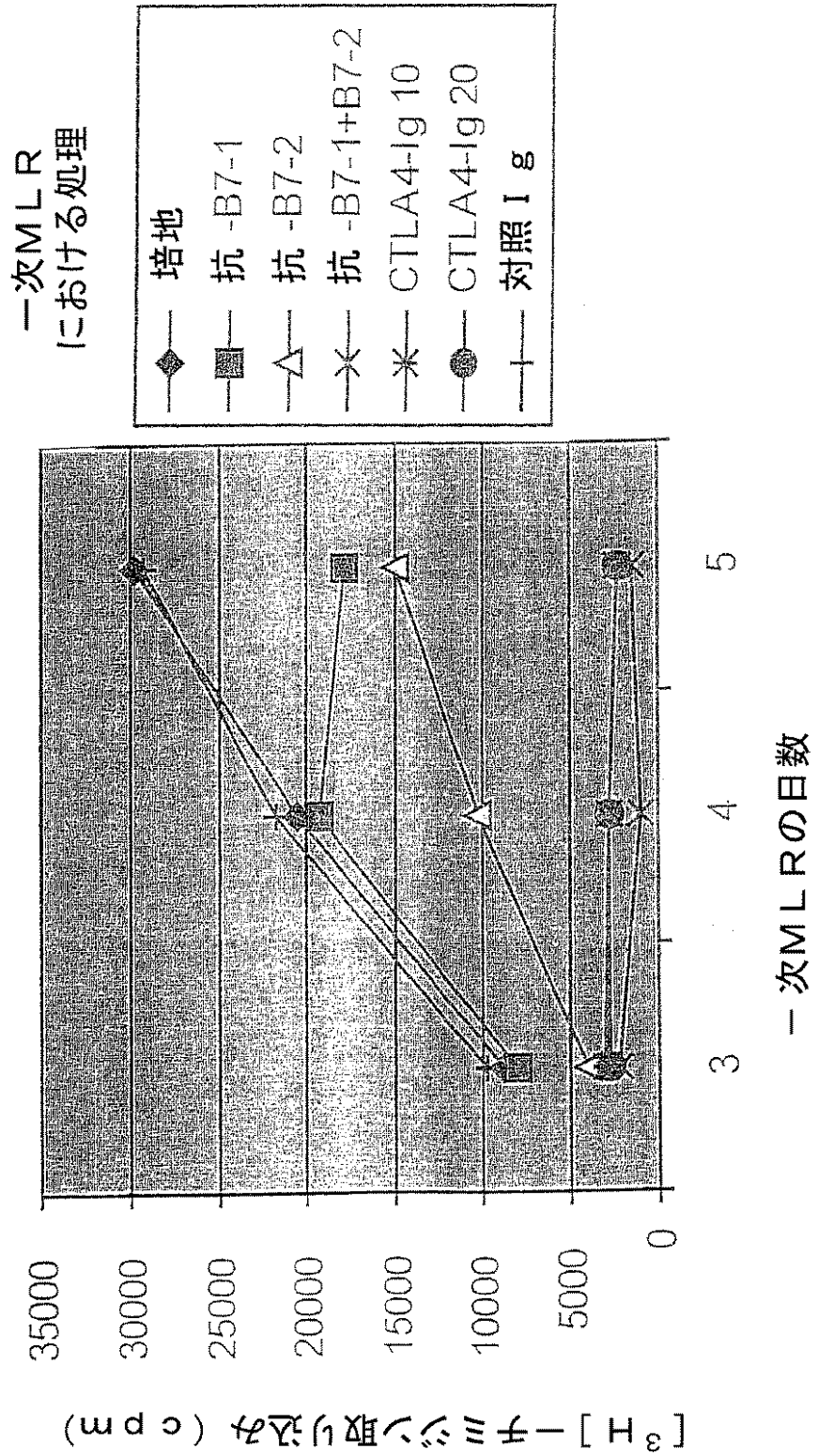
【図17】

Figure 17: 一次MLRレスポンス対「B」ステイミュレーター



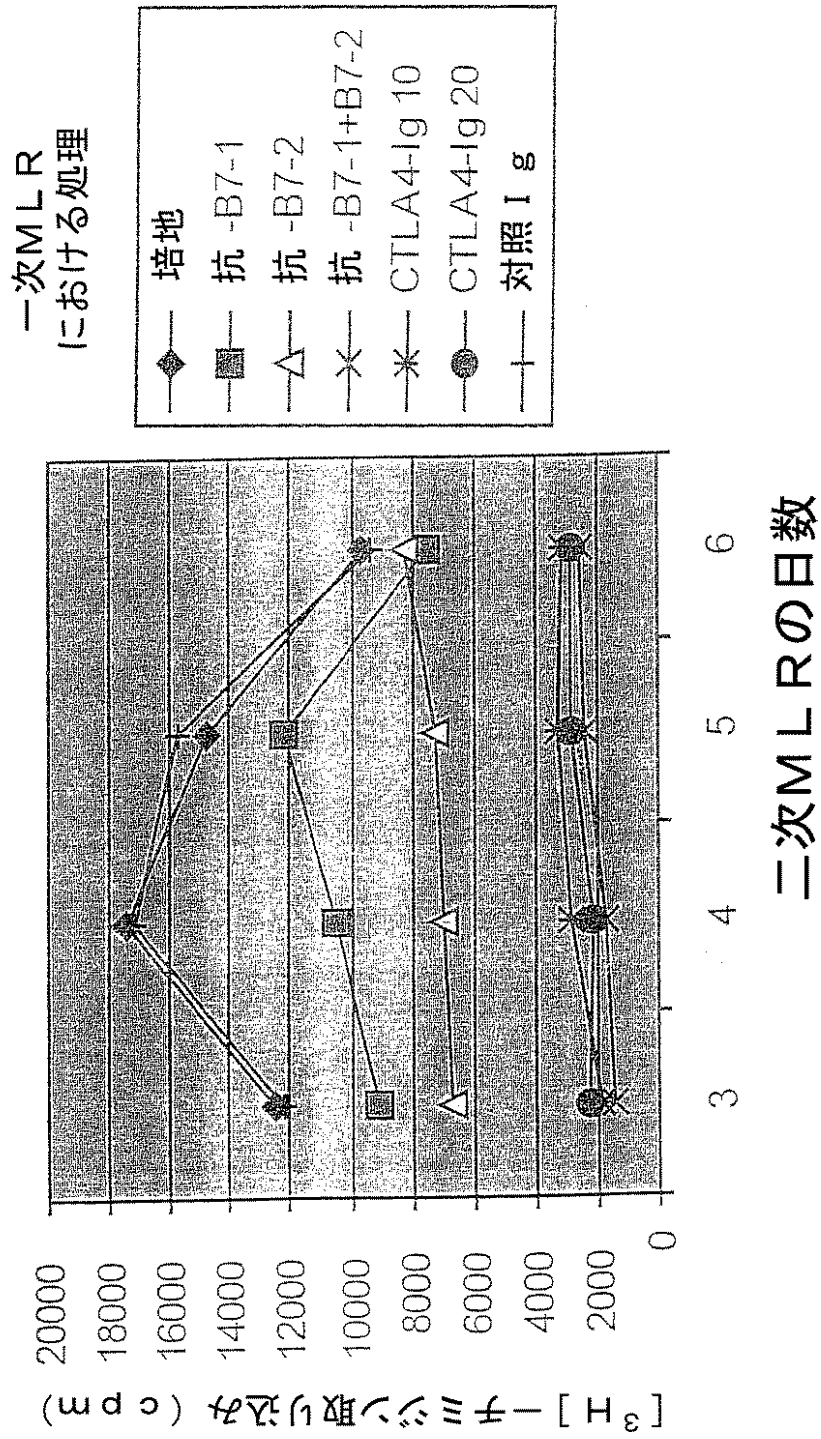
【図18】

Figure 18: 一次MLR-レスポンダー対「C」
ステイミュレーター



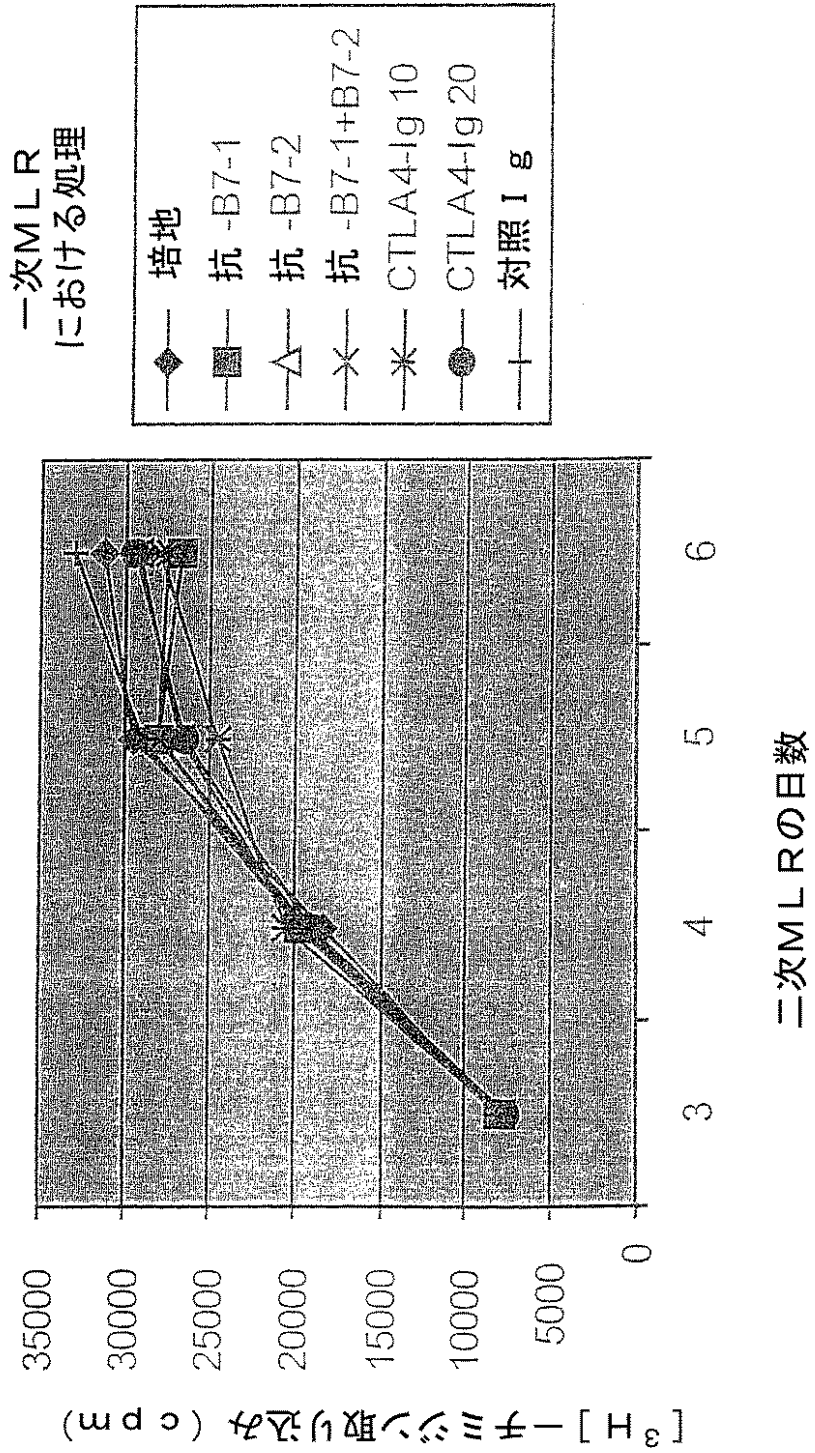
【図19】

Figure 19 : 「B」一次MLR対「B」ステイミュレーターからの二次MLR-レスポンス



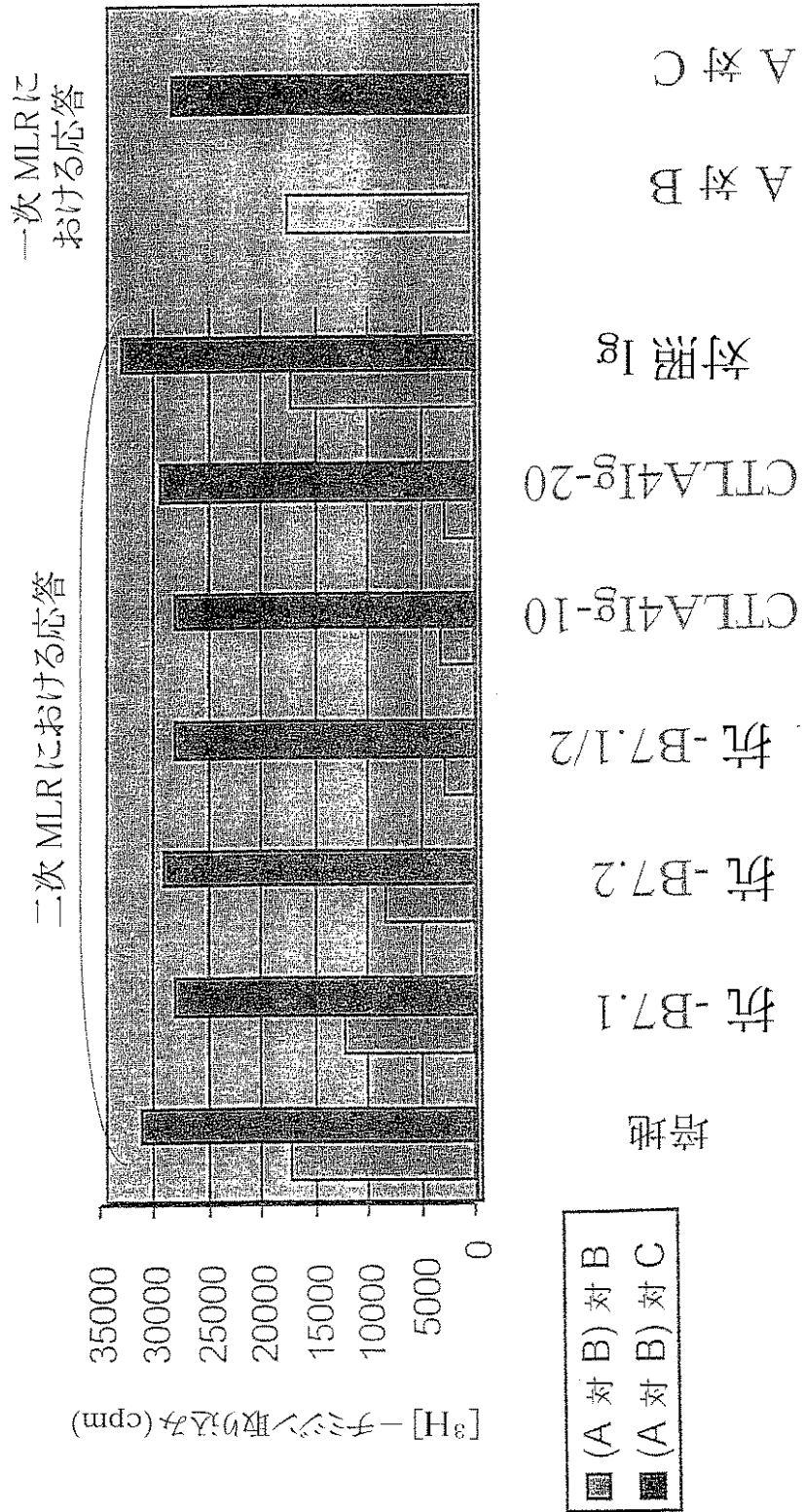
【図20】

Figure 20 : 「B」一次MLR対「C」ステイミュレーターからの二次MLRレスポンス



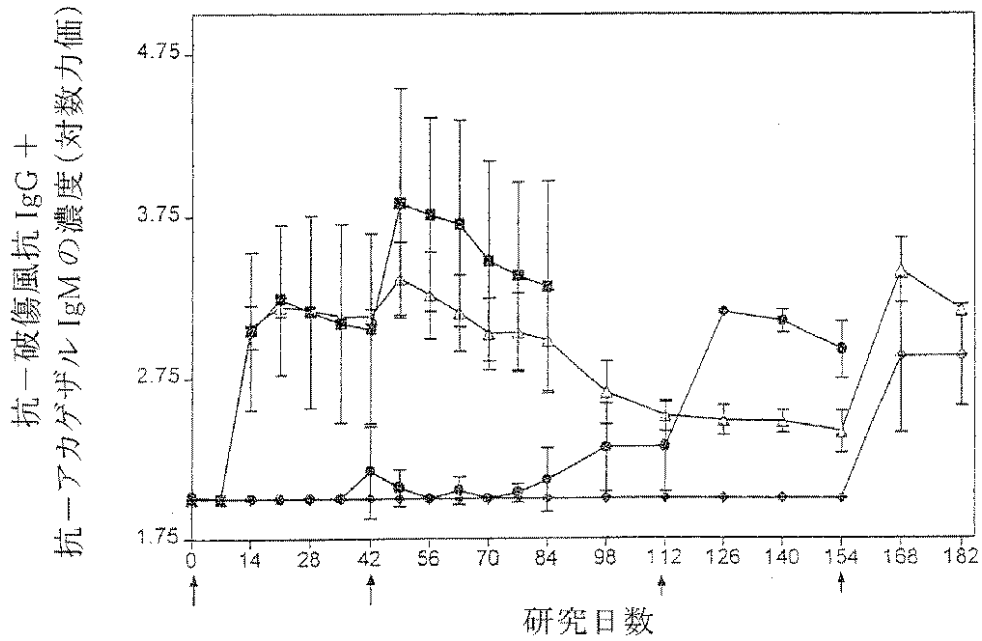
【図21】

Figure 21: 「B」一次 MLR 対 「B」および 「C」ステイミュレーターからの二次 MLR-レスポンス



【図22】

Figure 22 破傷風トキソイドでの攻撃後の抗-B7.1およびB7.2での処理の間のカナクイザルにおける抗-破傷風トキソイドの濃度



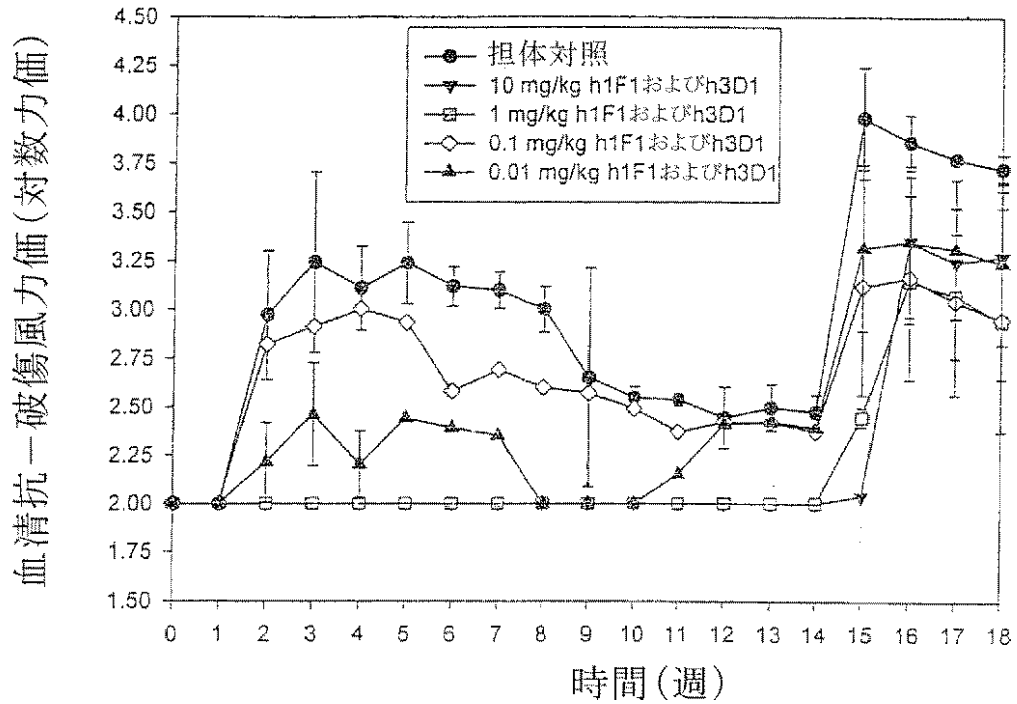
- 群 A (セイライン 対照)
- 群 B (10mg/kg α B7 コンボ 0日目)
- ▲ 群 C (10mg/kg α B7 コンボ 42日目)
- ◆ 群 D (10mg/kg α B7 コンボ 0日目および42日目)

0および42日目にすべての群に10 LFU IM および1 LFU ID の破傷風トキソイドを与えた。
最後のB7注射から112日後に群B、CおよびDに10LFU IM の破傷風トキソイドを与えた。

84日目にすべての群に1 LFU ID の破傷風トキソイドを与えて破傷風特異的 DTH 反応を調べた。

【図23】
Figure 23

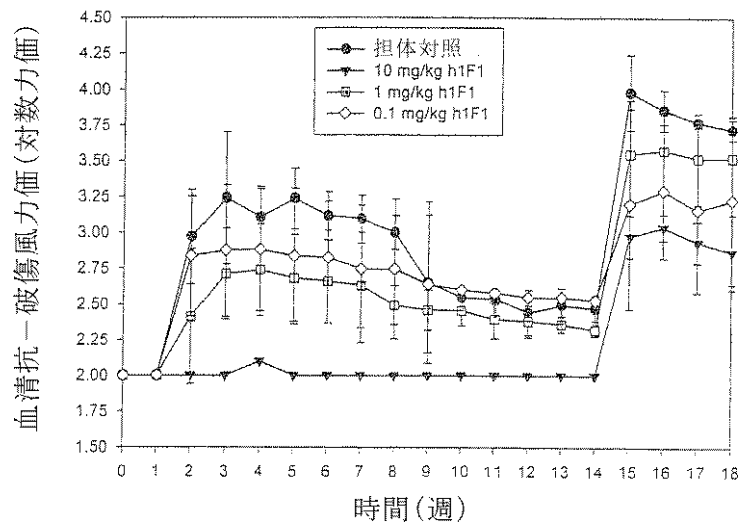
破傷風トキソイドでの一次および二次免疫
ならびにh1F1およびh3D1を組み合わせ
て一回IV投与治療した後のカニクイザルに
おける血清抗-破傷風抗体力価



【図24】

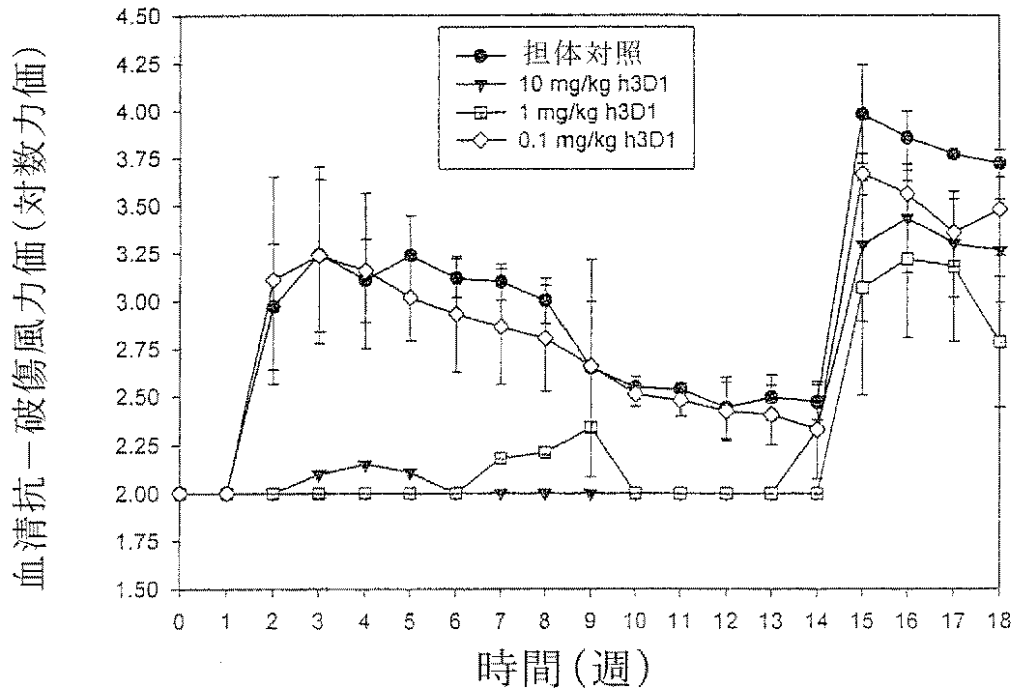
Figure 24

破傷風トキソイドでの一次および二次
免疫ならびにh3D1のみを1回IV投与治療した後の
カニクイザルにおける血清抗-破傷風抗体力価



【図25】

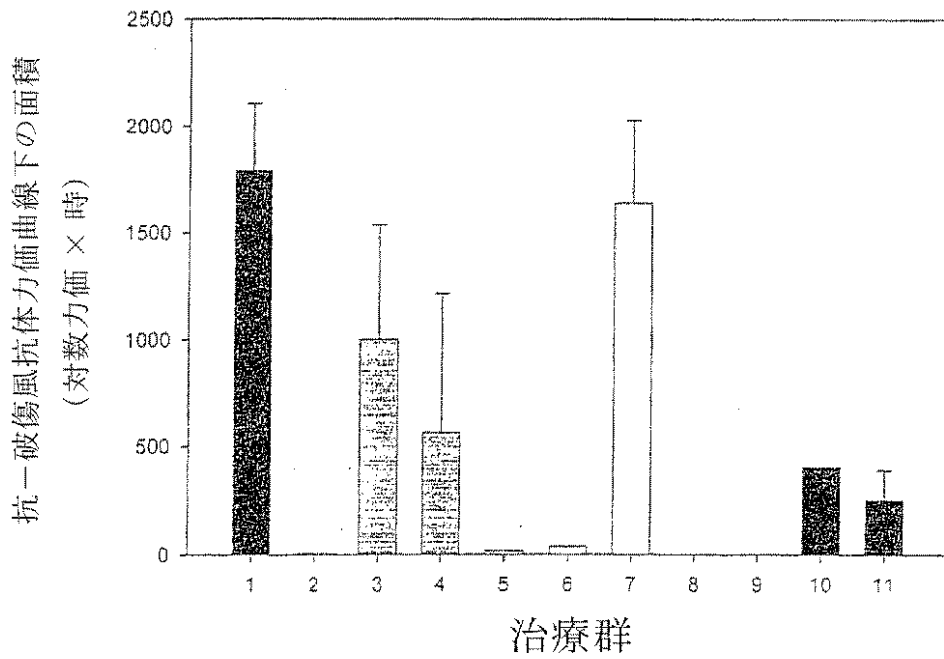
Figure 25 破傷風トキソイドでの一次および二次免疫ならびにh3D1のみを1回IV投与治療した後のカニクイザルにおける血清抗-破傷風抗体力価



【図26】

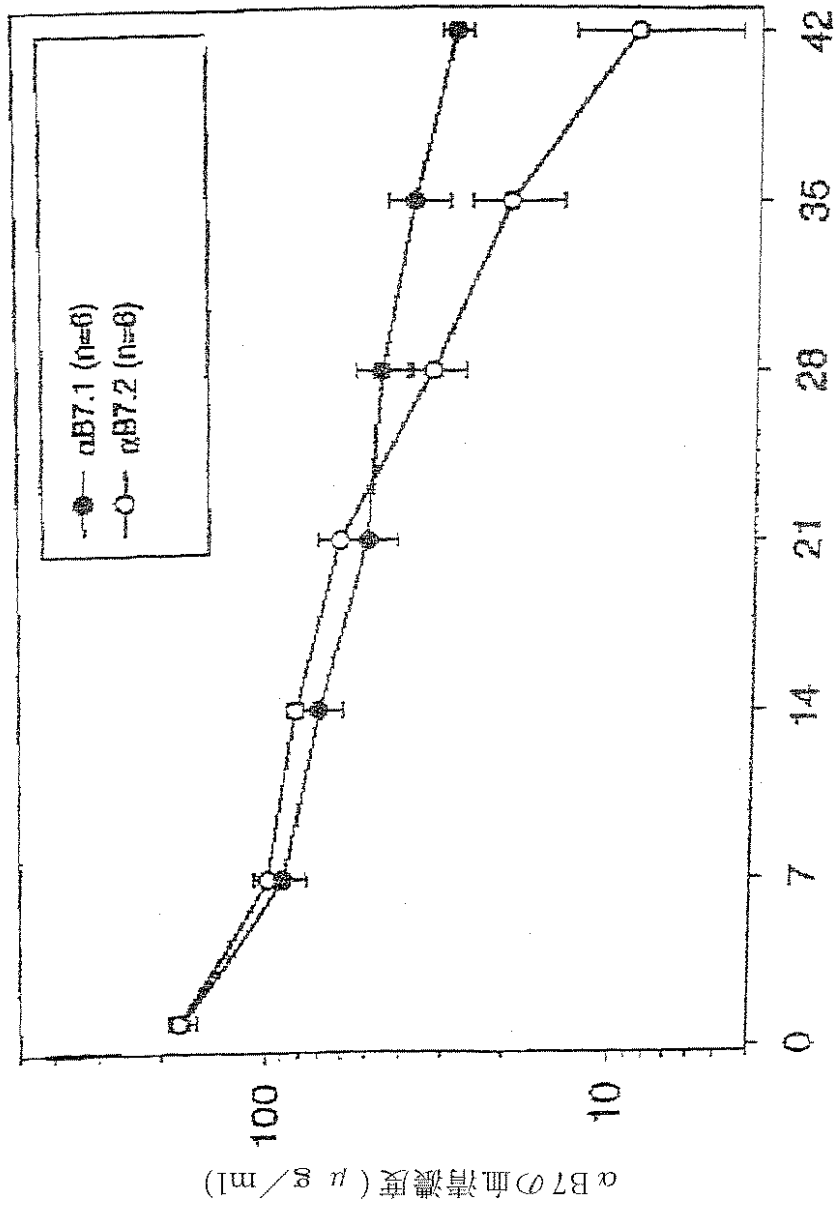
Figure 26

破傷風トキソイドでの一次免疫ならびにh1F1およびh3D1での治療後のカニクイザルにおける破傷風力価曲線下の面積



【図27】

一次破傷風免疫カニクザルモデルにおける
10 mg/kg 1回 IV 投与後の α B7.1 および α B7.2 の血清濃度

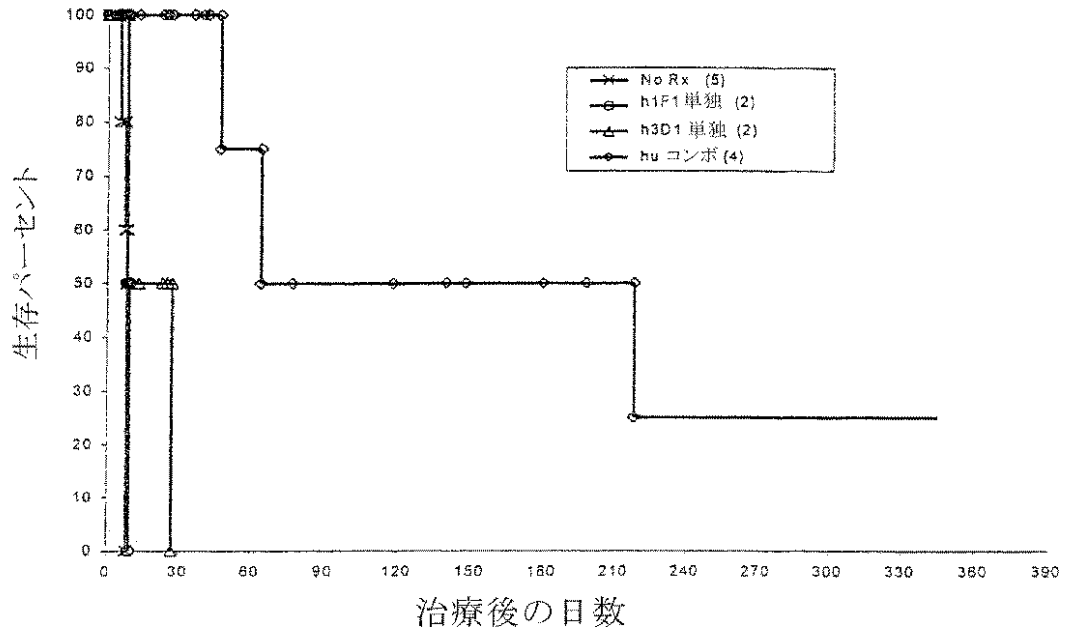


時間(日)
Figure 27

【図28】

Figure 28 平均アカゲザル生存曲線

ヒト化抗-B7抗体を用いた腎臓異種移植片生存



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

						International Application No PCT/US 00/03303
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C07K16/28	C12N5/10	C12N15/62	C12N15/13	G01N33/68	
	G01N33/577	A61K39/395	A61K35/12	A61P35/00	A61P7/06	
	A61P3/00	A61P37/00	A61P25/00	A61P1/18	A61P19/02	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
B. FIELDS SEARCHED						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)						
IPC 7 C07K A61K						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	WO 96 14865 A (REPLIGEN CORP ; DANA FARBER CANCER INST INC (US)) 23 May 1996 (1996-05-23)					1-7, 11, 12, 21, 23-26, 28-30, 34, 35, 44, 46-49, 51-55, 59-63, 66-71, 73, 74, 78, 79
Y	abstract					8-10, 13-20, 22, 31-33, 36-43, 45, 50, 56-58,
-/--						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.			
^a Special categories of cited documents:						
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention			
"E" earlier document but published on or after the international filing date			"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone			
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)			"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.			
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"B" document member of the same patent family			
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
18 August 2000				09.05.00		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040; Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer Montrone, M		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/03303
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61P1/00 A61P17/00 A61K35/14 //A61K39/505,A61K38/13, A61K31/445,A61K31/56,(A61K39/395,38:13),(A61K39/395,31:56), (A61K39/395,31:445),(A61K39/395,39:00) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>page 2, line 23 - line 37 page 3, line 1 - line 10 page 9, line 26 -page 10, line 11 page 14, line 7 - line 10 page 16, line 12 -page 17, line 30 examples 2-4</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	64, 65, 75-77, 80
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
^a Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 August 2000		Date of mailing of the international search report 05.09.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 MY Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montrone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/03303

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 5 747 034 A (DE BOER MARK ET AL) 5 May 1998 (1998-05-05)</p> <p>abstract column 4, line 29 - line 32 column 3, line 63 -column 4, line 32 column 7, line 14 - line 35 column 13, line 21 - line 35 column 14, line 58 - line 67 column 15, line 1 -column 16, line 65</p>	<p>1-7,11, 12,21, 23-27, 72-74, 78,79</p>
X	<p>WETTENDORFF M ET AL: "Generation of humanized Fab fragments of B7-24 mAb, an antibody with potential use in the prevention of graft rejection and development of graft-versus-host disease." MEDEDELINGEN FACULTEIT LANDBOUWKUNDIGE EN TOEGEPASTE BIOLOGISCHE, vol. 60, no. 4A-B, 1995, pages 2057-2063, XP000917692 Ninth Forum for Applied Biotechnology;Gent, Belgium; September 27-29, 1995, 1995</p>	<p>1-7,11, 12,21, 24-26, 78,79</p>
Y	<p>page 2057, paragraph 4 -page 2058, paragraph 1 page 2059, line 1 -page 2060, paragraph 1 page 2062, paragraph 3 - paragraph 4 figure 8</p>	<p>50,64, 65,77</p>
Y	<p>ALEGRE MARIA-LUISA ET AL: "Immunomodulation of Transplant Rejection Using Monoclonal Antibodies and Soluble Receptors." DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, vol. 40, no. 1, 1995, pages 58-64, XP002912150 ISSN: 0163-2116 abstract page 60, column 2, paragraph 2 - paragraph 3</p>	<p>8-10, 31-33</p>
Y	<p>LENSCHOW DEBORAH J ET AL: "Differential Effects of Anti-B7-1 and Anti-B7-2 Monoclonal Antibody Treatment on the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 181, no. 3, 1995, pages 1145-1155, XP000917646 ISSN: 0022-1007 abstract</p>	<p>56-58</p>
	---	-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.

PCT/US 00/03303

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LENSCHOW DEBORAH J ET AL: "Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies." TRANSPLANTATION (BALTIMORE), vol. 60, no. 10, 1995, pages 1171-1178, XP000917644 ISSN: 0041-1337 abstract page 1171, column 2, paragraph 2 -page 1172, column 1, paragraph 4	13-20, 22, 36-43,45
Y	HATHCOCK KAREN S ET AL: "Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses." ADVANCES IN IMMUNOLOGY, vol. 62, 1996, pages 131-166, XP000916009 1996 Academic Press, Inc.;Academic Press Ltd. 1250 Sixth Ave., San Diego, California 92101, USA; 14 Belgrave Square, 24-28 Oval Road, London NW1 7OX, England, UK ISBN: 0-12-022462-3 page 132, paragraph 2 page 141, paragraph 2 -page 142, paragraph 1 page 143, paragraph 3 -page 144, paragraph 1 page 150, paragraph 3 -page 152, paragraph 2	75,76,80
P,X	BREE A G ET AL: "Humanized anti-B7.1 and anti-B7.2 antibodies prevent antigen specific induction of immunity in nonhuman primates immunized with tetanus toxoid and mumps virus vaccine." BLOOD, vol. 94, no. 10 SUPPL. 1 PART 1, 15 November 1999 (1999-11-15), page 439a XP000917661 Forty-first Annual Meeting of the American Society of Hematology;New Orleans, Louisiana, USA; December 3-7, 1999 ISSN: 0006-4971 abstract	1-22,26, 28-45,49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/03303**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 23, 46 (partially) and claims 24, 25, 47, 48 and 51 to 77 (completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/03303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9614865 A	23-05-1996	AU 4158396 A	06-06-1996
US 5747034 A	05-05-1998	US 5869050 A	09-02-1999
		US 5397703 A	14-03-1995
		AU 694760 B	30-07-1998
		AU 1687795 A	04-09-1995
		CA 2183680 A	24-08-1995
		EP 0745136 A	04-12-1996
		JP 9510607 T	28-10-1997
		WO 9522619 A	24-08-1995
		EP 0651797 A	10-05-1995
		EP 0945465 A	29-09-1999
		CA 2125472 A	20-01-1994
		JP 7509359 T	19-10-1995
		US 5677165 A	14-10-1997
		WO 9401547 A	20-01-1994
		US 6056959 A	02-05-2000
		US 6004552 A	21-12-1999
		US 5874082 A	23-02-1999

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 マキシミアノ・バスケス
アメリカ合衆国94303カリフォルニア州パ
ロ・アルト、ルイス・ロード3813番
- (72)発明者 ベアトリス・カレノ
アメリカ合衆国01720マサチューセッツ州
アクトン、ナッシュ・ロード37番
- (72)発明者 アビー・シェリル・セルナイカー
アメリカ合衆国02468マサチューセッツ州
ニュートン、チェスナット・ストリート
560番
- (72)発明者 メアリー・コリンズ
アメリカ合衆国01760マサチューセッツ州
ナティック、ラスバン・ロード54番
- (72)発明者 サミュエル・ゴールドマン
アメリカ合衆国01720マサチューセッツ州
アクトン、モホーク・ドライブ9番
- (72)発明者 ゲイリー・エス・グレイ
アメリカ合衆国02445マサチューセッツ州
ブルックライン、ミルトン・ロード32番
- (72)発明者 アンドレア・ナイト
アメリカ合衆国03842ニューハンプシャー
州ハンプトン、ハンプトン・タウン・エス
テイツ35番
- (72)発明者 デニス・オハラ
アメリカ合衆国01867マサチューセッツ州
リーディング、ジア・ロード8番
- (72)発明者 ボニータ・ラップ
アメリカ合衆国01867マサチューセッツ州
リーディング、ワシントン・ストリート
234番
- (72)発明者 ヘールトライダ・エム・フェルトマン
アメリカ合衆国01776マサチューセッツ州
サドベリー、ウッドミア・ドライブ60番

(72)発明者 ガービン・ワーナー
アメリカ合衆国03087ニューハンプシャー
州ウィンダム、ロング・メドー・ロード15
番

(72)発明者 スチュアート・フリードリック
アメリカ合衆国02176マサチューセッツ州
メルローズ、アルピオン・ストリート20番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 HA15
4B065 AA91Y AA93Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA17 DA11 MA02 ZB08
4C085 AA14 BA01 BB31 EE01 EE03
4C086 AA01 CB09 CB22 DA10 MA02
MA04 NA05 ZB07
4C087 BB34 BB37 BB44 NA06 ZA51
ZA55 ZB07
4H045 AA11 BA41 CA40 DA75 EA22
EA28 EA50

专利名称(译)	人源化免疫球蛋白与B7分子反应和使用它的治疗方法		
公开(公告)号	JP2002540764A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000598540	申请日	2000-02-09
申请(专利权)人(译)	遗传学研究所有限公司		
[标]发明人	マンスンコ マキシミアノバスケス ペアトリスカレノ アビーシェリルセルナイカー メアリーコリンズ サミュエルゴールドマン ゲイリーエスグレイ アンドレアナイト デニスオハラ ボニータラップ ヘールトライダエムフェルトマン ガービンワーナー スチュアートフリードリック		
发明人	マン・スン・コ マキシミアノ・バスケス ペアトリス・カレノ アビー・シェリル・セルナイカー メアリー・コリンズ サミュエル・ゴールドマン ゲイリー・エス・グレイ アンドレア・ナイト デニス・オハラ ボニータ・ラップ ヘールトライダ・エム・フェルトマン ガービン・ワーナー スチュアート・フリードリック		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/436 A61K31/519 A61K31/573 A61K35/14 A61K35/28 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37 /02 A61P37/06 C07K16/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 G01N33 /533 G01N33/534 G01N33/535		
CPC分类号	A61K39/395 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19 /02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/2827 C07K2317/24 C07K2317 /52 C07K2319/00 C07K2319/30 A61K2300/00		
FI分类号	A61K31/436 A61K31/519 A61K31/573 A61K35/14.Z A61K35/28 A61K39/00.H A61K39/395.A A61K39 /395.H A61K39/395.U A61K39/395.Y A61K45/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35 /02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/HA15 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/DA11 4C084/MA02 4C084/ZB08 4C085/AA14 4C085/BA01 4C085/BB31 4C085/EE01 4C085 /EE03 4C086/AA01 4C086/CB09 4C086/CB22 4C086/DA10 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05		

