

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-545958
(P2008-545958A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 B	2 G O 4 5
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28 Z N A J	2 G O 5 2
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 C O 8 5
CO 7 K 16/28 (2006.01)	CO 7 K 16/28	4 H O 4 5
CO 7 K 1/22 (2006.01)	CO 7 K 1/22	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-512557 (P2008-512557)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月19日 (2006. 5. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年1月21日 (2008. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/019576
 (87) 国際公開番号 W02006/127517
 (87) 国際公開日 平成18年11月30日 (2006. 11. 30)
 (31) 優先権主張番号 60/682, 990
 (32) 優先日 平成17年5月20日 (2005. 5. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

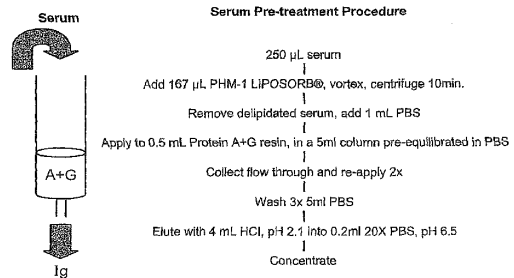
(71) 出願人 507202770
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, ディー
 エヌエー ウェイ 1, エムエス 49
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 マカッチオン, クリスタ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 10, バーリングゲーム, キャロル ア
 ヴェニュー 1512

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫性疾患の被検体の生体試料の前処理

(57) 【要約】

本発明は、干渉を回避するために自己免疫性疾患被検体の生体試料を前処理する方法であって、特に該試料が中和抗体アッセイなどの細胞ベースの生物活性アッセイに供されるものである方法を記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己免疫性疾患被検体の生体試料の処理方法であって、

- (a) 試料を脱脂する；
- (b) 試料中の免疫グロブリンを親和性精製する；
- (c) 精製された免疫グロブリンを濃縮する；そして、
- (d) 濃縮された免疫グロブリンを細胞ベースの生物活性アッセイに供する、
ことを含んでなる方法。

【請求項 2】

前記の(d)のアッセイが中和抗体アッセイである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記の(a)の試料が血清試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記被検体が関節リウマチを有する、請求項 1 ないし 3 の何れかーに記載の方法。

【請求項 5】

前記被検体が全身性エリテマトーデス(SLE)を有する、請求項 1 ないし 3 の何れかー
に記載の方法。

【請求項 6】

工程(b)が基本的にすべての免疫グロブリンアイソタイプを精製することを含んでなる
、請求項 1 ないし 5 の何れかーに記載の方法。

20

【請求項 7】

工程(b)がプロテイン A + G 親和性精製を含んでなる、請求項 1 ないし 6 の何れかーに
記載の方法。

【請求項 8】

前記プロテイン A + G 親和性精製が 2 回以上繰り返される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記プロテイン A + G 親和性精製が 3 回繰り返される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程(a)の試料が干渉を含んでなる、請求項 1 ないし 9 の何れかーに記載の方法。

【請求項 11】

前記自己免疫性疾患被検体が治療用抗体又はイムノアドヘシンにて処置されている、請
求項 1 ないし 10 の何れかーに記載の方法。

30

【請求項 12】

前記自己免疫性疾患被検体が治療用抗体にて処置されている、請求項 11 に記載の方法
。

【請求項 13】

前記治療用抗体が CD 20 抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記治療用抗体がリツキシマブ又はヒト化 2 H 7 である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記治療用抗体が、リツキシマブ、ヒト化 2 H 7、2 F 2 (HuMax-CD 20) ヒト
CD 20 抗体、ヒト化 A 20 抗体ないしは IMM U - 1 0 6、TR U 0 1 5、腫瘍壊死因
子(TNF)- 抗体、インフリキシマブ、CD P 5 7 1、MA K - 1 9 5、アダリムマブ、
ペグ化された TNF 抗体断片、CD P - 8 7 0、抗 TNF ポリクローナル抗体、P a
s s TNF、インテグリン抗体、エファリズマブ、ナタリズマブ、B A F F 抗体、B R 3
抗体、B A F F レセプター抗体、B l y s 抗体、ベリムマブ、CD 3 7 抗体、TR U 0 1
6、CD 2 2 抗体、エピラツズマブ、アビオジェン CD 2 2 抗体、C M C 5 4 4、コンボ
トックス、B L 2 2、L I F 2 2 6、V E G F 抗体、V E G F レセプター抗体、ペバシズ
マブ、ラニビズマブ、抗 H E R 抗体、トラスツズマブ、パーツズマブ、セツキシマブ、抗
I g E 抗体、オマリズマブ、I L - 2 1 抗体、イムフェロン抗 B 細胞抗体、1 D 0 9 C 3

40

50

、Lym-1抗体、オンコリン、ISF154、ゴミリキシマ、IL-6レセプター抗体、アトリズム、IL-15抗体、HuMax-IL-15、ケモカインレセプター抗体、CCR2抗体、MLN1202、抗補体抗体、C5抗体、エキュリズム、ヒト免疫グロブリンの経口製剤、IgPO、IL-12抗体、ABT-874、テネリキシマブ、CD40抗体、ヒト化S2C6、TNX100、CD52抗体、カンバス-1H、及びv3抗体からなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

前記治療用抗体がインテグリン抗体である、請求項12に記載の方法。

【請求項17】

前記インテグリン抗体がエファリズムブ又はナタリズムブである、請求項16に記載の方法。 10

【請求項18】

前記自己免疫性疾患被検体がイムノアドヘシンで処置されている、請求項11の方法。

【請求項19】

前記イムノアドヘシンが、BR3-Ig、TNF-イムノアドヘシン、エタネルセプト、抗BAFFペプチボディ、TACI-Ig、BCMA-Ig、CTLA4-Ig、アバタセプト、及びBAFF-R-Igからなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記自己免疫性疾患被検体が腫瘍壊死因子(TNF)-抗体又はTNF-イムノアドヘシンにて処置されている、請求項11に記載の方法。 20

【請求項21】

前記自己免疫性疾患被検体がインフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト、CDP-870又はD2E7で処置されている、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記自己免疫性疾患被検体がペグ化された可溶性TNF-R、ペグスネルセプト、IL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)、アナキラ、DN-BAFF、及びワクチンからなる群から選択される薬剤で処置されている、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

自己免疫性疾患を有する被検体の処置方法であって、

(a) 自己免疫性疾患を治療するために被検体に治療用抗体又はイムノアドヘシンが投与される； 30

(b) 被検体から生体試料を得る；

(c) 生体試料中の免疫グロブリンを親和性精製する；そして、

(d) 精製された免疫グロブリンを中和抗体アッセイに供する、

ことを含む方法。

【請求項24】

前記の工程(b)の試料がヒト血清を含んでなる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記自己免疫性疾患が関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)又はシェーグレン病である、請求項23に記載の方法。 40

【請求項26】

工程(b)の試料が干渉を含んでなる、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

(a) 脱脂試薬；

(b) 免疫グロブリンの親和性精製のためのバッファ；及び、

(c) 請求項1に記載の方法を実施するための診断用キットの使用を使用者に指示する取扱説明書

を具備する診断用キット。

【請求項28】

さらに、薬剤標準物質、陽性のコントロール中和抗体、補体血清、細胞のためのアッセ 50

イ希釈液、及び細胞を標識する試薬の何れか一又は複数を具備する、請求項 27 に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(関連出願)

本出願は、その全体の開示内容が出典明記により本明細書中に援用される 2005 年 5 月 20 日出願の仮出願第 60 / 682990 号に基づく米国特許法 119 条の優先権を主張する非仮出願である。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、干渉を回避するために自己免疫性疾患被検体の生体試料を前処理するための方法であって、特に該試料が細胞ベースの生物活性アッセイ、例えば中和抗体アッセイに供されるものである方法に関する。

【0003】

(発明の背景)

リンパ球は、造血過程の間に骨髄において生産される多種ある白血球のうちの 1 つである。リンパ球の 2 つの主な分類は、B リンパ球 (B 細胞) と T リンパ球 (T 細胞) である。ここで特に対象とするリンパ球は B 細胞である。

B 細胞は骨髄内で成熟して、その細胞表面上に抗原結合抗体を発現する骨髄を放出する。天然の B 細胞がその膜結合性抗体に特異的な抗原と初めて遭遇すると、細胞は速やかに分離し、その子孫はメモリー B 細胞と「プラズマ細胞 (形質細胞、plasma cell)」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。メモリー B 細胞は長い寿命を持ち、本来の親細胞と同じ特異性を有する膜結合性抗体を発現し続ける。プラズマ細胞は、膜結合性抗体を発現する代わりに、分泌型抗体を産生する。分泌された抗体は、体液性免疫の主要なエフェクター分子である。

【0004】

CD20 抗原 (ヒト B リンパ球制限分化抗原、Bp35 と呼ばれる) はプレ B 及び成熟 B リンパ球上に位置するおよそ 35 kD の分子量の疎水性膜貫通型タンパク質である (Valentine 等, J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989); 及び Einfeld 等, EMBO J. 7(3):711-717(1988))。該抗原はまた B 細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) の 90% 以上に発現されるが (Anderson 等, Blood 63(6):1424-1433 (1984))、造血幹細胞、プロ B 細胞、正常なプラズマ細胞又は他の正常な組織上には見出されない (Tedder 等, J. Immunol. 135(2):973-979 (1985))。CD20 は分化及び細胞周期の開始の活性化過程における初期段階を調節し (上掲の Tedder 等)、おそらくはカルシウムイオンチャンネルとして機能する (Tedder 等, J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990))。

【0005】

B 細胞リンパ腫では CD20 が発現されるため、この抗原はこのようなリンパ腫の「標的とする (ターゲティング)」ための候補となりうる。基本的に標的とするとは以下のことを言う: B 細胞の CD20 表面上抗原特異的な抗体を患者に投与する。これらの抗 CD20 抗体は、正常及び悪性の何れの B 細胞 (表面上) の CD20 抗原にも特異的に結合する; CD20 表面上抗原に結合する抗体は、腫瘍性 B 細胞を破壊及び減少に至らしめることができる。さらに、腫瘍を破壊する可能性を有する化学薬品又は放射性標識は抗 CD20 抗体に結合させて、作用剤が腫瘍性 B 細胞特異的に「運ばれる」ようにすることができる。方法にかかわらず、主たる目的は、腫瘍を破壊することである; 特定の方法は、使用する特定の抗 CD20 抗体により測定することができ、ゆえに、CD20 抗原を標的とする有用な方法はかなり異なる。

【0006】

リツキシマブ (rituximab) (リツキサン (RITUXAN) (登録商標)) 抗体は、一般的に CD20 抗原に対する遺伝子的操作を施したキメラマウス / ヒトモノクローナル抗体である。リツ

10

20

30

40

50

キシマブは1998年4月7日に発行の米国特許第5736137号(Anderson等)において「C2B8」と呼ばれている抗体である。リツキシマブは、再発性又は低抵抗性(refractory low-grade)又は濾胞性(follicular)の、CD20陽性、B細胞非ホジキンリンパ腫患者の治療のためのものである。インビトロでは、リツキシマブは、補体依存性細胞障害性(CDC)及び抗体依存細胞性細胞障害性(ADCC)を調節して、アポトーシスを誘導することが実証されている(Reff等, Blood 83(2):435-445 (1994); Maloney等, Blood 88:637a (1996); Manches等, Blood 101:949-954 (2003))。また、リツキシマブ及び化学療法及び毒素間の相乗効果は、実験的に観察された。特に、リツキシマブは、ドキソルビシン、CDDP、VP-16、ジフテリア毒素及びリシンの細胞障害性効果に対するヒトB細胞リンパ腫細胞系の薬物抵抗性の感度を高める(Demidem等 Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3):177-186 (1997))。インビボ前臨床研究では、リツキシマブが、カニクイザルの末梢血、リンパ節及び骨髄のB細胞を減少させることを示した(Reff等 Blood 83(2):435-445 (1994))。

10

【0007】

また、リツキシマブは様々な非悪性腫瘍性自己免疫疾患において研究されており、そこでB細胞と自己抗体は疾患病理学上の役割があるようである。Edwards等, Biochem Soc. Trans. 30:824-828 (2002)。リツキシマブは、例えば、関節リウマチ(RA) (Leandro等, Ann. Rheum. Dis. 61:883-888 (2002); Edwards等, Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl等, Ann. Rheum. Dis., 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Emery等, Arthritis Rheum. 48(9): S439 (2003))、ループス(Eisenberg, Arthritis. Res. Ther. 5:157-159 (2003); Leandro等 Arthritis Rheum. 46: 2673-2677 (2002); Gorman等, Lupus, 13: 312-316 (2004))、免疫性血小板減少性紫斑病(D'Arena等, Leuk. Lymphoma 44:561-562 (2003); Stasi等, Blood, 98: 952-957 (2001); Saleh等, Semin. Oncol., 27 (Suppl. 12):99-103 (2000); Zaia等, Haematologica, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn等, Ann. Int. Med., 133: 275-279 (2000))、赤芽球ろう (Auner等, Br. J. Haematol., 116: 725-728 (2002)); 自己免疫性貧血(Zaja等, Haematologica 87:189-195 (2002) (Haematologica 87:336 (2002)に誤植あり)、寒冷凝集素症 (Layios等, Leukemia, 15: 187-8 (2001); Berentsen等, Blood, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen等, Br. J. Haematol., 115: 79-83 (2001); Bauduer, Br. J. Haematol., 112: 1083-1090 (2001); Damiani等, Br. J. Haematol., 114: 229-234 (2001))、重症インスリン耐性のタイプB症候群(Coll等, N. Engl. J. Med., 350: 310-311 (2004)、混合クリオグロブリン血症(DeVita等, Arthritis Rheum. 46 Suppl. 9:S206/S469 (2002))、重症筋無力症(Zaja等, Neurology, 55: 1062-63 (2000); Wylam等, J. Pediatr., 143: 674-677 (2003))、ウェゲナー肉芽腫症(Specks等, Arthritis & Rheumatism 44: 2836-2840 (2001))、難治性尋常性天疱瘡(Dupuy等, Arch Dermatol., 140:91-96 (2004))、皮膚筋炎(Levine, Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9):S1299 (2002))、シェーグレン症候群(Somer等, Arthritis & Rheumatism, 49: 394-398 (2003))、急性タイプII混合クリオグロブリン血症(Zaja等, Blood, 101: 3827-3834 (2003))、尋常性天疱瘡(Dupay等, Arch. Dermatol., 140: 91-95 (2004))、自己免疫性ニューロパチー(Pestronk等, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74:485-489 (2003))、腫瘍随伴性眼球クローヌス-筋クローヌス症候群(Pranzatelli等 Neurology 60(Suppl. 1) P05.128:A395 (2003))、及び再発性多発性硬化症(RRMS)の徴候及び症状を潜在的に軽減することが報告されている。Cross等 (abstract) 「Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS」 Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003)。

20

30

40

【0008】

第II相研究(WA16291)を関節リウマチ(RA)患者で行い、リツキシマブの安全性及び有効性に関する48週フォローアップデータを得ている。Emery等 Arthritis Rheum 48(9): S439 (2003); Szczepanski等 Arthritis Rheum 48(9): S121 (2003); Edwards等, "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis" N Engl. J. Med. 350:2572-82 (2004)。合計161人の患者は、4つの

50

治療アームについて均等にランダム化した：メトトレキセート、リツキシマブ単独、リツキシマブとメトトレキセート、及びリツキシマブとシクロホスファミド(C T X)。リツキシマブの治療投薬計画は、第1日目と第15日目に1gを静脈内に投与された。ほとんどのRA患者はリツキシマブを注入すると、十分な耐性となり、初めの注入の間でさえ少なくとも一の有害症状を経験するものは36%に上る(これに対してプラシーボ投与患者は30%)。概して、大多数の有害症状は、重症度が軽度から中程度のものと考えられ、すべての治療群全体で等しかった。48週間の4アーム全体の中に合計19の重度の有害症状があった。それはリツキシマブ/C T X群においてわずかに頻度が多かった。感染の発病は、すべての群全体で等しかった。このRA患者集団の深刻な感染の平均率は年間100患者につき4.66であった。それは地域に密着した疫学研究で報告されたRA患者の入院を必要とする感染率より低い(年間100患者につき9.57)。Doran等, *Arthritis Rheum.* 46:2287-2293 (2002)。

10

【0009】

少数の自己免疫神経障害(Pestronk等, 上掲)、眼球クローヌス-筋クローヌス症候群(Pranzatelli等, 上掲)及びRRMS (Cross等, 上掲)を含む神経病患者におけるリツキシマブの報告された安全特性は、腫瘍学又はRAにおいて報告されたものと同じであった。RRMS患者においてインターフェロン(IFN-)又は酢酸グラチラマー(glatiramer acetate)と組み合わせたリツキシマブの現行の研究者主導試験(investigator-sponsored trial, IST)(Cross等, 上掲)では、10人の治療された患者のうちの1人はリツキシマブの第一注入の後に中程度の熱と悪寒を経験し、一晚観察のために病院に入院したが、その他の9人の患者は有害症状を報告することなく4の注入投薬計画を終えた。

20

【0010】

CD20抗体及びCD20結合分子に関する特許及び特許公報には、米国特許第5776456号、同第5736137号、同第5843439号、同第6399061号及び同第6682734号、並びに米国公開特許第2002/0197255号、米国公開特許第2003/0021781号、米国公開特許第2003/0082172号、米国公開特許第2003/0095963号、米国公開特許第2003/0147885号(Anderson等)；米国特許第6455043号、米国公開特許第2003/0026804号及び国際公開第2000/09160号(Grillo-Lopez, A.)；国際公開第2000/27428号(Grillo-Lopez及びWhite)；国際公開第2000/27433号及び米国公開特許第2004/0213784号(Grillo-Lopez及びLeonard)；国際公開第2000/44788号(Braslawsky等)；国際公開第2001/10462号(Rastetter, W.)；国際公開第01/10461号(Rastetter及びWhite)；国際公開第2001/10460号(White及びGrillo-Lopez)；米国公開特許第2001/0018041号、米国公開特許第2003/0180292号、国際公開第2001/34194号(Hanna及びHariharan)；米国公開特許第2002/0006404号及び国際公開第2002/04021号(Hanna及びHariharan)；米国公開特許第2002/0012665号及び国際公開第2001/74388号(Hanna, N.)；米国公開特許第2002/0058029号(Hanna, N.)；米国公開特許第2003/0103971号(Hariharan及びHanna)；米国公開特許第2005/0123540号(Hanna等)；米国公開特許第2002/0009444号及び国際公開第2001/80884号(Grillo-Lopez, A.)；国際公開第2001/97858号(White, C.)；米国公開特許第2002/0128488号及び国際公開第2002/34790号(Reff, M.)；国際公開第2002/060955号(Braslawsky等)；国際公開第2002/096948号(Braslawsky等)；国際公開第2002/079255号(Reff及びDavies)；米国特許第6171586号及び国際公開第1998/56418(Lam等)；国際公開第1998/58964(Raju, S.)；国際公開第1999/22764号(Raju, S.)；国際公開第1999/51642号、米国特許第6194551号、米国特許第6242195号、米国特許第6528624号及び米国特許第6538124号(Idusogie等)；国際公開第2000/42072号(Presta, L.)；国際公開第2000/67796号(Curd等)；国際公開第2001/03734号(Grillo-Lopez等)；米国公開特

30

40

50

許第2002/0004587号及び国際公開第2001/77342号(Miller及びPresta); 米国公開特許第2002/0197256号(Grewal, I.); 米国公開特許第2003/0157108号(Presta, L.); 国際公開第04/056312号(Lowman等); 米国公開特許第2004/0202658号及び国際公開第2004/091657号(Benyunes, K.); 国際公開第2005/000351号(Chan, A.); 米国公開特許第2005/0032130号A1(Beresini等); 米国公開特許第2005/0053602号A1(Brunetta, P.); 米国特許第6565827号、同第6090365号、同第6287537号、同第6015542号、同第5843398号、及び同第5595721号、(Kaminski等); 米国特許第5500362号、同第5677180号、同第5721108号、同第6120767号、同第6652852号(Robinson等); 米国特許第6410391号(Raubitschek等); 米国特許第6224866号及び国際公開第00/20864号(Barbera-Guillem, E.); 国際公開第2001/13945号(Barbera-Guillem, E.); 米国公開特許第2005/0079174号A1(Barbera-Guillem等); 国際公開第2000/67795号(Goldenberg); 米国公開特許第2003/0133930号及び国際公開第2000/74718号(Goldenberg及びHansen); 米国公開特許第2003/0219433号及び国際公開第2003/68821号(Hansen等); 国際公開第2004/058298号(Goldenberg及びHansen); 国際公開第2000/76542号(Golay等); 国際公開第2001/72333号(Wolin及びRosenblatt); 米国特許第6368596号(Ghetie等); 米国特許第6306393号及び米国公開特許第2002/0041847号(Goldenberg, D.); 米国公開特許第2003/0026801号(Weiner及びHartman); 国際公開第2002/102312号(Engleman, E.); 米国公開特許第2003/0068664号(Albitar等); 国際公開第2003/002607号(Leung, S.); 国際公開第2003/049694号、米国公開特許第2002/0009427号、及び米国公開特許第2003/0185796号(Wolin等); 国際公開第2003/061694号(Sing及びSiegall); 米国公開特許第2003/0219818号(Bohen等); 米国公開特許第2003/0219433号及び国際公開第2003/068821号(Hansen等); 米国公開特許第2003/0219818号(Bohen等); 米国公開特許第2002/0136719号(Shenoy等); 国際公開第2004/032828号(Wahl等); 及び国際公開第2002/56910号(Hayden-Ledbetter)が含まれる。また、米国特許第5849898号及び欧州特許第330191号(Seed等); 欧州特許第332865号A2(Meyer及びWeiss); 米国特許第4861579号(Meyer等); 米国公開特許第2001/0056066号(Bugelski等); 国際公開第1995/03770号(Bhat等); 米国公開特許第2003/0219433号A1(Hansen等); 国際公開第2004/035607号(Tee ling等); 米国公開特許第2004/0093621号(Shitara等); 国際公開第2004/103404号(Watkins等); 国際公開第2005/000901号(Tedder等); 米国公開特許第2005/0025764号(Watkins等); 国際公開第2005/016969号及び米国公開特許第2005/0069545号A1(Carr等); 及び国際公開第2005/014618号(Chang等)も参照のこと。

【0011】

リツキシマブを用いた治療法に関する文献には、Perotta及びAbuel, 「Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab」 Abstract # 3360 Blood 10(1)(part 1-2): p. 88B (1998); Perotta等, 「Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)」, Blood, 94: 49 (abstract) (1999); Matthews, R., 「Medical Heretics」 New Scientist (7 April, 2001); Leandro等, 「Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response」 Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro等, 「An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus」, Arthritis and Rheumatism, 46:2673-2677 (2002)、この中では2週間の期間に各患者はリツキシマブ500mgの2回投与、シクロフォスファミド750mgの2回投与、及び高用量経口副腎皮質ステロイドを受け、この治療患者のうち2人はそれぞれ7か月目と8か月目に

再発し、異なるプロトコールで再治療されている；「Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy」 Weide等, *Lupus*, 12: 779-782 (2003)、この中ではある患者はリツキシマブ(375 mg / m² × 4回、1週間間隔で繰り返す)で治療を受け、更に5～6か月ごとにリツキシマブを適用し、次いで維持療法として3か月ごとに375 mg / m²のリツキシマブ投与をした、他方、難治性SLE患者はリツキシマブで成功裏に治療され、維持療法を3か月ごとに受けている、両患者はリツキシマブ療法によく応答している；Edwards及びCambridge, 「Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes」 *Rheumatology* 40:205-211 (2001)；Cambridge等, 「B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters」 *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S1350 (2002)；Edwards等, 「Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002)；Pavelka等, *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-90 (2004)；Emery等, *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004)；Levine及びPestronk, 「IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab」 *Neurology* 52: 1701-1704 (1999)；DeVita等, 「Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis」 *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002)；Hidashida等 「Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab.」 the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology ; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002に公開；Tuscano, J. 「Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab」 the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002に公開；「Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic」 Martin and Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004)；Silverman及びWeisman, 「Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy」, *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003)；Kazkaz及びIsenberg, 「Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases」, *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004)；Virgolini and Vanda, 「Rituximab in autoimmune diseases」, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299-309(2004)；Klemmer等, 「Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab」, *Arthritis And Rheumatism* , 48: (9) 9,S (SEP), page: S624-S624 (2003)；Kneitz等, 「Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases」, *Immunobiology*, 206: 519-527 (2002)；Arzoo等, 「Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)」 *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10), p922-4 (2002) Comment in *Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002)；「Future Strategies in Immunotherapy」 Lake及びDionne, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 by John Wiley & Sons, Inc.)Article Online Posting Date: January 15, 2003 (Chapter 2 「Antibody-Directed Immunotherapy」)；Liang and Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Section: CD20 as an Immunotherapy Target, 文献オンライン登記日: 2002年1月15日 表題「CD20」；「Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens」と題するAppendix 4A Stockinger等, 編集: Coligan等, in *Current Protocols in Immunology* (2003 John Wiley & Sons, Inc) オンライン登記日: 2003年3月；印刷物出版日: 2003年2月；Penichet及びMorrison, 「CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering」 *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* Section: Chimeric, Humanized and Human Antibodies; オンライン登記 2002年1月15日；Specks等 「Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy」 *Arthritis & Rheumatism* 44:2836-2840 (2001)；online abstract submission and invitation Koegh等, 「Rituximab for Remission Indu

10

20

30

40

50

ction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients」, American College of Rheumatology, Session Number: 28-100, Session Title: Vasculitis, Session Type: ACR Concurrent Session, Primary Category: 28 Vasculitis, Session 10/18/2004 (<<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>>); Eriksson, 「Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab」, Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003); Jayne等, 「B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis」 Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003); Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone及びSpecks, 「Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis」, the 2002-2003 Immune Tolerance Networkのthe Clinical Trial Research Summary, <<http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>>が含まれる。また、Leandro等, 「B cell repopulation occurs mainly from naive B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus」 Arthritis Rheum., 48 (Suppl 9): S1160 (2003)も参照。

10

【 0 0 1 2 】

米国公開特許第 2 0 0 3 / 0 0 6 8 6 6 4 号(Albitar等)は、リツキシマブに対するヒト抗キメラ抗体(HACA)を決定するためのELISAアッセイを記載する。

米国公開特許 2 0 0 5 / 0 0 3 2 1 3 0 号 A 1 (Beresini及びSong)は、CD20抗体などの治療用抗体に対する中和抗体を検出する方法を開示する。

20

Mire-Sluis等 J. Immunol. Methods 289: 1-16 (2004)は、バイオテクノロジー産物に対する宿主抗体の検出に用いられるイムノアッセイの検出及び最適化に関する忠告を提供する。

Hong等は、細胞表面タンパク質CD20に対するヒト化抗体についての単一の定量的な生細胞及び抗イデオタイプ抗体ベースのELISAを記載する(Hong等 J Immunol Methods. 294:189-197 (2004))。

Wei等, J Immunol Methods. 293:115-26 (2004)は、臨床研究における組換えヒトエリスロポエチンに対する中和抗体の検出のための細胞ベースのバイオアッセイを記載する。

30

【 0 0 1 3 】

Leon等は、ハト飼育者中の抗トリ抗体の検出におけるリウマチ因子活性による干渉を記載する(Leon等 Clin Exp Med. 2(2): 59-67 (2002); 誤字あり: Leon等 Clin Exp Med. 2(3): 157 (2002))。Stahl等 Vox Sang. 74(4): 253-255 (1998)は、高力価IgM寒冷凝集素を有する患者におけるIgGアロ抗体の検出のための血清親和性クロマトグラフィに関する。Koper等 Clin Chem Lab Med. 36(1): 23-28 (1998)は、親和性クロマトグラフィを用いたCA125測定におけるIgG及びIgMヒト抗マウス抗体(HAMA)干渉を定量化した。Crowley及びWaltersは、高性能親和性クロマトグラフィによる血清中の免疫グロブリンの測定に関する(Crowley and Walters J Chromatogr. 266:157-162 (1983))。

また、Maeda等, Intl. J. Hematology 74(1): 70-75 (2001); Gordon等, Blood 98(11 Part 2): 228b (2001); Kaminski等, Blood 96(11 Part 1): 734a (2000); Shan等, Cancer Immunology Immunotherapy 48(12): 673-683 (2000); Idusogie等, Journal of Immunology 166(4): 2571-2575 (2001); Reff等, Blood 83(2): 435-445 (1994); 及びZaya等, Blood 98(11 Part 2): 41b (2001)を参照。

40

【 0 0 1 4 】

(発明の概要)

本発明は、RA又はSLEなどの自己免疫性疾患を有する被検体からの血清が細胞ベースのバイオアッセイ、例えば中和抗体アッセイの実施を妨げる物質(一又は複数)を含有するという発見に、少なくともある程度関する。免疫グロブリン親和性精製が干渉を取り除く好適な方法として同定されるまで、より信頼性のある結果をバイオアッセイにおいて達成されるように、干渉の問題を解決するために様々な方法が試みられていた。

50

したがって、第一態様では、本発明は、自己免疫性疾患被検体の生体試料を処理するための方法であって、

- (a) 試料を脱脂する、
- (b) 試料中の免疫グロブリンを親和性精製する、
- (c) 精製された免疫グロブリンを濃縮する、そして、
- (d) 濃縮された免疫グロブリンを細胞ベースの生物活性アッセイに供することを含んでなる方法を提供する。

【0015】

本発明は、さらに、自己免疫性疾患を有する被検体を処置するための方法であって、

- (a) 自己免疫性疾患を治療するために被検体に治療的抗体又はイムノアドヘシンが投与される、
- (b) 被検体から生体試料を得る、
- (c) 生体試料中の免疫グロブリンを親和性精製する、そして、
- (d) 精製された免疫グロブリンを中和抗体アッセイに供することを含んでなる方法を提供する。

上記の方法における使用のために、本発明は、さらに、

- (a) 脱脂試薬、
- (b) 免疫グロブリンの親和性精製のためのバッファ、そして、
- (c) 前記の方法のいずれか又は両方を実施するための診断用キットの使用を使用者に指示する取扱説明書を具備する診断用キットを提供する。

【0016】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

I. 定義

特に示さない限り、本明細書中の「生体試料」はヒト被検体から得られる試料を意味する。被検体は自己免疫性疾患被検体であることが好ましい。試料は、ヒト抗マウスの抗体(HAMA)、ヒト抗キメラ抗体(HACA)又はヒト抗ヒト抗体(HAHA)などの、患者を治療していた抗体又は薬剤と結合する被検体の免疫グロブリンを含んでもよい。生体試料は、例えば血清、血漿、細胞溶解物、乳汁、唾液、硝子体液(vitrous fluid)、関節液、腹腔体液、涙液、組織ホモジェネートを含んでもよいが、好ましくは血清を含む。試料が、薬剤にて治療されている被検体から入手するか(この場合、試料はさらに治療用抗体又はイムノアドヘシンなどの薬剤を含んでもよい)、又は無治療又は薬剤未処理の被検体から入手してもよい。

【0017】

本明細書中の「自己免疫性疾患」は、個体の自己組織ないしは臓器又は同時分離に対する及びそれらから生じる疾患又は症状、又はその徴候又は結果として生じるその症状である。一実施態様では、正常な体組織及び抗原と反応する抗体のB細胞による産生の結果から生じる、又はその産生により悪化する症状を指す。他の実施態様では、自己免疫性疾患は、自己抗原(例えば核抗原)のエピトープに特異的な自己抗体の分泌を伴うものである。自己免疫疾患又は症状の例として、限定するものではないが、関節炎(関節リウマチ(例えば急性の関節炎、慢性の関節リウマチ、痛風又は痛風性関節炎、急性の痛風性関節炎、急性免疫学的関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、タイプIIコラーゲン誘導性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、スティルス病、椎骨関節炎及び若年性発症関節リウマチ、骨関節炎、関節炎慢性化、関節炎変形、関節炎慢性原発、反応性関節炎、及び強直性脊椎炎)、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例えばブランク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬)、アトピー性疾患を含むアトピー、例えば花粉症及びジョブ症候群、皮膚炎、例として接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥離性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状の皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、一次刺激物接触皮膚炎及び過敏性皮膚炎、X連鎖性過剰IgM症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢

性特発性蕁麻疹、例として慢性自己免疫蕁麻疹、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症(MS)、例えば脊椎-眼(spino-optical)MS)、一次進行性MS(PPMS)及び再発性寛解MS(RRMS)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、硬化症汎発、失調性硬化症、視神経脊髄炎(NMO)、炎症性腸疾患(IBD)(例えばクローン病、自己免疫性胃腸疾患、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸性潰瘍、微細な大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープ、壊死性全腸炎及び経壁の大腸炎、及び自己免疫炎症性腸疾患)、腸炎症、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例として成人性又は急性の呼吸窮迫症候群(ARDS)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫血液疾患、リウマチ様脊椎炎、リウマチ様関節滑膜炎、遺伝性血管性浮腫、髄膜炎などの脳神経損傷、妊娠性疱疹、妊娠性天疱瘡、陰囊炎そう痒症、自己免疫性成熟前卵巣の機能不全、自己免疫症状による突発性聴力障害、IgE媒介性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎及び辺縁及び/又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例として、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎(GN)、例として、慢性又は急性の糸球体腎炎、例として原発性GN、免疫性GN、膜性GN(膜性ネフロパシ)、特発性膜性GN又は特発性膜性ネフロパシ、膜又は膜性増殖性GN(MPGN)(タイプI及びタイプIIを含む)、急速進行性GN、増殖性腎炎、自己免疫多腺性内分泌の機能不全、亀頭炎例えば限局性プラズマ細胞性亀頭炎、亀頭包皮炎症、遠心性環状紅斑、紅斑性花弁状色素斑、多様な紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬(lichen nitidus)、硬化性萎縮性苔癬、限局性神経皮膚炎、棘状苔癬、扁平苔癬、薄板状魚りん癬、表皮剥離性角質増殖症、妊娠前角化症、膿皮症壊疽、アレルギー性症状及び応答、アレルギー性反応、湿疹、例としてアレルギー性又はアトピー性湿疹、皮脂欠乏性湿疹、汗疱状湿疹及び小胞の掌蹠湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息及び自己免疫喘息、T細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、妊娠中の胎児のABO式血液型など外来性抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、ループス、例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、円板状ループス及び円板状エリテマトーデス、脱毛症ループス、全身性エリテマトーデス(SLE)、例えば皮膚SLE又は亜急性の皮膚SLE、新生児期ループス症候群(NLE)及び紅斑性狼瘡汎発、若年性開始型(I型)真正糖尿病、例として小児インシュリン依存性真正糖尿病(IDDM)、成人発症型真正糖尿病(II型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシ、糖尿病性大動脈疾患、サイトカイン及びTリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、ヴェゲナー肉芽腫症、無顆粒球症、脈管炎、例として血管炎、大血管性血管炎(例えば大脈管脈管炎(リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞(高安)動脈炎を含む)、中脈管脈管炎(川崎病及び結節性多発動脈炎/結節性動脈周囲炎を含む)、微小多発動脈炎、免疫性血管炎、CNS脈管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、壊死性血管炎、例えば全身性壊死性血管炎、及びANCA関連の脈管炎、例としてチャージ-ストラウス脈管炎又は症候群(CSS)及びANCA関連の小血管性血管炎、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイヤモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血(AIHA)、悪性貧血(貧血症悪性熱)、アジソン病、純粋な赤血球貧血症又は形成不全(P RCA)、第VIII因子欠損症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、CNS炎症性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病/症候群、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡そう及び類天疱瘡皮膚、天疱瘡(尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、ペンフィグス粘液

10

20

30

40

50

膜類天疱瘡及び天疱瘡エリテマトーデスを含む)、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、熱障害、子癇前症、免疫複合体疾患、例として免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばIgM多発性神経炎又はIgM媒介性神経障害、血小板減少(例えば心筋梗塞患者によるもの)、例えば血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、輸血後紫斑病(PTP)、ヘパリン誘発性血小板減少及び自己免疫性又は免疫媒介性血小板減少、例えば慢性及び急性のITPを含む特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、強膜炎、例えば特発性角強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブ病、自己免疫多腺性症候群、例として多腺性症候群(又は、多腺性内分泌障害症候群)、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランバート-イートン筋無力症候群又はイートン ランバート症候群、スティッフマン又はスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群(OMS)及び感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ系間隙間質性肺炎(LIP)、閉塞性細気管支炎(非移植)対NSIP、ギラン バレー症候群、ベルガー病(IgAネフロパシ)、特発性IgAネフロパシ、線状IgA皮膚病、急性熱性好中球性皮膚症、角層下膿疱症、一時的棘融解皮膚病、肝硬変、例えば原発性胆管萎縮症及び肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアック病又はコエリアック病、脂肪便症(グルテン腸疾患)、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症(ALS;筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease))、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患(AIED)、自己免疫聴力障害、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性又は再発する多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、コーガン症候群/非梅毒性間質性角膜炎、ベル麻痺、スウィート病/症候群、自己免疫酒さ、帯状ヘルペス関連の疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症、これにはモノクローナルB細胞リンパ球増多症(例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び未同定の有意なモノクローナル免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance)、MGUS)が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャンネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びCNSのチャンネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性又は分節性又は局所性分節性系球体硬化症(FSGS)、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例として、自己免疫脱髄性病及び慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、完全脱毛症、CREST症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症及び毛細管拡張症)、雌雄自己免疫性不妊性、例えば抗精子抗体によるもの、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎及び繊維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫病、例えばリーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、割込み肺線維形成、肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic fasciitis)、シャルマン症候群、フェルティエー症候群、フィラリア(flariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎(急性又は慢性)又はFuchの毛様体炎)、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、SCID、後天性免疫不全症候群(AIDS)、エコーウィルス感染、敗血症、内毒血症、腓炎、甲状腺炎(thyrotoxicosis)、バル

10

20

30

40

50

ボウウイルス感染、風疹ウイルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウイルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、慢性過敏性肺炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、移植器官再灌流、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道/肺疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、アスペルミオジェネシス(aspermiogenese)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、結節性紅斑、leprosum、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフロゼ、眼炎sympathica、精巣炎肉芽腫症、睪炎、多発性神経根炎急性、膿

皮症壊疽、Quervain甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、白斑、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う症状、白血球-粘着力欠損、サイトカイン及びTリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフロゼ症候群、睪島炎、多内分泌性不全、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症(AOIH)、心筋症、例えば拡張型心筋症、後天性表皮水疱症(EBA)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフロゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、血清陰性脊椎関節炎、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウスコット アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、神経病学的疾患、リンパ節炎、血圧応答の減退、血管機能不全、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、虚血性再灌流疾患、心筋又は他の組織の再灌流損傷、リンパ腫の気管支炎、炎症性皮膚病、急性炎症性成分を有する皮膚病、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、眼性及び眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、ナルコレプシ、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症などがある。

【0018】

本明細書中の「被検体」はヒト被検体である。

本明細書中の「自己免疫性疾患被検体」は、自己免疫性疾患を有する、又は自己免疫性疾患を発達させるリスクにある被検体である。

本明細書中の「脱脂する」とは、血清などの生体試料から脂質を取り除くことを意味する。脱脂は、試料中に存在し、精製カラムを閉塞する又は詰まらせる脂質を取り除くために望ましい。脱脂は、吸収剤(例として、LIPOSORB(登録商標)、ソルビタンエステル/ポリオキシエチレンソルビタンエステル)、有機物抽出物、濾過、遠心などの使用を含む様々な方法により達成されうる。

「親和性精製する」とは、精製される化合物又は組成物(例えばFc領域含有ポリペプチド)に選択的又は好適に結合する吸着剤、好ましくは固定されたものの使用を意図する。例えば、プロテインA+G精製、IgG親和性精製(例えばPierce製のMELON GEL™を使用する)、抗免疫グロブリン抗体(単独で、又は一又は複数のアイソタイプに対する特異性を組み合わせて用いる、例えば各々のアイソタイプの特異的親和性精製のためにカップリ

10

20

30

40

50

ングされた、抗ヒト I g G、I g A、I g M 及び I g E の組合せ)、免疫グロブリン結合特性を有する任意の他の吸着剤(例えば PIERCE T-GEL™)が含まれる。本明細書中の好適な親和性精製法は、生体試料からの I g G、I g A、I g M 及び I g E 抗体アイソタイプを精製するために、プロテイン A + G 親和性精製(下記の定義を参照)の使用を伴う。好ましくは、本明細書中の親和性精製は、基本的にすべてのアイソタイプの F c 領域含有ポリペプチドを精製する。

【0019】

本明細書中の「F c 領域含有ポリペプチド」は、F c 領域を含んでなるポリペプチドである。このようなポリペプチドの例には、被検体からの治療用抗体、イムノアドヘシン及び免疫グロブリン(被検体の抗薬剤免疫グロブリンを含む)が含まれる。

本明細書中の「吸収剤」は、任意の共有的な結合をすることなくその表面に他の物質を接着させることができる物質又は組成物である。好ましくは、吸収剤は固定される。

「固定された」吸着剤は固相に固定されるものである。

「固相」とは、吸着剤が接着されうる非水溶基質を意味する。本明細書中で対象とする固相は、通常、ガラス、二酸化ケイ素、アガロース又はポリスチレン表面を含むものである。固相は、例えば、精製カラム又は分散粒子の分散相を含んでもよい。

本明細書中の「プロテイン A + G 親和性精製」は、試料から免疫グロブリン又は F c 領域含有ポリペプチドを除去するために、好ましくは固相に固定されるプロテイン A 及びプロテイン G、その変異体、断片及び / 又は融合体を含むものの使用を意味する。このような精製には、本質的に同時のプロテイン A 及びプロテイン G 精製、並びにいずれかの順番で連続した精製(すなわち、プロテイン A の後にプロテイン G、及びその逆)が含まれる。

【0020】

本明細書中の「濃縮する」とは、対象とする化合物又は組成物の濃度を増やすことを意味する。例えば、試料中の免疫グロブリンの濃度は、濃縮器(Pierce ICON(登録商標)タンパク質濃縮器又は CENTRICON-30™ など)、遠心、濾過などを用いて増やすことができる。

「生物活性」なる表現は、本明細書中の治療用抗体又はイムノアドヘシンなどの薬剤の測定可能な機能を指す。様々な活性が考慮され、補体依存性細胞障害作用(CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、アポトーシス、イオンチャネル調節、細胞(例えば治療用抗体又はイムノアドヘシンが結合しうる抗原を発現している細胞)の増殖の阻害などを含まれるが、これに限定されるものではない。

「生物活性アッセイ」は、治療用抗体又はイムノアドヘシンなどの薬剤又は組成物の生物活性を評価するアッセイを指す。

本明細書中の「細胞ベースの」アッセイは、治療用抗体又はイムノアドヘシンなどの薬剤又は組成物の生物活性を評価するために、細胞株を含む細胞を利用するバイオアッセイである。好ましくは、アッセイに用いられる細胞又は細胞株は、治療用抗体又はイムノアドヘシンが結合する抗原を発現する。

【0021】

アンタゴニスト又は抗体の生物活性を「阻止(ブロック)」する生物試料(前処理された試料又は精製された免疫グロブリン調製物を含む)の能力は、その活性の部分的な阻止及び完全な阻止の両方を指す。

本明細書中の「中和抗体」は、対象とする抗原(例えば治療用抗体又はイムノアドヘシン)に結合するだけでなく、さらに、ある程度その抗原の生物活性を阻害もする抗体を指す。

本明細書中の「中和抗体アッセイ」は、試料の中和抗体の存在を評価するアッセイである。

本明細書中の「干渉」は、中和抗体アッセイなどの細胞ベースの生物活性アッセイの再現性を妨げる化合物(一又は複数)又は組成物(一又は複数)の存在を指す。試料における干渉の存在は、例えば、バイオアッセイが行われる標的集団の薬剤未処理自己免疫性被検体からの血清をアッセイすることによって、確認できる。アッセイがこれらの個体間で高度に可変性のある細胞性応答を示す場合、血清干渉が一又は複数の試料中に存在すると結論

10

20

30

40

50

づけてもよい。好ましくは、干渉は、リウマチ因子(RF)、免疫グロブリン、又は被検体が治療されている薬剤である。

【0022】

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

ここで「B細胞表面上マーカー」又は「B細胞表面上抗原」とは、B細胞の表面上に発現する抗原であり、それに結合するアンタゴニスト又は抗体の標的となることができる。例示的B細胞表面上マーカーには、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及びCD86白血球表面上マーカーが含まれる。(詳しくは、The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition, 1997, Barclay等編集, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New Yorkを参照)。他のB細胞表面上マーカーには、RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Bti g、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、及び239287などがある。特に対象とするB細胞表面上マーカーは、被検体の他の非B細胞組織と比較してB細胞上に主に発現しており、B細胞前駆細胞及び成熟B細胞の両方の細胞上に発現しているもよい。本明細書中の目的に適するB細胞表面マーカーは20、CD22及びBR3である。

10

20

【0023】

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

「B細胞表面マーカーアンタゴニスト」とは、B細胞上のB細胞表面マーカーに結合することによって被検体のB細胞を破壊又は枯渇させる、及び/又は一以上のB細胞機能を妨げる、例えば、B細胞に誘導される体液性反応を低減又は阻害する分子である。好ましくは、アンタゴニストは、それによって治療される被検体のB細胞を枯渇する(すなわち、循環中のB細胞レベルを下げる)ことができる。そのような枯渇は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)、B細胞増殖の阻害及び/又はB細胞死の誘導(例えば、アポトーシスを介する)等の多様なメカニズムを介して達成されるであろう。本発明の範囲に包含されるアンタゴニストには、場合によって細胞障害性剤とコンジュゲート又は細胞障害性剤と融合している、CD20などのB細胞表面マーカーに結合する抗体、合成又は天然配列のペプチド、イムノアドヘシン、及び小分子アンタゴニストが含まれる。好適なアンタゴニストは抗体を含む。

30

【0024】

本明細書中の「CD20抗体アンタゴニスト」とは、B細胞上のCD20に結合することによって被検体のB細胞を破壊又は枯渇させる、及び/又は一以上のB細胞機能を妨げる、例えば、B細胞に誘導される体液性反応を低減又は阻害する抗体である。好ましくは、抗体アンタゴニストは、それによって治療する被検体のB細胞を枯渇する(すなわち、循環中のB細胞レベルを下げる)ことができる。そのような枯渇は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)、B細胞増殖の阻害及び/又はB細胞死の誘導(例えば、アポトーシスを介する)等の多様な機能を介して達成されるであろう。

40

本明細書中で用いるように、「B細胞枯渇」は、治療の前のレベルと比較して、一般に薬剤又は抗体治療後の動物又はヒトにおけるB細胞レベルの減少を指す。B細胞枯渇は部

50

分的でも完全でもよい。B細胞レベルは、Reff等, Blood 83: 435-445 (1994)又は米国特許第5736137号(Anderson等)に記載されるような周知の技術を使用して測定できる。例として、哺乳動物(例えば正常な霊長類)は様々な用量の抗体又はイムノアドヘシンで治療されてもよく、末梢B細胞濃度は例えばB細胞を計数するFACS方法により決定されてもよい。

【0025】

CD20抗体の例には以下のものが含まれる：現在では「リツキシマブ」(「リツキサン(登録商標)」)と称される「C2B8」(米国特許第5736137号)；「Y2B8」又は「Ibritumomab Tiuxetan」(ゼパリン(登録商標))と命名されるイットリウム-[90]-標識2B8マウス抗体、IDEC Pharmaceuticals, Inc.から市販(米国特許第5736137号；1993年6月22日に受託番号HB11388としてATCCに寄託された2B8)；場合によっては「131I-B1」又はCorixaから市販の「ヨードI131 Tositumomab」抗体(BEXXARTM)を生成するために¹³¹Iで標識した「Tositumomab」とも呼称されるマウスIgG2a「B1」(米国特許第5595721号も参照のこと)；マウスモノクローナル抗体「1F5」(Press等 Blood 69(2):584-591 (1987)及びそれらの変異体、例として「フレームワークパッチ」又はヒト化1F5(国際公開第2003/002607号, Leung, S；ATCC寄託番号HB-96450)；マウス2H7及びキメラ2H7抗体(米国特許第5677180号)；ヒト化2H7(国際公開第2004/056312号(Lowman等)及び以下に挙げるもの)；B細胞の細胞膜のCD20分子を標的とした完全なヒト、高親和性抗体である、2F2(HuMax-CD20)(Genmab, Denmark；例としてGlennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8: 503-510 (2003)及びCragg等, Blood 101: 1045-1052 (2003)；国際公開第2004/035607号；米国公開特許第2004/0167319号を参照)；国際公開第2004/035607号及び米国公開特許第2004/0167319号(Teeling等)に記載のヒトモノクローナル抗体；米国公開特許第2004/0093621号(Shitara等)に記載のFc領域に結合した複合体Nグリコシド結合糖鎖を有する抗体；CD20に結合するモノクローナル抗体及び抗原結合断片(国際公開第2005/000901号, Tedder等)、例えばHB20-3、HB20-4、HB20-25、及びMB20-11；抗体のAMEシリーズなどのCD20結合分子、例えば国際公開第2004/103404号及び米国公開特許第2005/0025764号(Watkins等, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME)に記載のAME33抗体；CD20結合分子、例えば米国公開特許第2005/0025764号(Watkins等)に記載のもの；A20抗体又はその変異体、例えばキメラないしはヒト化A20抗体(それぞれcA20、hA20)(米国公開特許第2003/0219433号, Immunomedics)；CD20結合抗体、例えばエピトープ劣化Leu-16、1H4又は2B8、場合によってIL-2とコンジュゲートしたもの、米国公開特許第2005/0069545号A1及び国際公開第2005/16969号(Carr等)；CD22及びCD20を結合する二重特異性抗体、例えばhLL2xhA20(国際公開第2005/14618号, Chang等)；the International Leukocyte Typing Workshopより入手可能なモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1又はNU-B2(Valentine等, Leukocyte Typing III (McMichael, 編集, p. 440, Oxford University Press (1987))；1H4(Haisma等 Blood 92:184 (1998))；抗CD20アウリスタチンEコンジュゲート(Seattle Genetics)；抗CD20-IL2(EMD/Biovation/City of Hope)；抗CD20MAb療法(EpiCyte)；抗CD20抗体TRU015(Trubion)。本明細書中の好適なCD20抗体は、キメラ、ヒト化ないしはヒトCD20抗体であり、より好ましくはリツキシマブ、ヒト化2H7、2F2(HuMax-CD20)ヒトCD20抗体(Genmab)、及びヒト化A20又はIMMUN-16抗体(Immunomedics)である。

【0026】

本明細書中の「リツキシマブ」又は「リツキサン(登録商標)」なる用語は、CD20抗原に対する一般的に遺伝子操作したキメラのマウス/ヒトモノクローナル抗体を指し、米国特許第5736137号では「C2B8」と命名されるものであり、CD20を結合す

10

20

30

40

50

る能力を保持する該抗体の断片を含みうる。

本明細書中の目的のためだけに、そして特に明記しなければ、「ヒト化2H7」抗体はマウス2H7抗体のヒト化変異体であり、該抗体はインビボで循環B細胞を減少するために有効である。

【0027】

一実施態様では、ヒト化2H7抗体は以下のCDR配列の1、2、3、4、5又は6を含んでなる。

XがM又はLであるCDRL1配列RASSSVSYXH(配列番号21)、例として配列番号4(図1A)、

配列番号5(図1A)のCDRL2配列、

XがS又はAであるCDRL3配列QQWXFNPPT(配列番号22)、例として配列番号6(図1A)、

配列番号10のCDRH1配列(図1B)、

XがD又はAであるCDRH2配列AIYPGNGXTSYNQKFKG(配列番号23)、例として配列番号11(図1B)、及び

位置6のXがN、A、Y、W又はDであり、位置7のXがS又はRである、CDRH3配列VVYYSXXYWYFDV(配列番号24)、例として配列番号12(図1B)。

【0028】

上記のCDR配列は一般的に、ヒト可変軽鎖及び可変重鎖のフレームワーク配列、例えばヒト軽鎖サブグループI(V_LI)の実質的なヒトコンセンサスFR残基、及びヒト重鎖サブグループIII(V_HIII)の実質的なヒトコンセンサスFR残基内に存在する。また、国際公報2004/056312号(Lowman等)も参照のこと。

可変重鎖領域はヒトIgG鎖定常領域に結合されてもよく、該領域は例えば天然配列及び変異形の定常領域を含むIgG1又はIgG3でもよい。

好適な実施態様では、このような抗体は、配列番号8の可変重鎖ドメイン配列(v16、図1Bに示す)を含有し、場合によっては配列番号2の可変軽鎖ドメイン配列(v16、図1Aに示す)を含有し、場合によっては、可変重鎖ドメイン内の位置56、100及び/又は100aの一又は複数のアミノ酸置換、例えばD56A、N100A又はN100Y、及び/又はS100aRと、可変軽鎖ドメイン内の位置32及び/又は92の一又は複数のアミノ酸置換、例えばM32L及び/又はS92Aを含有する。好ましくは、抗体は配列番号13又は15の軽鎖アミノ酸配列と、配列番号14、16、17又は20の重鎖アミノ酸配列を含有するインタクト抗体である。

好適なヒト化2H7抗体はオクレリズマブ(ocrelizumab)(Genentech)である。

【0029】

本明細書中の抗体はさらに、ADC活性を改善するFc領域内に少なくとも一のアミノ酸置換を含有する、例えば重鎖残基のEu番号付けでいうと、位置298、333及び334にアミノ酸置換、好ましくはS298A、E333A及びK334Aを有するものである。また、米国特許第6737056号、Prestaを参照のこと。

これら抗体の何れかは、FcRn結合又は血清半減期を改善するようなFc領域内での少なくとも一の置換、例えばN434Wなどの重鎖位置434での置換を含有してもよい。また、米国特許第6737056号、Prestaを参照のこと。

これら抗体の何れかはさらに、CDC活性を亢進するFc領域内での少なくとも一のアミノ酸置換、例えば位置326での少なくとも一の置換、好ましくはK326A又はK326Wを含有してもよい。また、米国特許第6528624号(Idusogie等)を参照のこと。

【0030】

いくつかの好適なヒト化2H7変異体は、配列番号2の可変軽鎖ドメインと配列番号8の可変重鎖ドメインを含有するものであり、例として、(存在する場合には)Fc領域内に置換を有するもの又は有さないもの、配列番号8に変異N100A;又はD56AとN100A;又はD56A、N100YとS100aRを含有する可変重鎖ドメインと配列番

10

20

30

40

50

号 2 に変異 M 3 2 L ; 又は S 9 2 A ; 又は M 3 2 L と S 9 2 A を含有する可変軽鎖ドメインを有するものなどがある。

2 H 7 . v 1 6 の可変重鎖の M 3 4 は抗体安定性を供給する可能性のあるものとして同定され、新たな置換の候補となりうる。

本発明のいくつかの多様な好適な実施態様をまとめると、2 H 7 . v 1 6 をベースとした突然変異体の可変領域は、以下の表 1 に挙げる位置のアミノ酸置換を除いて v 1 6 のアミノ酸配列を含有する。特に明記しない限り、2 H 7 変異体は v 1 6 と同じ軽鎖を有する【 0 0 3 1 】

表 1 例示的なヒト化 2 H 7 抗体変異体

2H7 バージョン	重鎖(V _H) 変異	軽鎖(V _L) 変異	Fc 変異
16 (比較 対象)			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

ある好適なヒト化 2 H 7 は、2 H 7 . v 1 6 可変軽鎖ドメイン配列：

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPE
DFATYYCQQWFSNPPTFGQGTKVEIKR (配列番号： 2) ;

と、2 H 7 . v 1 6 可変重鎖ドメイン配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLVWVAIYPNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS (配列番号： 8)

を含んでなる。

【 0 0 3 3 】

ヒト化 2 H 7 . v 1 6 抗体がインタクト抗体である場合、軽鎖アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPE
DFATYYCQQWFSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号： 1 3) ;

と、配列番号： 1 4 の重鎖アミノ酸配列又は：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLVWVAIYPNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号：17)

を含んでなりうる。

【0034】

他の好適なヒト化2H7抗体は、2H7.v511可変軽鎖ドメイン配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASSSVSYLHWYQQKPKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (配列番号：18)

と、2H7.v511可変重鎖ドメイン配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLVWVAIYPNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSS (配列番号：19)

を含んでなる。

【0035】

ヒト化2H7.v511抗体がインタクト抗体である場合、軽鎖アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASSSVSYLHWYQQKPKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQEQ
SVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号：15)；

と、配列番号：16の重鎖アミノ酸配列又は：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLVWVAIYPNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNL
GKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号：20)

を含んでなりうる。

【0036】

本明細書中のために、「免疫療法」は、抗体を用いた哺乳動物(好ましくはヒト患者)の
治療方法を指し、該抗体はコンジュゲートされていないないしは「ネイキッドな」抗体で
あるか、又は該抗体は一又は複数の細胞障害性剤(一又は複数)などの異種性分子(一又は
複数)ないしは薬剤(一又は複数)とコンジュゲートされているかないしは融合して、「イ
ムノコンジュゲート」を生成してもよい。

【0037】

本明細書中で用いられるように、「治療用抗体」は、疾患ないしは疾病を有する哺乳動
物又は疾患ないしは疾病の素因を有する哺乳動物の疾患又は疾病(好ましくは自己免疫性
疾患)を治療する際に有用な抗体である。例示的な治療用抗体には、トラスツズマブ(HERC
EPTIN(登録商標))を含むHER2抗体(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285
-4289 (1992)、米国特許第5725856号)及び、パーツズマブ(OMNITARGTM)(国際公開
第01/00245号)；CD20抗体(下記参照)；IL-8抗体(St John等, Chest, 103
:932 (1993)、及び国際公開第95/23865号)；VEGFないしはVEGFレセプター
抗体、例として、ヒト化及び/又は親和性成熟したVEGF抗体、例えばヒト化VEG
F抗体huA4.6.1ベパシズマブ(AVASTIN(登録商標))及びラニビズマブ(ranibizumab
(LUCENTIS(登録商標)))(Kim等, Growth Factors, 7:53-64 (1992)、1998年10月1
5日公開の国際公開第96/30046号及び同第98/45331号)；PSCA抗体(国
際公開第01/40309号)；CD11a抗体、例としてエファリズマブ(RAPTIVA(登
録商標)))(米国特許第5622700号、国際公開第98/23761号、Steppe等, Tra
nsplant Intl. 4:3-7 (1991)及びHourmant等, Transplantation 58:377-380 (1994))；I
gEを結合する抗体、例としてオマリズマブ(omalizumab)(XOLAIR(登録商標)))(Presta等,
J. Immunol. 151:2623-2632 (1993)、及び国際公開第95/19181号)；1998年
2月3日発行の米国特許第5714338号又は1992年2月25日発行の米国特許第

10

20

30

40

50

5091313号、1993年3月4日発行の国際公開第93/04173号、又は1998年6月30日出願の国際特許第PCT/US98/13410号、米国特許第5714338号); CD18抗体(1997年4月22日発行の米国特許第5622700号、又は1997年7月31日公開の国際公開第97/26912号); Apo-2レセプター抗体(1998年11月19日公開の国際公開第98/51793号); 組織因子(TF)抗体(1994年11月9日に権利付与された欧州特許第0420937号B1); α -7インテグリン抗体(1998年2月19日公開の国際公開第98/06248号); EGF R抗体(1996年12月19日公開の国際公開第96/40210号の、キメラ化又はヒト化の225抗体であるセツキシマブ(cetuximab)、ERBUTIX(登録商標)); CD3抗体、例えばOKT3(1985年5月7日発行の米国特許第4515893号); CD25又はTac抗体、例としてCHI-621(SIMULECT(登録商標))及びZENAPAX(登録商標)(1997年12月2日発行の米国特許第5693762号を参照); CD4抗体、例えばcM-7412抗体(Choy等 *Arthritis Rheum* 39(1): 52-56 (1996)); CD52抗体、例えばCAMPATH-1H(ILEX/Berlex)(Riechmann等 *Nature* 332:323-337 (1988)); Fcレセプター抗体、Fcに対するM22抗体(Graziano等 *J. Immunol.* 155(10): 4996-5002 (1995)に記載のRI); 癌胎児性抗原(CEA)抗体、例えばhMN-14(Sharkey等 *Cancer Res.* 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)); 胸部上皮細胞に対する抗体、例としてhuBrE-3、hu-Mc3及びCHL6(Ceriani等 *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995)); 及びRichman等 *Cancer Res.* 55(23 Supp): 5916s-5920s (1995)); 大腸癌細胞と結合する抗体、例えばC242(Litton等 *Eur J. Immunol.* 26(1): 1-9 (1996)); CD38抗体、例えばAT13/5(Ellis等 *J. Immunol.* 155(2): 925-937 (1995)); CD33抗体、例えばHuM195(Jurcic等 *Cancer Res* 55(23 Suppl): 5908s-5910s (1995))及びCMA-676又はCDP771; EpCAM抗体、例えば17-1A(PANOREX(登録商標)); GpIIb/IIIa抗体、例えばアブシキマブ(abciximab)又はc7E3 Fab(REOPRO(登録商標)); RSV抗体、例えばMEI-493(SYNAGIS(登録商標)); CMV抗体、例えばPROTOVIR(登録商標); HIV抗体、例えばPRO542; 肝炎抗体、例えばHepB抗体OSTAVIR(登録商標); CA125抗体 OvaRex; イディオタイプのGD3エピトープ抗体 BEC2; α -3抗体(例えば、VITAXIN(登録商標)、Medimmune); ヒト腎臓細胞上皮癌抗体、例えばch-G250; ING-1; 抗ヒト17-1A抗体(3622W94); 抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体(A33); GD3ガングリオシドに対する抗ヒトメラノーマ抗体R24; 抗ヒト扁平上皮癌(SF-25); ヒト白血球抗原(HLA)抗体、例えばSmartID10及び抗HLA DR抗体 オンコリン(Oncolym)(Lym-1); CD37抗体、例えばTRU016(Trubion); IL-21抗体(Zymogenetics/Novo Nordisk); 抗B細胞抗体(Impheron); B細胞ターゲティングMab (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad131(HGS); Lym-1抗体、例えばLym-1Y-90(USC)又は抗Lym-1 オンコリン (USC/Peregrine); LIF226 (Enhanced Lifesci.); BAF抗体(例えば国際公開第03/33658号); BAFレセプター抗体(例えば国際公開第02/24909号); BR3抗体; BlyS抗体、例えばベリムマブ(belimumab)、LYMPHOSTAT -BTM; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); ゴミリキシマ(gomilixim)(Idec152、Biogen Idec); IL-6レセプター抗体、例えばアトリズマブ(atlizumab)(ACTEMRATM; Chugai/Roche); IL-15抗体、例えばHumax-IL-15(Genmab/Angen); ケモカインレセプター抗体、例えばCCR2抗体(例えばMLN1202; Millieneum); 抗補体抗体、例としてC5抗体(例えばエキュリズマブ(eculizumab)、5G1.1; Alexion); ヒト免疫グロブリンの経口剤(例えばIgPO、Protein Therapeutics); IL-12抗体、例えばABT-874 (CAT/Abbott); テネリキシマブ(Teneliximab)(BMS-224818; BMS); CD40抗体、例えばS2C6及びそのヒト化変異体(国際公開第00/75348号)及びTNX100(Chiron/Tanox); TNF- α 抗体、例えばcA2又はインフリキシマブ(REMICADE(登録商標))、CDP571、MAK-195、アダリムマブ(adalimumab)(HUMIRATM)、ペグ化されたTNF- α 抗体断片、例えばCDP-870(Celltech)、D2E7(Knoll)、抗TNF- α ポリクローナル抗体(例えばPass

T N F ; Verigen) ; C D 2 2 抗体、例えば L L 2 又はエピラツズマブ (LYMPHOCIDE (登録商標) ; Immunomedics)、例としてエピラツズマブ Y - 9 0 及びエピラツズマブ I - 1 3 1、アビオジェン (Abiogen) の C D 2 2 抗体 (Abiogen, Italy)、C M C 5 4 4 (Wyeth/Celltech)、コンボトックス (combotox) (UT Southwestern)、B L 2 2 (NIH)、及び L y m p o S c a n T c 9 9 (Immunomedics) が含まれる。好ましくは、本明細書中の治療用抗体は、R A 及び / 又は S L E などの自己免疫性疾患の治療に有用なネイキッドなインタクト抗体である。

【 0 0 3 8 】

本明細書中で用いられるように、「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを兼ね備えた分子を示す。構造的に、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を有するアミノ酸配列の融合体を含んでなり、該アミノ酸配列が抗体の抗原認識及び結合部位以外(すなわち「異種性の」もの)であり、免疫グロブリン定常ドメイン配列(例えば I g G の C H 2 及び / 又は C H 3 配列)であるものである。例示的なアドヘシン配列は、対象とするタンパク質と結合するレセプター(本明細書中の「リガンド結合ドメイン」)又はリガンド(本願明細書「レセプター結合ドメイン」)の一部を含んでなる連続するアミノ酸配列を含む。また、アドヘシン配列は、対象とするタンパク質を結合する配列を含むが、レセプター又はリガンド配列(例えばペプチボディのアドヘシン配列)は含まない。このようなポリペプチド配列は、ファージディスプレイ技術及びハイスルーブット分類法などの様々な方法によって選択又は同定されうる。

10

20

【 0 0 3 9 】

ここで使用される「リガンド結合ドメイン」という用語は、任意の天然細胞表面レセプターあるいは対応する天然レセプターの定性的リガンド結合能を少なくとも保持しているその任意の領域あるいは誘導体を意味する。特定の実施態様では、レセプターは、免疫グロブリンのスーパーファミリーのメンバーと相同な細胞外ドメインを持つ細胞表面ポリペプチド由来である。免疫グロブリンのスーパーファミリーのメンバーではないが、それにもかかわらずこの定義によって特にカバーされる他のレセプターは、サイトカインに対するレセプター、特にチロシンキナーゼ活性(レセプターチロシンキナーゼ)を持つレセプター、ヘマトポエチン(hematopoietin)のメンバー及び神経成長因子レセプターのスーパーファミリー、及び細胞接着分子、例えば(E、L-及びP-)セレクトインである。

30

【 0 0 4 0 】

「レセプター結合ドメイン」という用語は、細胞接着分子を含むレセプターに対する任意の天然リガンド、あるいは対応する天然リガンドの定性的レセプター結合能力を少なくとも保持しているかかる天然リガンドの任意の領域又は誘導体を指すために使用する。この定義は、とりわけ、上述のレセプターに対するリガンドからの結合配列を特に含む。

「抗体-イムノアドヘシンキメラ」は、(ここで定義された)抗体の少なくとも一つの結合ドメインを(本出願中で定義された)少なくとも一つのイムノアドヘシンと組み合わせる分子を含む。例示的な抗体-イムノアドヘシンキメラは Berg ら PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) 及び Chamow ら J. Immunol. 153:4268 (1994) に記載された二重特異性 C D 4 - I g G キメラ類である。

40

本明細書中の被検体の「治療」は、治療的処置及び予防又は阻止的な処置を指す。治療を必要とする者には、既に前記疾患を有する者、並びに前記疾患が予防されるべきものである者が含まれる。したがって、被検体は、前記疾患を有すると診断されているか、前記疾患の素因があるか、又は前記疾患に罹りやすいかもしれない。本明細書中で用いる「処置」、「治療する」又は「治療」なる用語には、阻止(例えば、予防)、対症療法及び治療的療法が含まれる。

「有効量」なる用語は、前記疾患を予防するか、改善するか又は治療するために有効である薬剤(例えば抗体又はイムノアドヘシン)の量を指す。このような有効量により、通常、疾患の徴候又は症状の改善が生じるであろう。

【 0 0 4 1 】

50

ここで補助治療として用いる「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書中で治療される被検体の免疫系を抑制する又は遮断するように働く物質を表す。これは、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原の発現を下方制御又は抑制する、あるいはMHC抗原を遮断する物質を含む。そのような薬剤の例として、2-アミノ-6-アリル-5-代替ピリミジン(米国特許第4665077号参照)；非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)；ガンシクロビル、タクロリムス、糖質ステロイド、例としてコルチゾール又はアルドステロン、抗炎症剤、例としてシクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リボキシゲナーゼインヒビター又はロイコトリエンレセプターアンタゴニスト；プリンアンタゴニスト、例えばアザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル(MMF)；アルキル化剤、例えばシクロホスファミド；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド(米国特許第4120649号に記載のように、MHC抗原を遮断する)；MHC抗原及びMHCフラグメントに対する抗イデオタイプ抗体；シクロスポリン；6メルカプトプリン；副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質ステロイド類似体などのステロイド、例としてプレドニゾン、メチルプレドニゾン、例えばSOLU-MEDROL(登録商標)メチルプレドニゾンコハク酸ナトリウム、及びデキサメタゾン；ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター、例としてメトトレキサート(経口又は皮下)；クロロキン及びヒドロキシクロロキンなどの抗マラリア剤；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカイン又はサイトカインレセプター抗体又はアンタゴニスト、例として抗インターフェロン- α 、 β 、又は γ 抗体、抗腫瘍壊死因子抗体(インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))又はアダリムマブ)、抗TNFイムノアドヘシン(エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子抗体、抗インターロイキン2(IL-2)抗体及び抗IL-2レセプター抗体、抗インターロイキン6(IL-6)レセプター抗体及びアンタゴニスト；抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；抗-L3T4抗体；異種性抗リンパ球グロブリン；pan-T抗体、好ましくは、抗-CD3又は抗CD4/CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日公開の国際公開第90/08187号)；ストレプトキナーゼ；トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β)；ストレプトドルナーゼ(streptodornase)；宿主由来のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；クロランブシル；デオキシスペルグアニン(deoxyspergualin)；ラパマイシン；T細胞レセプター(Cohen等、米国特許第5114721号)；T細胞レセプターフラグメント(Offner等、Science 251:430-432(1991)；国際公開第90/11294号；laneway, Nature, 341:482(1989)；及び国際公開第91/01133号)；BAFFないしBR3抗体ないしイムノアドヘシンなどのBAFFアンタゴニスト及び α TNF4アンタゴニスト(参考までにMackay及びMackay, Trends Immunol., 23:113-5(2002)と以下の定義を参照のこと)；T細胞ヘルパーシグナルを阻害する生物学的な薬剤、例として抗CD40レセプター又は抗CD40リガンド(CD154)、例えばCD40-CD40リガンドに対する阻止抗体(例えば、Durie等、Science, 261:1328-30(1993)；Mohan等、J. Immunol., 154:1470-80(1995))及びCTLA4-Ig(Fink等、Science, 265:1225-7(1994))；及びT10B9などのT細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)を含む。

【0042】

本明細書中で用いられるように、「BAFFアンタゴニスト」は、一般に、BAFFの生物活性を直接阻害する任意の化合物を指す。分子は、BAFFポリペプチド、BAFF遺伝子、BAFF転写産物又はBAFFレセプターと相互に作用することによって、BAFFの生物活性を直接阻害する。BAFFアンタゴニストは、例えば、BAFFに結合してBAFFの活性の中和、BAFF発現レベルの低下、BAFFの安定性に作用、BAFFの膜結合型の可溶型へのタンパク分解性切断に作用、一又は複数のレセプターへのBAFFの結合の阻害を行ってもよく、又は、一又は複数のBAFFレセプターの細胞内シグナル伝達を妨げてもよい。BAFFアンタゴニストは、タンパク質性(例えば抗体、レセプター融合タンパク質、ペプチド、ペプチボディ、優性ネガティブなBAFF変異体)又は非タンパク質性の分子(例えば小有機分子(およそ500Da未満))、例えばsiRNA及びアプタマーなどであってもよい。BAFFアンタゴニストの生物活性の中和を評価す

10

20

30

40

50

るための方法には、当分野で公知のものが含まれる。B A F F アントゴニストの例には、B A F F レセプターの B A F F - 結合部分又はその B A F F - 結合変異体(例えば国際公開第 0 1 / 1 2 8 1 2 号、国際公開第 0 2 / 2 4 9 0 9 号、国際公開第 0 0 / 4 0 7 1 6 号、国際公開第 0 3 / 0 2 4 9 9 1 号)、抗 B A F F 抗体(例えば国際公開第 0 3 / 3 3 6 5 8 号)、B A F F - 結合ペプチボディ(例えば国際公開第 0 2 / 0 9 2 6 2 0 号)、抗 B A F F - R 抗体(例えば国際公開第 0 2 / 2 4 9 0 9 号)及び B A F F - 結合ペプチド(例えば国際公開第 0 2 / 1 6 4 1 2 号)を含んでなるポリペプチドが含まれる。一実施態様では、B A F F アントゴニストは、B C M A - F c (例えば国際公開第 0 1 / 1 2 8 1 2 号)、B A F F - R - F c (例えば国際公開第 0 2 / 2 4 9 0 9 号)、T A C I - I g (例えば国際公開第 0 0 / 4 0 7 1 6 号)、抗 B A F F 抗体(例えば国際公開第 0 3 / 3 3 6 5 8 号)、抗 B A F F - R 抗体(例えば国際公開第 0 2 / 2 4 9 0 9 号)、B A F F - 結合ペプチボディ(例えば国際公開第 0 2 / 0 9 2 6 2 0 号)、優性ネガティブな B A F F (例えば国際公開第 0 4 / 0 8 1 0 4 3 号)からなる群から選択される。更なる実施態様では、抗 B A F F 抗体及び抗 B A F F レセプター抗体は、ヒト、ヒト化、キメラ化であり、さもなければヒトの治療のために向上されている。

【 0 0 4 3 】

ここで使用する「細胞障害性剤」なる用語は、細胞の機能阻害又は阻止、及び/又は細胞破壊をもたらす物質を表す。この用語は、放射性同位体(例として、 $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及び Lu の放射性同位体)、化学療法剤、及び細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素又は小分子毒素などの毒素、又はそれらの断片を含むことを意図する。

【 0 0 4 4 】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標))、C P T - 1 1 (イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニボシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成アナログ、K W - 2 1 8 9 及びC B 1 - T M 1 を含む)；エリュテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン 1 I 及びカリケアマイシン I 1 (例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin) A を含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オ

10

20

30

40

50

ー スラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルホリノ-ドキシソルビシン、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン、ドキシソルビシンH C Iリポソーム注射剤(DOXIL(登録商標))、リポソームドキシソルビシンT L C D-99(MYOCET(登録商標))、ペグ化リポソームドキシソルビシン(CAELYX(登録商標))及びデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、ゲムシタピン(gemcitabine)(GEMZAR(登録商標))、テガフル(tegafur)(UFTORAL(登録商標))、カペシタピン(capecitabine)(XELODA(登録商標))、エポチロン(epothilone)、及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサラン(razoxane)；リゾキシシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニューアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「A r a - C」)；チオテパ；タキソイド類、例えばパクリタキセル(TAXOL(登録商標))、パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(ABRAXANE™)、及びドキシセタキセル(TAXOTERE(登録商標))；クロランブシル；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；プラチナ剤、例えばシスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチン；ピンカ類、チューブリン重合の微小管形成を阻害するもの、例えばピンプラスチン(VELBAN(登録商標))、ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))、ピンデシン(ELDISINE(登録商標))、FILDESIN(登録商標)、及びビノレルピン(NAVELBINE(登録商標))；エトボシド(V P - 16)；イホスファミド；マイトキサントロン；ロイコボピン(leucovovin)；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害薬R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸などのレチノイド、例えば、ベキサロテン(TARGRETIN(登録商標))；

10

20

30

40

50

ビスホスホネート、例えばクロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロロン酸/ゾレドロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロン酸(SKELID(登録商標))、又はリセドロロン酸(ACTONEL(登録商標))；トロキサシタピン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、及びH-Ras、及び上皮増殖因子レセプター(EGFR)；THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害薬(例えばLURTOTECAN(登録商標))；rmRH(例えばABARELIX(登録商標))；BAY439006(ソラフェニブ；Bayer)；SU-11248(Pfizer)；ペリフォシン(perifosine)、COX-2阻害剤(例えばセレコキシブ又はエトリコキシブ)、プロテオゾーム阻害剤(例えばPS341)；ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標))；CCI-779；チピファルニブ(tipifarnib)(R11577)；オラフィニブ(orafenib)、ABT510；BCL-2阻害剤、例えばオブリメルセンナトリウム(oblimersen sodium)(GENASENSE(登録商標))；ピクサントロン；及び上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体：並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるCHOP、及び5-FU及びロイコボピン(leucovorin)とオキサリプラチン(ELOXATIN™)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

10

20

【0045】

本明細書において、化学療法剤には、癌の増殖を促進しうるホルモンの影響を調節、低減、遮断又は阻害するように作用する「抗ホルモン剤」又は「内分泌療法」が含まれる。これらは、ホルモン類そのもの、例として、混合アゴニスト/アンタゴニスト特性を有する抗卵胞ホルモン、例えばタモキシフェン(NOLVADEX(登録商標))、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン(FARESTON(登録商標))、イドキシフェン、ドロロキシフェン(droloxifene)、ラロキシフェン(EVISTA(登録商標))、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、及び選択的なエストロゲンレセプター修飾因子(SERM)、例えばSERM3、アゴニスト特性のない純粋な抗卵胞ホルモン、例えばフルベストラント(FASLODEX(登録商標))、及びEM800(このような薬剤はエストロゲンレセプター(ER)二量体化を遮断、DNA結合を阻害、ER代謝回転を増加、及び/又は、ERレベルを抑制してもよい)、アロマターゼ阻害剤、例としてステロイド性アロマターゼ阻害剤、例えばホルメスタン及びエキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、及び非ステロイド性アロマターゼ阻害剤、例えばアナストロゾール(anastrozole)(ARIMIDEX(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))及びアミノグルテチミド、及び他のアロマターゼ阻害剤、例としてボロゾール(RIVISOR(登録商標))、メゲストロールアセテート(MEGASE(登録商標))、ファドロゾール及び4の(5)-イミダゾール、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えばロイプロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、ゴセレリン、プセレリン及びトリプトレリン(tripterelin)、性ステロイド、例としてプロゲステロン、例えばメゲストロールアセテート及びメドロキシプロゲステロンアセテート、エストロゲン、例えばジエチルstilbestrol及びプレマリン、及びアンドロゲン/レチノイド、例えばフルオキシメステロン、すべてのトランスレチノイン酸及びフェンレチニド、オナプリストン、抗プロゲステロン、エストロゲンレセプター下方制御因子(ERD)、抗アンドロゲン物質、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド)、及び、上記いずれかの薬学的に受容可能な塩類、酸又は誘導体、並びに上記の2以上の組み合わせを含むが、これらに限定するものではない。

30

40

【0046】

本明細書中で用いられているように、「EGFR阻害剤」なる用語は、EGFRと結合するか、さもなければ直接相互に作用して、そのシグナル伝達活性を予防又は低減する化合物を指しており、「EGFRアンタゴニスト」として称されることもある。このような

50

薬剤の例には、EGFRに結合する抗体及び小分子が含まれる。EGFRに結合する抗体の例には、MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB 8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(米国特許第4943533号、Mendelsohn等を参照)、及びその変異体、例えばキメラ化225(C225又はセツキシマブ; ERBUTIX(登録商標))及び、再構築されたヒト225(H225)(国際公開第96/40210号、Imclone Systems Inc.を参照); IMC-11F8、完全なヒトの、EGFRターゲティング抗体(Imclone); タイプII変異体EGFRを結合する抗体(米国特許第5212290号); 米国特許第5891996号に記載の、EGFRを結合する、ヒト化及びキメラの抗体; 及び、EGFRを結合するヒト抗体、例として、ABX-EGF又はパニツムマブ(国際公開第98/50433号、Abgenix/Amgenを参照); EMD 55900 (Stragliotto等 Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EGFR結合に関してEGFとTGF- β の両方と競合するEGFRに対するヒト化EGFR抗体であるEMD 7200(マツズマブ(matuzumab))(EMD/Merck); ヒトEGFR抗体、HuMax-EGFR(GenMab); E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3及びE7.6.3として知られていて、米国特許第6235883号に記載の完全なヒト抗体、MDX-447(Medarex Inc); 及び、mAb 806又はヒト化mAb 806(Johns等, J. Biol. Chem. 279(29): 30375-30384 (2004))が含まれる。抗EGFR抗体は、細胞障害性剤とコンジュゲートして、免疫コンジュゲートを生成してもよい(例として欧州特許第659,439号A2、Merck Patent GmbHを参照)。EGFRアンタゴニストには、小分子、例えば米国特許第5616582号、同第5457105号、同第5475001号、同第5654307号、同第5679683号、同第6084095号、同第6265410号、同第6455534号、同第6521620号、同第6596726号、同第6713484号、同第5770599号、同第6140332号、同第5866572号、同第6399602号、同第6344459号、同第6602863号、同第6391874号、同第6344455号、同第5760041号、同第6002008号及び同第5747498号、並びにPCT公報: 国際公開第98/14451号、同第98/50038号、同第99/09016号及び同第99/24037号に記載の化合物が含まれる。特定の小分子EGFRアンタゴニストにはOSI-774(CP-358774、エルロチニブ、TARCEVA(登録商標) Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD183805(CI1033、2-プロペンアミド、N-[4[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3(4-ホルホルニル)プロボキシ]-6-キナゾリニル]-、ジヒドロクロライド、Pfizer Inc.); ZD1839、ゲフィチニブ(IRESSA) 4(3'-クロロ-4'-フルオロアニリノ)-7-メトキシ-6-(3-ホルホルノプロボキシ)キナゾリン、AstraZeneca); ZM105180((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル-アミノ)-キナゾリン、Zeneca); BIBX-1382(N8-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N2-(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン、Boehringer Ingelheim); PKI-166((R)4-[4[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール); (R)-6-(4-ヒドロキシフェニル)-4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン); CL-387785(N-[4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチンアミド); EKB-569(N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-3-シアノ-7-エトキシ-6-キノリンイル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブテンアミド)(Wyeth); AG1478(Sugen); AG1571(SU5271; Sugen); 二重EGFR/HER2チロシンキナーゼ阻害剤、例えばラパチニブ(GW572016又はN-[3-クロロ-4-[(3フルオロフェニル)メトキシ]フェニル]6[5[[[2メチルスルホニル)エチル]アミノ]メチル]-2-フラニル]-4-キノゾリンアミン、Glaxo-SmithKline)。

【0047】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、HERレセプターなどのチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性を阻害する分子である。このような阻害剤の例には、前段落に記載のEGFRターゲティング薬剤; 小分子HER2チロシンキナーゼ阻害剤、例えばTakedaから入手

10

20

30

40

50

可能なTAK165; ErbB2レセプターチロシンキナーゼの経口選択的阻害剤であるCP-724714 (Pfizer and OSI); 二重HER阻害剤、例えばEKB-569 (Wyethから入手可能)、これは優先的にEGFRを結合するが、HER2及びEGFRを過剰発現している細胞を阻害する; 経口HER2及びEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるラパチニブ(GW572016、Glaxo-SmithKlineから入手可能); PKI-166 (Novartisから入手可能); パンHER阻害剤、例えばカネルチニブ(canertinib)(CI-1033; Pharmacia); Raf-1阻害剤、例えばRaf-1シグナル伝達を阻害するISIS Pharmaceuticalsから入手可能なアンチセンス薬剤ISIS-5132; 非HERターゲティングTK阻害剤、例えばGlaxoから入手可能なイマチニブメシレート(GLEEVACTM); MAPK細胞外調節キナーゼI阻害剤CI-1040 (Pharmaciaから入手可能); キナゾリン、例として、PD153035, 4-(3-クロロアニリノ)キナゾリン; ピリドピリミジン; ピリミドピリミジン; ピロピリミジン、例えばCGP59326、CGP60261及びCGP62706; ピラゾロピリミジン、4(フェニルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン; クルクミン(ジフェルロイルメタン、4,5-ビス(4-フルオロアニリノ)フタルイミド); ニトロチオフェン成分を含有するチロホスチン; PD-0183805 (Warner-Lambert); アンチセンス分子(例えばHERコード化核酸と結合するもの); キノキサリン(米国特許第5804396号); チロホスチン(米国特許第5804396号); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); CI-1033などのパンHER阻害剤(Pfizer); Affinitac (ISIS3521; Isis/Lilly); イマチニブメシレート(Gleevac; Novartis); PKI166 (Novartis); GW2016 (Glaxo Smith Kline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); セマキシニブ(Semaxinib)(Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); 又は以下のいずれかの特許公報に記載のもの: 米国特許第5804396号; 国際公開第99/09016号(American Cyanamid); 国際公開第98/43960号(American Cyanamid); 国際公開第97/38983号(Warner Lambert); 国際公開第99/06378号(Warner Lambert); 国際公開第99/06396号(Warner Lambert); 国際公開第96/30347号(Pfizer, Inc); 国際公開第96/33978号(Zeneca); 国際公開第96/3397号(Zeneca); 及び国際公開第96/33980号(Zeneca)が含まれる。

10

20

30

【0048】

「抗血管新生剤」は、ある程度、血管の発達を阻止又は阻害する化合物を指す。抗血管新生因子は、例えば、血管新生を促進する際に伴う増殖因子又は増殖因子レセプターと結合する小分子又は抗体であってもよい。本明細書において好適な抗血管新生因子は、血管内皮増殖因子(VEGF)又はそのレセプターと結合する抗体、例として、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))又はラニビズマブ(ranibizumab)(LUCENTIS(登録商標))、又はv3抗体、例えばVITAXINTM (Medimmune)である。

【0049】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン; IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15等のインターロイキン(IL)、例えば、PROLEUKIN(登録商標)rIL-2及びヒトIL-4及びヒトIL-4の変異体、例として、IL-2Rへの結合に關与するIL-4の領域内に突然変異を有する変異体、例えばArg21がGlu残基に変異したもの; 腫瘍壊死因子、例えばTNF-又はTNF-、及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養物由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物、例えば合成して産生された小分子構成要素及び製薬的に受容可能な誘導体及びその塩類を含む。

40

【0050】

50

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

10

【0051】

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

20

【0052】

「インテグリン」なる用語は、細胞の細胞外基質への結合と応答の両方をさせるレセプタータンパク質であり、創傷治癒、細胞分化、腫瘍細胞のホーミング及びアポトーシスなどの様々な細胞性機能に関与するものを表す。これらは細胞-細胞外基質及び細胞間相互作用に関与する細胞接着レセプターの大きなファミリーの一部である。機能的なインテグリンは、及びと称する2つの膜貫通性グリコプロテインサブユニットから成り、非共有的に結合している。サブユニットのように、サブユニットはすべて互いにいくらかの相同性がある。レセプターは常に1の鎖及び1の鎖を含有する。例えば、61、31、71、LFA-1などがある。本明細書中で用いられる、インテグリンなる用語には、天然源由来あるいは組換え細胞培養物由来のタンパク質及び天然配列インテグリンの生物学的に活性な等価物、例えば合成して産生された小分子構成要素及び製薬的に受容可能な誘導體及びその塩類を含む。

30

【0053】

本明細書中では、「腫瘍壊死因子(TNF)」とは、Pennica等、Nature, 312:721(1984)又はAggarwal等、JBC, 260:2345(1985)に記載のアミノ酸配列を含有するヒトTNF分子を意味する。

本明細書中の「TNFインヒビター」は、一般的にはTNFへの結合とその活性を中和することを介してTNFの生物学的活性をある程度阻害する薬剤である。本明細書中で考慮されるTNFインヒビターの具体例は、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))、インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))及びアダリムマブ(HUMIRA™)、ペグ化した可溶性TNF-Rペグスネルセプト(pegsunercept)(sTNF-R1; Amgen)；ペグ化した抗TNF抗体断片、CDP-870(Celltech)である。

40

「疾患変更性抗リウマチ剤」又は「DMARD」の例には、ヒドロキシクロロキノン、スルファサラジン、メトトレキサート、レフルノミド、エタネルセプト、インフリキシマブ(並びに、経口及び皮下用メトトレキサート)、アザチオプリン、D-ペニシラミン、ゴールド塩類(経口)、ゴールド塩類(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリンA及び局所性シクロスポリンを含むシクロスポリン、ブドウ球菌プロテインA(Goodyear及びSilver

50

man, J. Exp. Med., 197, (9), p1125-39 (2003))、これらの塩類及び誘導体を含むものなどがある。

【 0 0 5 4 】

「非ステロイド系抗炎症薬」又は「NSAID」の例として、アスピリン、アセチルサリチル酸、イブプロフェン、ナプロキセン、インドメタシン、スリダク、トルメチン、COX-2インヒビター、例としてセレコキシブ(celecoxib) (CELEBREX(登録商標)；4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾロ-1-イル) ベンゼンスルホンアミド及びバルデコキシブ(valdecoxib) (BEXTRA(登録商標))、及びメロキシカム(MOBIC(登録商標))、これらの塩類及び誘導体などがある。好ましくは、これらはアスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、インドメタシン又はトルメチンである。

10

本明細書中の「インテグリンアンタゴニスト又は抗体」の例として、CD11a又はLFA-1抗体、例としてGenentechから市販のエファリズマブ(RAPTIVA(登録商標))、又は、4インテグリン抗体、例としてBiogen Idec/Elanから入手可能なナタリズマブ(ANTEGREN(登録商標))、又は、ジアザサイクリックフェニルアラニン誘導体(国際公開第2003/89410号)、フェニルアラニン誘導体(国際公開第2003/70709号、国際公開第2002/28830号、国際公開第2002/16329号及び国際公開第2003/53926号)、フェニルプロピオン酸誘導体(国際公開第2003/10135号)、エナミン誘導体(国際公開第2001/79173号)、プロパン酸誘導体(国際公開第2000/37444号)、アルカノン酸誘導体(国際公開第2000/32575号)、置換型フェニール誘導体(米国特許第6677339号及び同第6348463号)、芳香族アミン誘導体(米国特許第6369229号)、ADAMディスプレイグリンドメインポリペプチド(米国公開公報2002/0042368号)、v3インテグリンに対する抗体(欧州特許第633945号)、アザ架橋された二環式アミノ酸誘導体(国際公開第2002/02556号)、及び683699(Tanabe)などが含まれる。

20

【 0 0 5 5 】

「副腎皮質ステロイド」は、天然に生じる副腎皮質ステロイドの効果を模倣するかあるいは増大するステロイドの一般的な化学構造を有するいくつかの合成又は天然に生じる物質の何か一つを指す。合成副腎皮質ステロイドの例として、プレドニゾン、プレドニゾロン(メチルプレドニゾロン、例としてSOLU-MEDROL(登録商標)メチルプレドニゾロンコハク酸ナトリウムを含む)、デキサメサゾン又はデキサメサゾントリアムシノロン、ヒドロコルチゾン、及びベタメサゾンが含まれる。本明細書中の好適な副腎皮質ステロイドは、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン又はデキサメサゾンである。

30

ここで「抗体」なる用語は、広い意味で用いられ、特にモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクト抗体から形成した多特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び所望の生物学的活性を有する限りにおける抗体断片の範囲にわたる。

【 0 0 5 6 】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部、好ましくはその抗原結合領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。

40

本明細書中の「インタクト抗体」とは、2つの抗原結合領域とFc領域を含有してなるものである。場合によって、インタクト抗体は機能的なFc領域を有する。

「成長阻害(「増殖阻害」ともいう)抗体は、抗体が結合する抗原を発現している細胞の増殖を阻害又は低減するものである。例えば、アンタゴニストはインビトロ及び/又はインビボでのB細胞の増殖を阻害又は低減しうる。

「アポトーシスを誘導する」抗体とは、標準的なアポトーシスアッセイにより測定できるようなB細胞などのプログラム細胞死、例えば、アネキシンVの結合、DNA断片化、細胞収縮、小胞体の肥大、細胞断片化、及び/又は膜小囊の形成(アポトーシス体と呼称)を誘導するものである。「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異

50

なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中でばらつきがある。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

【0057】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞性細胞障害(ADCC)への抗体の関与を示す。

10

20

【0058】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理は $F(a b')$ ₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用して V_H-V_L 二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

30

【0059】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも一つの遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。 $F(a b')$ ₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップ()及びラムダ()と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

40

(存在する場合には)抗体の「重鎖」の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体は異なるクラスが割り当てられる。インタクト抗体には5つの主なクラスがある：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2等のサブクラス(イソ型)に分かれる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 κ 、 λ 、 μ 、及び δ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られている。

【0060】

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明記

50

によって本明細書中に特別に援用されるKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のE Uインデックスのものである。「KabatのE Uインデックス」はヒトI g G 1 E U抗体の残基番号を指す。

「Fc領域」なる用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトI g G重鎖Fc領域はC y s 2 2 6の位置又はP r o 2 3 0からの位置のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(E U番号付けシステムによれば残基4 4 7)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてのK 4 4 7残基が除去された抗体群、K 4 4 7残基が除去されていない抗体群、及びK 4 4 7残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含みうる。

10

【0061】

「機能的なFc領域」は、天然配列のFc領域のエフェクター機能を保持する。典型的な「エフェクター機能」は、C 1 q結合；補体依存性細胞障害活性、Fcレセプター結合；抗体依存性細胞障害活性(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター(すなわち、B細胞レセプター)の下方制御などである。このようなエフェクターの機能は、一般に、Fc領域が結合領域(例えば、抗体の可変ドメイン)に結合するのに必要とされており、ここで実施例として開示する様々はアッセイを用いることで評価することが可能である。

20

「天然配列のFc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒトFc領域は、天然配列のヒトI g G 1 Fc領域(非A-及びA-アロタイプ)；天然配列のヒトI g G 2 Fc領域；天然配列のヒトI g G 3 Fc領域；及び天然配列のヒトI g G 4 Fc領域；並びに、上記何れかの自然に生じる変異体が含まれる。

【0062】

「変異体Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは一又は複数のアミノ酸置換により、天然配列のFc領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。好ましくは、変異体Fc領域は、天然配列のFc領域もしくは親ポリペプチドのFc領域と比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列のFc領域又は親のポリペプチドのFc領域におよそ1からおよそ10のアミノ酸置換、好ましくはおよそ1からおよそ5のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体Fc領域は、天然配列のFc領域及び/又は親ポリペプチドのFc領域と好ましくは少なくともおよそ80%の相同性を有するか、最も好ましくは少なくともおよそ90%の相同性を、さらに好ましくは少なくともおよそ95%の相同性を有するものであろう。

30

【0063】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)を発現する非特異的細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞を溶解する細胞媒介性反応を指す。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現する一方、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血性細胞でのFcRの発現は、Ravetch及びKinet, Annu.Rev.Immunol., 9:457-92(1991)の464頁の表3に要約されている。対象分子のADCC活性を評価するためには、米国特許第5500362号又は第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子のADCC活性は、例えばClynes等 PNAS(USA), 95:652-656(1998)に開示されたような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。

40

【0064】

「ヒトエフェクター細胞」とは、1つ又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能

50

を実行する白血球のことである。好ましくは、その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを表す。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(レセプター)に結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA(「活性化レセプター」)及びFcRIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース阻害モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234(1997)参照)。FcRはRavetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含め、他のFcRもここにおける「FcR」なる用語によって包含される。この用語は胎児への母性IgGの移動及び免疫グロブリンホメオスタシスに寄与する新生児レセプターであるFcRnもまた含む(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及びKim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

10

20

【0065】

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

「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはscFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。scFvの概説については、*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg及びMoore編集, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

30

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号; 国際公開第93/11161号; 及びHollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

40

【0066】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、モノクローナル抗体の産生中に生じ得、一般に少量で存在しうる可能な変異を除いて、同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。そのようなモノクローナル抗体は典型的には標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含む方法によって得られている。例えば、選択方法は、ハイブリドーマクローンのプール、ファージクローン又は組換えDNAクローンのような複数のクローンから独特のクローンを選択することでありうる。選択された標的結合配列は、例えば標的への親和性を改善し、標的結合配列をヒト化し、細胞培養においてその生産を改善し、インビボでのその免疫原性を減少させ、多重

50

特異的抗体を作り出す等のために、更に改変することができ、改変された標的結合配列を含む抗体はまた本発明のモノクローナル抗体であることが理解されなければならない。異なった決定基(エピトープ)に対する異なった抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物と異なり、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、典型的には他の免疫グロブリンによって汚染されていない点で有利である。「モノクローナル」との修飾語句は、実質的に均一な抗体の集団から得たものとしての抗体の性質を表すものであり、抗体が何か特定の方法による生成を必要とするものであると考えてはならない。例えば、本発明で使用されるモノクローナル抗体は、例えばハイブリドーマ法(例えばKohler等, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2版 1988); Hammerling等, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法(例えば米国特許第4816567号を参照)、ファージディスプレイ法(例えばClackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等 *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)を参照)、及びヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座又は遺伝子の一部又は全てを有する動物においてヒト又はヒト様抗体を産生する技術(例えば国際公開第1998/24893号; 同第1996/34096号; 同第1996/33735号; 同第1991/10741号; Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第5545806号; 同第5569825号; 同第5591669号(全てGenPharm); 同第5545807号; 国際公開第1997/17852号; 米国特許第5545807号; 同第5545806号; 同第5569825号; 同第5625126号; 同第5633425号; 及び同第5661016号; Marks等, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); 及びLonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)を参照)を含む様々な技術によって作製することができる。

【0067】

本明細書中のモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列に相同な又は同一な重鎖及び/又は軽鎖の一部を含むものであり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列に相同な又は同一なものである(米国特許第4816567号; 及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。ここで対象とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば、ヒヒ、アカゲザル又はカニクイザルなどの旧世界サル)由来の可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む(米国特許第5693780号)。

【0068】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリン(免疫グロブリン)に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロ

ブリンのものに対応し、ヒト免疫グロブリン配列の高頻度可変ループが上記のFR置換を除くFRのすべて又は実質的にすべてである少なくとも1又は一般的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域の一部、一般的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。更なる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照のこと。

【0069】

本明細書中で使用されるところの「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合に寄与する抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は一般には「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び/又は「高頻度可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))を含む。「フレームワーク」又は「FR」残基はここで定義するように高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

本明細書中の目的のための「ネイキッド抗体」は、細胞障害性分子又は放射性標識とコンジュゲートしていない抗体である。

【0070】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様においては、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、抗体が95重量%より多くなるまで、最も好ましくは99重量%より多くなるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分な程度まで精製される。抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0071】

「親和性成熟」抗体は、その一又は複数の高頻度可変領域に一又は複数の変異を有する抗体であって、そのような変異を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させたものである。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により産生できる。Marks等は、*Bio/Technology*, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和性成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas等、*Proc Nat. Acad. Sci*, USA 91:3809-3813(1994); Schier等、*Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton等、*J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson等、*J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins等、*J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0072】

「抗体曝露」とは、およそ1日から20日の期間にわたって投与される一又は複数回用量の本明細書中の抗体への接触又は曝露を意味する。前記用量は、この曝露期間にわたって一回又は決まった時間ないしは変則的な時間で、投与されてもよい。初め及びその後(例えば2回目又は3回目)の抗体曝露は、本明細書中で詳述されるようにそれぞれ時間を隔てたものである。

「パッケージ挿入物」は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌、パッケージされている製品と併用される他の治療薬、及び/又はその治療薬の用途に関する警告などについての情報を含む、治療薬の商業的包装を慣習的に含めた指示書を指す。

【0073】

II. 試料前処理

下記の実施例において、RA又はSLEなどの自己免疫性疾患を有する被検体からの血清が、中和抗体アッセイなどの細胞ベースのバイオアッセイの再現性を妨げる物質(一又は複数)を含有するというのを発見した。干渉はリウマチ因子(RF)又は免疫グロブリンでなかった。

この課題に対処するために様々な方法を評価したが、特定の抗体の回復又はアッセイ干渉を取り除く際に特に有用ではなかった。試料希釈を増やすことが干渉を最小化した、アッセイの感度は大いに損なわれた。干渉の課題に対処する他の方法を評価した。例えば、アッセイ読み取り(readout)又は細胞ベースの結合実験を変えることでは問題は解決せず、また、脱塩、脱脂質、サイトカイン相互関係又は飽和した硫酸アンモニウム沈殿によって、試料を前もって処理することでも解決しなかった。

最終的に、免疫グロブリン親和性精製は、干渉を取り除くための好適な方法として確認した。この方法は、精製された免疫グロブリンが細胞ベースのバイオアッセイにより確実に供されるように、干渉から離して被検体の免疫グロブリンを回収した。

【0074】

したがって、本発明は、自己免疫性疾患被検体の生体試料を処理するための方法であって、

- (a) 試料を脱脂する、
 - (b) 試料中の免疫グロブリンを親和性精製する、
 - (c) 精製された免疫グロブリンを濃縮する、そして、
 - (d) 濃縮された免疫グロブリンを細胞ベースの生物活性アッセ(好ましくは中和抗体アッセイ)に供する、
- ことを含んでなる方法に関する。

工程(a)、(b)及び(c)は、いずれの順序で行われてもよいが、好ましくは工程(a)の後に工程(b)、その後に(c)として行われる。

本明細書中の生体試料には、血清、血漿、細胞溶解物、乳汁、唾液、硝子体液(vitrous fluid)、及び他の分泌物、関節液、腹腔体液、涙液、組織ホモジェネートが含まれるが、好ましくは試料には血清が含まれる。さらに、試料は、液体、凍結、冷蔵、凍結乾燥などを含む様々な形態であってもよい。試料は、本明細書中の親和性精製工程の前及び/又は後の、更なる精製又は処理工程に供してもよい。

【0075】

試料は、ヒト抗マウスの抗体(HAMA)、ヒト抗キメラ抗体(HACA)又はヒト抗ヒト抗体(HAHA)などの、患者を治療していた抗体又は薬剤と結合する被検体の免疫グロブリンを含んでもよい。HAHAは、ヒト化又はヒトの治療用抗体に対するものであってよい。一実施態様では、試料は、このような抗体を含有することが決定されているものである。例えば、患者からの血清は、ELISAアッセイ、例えば米国特許第2005/0032130号A1(Beresini及びSong)又は米国特許第2003/0068664号(Albitar等)に記載のELISAアッセイによって、問題の薬剤に対する抗体を含むことが明らかとなってもよい。

試料は、上記のものなどの自己免疫性疾患、好ましくは関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)又はシェーグレン病、最も好ましくはRAを有する被検体由来である。

さらに、試料を入手した被検体は、治療用抗体、イムノアドヘシン、又は他の生物学的な薬剤、例として、ペグ化した可溶性TNF-R(sTNF-R1ペグスネルセプト(pegsuncept)、Amgenを含む)、IL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)、例として、アナキラ(anakira)(KINERET(登録商標))、DN-BAFF(Xencor)、又はワクチン、例えば

10

20

30

40

50

B細胞リンパ腫ワクチン(CRV/ATROS、Intracel、Large Scale Biology、Favrilie、NCI、Genitopeなどから入手可能なものを含む)又はLeukoVAX(Inflammatics)にて処置されても、処置されていてもよい。

【0076】

被検体が治療用抗体にて処置されている場合、抗体がB細胞表面マーカーを結合してもよい。例えばCD20抗体、例示的なこのような抗体には、例としてリツキシマブ、ヒト化2H7、2F2(HuMax-CD20)ヒトCD20抗体(Genmab)、ヒト化A20抗体又はIMMU-106(Immunomedics)、TRU015(Trubion)が含まれる。本明細書中の好適なCD20抗体はリツキシマブ又はヒト化2H7である。

対象とする他の治療用抗体には、腫瘍壊死因子(TNF)-抗体(例として、インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))、CDP571、MAK-195、アダリムマブ(HUMIRATM)、ペグ化したTNF-抗体断片、例えばCDP-870、抗-TNF-ポリクローナル抗体、例えばPassTNF)、インテグリン抗体(例えばエファリズマブ又はナタリズマブ)、BAFF抗体(例えば国際公開第03/33658号)、BR3抗体、BAFFレセプター抗体(例えば国際公開第02/24909号)、Blys抗体(例えばLYMPHOSTAT-BTMベリムマブ(belimumab)、HGS/CAT)、CD37抗体(例としてTRU016、Trubion)、CD22抗体、例えばLL2又はエピラズマブ(LYMPHOCIDE(登録商標)、Immunomedics)、AbiogenのCD22抗体、CMC544(Wyeth/Celltech)、コンボトックス(comboto)(UT Southwestern)、BL22(NIH)、LIF226(Enhanced Lifesci.)、VEGF又はVEGFレセプター抗体、例えばベパシズマブ(AVASTIN(登録商標))及びラニビズマブ(ranibizumab)(LUCENTIS(登録商標))、抗HER抗体、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))、パーツマブ(OMNITARGTM)及びセツキシマブ(cetuximab)(ERBUTIX(登録商標))、抗IgE抗体、例えばオマリズマブ(omalizumab)(XOLAIR(登録商標))、IL-21抗体(Zymogenetics/Novo Nordisk)、抗B細胞抗体(Impheron)、B細胞ターゲティングMab(Immunogen/Aventis)、1D09C3(Morphosys/GPC)、Lym-1抗体、例えば抗Lym-1オンコリン(Oncolym)(USC/Peregrine)、ISF154(UCSD/Roche/Tragen)、ゴミリキシマ(gomilixim)(Idec152、Biogen Idec)、IL-6レセプター抗体、例えばアトリズマブ(atlizumab)(ACTEMRATM、Chugai/Roche)、IL-15抗体、例えばHuMax-IL-15(Genmab/Amgen)、ケモカインレセプター抗体、例えばCCR2抗体(例えばMLN1202、Millienuum)、抗補体抗体、例としてC5抗体(例えばエキュリズマブ(eculizumab)、5G1.1、Alexion)、ヒト免疫グロブリンの経口剤(例えばIgPO、Protein Therapeutics)、IL-12抗体、例えばABT-874(CAT/Abbott)、テネリキシマブ(Teneliximab)(BMS-224818、BMS)、CD40抗体、例えばS2C6及びそのヒト化変異体(国際公開第00/75348号)及びTNX100(Chiron/Tanox)、CD52抗体(例えばCampath)、v3抗体(VITAXIN(登録商標)、Medimmune)などが含まれる。

【0077】

自己免疫性疾患被検体がイムノアドヘシンで処置されている場合、イムノアドヘシンはBR3-Ig、TNF-イムノアドヘシン(例えばエタネルセプト)、抗BAFFペプチボディ(例えば、国際公開第02/092620号、Amgen)、TACI-Ig(Zymogenetics)(例えば国際公開第00/40716号)、BCMA-Ig(ZymoGenetics)(例えば国際公開第01/12812号)、CTLA4-Ig、B7及びCD28同時刺激遮断薬、例えばアバタセプト(abatacept)(BMS)、BAFF-R-Fc(例えば国際公開第02/24909号)、などであってよい。

一般的に試料は、患者が薬剤、抗体又はイムノアドヘシンで処置される前及び/又はその後患者から得る。通常、生体試料は、例えば処置周期(一又は複数)の全体にわたって前処理から一連の時点に患者から得る。アッセイの実施を妨げている薬剤を回避するために、通常、薬剤流失が起こるときに生体試料を採取するであろう。例えば、基準時、及び3、6及び9か月の試料を試験してもよい。患者が後日再処置される場合、基準時、及び3又は6か月の試料を予め処理して、次いで中和抗体について試験してもよい。

【0078】

親和性精製前の脱脂工程は、親和性精製工程の間をつまりを減らすために望ましい。脱脂のために脂質吸収剤(LIPOSORB(登録商標)、ソルビタンエステル/ポリオキシエチレンソルビタンエステル)を使うことができるが、有機物抽出、濾過、遠心など他の方法も試料の脱脂のために有用である。

親和性精製工程は、実質的にすべての免疫グロブリンアイソタイプ(すなわち、選択した吸着剤の親和性が異なるアイソタイプについて異なる場合であっても、ヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA及びIgE)を精製することを含むことが好ましい。親和性精製は、プロテインAクロマトグラフィ、プロテインGクロマトグラフィ、プロテインA+Gクロマトグラフィ(例えば、例としてプロテインA/Gクロマトグラフィ、又はプロテインA及びプロテインG樹脂の混合など)、IgG親和性精製(例えばPierce製のMELON GEL™を使用する)、抗免疫グロブリン抗体親和性精製(抗免疫グロブリン抗体が単独で又は一ないしはすべてのアイソタイプについて特異性を組み合わせて用いられる場合、例えば抗ヒトIgG、IgA、IgM及びIgEの組み合わせ、各々のアイソタイプの特異的親和性精製のためにカップリングされたもの)、他の免疫グロブリン結合特性を有する吸収剤(例えばPIERCE T-GEL™)などによって達成できる。好ましくは、親和性精製はプロテインA+G親和性精製を含んでなる。

10

【0079】

親和性精製(例えばプロテインA+G親和性精製)は、好ましくは2、3、4又はそれ以上の回数、最も好ましくは3回繰り返す。親和性カラムを負荷した後に、固相を洗浄して非特異的結合を取り除くことが好ましく、免疫グロブリンは様々な溶出緩衝液を用いて溶出できる。好適な溶出緩衝液は、その後の細胞ベースの中和抗体アッセイと互換性を持つ。例えば、溶出緩衝液は低pHであってもよく、及び/又は塩酸(HCl)、グリシン、トリフルオロ酢酸(TFA)、酢酸などを含有してもよい。場合によって、溶出緩衝液は基本的なバッファにて中和され、及び/又は、リン酸緩衝食塩水(PBS)は中和抗体アッセイを行う前に加えられてもよい。

20

一実施態様では、精製された免疫グロブリンは、更なる精製である濃縮工程の処理に供する。例えば、免疫グロブリンは、例えば、濃縮器を用いて濃縮される、又は沈殿して再懸濁される、又は凍結乾燥されるなどしてもよい。

次いで、濃縮されたか又は精製された免疫グロブリンを含有する試料は、以下の項目に記載のものなどの中和抗体アッセイに供することができる。試料は、精製されたFc含有ポリペプチド、例として、被検体の免疫グロブリン(自己抗体及び抗薬剤抗体を含む)、治療用抗体及びイムノアドヘシン、及びリウマチ因子(RF)を含んでもよい。

30

中和抗体アッセイが本明細書中の好適な細胞ベースのバイオアッセイであるが、前処理された試料は、例えば細胞に対する患者血清中の薬剤の機能的な活性を測定できる薬力学的(PD)バイオマーカーなどによる他の細胞ベースの生物学的アッセイに供してもよい。

【0080】

III. 中和抗体アッセイ

本明細書中の試料前処理方法は、薬剤、例えば治療用抗体又はイムノアドヘシン又は他の生体内因子、又はB細胞表面マーカーと結合するアンタゴニスト又は抗体(例えばCD20を結合する抗体)に対する中和抗体を検出するためのアッセイを組み合わせることで好ましい。アッセイは、治療用抗体、イムノアドヘシン又は他の薬剤にて処置された患者からの生体試料の、薬剤の生物活性を遮断する能力を決定する。この場合、遮断活性は薬剤の減弱した効果を示しうる。

40

中和抗体は、注入された薬剤の予想される薬理的なレベルを減らし、それによって、有効性を減少させるか又は応答の可能性をより可変的にしうる。中和抗体は、再治療の際の血清病又は免疫複合体病と関係しうる。例えば、中和抗体応答が見られる場合、治療は中止するか又は延期してもよい、又は、用量を増加してもよく、又は、患者は薬剤の有効性を向上させる及び/又は薬剤に対する任意の免疫応答を低減する薬剤を与えられてもよい。中和抗体応答が観察される場合に、免疫応答を減らすために処置を組み合わせること

50

ができる様々な免疫抑制剤は公知であり、そのような例示的な薬剤は本明細書中に具体的に記載される。

【0081】

患者の治療の際の臨床医によるアッセイ結果の使用に加えて、HAM A、HACA又はHAAデータとともに、抗薬剤抗体の中和特性は、免疫原性又は免疫原性の傾向、並びに薬剤の免疫原性の性質を示す。この情報は、薬物安全性を評価して、治療への患者の潜在的な免疫応答を予測する際に有用である。

CD20抗体又はB細胞表面マーカーを結合する他のアンタゴニストに関して、そのみによる治療によって、部分的なB細胞枯渇が生じる、B細胞過剰活性化が生じている場合(例えばSLEのように)、又は持続性の疾患症状が何年もある場合(例えばSLE及びRAのように)に、アッセイが特に有用であると考えられる。

自己免疫性疾患を治療するために薬剤で治療されている患者に関するアッセイの使用は、特に望ましい。様々な自己免疫性疾患が本明細書中に記載されており、例として、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、ウェゲナー病、炎症性腸疾患(IBD)、突発性又は免疫性の血小板減少性紫斑病(ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、自己免疫性血小板減少、多発性硬化症(MS)、乾癬、IgA腎症(ネフロパシー)、IgM多発性神経炎、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群、糸球体腎炎、自己免疫性溶血性貧血などが含まれる。

【0082】

本発明の好適な実施態様では、生物活性アッセイには、細胞ベースのバイオアッセイ、例として、補体依存性細胞障害作用(CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、アポトーシス、イオンチャネル調節又は細胞増殖の阻害を決定するアッセイが含まれる。

好ましくは、アッセイはCDC活性を調べる。本発明の実施態様では、治療用抗体又はイムノアドヘンシが結合する抗原(例えばCD20などのB細胞表面マーカー)を発現している細胞は、薬剤の存在下(又は非存在下)において、補体(好ましくはヒト補体)並びに該薬剤で処置される患者からの生体試料に曝されてもよい。本出願は、4つの構成成分(細胞、補体、薬剤及び生体試料)を同時又はいずれかの順序で連続して曝すことを意図する。これらの可能性はすべて本明細書中に包含される。しかしながら、本発明の好適な実施態様では、生体試料(例えば血清)は薬剤と組み合わせ、薬剤の活性を中和し、次いで、細胞と補体をこの混合物に添加する。

リツキシマブ中和抗体アッセイとしての補体依存性細胞障害作用(CDC)を図4に示す。リツキシマブのFabドメインは、Bリンパ球上の細胞表面抗原であるCD20と結合する。結合すると、リツキシマブのFcドメインは補体を補充して、細胞溶解を媒介する。インビトロでは、リツキシマブは、正常ヒト血清補体とともにWIL2-S細胞に加えらる。細胞溶解は、アラマブルー^{T M}又はCELLTITER GLO(登録商標)のいずれかを用いて生きている細胞のミトコンドリア代謝活性に対する比率を測定する(上方パネル)。患者血清中のリツキシマブ中和抗体を評価するためにこのCDCアッセイを用いる場合、補体及び細胞を投与する前にリツキシマブを患者抗体と予めインキュベートする(下方パネル)。中和抗体はリツキシマブの効力を低減させ、その結果、代謝的に活性な生細胞がより多くなる。患者の血清における中和活性の量は、ネガティブコントロールと比較して、アラマブルー^{T M}又はCELLTITER GLO(登録商標)シグナルの増加に対する比率を測定する。

【0083】

曝露工程の後に、CDC活性を、好ましくは細胞生存率を評価することによって(すなわち、生きている細胞を定量化することによって)決定する。未処理の細胞と比較してヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンブルー(Moore等 Cytotechnology 17:1-11 (1995)を参照)、アネキシンV又は7AADの取り込みにより評価される膜完全性の損失の決定、米国特許第2005/0032130号A1 (Beresini及びSong)に記載のアラマブルー^{T M}(レサズリン)アッセイ、又は後述するようなアッセイ読み取りのためにCELLTITER-GL

10

20

30

40

50

O(登録商標)蛍光細胞生存率アッセイ(Luminescent Cell Viability Assay)を用いた変更アッセイ法などを含め、細胞生存率を決定するための様々な方法が有用である。CDCを媒介する抗体又はイムノアドヘシンの能力の減少は、中和抗体が生体試料中に存在することを示しうる。

細胞ベースのアッセイのために、通常、抗体又はイムノアドヘシンが結合する抗原を発現する細胞株を使用するであろう。CD20抗原の場合、WIL2-S細胞(ATCC CRL 8885、アメリカ培養細胞系統保存機関)又はWIL2-NS(ATCC CRL-8155)、SU-DHL-4(DSMZ番号ACC 495、Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen)、又はCD20発現リンパ芽B細胞株を含め、様々な細胞が有用である。CD20陽性細胞を用いるCDCアッセイは、Idusogie等、J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)、Idusogie等、J. Immunol. 166:2571-2575 (2001)、Reff等 Blood 83(2): 435-445 (1994)、米国特許第6194551号B1(Idusogie等)、及び米国特許第5736137号(Anderson等)に記載されている。

10

【0084】

アッセイがADCCを評価する場合、抗体又はイムノアドヘシンは、治療用抗体が結合する抗原を発現している細胞のナチュラルキラー細胞(NK細胞)及び/又は末梢血単核細胞(PBMC)細胞溶解を媒介する能力についてアッセイされてもよい。CD20抗原の場合、WIL2-S細胞が使われてもよく、Shields等、J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)及び国際公開第00/42072号(Presta, L.)はそれらの細胞を用いる例示的なADCCアッセイを記述する。またClynes等 Nature Medicine 6:443-6 (2000)も参照のこと。また、米国特許第5736137号(Anderson等)は、CD20陽性細胞を用いたADCCアッセイを記述する。

20

アポトーシスは、例えばB細胞のプログラムされた細胞死を指し、様々な異なるアッセイ、例として、アネキシンVの結合、DNAの分裂、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化及び/又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)により測定されてもよい。アポトーシスを誘導するための抗体(例えばリツキシマブ)の能力を決定するアッセイは、例えばShan等 Cancer Immunol Immunother 48:673-83 (2000)、Pedersen等 Blood 99:1314-9 (2002)、Demidem等 Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186 (1997)に記載されている。

【0085】

細胞、例えばアンタゴニスト又は抗体が結合する抗原を発現する癌性のB細胞の増殖を阻害する抗体又はイムノアドヘシンの能力は、様々な異なるアッセイによって、評価できる。Taji等 Jpn J. Cancer Res 89:748-56 (1998)は、CD20抗体によるCD20陽性Bリンパ腫細胞株の増殖阻害を測定する方法を記述する。

30

本明細書中の中和抗体アッセイを使用して、薬剤(例えばCD20を結合するもの)の有効性を、薬剤にて処置された患者の生体試料の該薬剤の生物活性を遮断する能力を測定することによって決定してもよい。このとき、コントロール試料と比較して生物活性が減弱していれば、患者が問題の薬剤に対する抗体を生じている、及び/又はそのような抗体が少なくともある程度その生物活性を中和できることを示す。有意な応答は、薬剤の変更したクリアランスに応じた一次薬剤の用量を変更する必要性及び/又は中和抗体発達から安全性関連問題を生じるものでもよい。例えば、同じ量の前処理相対物(例えばHAM A、HACA及びHAAネガティブ)と比較して、提示の濃度の薬剤のおよそ20%以上(例えばおよそ20%からおよそ100%の範囲で)の活性を中和する試料は薬剤に対する中和抗体について陽性であるとしてもよい。

40

本明細書中の好適な中和抗体アッセイは、2005年2月10日公開の米国特許公開第2005/0032130号A1(Beresini及びSong)に開示されたものに基づくが、以下の実施例1のより詳述した様々な点について変更される。特に、生体試料(すなわち血清)はここでは前処理した血清であり、ここではアラマーブルー^{T M}(レサズリン)でなく、CELLTITER-GLO(登録商標)蛍光細胞生存率アッセイがアッセイ読み取りであり、使用するコントロール抗体は、ヤギ抗リツキシマブでなく、カニクイザルプロテインA精製(HER

50

2 吸収)調製物であり、そして、バッファ、容量、補体、コントロール、血清マトリック ス効果、データ分析及び解釈は、実施例 1 にて説明したように変更している。

【 0 0 8 6 】

I V . 抗体の製造

本明細書中の対象とする薬剤は、治療用抗体、例えば B 細胞表面上のマーカ ーに結合する抗体、特に C D 2 0 に結合する抗体であってもよい。したがって、抗体の製造方法をこ こに記載する。

抗体の製造又はスクリーニングのために用いる抗原は、例えば、所望のエピト ープを含む該抗原ないしはその一部の可溶性形態であってもよい。あるいは又は更に、前記抗原を その細胞表面上に発現する細胞を抗体の製造又はスクリーニングに用いることができる。 10
抗体の製造に有用な抗原の他の形態は当業者に明らかである。

以下は、本発明に従って用いた抗体の製造の例示的技術として記載する。

【 0 0 8 7 】

(i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下 (s c)、腹腔内 (i p)又は筋肉内 (i m)注射することにより動物に産生される。免疫化される種 において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清ア ルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビターに関連抗原を、二官 能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(シ ス테인残基による抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基による)、グルタル 20
アルデヒド、無水コハク酸、S O C l ₂、又は R と R ¹ が異なったアルキル基である R ¹ N = C = N R により抱合させることが有用である。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート 1 0 0 μ g 又は 5 μ g (それぞれウサギ 又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント 3 容量と併せ、この溶液を複数部位に 皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫化 する。1 か月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の 1 / 5 ないし 1 / 1 0 のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追 加免疫する。7 ないし 1 4 日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は 、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原のコンジュ ゲートであるが、異なったタンパク質にコンジュゲートさせた、及び / 又は異なった架橋 30
剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートで追加免疫する。コンジュゲートはまた タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することもできる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【 0 0 8 8 】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわ ち、集団を構成する個々の抗体が、一般にわずかながら存在する突然変異体などのモノク ローナル抗体の産生中に生じうる突然変異体を除いて同一及び / 又は同じエピトープに結 合するものである。よって、「モノクローナル」との修飾詞は、別個又はポリクローナル の抗体の混合物ではなく、抗体の特性を示すものである。 40

例えば、モノクローナル抗体は、Kohler 等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載 されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換え D N A 法(米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスター を上記したようにして免疫し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を 生産するか又は生産することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をイン ビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適 当な融剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoc lonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増 50

殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0089】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及びアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville, Maryland USAから入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

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

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson等, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、DMEM又はRPMI-1640培地が含まれる。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

【0090】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

モノクローナル抗体をコードしているDNAは、常法を用いて(例えば、マウスの重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に単離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、そうしないと免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を達成することができる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPlueckthum, Immunol. Revs., 130:151-188(1992)がある。

【0091】

更なる実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから単離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の単離を記述している。続く刊行物は、鎖混合による高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生産(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための

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

DNAはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を、相同的マウス配列に代えて置換することにより(米国特許第4816567号; Morrison等, *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることで修飾できる。

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに置換され、又は抗体の1つの抗原結合部位の変域ドメインに置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0092】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は従来からよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」変域ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、基本的にはウィンターと共同研究者の方法(Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986)、Riechmann等, *Nature*, 332:323-327 (1988)、Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536(1988))に従って、ヒト抗体の該当する配列を高頻度可変領域配列に置換することにより実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4816567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

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

【0093】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0094】

(iv) ヒト抗体

ヒト化のための別法により、ヒト抗体を生産することができる。例えば、内因性の免疫グロブリン産生がなくともヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが今は可能である。例えば、

キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggerman等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5591669号、同5589369号及び同5545807号を参照されたい。

【0095】

あるいは、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348:552-553(1990))を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13のメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかにおいてイン-フレームをクローンする。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖のDNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がなされる。よって、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)を参照のこと。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clackson等, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライブラリーからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成可能で、抗原(自己抗原を含む)とは異なる配列の抗体を、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

またヒト抗体は、活性化B細胞によりインビトロで生産してもよい(例えば米国特許第5567610号及び同5229275号を参照)。

【0096】

(v) 抗体断片

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(ab')₂断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。国際公開93/16185号; 米国特許第5571894号; 及び米国特許第5587458号を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

【0097】

(vi) 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、B細胞表面マーカーの2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体ではB細胞表面マーカーを結合し、更に異なるB細胞表面上のマーカーが結合しうる。あるいは、抗B細胞表面マーカーは、B細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFc

10

20

30

40

50

R III(C D 1 6)等の I g G(F c R)に対する F c レセプター、又は T 細胞レセプター分子(例えば C D 2 又は C D 3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は B 細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体は B 細胞表面マーカー結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシン A 鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は全長抗体又は抗体断片(例えば F(a b')₂ 二重特異性抗体)として調製することができる。

【 0 0 9 8 】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は 1 0 個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィ工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第 9 3 / 8 8 2 9 号及びTrauneker等, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C H 2 及び C H 3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしている D N A を、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される 3 つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、3 つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも 2 つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2 又は 3 個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【 0 0 9 9 】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第 9 4 / 0 4 6 9 0 号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインの C_H 3 ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第 1 抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第 2 の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【 0 1 0 0 】

二重特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること

10

20

30

40

50

(米国特許第4676980号)及びHIV感染の治療(国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4676980号などに記されている。

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

【0101】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelný等, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により2つの異なった抗体のFab'部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアポディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

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

【0102】

V. イムノアドヘシンの産生

他の実施態様では、本明細書中の薬剤は、イムノアドヘシン、例えばBR3-Ig又はTNF-イムノアドヘシンであってもよい。イムノアドヘシンを作製するための例示的な方法は以下に詳述する。

最も単純で最も直接的なイムノアドヘシン設計は、アドヘシン(例えばレセプターの細胞外ドメイン(ECD))の結合ドメインと免疫グロブリン重鎖のFc領域を組み合わせる。通常、本発明のイムノアドヘシンを調整する場合、アドヘシンの結合ドメインをコードする核酸をC末端でイムノグロブリン定常ドメイン配列のN末端をコードする核酸に融合させるが、N末端融合は不可能である。

典型的には、そのような融合において、コード化されるキメラポリペプチドは免疫グロブリン重鎖の定常ドメインの機能的に活性なヒンジ、C_H2及びC_H3ドメインを保持する。融合はまた定常ドメインのFc領域のC末端、又は重鎖のC_H1又は軽鎖の対応する領域にN末端に直ぐになされる。融合がなされる正確な部位は重要なものではない；特定の部位がよく知られており、イムノアドヘシンの生物活性、分泌、又は結合特性を最適化するために選択されうる。

【0103】

好ましい実施態様では、アドヘシン配列が免疫グロブリンG₁(IgG₁)のFc領域のN末端に融合される。アドヘシン配列に重鎖定常領域全体を融合させることができる。し

かし、より好ましくは、I g GのF cを化学的に定めるパライン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域に始まる配列(すなわち、重鎖定常領域の最初の残基を114として残基216)、又は他の免疫グロブリンの類似部位が融合において使用される。特に好適な実施態様では、アドヘシニアミノ酸配列はI g G重鎖の(a)ヒンジ領域及びC_H2及びC_H3又は(b)C_H1、ヒンジ、C_H2及びC_H3ドメインに融合される。

二重特異的イムノアドヘシンについては、イムノアドヘシンは多量体として、特にヘテロ二量体又はヘテロ四量体として組み立てられる。一般には、これらの組み立てられた免疫グロブリンは既知の単位構造を有している。基本的な四鎖構造単位はI g G、I g D及びI g Eが存在する型である。四鎖単位はより高分子量の免疫グロブリンにおいて繰り返される；I g Mは一般にジスルフィド結合によって一緒に保持される四つの基本単位の五量体として存在する。I g Aグロブリン、そして時折I g Gグロブリンが血清中に多量体型で存在しうる。多量体の場合、四つの単位の各々は同じでも異なってもよい。

【0104】

ここに記載した範囲内の様々な組み立てられたイムノアドヘシンの例は以下に概略的に模式化される：

- (a) A C_L-A C_L；
- (b) A C_H-(A C_H, A C_L-A C_H, A C_L-V_HC_H, 又はV_LC_L-A C_H)；
- (c) A C_L-A C_H-(A C_L-A C_H, A C_L-V_HC_H, V_LC_L-A C_H, 又はV_LC_L-V_HC_H)；
- (d) A C_L-V_HC_H-(A C_H, 又はA C_L-V_HC_H, 又はV_LC_L-A C_H)；
- (e) V_LC_L-A C_H-(A C_L-V_HC_H, 又はV_LC_L-A C_H)；及び
- (f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂；

ここで、各Aは同一又は異なったアドヘシニアミノ酸配列を示し；

- V_Lは免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；
- V_Hは免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；
- C_Lは免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；
- C_Hは免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
- nは1より大きい整数であり；
- Yは共有結合架橋剤の残基を示す。

【0105】

簡略化のために、先の構造はキーとなる特徴を示しているのみである；これらは、免疫グロブリンの結合する(J)又は他のドメインを示していないジスルフィド結合も示していない。しかし、そのようなドメインが結合活性に対して必要である場合は、それらを構築して、免疫グロブリン分子にそれらが占める通常的位置に存在させることができる。

或いは、アドヘシン配列は、キメラ重鎖を含んでなる免疫グロブリンが得られるように、免疫グロブリン重鎖と軽鎖配列の間に挿入することができる。この実施態様では、アドヘシン配列は免疫グロブリンの各アームの免疫グロブリンの重鎖の3'末端に、ヒンジとC_H2ドメインの間、又はC_H2とC_H3ドメインの間の何れかで融合される。同様な作成物がHoogenboom等, Mol. Immunol. 28:1027-1037(1991)によって報告されている。

免疫グロブリン軽鎖の存在は本発明のイムノアドヘシンにおいて必要ではないけれども、免疫グロブリン軽鎖はアドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合的に結合するか、アドヘシンに直接的に融合されるかもしれない。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは典型的にはアドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードするDNAと同時発現される。分泌時にハイブリッドの重鎖及び軽鎖が共有結合的に結合されて、二つのジスルフィド結合で結合した免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含んでなる免疫グロブリン様構造を提供する。そのような構造の調製に好適な方法は、例えば1989年3月28日に発行された米国特許第4816567号に開示されている。

【0106】

イムノアドヘシンは最も簡便には免疫グロブリンcDNA配列にインフレームでアドヘシン部分をコードするcDNA配列を融合させることにより構築される。しかし、ゲノム

10

20

30

40

50

免疫グロブリン断片への融合もまた使用することができる(例えば、Aruffo等,Cell61:1303-1313(1990);及びStamenkovic等,Cell66:1133-1144(1991)を参照されたい)。融合の後者のタイプは、発現に対してI g調節配列の存在を必要とする。I g G重鎖定常領域をコードするc D N Aは、脾臓又は抹消血リンパ球から取り出されたc D N Aライブラリーからの公開されている配列に基づいて、ハイブリダイゼーションにより、又はポリメラーゼ鎖反応(P C R)法により単離することができる。「アドヘシン」をコードするc D N Aとイムノアドヘシンの免疫グロブリンが、選ばれた宿主細胞において効率的な発現を指示するプラスミドベクター内にタンデムに挿入される。

本明細書中のイムノアドヘシンには、例えば国際公開第02/092620号に記載のように作製することができるペプチボディが含まれる。

対象とするイムノアドヘシンを記載している他の文献には、B C M A - F cを記載する国際公開第01/12812号; B A F F - R - F cに関する国際公開第02/24909号; T A C I - I gに関する国際公開第00/40716号などがある。

【0107】

V I . 抗体又はイムノアドヘシンのコンジュゲート及び他の修飾

本明細書中の抗体又はイムノアドヘシンは、場合によって、他の薬剤、例えば細胞障害性剤又はサイトカイン(例えばI L 2 ; 例として国際公開第2005/016969号を参照)にコンジュゲートする。

結合は、通常共有結合で達成され、その正確な性質はターゲティング分子及びC D 20アンタゴニスト又は抗体ポリペプチド上の結合部位により測定されるであろう。一般的に、非ペプチド性剤は、化学的な修飾によって、抗体又はイムノアドヘシンに導入された反応基、糖鎖又はアミノ酸側鎖によって、抗体又はイムノアドヘシンへのコンジュゲートを可能にするリンカーの負荷により修飾される。例えば、薬剤は、リジン残基の -アミノ基により、遊離した -アミノ基により、システイン残基に対するジスルフィド交換により、又は、シッフ塩基結合により様々な求核基を含有する薬剤の付着を可能にする過ヨウ素酸を有する糖鎖の1,2-ジオールの酸化により付着されてもよい。例として米国特許第4256833号を参照。タンパク質修飾剤には、アミン反応性の試薬(例えば、反応性エステル、イソチオシアン酸(isothiocyanate)、アルデヒド及びスルホニルハロゲン化物)、チオール反応性の試薬(例えば、ハロアセチル誘導体及びマレイミド)、及びカルボン酸反応性の試薬及びアルデヒド反応性の試薬が含まれる。C D 20アンタゴニスト又は抗体ポリペプチドは、二官能性架橋試薬の使用によってペプチド薬剤に共有結合してもよい。ヘテロ二官能試薬はより共通して用いられており、2つの異なる反応性分子(例えば、アミン反応性とチオール、ヨードアセトアミド又はマレイミド)の使用によって、2つの異なるタンパク質のカップリングの制御が可能となる。このような連結剤の使用は公知技術である。例として米国特許第4671958号を参照。ペプチドリンカーもまた使用されてよい。あるいは、抗体又はイムノアドヘシンは、融合ポリペプチドの調製によってペプチド分子に連結されてもよい。

【0108】

更なる二官能性タンパク質カップリング剤の例には、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)が含まれる。

あるいは、抗体/イムノアドヘシン及び薬剤を含んでなる融合タンパク質を、例えば組み換え技術又はペプチド合成で製造してもよい。

【0109】

10

20

30

40

50

抗体又はイムノアドヘシンの他の修飾がここで検討される。例えば、抗体イムノアドヘシンは、様々な非タンパク質性(nonproteinaceous)のポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーの1つに結合されてもよい。

ここで開示されている抗体又はイムノアドヘシンはリポソームとして処方することもできる。アンタゴニスト又は抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したりリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

10

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

【0110】

抗体又はイムノアドヘシンのアミノ酸配列の修飾を考察する。例えば、抗体又はイムノアドヘシンの結合親和性及び/又は他の生物学的特性が改善されることが望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、適当なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終構造物に達するまでなされるが、その最終構造物は所望の特徴を有する。また、アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数又は位置の変化など、抗体の翻訳後過程を変更しうる。

20

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

30

【0111】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び/又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗体又は細胞障害ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素又はポリペプチドの抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

40

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基に異なる残基が挿入されている。抗体(一又は複数)の置換突然変異について最も関心ある部位は高度可変領域を含むが、FR交互変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表2に示す。これらの置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表2に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化が導入され、生成物がスクリーニングされ

50

うる。

【 0 1 1 2 】

表 2

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノロイシン	Leu
Leu (L)	ノロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノロイシン	Leu

10

20

30

【 0 1 1 3 】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又はヘリックス配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸はその側鎖の性質の類似性に応じて分類される(Biochemistry, 第2版., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)中のA. L. Lehninger) :

40

(1)非極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2)荷電のない極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3)酸性 : Asp (D), Glu (E)

(4)塩基性 : Lys (K), Arg (R), His(H)

あるいは、天然に生じる残基は共通の側鎖性質に基づいてグループに分類してもよい。

50

- (1)疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2)中性の親水性：cys、ser、thr、asn、gln；
- (3)酸性：asp、glu；
- (4)塩基性：his、lys、arg；
- (5)鎖配向に影響する残基：gly、pro；
- (6)芳香族：trp、tyr、phe。

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

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

【0114】

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

抗体のアミノ酸変異の他の型は、抗体又はイムノアドヘシンの元のグリコシル化パターンを変更する。このような変更とは、抗体に見い出される一又は複数の糖鎖部分の欠失、及び/又は抗体又はイムノアドヘシンに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加等を含む。

【0115】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの糖類のうち一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

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

【0116】

タンパク質がFc領域を含有する場合、それに接着する炭水化物を変更してもよい。例えば、抗体のFc領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国特

10

20

30

40

50

許公開出願番号2003/0157108号(Presta, L.)に記載される。CD20抗体組成物に関しては米国公開特許第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)も参照のこと。抗体のFc領域に接着した炭水化物内のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を二分する抗体は、国際公開第03/011878号(Jean-Mairet等)、及び米国特許第6602684号(Umana等)に参照されている。抗体のFc領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公開第97/30087号(Patel等)に報告される。また、抗体のFc領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公開第98/58964号(Raju, S.)及び国際公開第99/22764号(Raju, S.)も参照のこと。

【0117】

本明細書中の好適なグリコシル化変異形はFc領域を含有し、Fc領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善されたADCC機能を有する。場合によって、Fc領域は、更にADCCを改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えばFc領域の位置298、333および/または334の置換(Eu残基番号付け)を更に含む。「脱フコース化」または「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む：米国公開特許第2003/0157108号, Presta, L; 国際公開第2000/61739号; 国際公開第2001/29246号; 米国公開特許第2003/0115614号; 米国公開特許第2002/0164328号; 米国公開特許第2004/0093621号; 米国公開特許第2004/0132140号; 米国公開特許第2004/0110704号; 米国公開特許第2004/0110282号; 米国公開特許第2004/0109865号; 国際公開第2003/085119号; 国際公開第2003/084570号; 国際公開第2005/035778号; 国際公開第2005/035586号(フコシル化のRNA干渉(RNAi)を記載); Okazaki等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); およびYamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失Lecl3CHO細胞(Ripka等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)); 米国公開特許第2003/0157108号, Presta, L; および国際公開第2004/056312号, Adams等, 特実施例11)、およびノックアウト細胞株、例として-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8,-ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))などがある。

【0118】

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

エフェクター機能に関して、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)及び/又は補体依存性細胞毒性(CDC)を向上させるために、本発明の抗体を修飾することが望ましい。このことは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸修飾を導入することで達成される。あるいは又は加えて、Fc領域にシステイン残基を導入することによってこの領域での鎖間のジスルフィド結合形成が起こりうる。故に、生成されたホモ二量体抗体は内部移行能を向上及び/又は補体媒介性細胞障害及びADCCを増強する。Caron等, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照。抗腫瘍活性が亢進されたホモ二量体抗体もまた、Wolff等, Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されているような異種性二機能性交差結合を用いて調製されうる。又は、抗体を二重のFc領域を持つように操作して、それによって補体媒介性溶解及びADCC能を亢進した。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

【0119】

国際公開第00/42072号(Presta, L.)は、抗体がそのFc領域内にアミノ酸置換

10

20

30

40

50

を含有する場合のヒトエフェクター細胞の存在下で改善されたA D C C機能を有する抗体を述べる。好ましくは、改善されたA D C Cを有する抗体はF c領域内の位置298、333及び/又は334に置換を有する(残基のE u番号付け)。好ましくは、変更されたF c領域は、それらの位置のうち1、2又は3つに置換を含有する又はそれらからなるヒトI g G 1 F c領域である。そのような置換は場合によって、C 1 q結合及び/又はC D Cを亢進する置換(一又は複数)と組み合わせられる。

変更したC 1 q結合及び/又はC D Cを有する抗体については、国際公開第99/51642号、米国特許第6194551号B1、米国特許第6242195号B1、米国特許第6528624号B1及び米国特許第6538124号(Idusogie等)に記載される。抗体は、そのF c領域のアミノ酸位置270、322、326、327、329、313、333及び/又は334の一以上にアミノ酸置換を含有する(残基のE u番号付け)。位置326、327、333及び/又は334の一又は複数の残基の置換はC 1 q結合及び/又はC D C機能を改善することができる。

【0120】

抗体の血清半減期を延長するために、例として米国特許第5739277号に記載されているように抗体(特に抗体断片)内にサルベージレセプター結合エピトープを組み込む方法がある。ここで用いる、「サルベージレセプター結合エピトープ」は、I g G分子のインビボ血清半減期延長に關与するI g G分子(例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃又はI g G₄)のF c領域のエピトープを表す。また、F c領域内に置換を有し、血清半減期が延長された抗体は国際公開第00/42072号(Presta, L.)に記載される。

新生児のF cレセプター(F c R n)への結合が向上し、半減期が増加している抗体は、国際公開第00/42072号(Presta, L.)及び米国公開特許第2005/0014934号A1(Hinton等)において、記述される。これらの抗体は、その中にF c R nへのF c領域の結合を向上させる一又は複数の置換を有するF c領域を含んでなる。例えば、F c領域は、一又は複数の位置238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428又は434(残基のE u番号付け)に置換を有してもよい。向上したF c R n結合を有する好適なF c領域-含有抗体変異体は、そのF c領域の位置307、380及び434(残基のE u番号付け)のうち1、2又は3にアミノ酸置換を含んでなる。

3つ以上(好ましくは4つ)の機能的抗原結合部位を有する遺伝的に操作した抗体もまた考慮される(米国公開特許第2002/0004587号A1, Miller等)。

【0121】

V I I . 治療用製剤

本発明に関連して使用される抗体又はイムノアドヘシンの治療的剤形は、所望の純度を有する抗体又はイムノアドヘシンを選択的に薬剤的許容可能な担体、賦形剤、安定剤と混合して凍結乾燥の剤形又は液状溶液の形態の貯蔵に適するものである(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物E D T A等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Z n-タンパク質錯体)又はTWEENTM、PLURON

ICS™、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0122】

例示的抗CD20抗体の剤形は国際公開第98/56418号に記載されており、出典明記により特別に本明細書中に援用される。この公報は、2～8で2年間の最小限の貯蔵期間を持つように、リツキシマブ40mg/mL、25mM酢酸塩、150mMトレハロース、0.9%ベンジルアルコール、及び0.02%ポリソルベート20、pH5.0を含む液状複数回用量の剤形である。目的の他の抗CD20剤形は、リツキシマブ10mg/mL、塩化ナトリウム9.0mg/mL、クエン酸ナトリウム二水和物7.35mg/mL、ポリソルベート800.7mg/mL、及び注入用の滅菌水を含むpH6.5のものである。

凍結乾燥剤形は米国特許第6267958号(Andya等)に記載されるように、皮下的投与に適する。そのような凍結乾燥剤形は適当な希釈剤で高いタンパク質濃度に再編成されるかもしれない、また再編成された剤形はここで治療される哺乳動物に皮下注射されうる。

また、抗体又はイムノアドヘシンの結晶形態も考慮される。例えば米国公開第2002/0136719号A1(Shenoy等)も参照のこと。

【0123】

また、本明細書中の製剤は、治療される特定の徴候のための必要に応じて、一以上の活性な化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有するものを含有してもよい。例えば、以下の治療の項目において検討されたものなどの第二の医薬をさらに提供することが望ましい場合もある。そのような他の薬剤の種類と有効量は、例えば製剤中に存在する抗体の量、治療される自己免疫性疾患のタイプ、及び被検体の臨床的パラメータに依存する。これらは一般的に、前記の使用と同じ服用量と投薬経路で用いられるか、又は前記の用いた服用量のおよそ1から99%で用いられる。

また、活性成分は、例としてコアセルベーション技術又は界面重合化により調製したマイクロカプセル、例として、個々のコロイド状のドラッグデリバリーシステム(例として、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョン中の、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタサイクリン)マイクロカプセル中に含まれているかもしれない。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0124】

持続性徐放剤が調製される。持続性徐放剤の好適な例は、抗体を含む固形疎水性ポリマーの準透過性基質を含むものであり、基質は、造形品、例としてフィルム、又はマイクロカプセルの形である。持続性徐放基質の例として、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチルL-グルタミン酸の共重合体、非分解性のエチレンビニール酢酸塩、分解性の乳酸グリコール酸共重合体、例としてLUPRON DEPOT™(乳酸-グリコール酸共重合体及びロイプロリド酢酸塩で構成された注入可能マイクロスフェア)、及びポリD-(-)-3ヒドロキシブチリン酸を含む。

インビボ投与のために使用される製剤は無菌でなければならない。これは濾過滅菌膜による濾過によって容易に達成されうる。

【0125】

VIII. 自己免疫性疾患被検体の治療

本明細書中の本発明は、自己免疫性疾患を有する被検体を処置するための方法であって、自己免疫性疾患を治療するために被検体に治療用抗体、イムノアドヘシン又は他の生物薬剤が投与される；被検体から生体試料を得る；生体試料から免疫グロブリンを親和性精製する；そして、精製された免疫グロブリンを中和抗体アッセイに供することを含んでなる方法を提供する。好ましくは、生体試料は血清であり、中和抗体アッセイの実施を妨げる干渉を含有することが明らかとなってもよい。

10

20

30

40

50

本明細書中で治療されうる様々な自己免疫性疾患は、前記の定義の項目に記載される。例示的な好適な自己免疫性疾患には、自己免疫性リウマチ性疾患(例えば関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群、強皮症、狼瘡、例えばSLE及びループス腎炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、乾癬の関節炎)、自己免疫性胃腸及び肝臓疾患(例えば炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病)、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、セリアック病)、血管炎(ANCA関連血管炎、チャージ-シュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症及び多発性動脈炎)、自己免疫性神経障害(例えば多発性硬化症、眼球クローヌス筋硬直症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、自己免疫性多発性神経炎)、腎臓疾患(糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、ベルジェ病)、自己免疫性皮膚科疾患(乾癬、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、皮膚紅斑性狼瘡)、血液学的な疾患(血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病、自己免疫溶血性貧血)、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患、例えば内耳疾患及び聴力障害、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植、及び、自己免疫性内分泌性疾患(糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病、自己免疫性甲状腺疾患(グレース病、甲状腺炎)が含まれる。より好適な自己免疫性徴候には、関節リウマチ(RA)、SLE、潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレース病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎及び糸球体腎炎があり、RA及びSLEが本明細書中の目的のためには最も好ましい。

10

20

【0126】

本明細書中の好適な治療用抗体は、B細胞表面マーカーに結合する抗体、最も好ましくはCD20抗体、最も好ましくはキメラ、ヒト化、又は、ヒトのCD20抗体、より好ましくは、リツキシマブ、ヒト化2H7、2F2(HuMax-CD20)ヒトCD20抗体(Genmab)、ヒト化A20抗体(Immunomedics)、抗CD20アウリストアチンEコンジュゲート(Seattle Genetics)、抗CD20-IL2(EMD/Biovation/City of Hope)、抗CD20MAb療法(EpiCyte)、又は抗CD20抗体TRU015(Trubion)などである。なおより好ましくはリツキシマブ又はヒト化2H7である。

本明細書中の対象とする他の治療用抗体又はイムノアドヘシンには、リツキシマブ、ヒト化2H7、2F2(HuMax-CD20)ヒトCD20抗体、ヒト化A20抗体ないしはIMMU-106、TRU015、腫瘍壊死因子(TNF)-抗体、インフリキシマブ、CDP571、MAK-195、アダリムマブ、ペグ化されたTNF抗体断片、CDP-870、抗TNFポリクローナル抗体、PassTNF、インテグリン抗体、エファリズマブ、ナタリズマブ、BAFF抗体、BR3抗体、BAFFレセプター抗体、BlyS抗体、ベリムマブ、CD37抗体、TRU016、CD22抗体、エピラツズマブ、アピオジェンCD22抗体、CMC544、コンボトックス、BL22、LIF226、VEGF抗体、VEGFレセプター抗体、ペバシズマブ、抗HER抗体、トラスツズマブ、パーツズマブ、セツキシマブ、抗IgE抗体、オマリズマブ、IL-21抗体、イムフェロン抗B細胞抗体、1D09C3、Lym-1抗体、オンコリン、ISF154、ゴミリキシマ、IL-6レセプター抗体、アトリズマブ、IL-15抗体、HuMax-IL-15、ケモカインレセプター抗体、CCR2抗体、MLN1202、抗補体抗体、C5抗体、エキュリズマブ(eculizuma)、ヒト免疫グロブリンの経口製剤、IgPO、IL-12抗体、ABT-874、テネリキシマブ、CD40抗体、ヒト化S2C6、TNX100、CD52抗体、カンパス-1H、及びv3抗体が含まれる。

30

40

【0127】

抗体がCD20抗体、例えばリツキシマブ又はヒト化2H7である場合、抗体は1g m \times 2、375mg/m 2 \times 4などとして投与されてもよい。好ましくは、2以上の抗体曝露は、例えばおよそ6か月ごと、又はおよそ12か月ごとに行う。

抗体は、非経口、局所、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、及び/又は病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下投与が含まれる。また、くも膜下投与も考慮される(CD20抗体のくも膜下

50

輸送に関しては、例えば米国公開特許第2002/0009444号、Grillo-Lopez, Aを参照)。好ましくは、静脈内又は皮下に投薬される。

【0128】

治療用抗体、イムノアドヘシン又は他の生体内因子が自己免疫性疾患を治療するために単剤として投与されるのに対して、通常、治療用抗体又はイムノアドヘシンは一又は複数の医薬(一又は複数)と組み合わせられるであろう。例えば、RA及び他の自己免疫性疾患のために、抗体、イムノアドヘシン又は他の生物薬剤が、上記の定義の項目に挙げる免疫抑制剤、化学療法剤、BAFFアンタゴニスト、インテグリンアンタゴニストないしは抗体、及び/又はサイトカインのいずれか一又は複数；疾患変更抗リウマチ剤(DMARD)、例えばヒドロキシクロロキン(hydroxychloroquine)、スルファサラジン、メトトレキサート、レフルノミド、アザチオプリン、D-ペニシラミン、ゴールド(経口)、ゴールド(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリンのいずれか一又は複数；ブドウ球菌プロテインA免疫吸着；静脈免疫グロブリン(IVIg)；非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)；糖質コルチコイド(例えば関節注射による)；副腎皮質ステロイド(例えばメチルプレドニゾン及び/又はプレドニゾン)；葉酸塩；抗腫瘍壊死因子(TNF)アンタゴニスト、例えばエタネルセプト/ENBRELTM、インフリキシマブ/REMICADETM、D2E7(Kno11)又はCDP-870(Celltech)；IL-1Rアンタゴニスト(例えばKineret)；IL-10アンタゴニスト(例えばIlodecakin)；血液凝固調節因子(例えばWinRho)；IL-6アンタゴニスト/抗TNF(CBP1011)；CD40アンタゴニスト(例えばIDEC131)；Ig-Fcレセプターアンタゴニスト(MDX33)；免疫修飾物質(例えばサリドマイド又はImmudyn)；抗CD5抗体(例えばH5g1.1)；マクロファージ阻害剤(例えばMDX33)；共刺激遮断薬(例えばBMS188667又はトレリマブ(Tolerimab))；補体阻害剤(例えばh5G1.1、3E10又は抗デコイ促進因子(DAF)抗体)；IL-2アンタゴニスト(zxSMART)；EGFR阻害剤(上記の定義を参照)；チロシンキナーゼ阻害剤(上記の定義を参照)；抗血管新生剤(例えばVEGF抗体、例えばベバシズマブ)；CD22抗体、例えばLL2又はエピラツズマブ(LYMPHOCIDE(登録商標)；Immunomedics)、例えばエピラツズマブY-90(Juweid等 Cancer Res 55(23 Suppl): 5899s-5907s (1995))、アピオジェンのCD22抗体(Abiogen, Italy)、CMC544(Wyeth/Celltech)、コンボトックス(combotox)(UT Southwestern)、BL22(NIH)、及びLympoScan Tc99(Immunomedics)；EpCAM抗体、例えば17-1A(PANOREX(登録商標))；v3抗体(例えばVITAXIN(登録商標)；Medimmune)；CD37抗体、例えばTRU016(Trubion)；IL-21抗体(Zyngene/Novo Nordisk)；抗B細胞抗体(Impheron)；B細胞ターゲットティングMab(Immunogen/Aventis)；1D09C3(Morphosys/GPC)；LymphoRad131(HGS)；Lym-1抗体Y-90(USC)；LIF226(Enhanced Lifesci.)；BAFF抗体(例えば国際公開第03/33658号)；BAFFレセプター抗体(例えば国際公開第02/24909号)；BR3抗体；Bl ys抗体、例えばベリムマブ；LYMPHOSTAT-BTM抗Lym-1オンコリン(Oncolym)(USC/Peregrine)；ISF154(UCSD/Roche/Tragen)；ゴミリキシマ(gomilixim)(IDEC152；Biogen Idec)；IL-6レセプター抗体、例えばアトリズマブ(atlizumab)(ACTEMRATM；Chugai/Roche)；IL-15抗体、例えばHuMax-IL-15(Genmab/Amgen)；ケモカインレセプター抗体、例えばCCR2抗体(例えばMLN1202；Milliennium)；抗補体抗体、例えばC5抗体(例えばエキュリズマブ(eculizumab)、5G1.1；Alexion)；ヒト免疫グロブリンの経口剤(例えばIgPO；Protein Therapeutics)；IL-12抗体、例えばABT-874(CAT/Abbott)；テネリキシマブ(Tenelimumab)(BMS-224818)；B細胞ワクチン；DN-BAFF(Xencor)；CRx-119(CombinatoRx)；アムジェンのBAFFアンタゴニスト；ペントスタチン(Pfizer)；IC-485(ICOS)；ケモカインアンタゴニスト、例えばT-487(Tularik)又はレティキュロース(Reticulose)(AVR-118)；SCO-323(SCIOS)；インテグリンアンタゴニスト683699、Tanabe、NGD-2001-1(Neurogen)；SCIO-469(SCIOS)；BIRB-796(Boehringer Ingelheim)；VX702、VX850(Vertex)；ロイコトリエンB-4アンタゴニスト(例として、アメルブント(amelubunt)、BIIL-

284 ; B I) ; 微小管修飾因子 (P a x c e e d ; Angiotech) ; プロテアーゼ阻害剤 (M B S 5 6 1 3 9 2 ; BMS) ; A G I X - 4 2 0 7 (Atherogenics) ; I S I S - 1 0 4 8 3 8 (ISIS/Elan) ; M F G - I R A P (Univ. Pitt.) ; I L - 1 T r a p (R G N - 3 0 3 ; Regeneron/Novartis) ; オプレルベキン (Wyeth) ; エベロリムス (C e r t i c a n ; Novartis) ; A m e v i v e (Biogen Idec) ; O R G - 3 9 1 4 1 (Organon) ; F K - 5 0 6 (Fujisawa) ; I L - 2 アンタゴニスト (タクロリムス ; Fujisawa) ; など、のいずれか一又は複数と組み合わせられることが好ましい。

【 0 1 2 9 】

第二医薬は、治療用抗体又はイムノアドヘシンの初回の曝露及び/又はその後の曝露により投与されてもよい。このような併用投与は、別々の製剤又は単一の製薬製剤を用いた同時投与、及び何れかの順番での連続的な投与を含み、このとき、両方(又は全て)の活性薬剤が同時に各々の生物活性を及ぼす時間があることが好ましい。

被検体への抗体又はイムノアドヘシンの直接投与の他に、本出願は、遺伝子治療による抗体又はイムノアドヘシンの投与を考慮する。抗体をコードする核酸のこのような投与は、抗体の「有効量」を投与するという表現により包含される。例として、細胞内抗体を生成するための遺伝子治療の使用に関しては、1996年3月14日に公開の国際公開第96/07321号を参照のこと。

被検体の細胞内への核酸(場合によって、ベクターに含まれている)の取り込みには2つの主な手法があり、それはインピボとエクスピボである。インピボ運搬のために、通常被検体の抗体が必要である部位に核酸が直接注入される。エクスピボ治療のために、被検体の細胞が取り除かれ、核酸がこれら単離した細胞内に導入され、変更した細胞が直接又は、例えば、被検体内に着床される多孔性膜内に被包して被検体に投与される(例として米国特許第4892538号および同第5283187号を参照)。核酸を生きた細胞に導入するために有用な様々な技術がある。技術は、核酸が対象とする宿主の細胞内にインピボで移入されるか、又はインピトロで培養細胞に形質移入されるかの何れかによって、異なる。インピトロでの哺乳動物細胞への核酸の移入に適する技術には、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、などの使用が含まれる。遺伝子のエクスピボ運搬のために一般的に用いられるベクターはレトロウィルスである。

【 0 1 3 0 】

現在のところ、好適なインピボ核酸移入技術には、ウィルスベクター(例として、アデノウィルス、単純ヘルペスIウィルス又はアデノ関連ウィルス)及び脂質ベースのシステム(遺伝子の脂質が媒介する移入に有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPE及びDC-Cholである)を用いる形質移入が含まれる。場合によっては、標的細胞を標的とする薬剤、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなどにより核酸供給源を提供するのが好ましい。リボソームを用いる場合、エンドサイトーシスに関係する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の種類の細胞に対するキャプシドタンパク質ないしはその断片、循環への内部移行を起こすタンパク質に対する抗体、並びに、細胞内局在化を標的とするタンパク質及び細胞内半減期を上げるタンパク質は、ターゲティングのため及び/又は取込を促すために用いられてもよい。レセプターが媒介するエンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)、Wagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990)に記載されている。一般に知られている遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概要については、Anderson等, Science 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公開第93/25673号及びそこに引用される文献を参照のこと。

【 0 1 3 1 】

I X . 診断用キット

また、本発明は、本明細書中の前処理方法の使用のための、診断キット又は製造品を提供する。診断用キットは、以下のいずれか一又は複数を具備してもよい：アンタゴニスト/抗体/薬剤標準物質(例えばリツキシマブ標準物質)；ポジティブコントロール中和抗体

(好ましくはカニクイザルのヤギ)；プロテイン A + G カラム(例えばプロテイン A / G カラム)；脱脂試薬；免疫グロブリン親和性精製バッファ(一又は複数)(例えば結合、溶出及び中和バッファ)；補体血清；細胞のためのアッセイ希釈剤；取扱説明書又は文献；冷凍細胞(例えば W I L 2 細胞)のバイアル；細胞標識試薬(例として、CELL TITER GLO(登録商標))など。

例えば、診断用キットは、(a)脱脂試薬；(b)免疫グロブリンの親和性精製のためのバッファ(例えば結合及び溶出バッファ)；と、(c)(例えば血清干渉の問題を回避するために)試料に細胞ベースのバイオアッセイ(例えば中和抗体アッセイ)を行う前に自己免疫性疾患被検体の生体試料を前処理するために診断用キットを使用することを該キットの使用者に指示する取扱説明書とを具備してもよい。場合によって、生体試料は、薬剤、例えば治療用抗体又はイムノアドヘシンで処置されている。

診断用キットは、場合によって以下のいずれか一又は複数を更に具備する：薬剤標準物質、ポジティブコントロール中和抗体、補体血清、細胞のためのアッセイ希釈液、及び細胞標識試薬など。

さらに、本発明の詳細は、以下の非制限的な実施例で例示される。本明細書中のすべての引用文献の開示内容は、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

【実施例】

【0132】

実施例 1 血清前処理による抗体アッセイの中和

この実施例は、自己免疫性徴候における C D 2 0 抗体であるリツキシマブの中和抗体アッセイの開発に関する。リツキシマブはヒト-マウスキメラモノクローナル抗体であり、それは B 細胞上のヒトの C D 2 0 分子を認識して、抗体エフェクター機能による B 細胞を減少させる。リツキシマブは、低悪性の再発性非ホジキンリンパ腫(NHL)のために米国及び欧州において承認され、自己免疫性疾患、例えばとりわけ関節リウマチ(RA)及び全身性エリテマトーデス(SLE)のために開発されている。

リツキシマブに対する血清反応陽性中和抗体(NAb)活性の評価は、作用強度アッセイである補体依存性細胞傷害作用(CDC)アッセイに基づいて開発された。このアッセイでは、リツキシマブを、ヒト血清補体の標準的な供給源及び標的 B リンパ球細胞株である W I L 2 - S とともに 2 時間、インキュベートする。2 時間後に、リツキシマブ-CDC によって殺傷される細胞の量を、残りの生きている細胞の量の割合として測定する。

【0133】

試薬

脱脂試薬：PHM-L LIPOSORB(登録商標)吸収剤、Calbiochem、c a t 5 2 4 3 7 1

IMMUNOPURE™ 固定化プロテイン A / G : Pierce、c a t 2 0 4 2 2

5 m l のポリプロピレンカラム : Pierce、c a t 2 9 9 2 2

溶出バッファ : H C l を含む滅菌 d d H ₂ O、p H 2 . 1

中和バッファ : 2 0 × P B S、A 4 1 0、(C a ⁺⁺ / M g ⁺⁺ なし)、p H 6 . 5、HyCl one c a t S H 3 A 6 4 8 . 0 1

ブロッキングバッファ : 1 % B S A を含む P B S

B S A : 7 . 5 % B S A、フラクシオン V、試験される細胞培養物、Sigma c a t A 8 4 1 2

P B S : G N E B 5 Media Prep、コード A 0 8 2 9

CENTRICON-30(登録商標)濃縮器 : 2 m l のサイズ、Amicon、c a t 4 2 0 9

脱脂のための遠心機 : EPPENDORF(登録商標)遠心機 5 4 1 5 C

細胞及び濃縮のための遠心機 : ベックマン G S - 6 R

W I L 2 - S 細胞 (A T C C C R L - 8 8 8 5)

細胞増殖培養液 : R P M I 1 6 4 0、2 m M L - グルタミン、1 0 % F B S、ゲンタマイシン

アッセイ希釈剤 (A D) : R P M I 1 6 4 0、2 0 m M H E P E S、0 . 1 % B S A、2 5 u g / m l ゲンタマイシン。

10

20

30

40

50

枯渇メディアウム：10%の増殖培養液を含むAD

補体：ヒトの補体血清、Quidel パートA112、ロット3MO174

リツキシマブ標準物質：参照物質C2B81298-2、9.8mg/ml。

リツキシマブNAb標準物質：カニクイザル抗リツキサンpAb(ロット44082-81)、0.5mg/ml

リツキシマブNAbコントロール：NAbを含有するNHSpool(低力価及び高力価、ロット44083-48)

CELLTITER-GLO(登録商標)：Promega、catG7571(10x10mlのバイアル)

GUAVA(登録商標)VIACOUNT™：GUAVA(登録商標)Inc. 4000-0040

96ウェル白色TCプレート、蓋を有する透明な底：コーニングコスター3610

分子装置 SOFTMAX(登録商標) Pro Lmax読み取り機

Pierce iCON™濃縮器、7mlのサイズ、cat-89886(CENRICON-30(登録商標)に変更可能)

Pierce IMMUNOPURE(登録商標) プロテインAプラス(cat22811)(プロテインA/Gに変更可能)

Pierce IMMUNOPURE(登録商標) プロテインGプラス(cat22851)(プロテインA/Gに変更可能)

【0134】

試料前処理手順：

1. 血清を脱脂。200µLのLIPOSORB(登録商標)(製造業者の指示に従って、PBSにて再構成)溶液をシリコン処理した1.5mlポリプロピレンチューブ中の0.25mlの血清に加える。45秒間ボルテックスをかけて、4500回転数/分(1600xg)にて10分間遠心する。上清を取り除いて、シリコン処理した1.5mlポリプロピレンチューブ中の1mlのPBSに希釈する。(いくらかのLIPOSORB(登録商標)が試料に完全に移らなくても許容範囲であり、カラムを詰まらせない)

2. 各々の患者試料及びコントロールのために、別々の0.5mlのプロテインA/Gカラムを調製する。1mlのプロテインA/G懸濁液を5mlのカラムに加えて、総高を測定し、0.5mlの総容積を確認する。

3. ゲルが既に使われている場合、5mlの溶出バッファをカラムに通してカラムビーズを清浄化する。カラムが再利用できる数は決まっていない。

4. 2x5mlのPBSを用いてカラムを平衡化する。

5. カラムに1.25mlの希釈した血清をアプライする。シリコン処理した1.5mlポリプロピレンチューブに流したものを回収して、2回再アプライする。

6. 3x5mlのPBSを用いてカラムを洗浄する。

7. 0.2mlの中和バッファを含有する15mlのFALCON(登録商標)チューブに、4mlの溶出バッファにより抗体を溶出する。

8. 0.5mlのプロッキングバッファを加えて、3000回転数/分(1000xg)にて10分間、濃縮器を遠心分離することによって、2mlのCENTRICON-30(登録商標)濃縮器をブロックする。濃縮器の上部又は下部に残っているプロッキングバッファを廃棄する。

9. 0.25mlの終容量に達するまで、中和された溶出液を濃縮する。試料が過剰に濃縮される場合、CENTRICON-30(登録商標)流量を用いて0.25mlまで希釈し直す。シリコン処理した1.5mlポリプロピレンチューブを用いて、0.25mlのマークに終容量を調整する。

10. 中和CDCアッセイの試験に備えて、濃縮物を-70℃に保存する。

【0135】

中和アッセイ手順：

本明細書中の中和抗体アッセイは、2005年2月10日公開の米国公開特許第2005/0032130号A1(Beresini及びSong)の開示内容に基づいた。しかしながら、アッセイは以下の点において変更した：生体試料(すなわち血清)は、ここでは前処理した血

10

20

30

40

50

清である、ここではアラマーブルー™(レサズリン)でなく、CELLTITER-GLO(登録商標)がアッセイ読み取りであり、使用するコントロール抗体は、ヤギ抗リツキシマブでなく、カニクイザルプロテインA精製(HER2吸収)調製物であり、そして、バッファ、容量、補体、コントロール、血清マトリックス効果、データ分析及び解釈は、以下に記載のように変更している。

【0136】

1. アッセイの前日に、20mlの枯渇培地に 8×10^6 個の細胞を播く (0.4×10^6 個の細胞/ml)。

2. 100(CDC_{max})、0.4(CDC_{NA b})及び0(CDC_{zero}) µg/mlのリツキシマブを調製する。

100 µg/ml : 1mlのADに対して10.2mlのリツキシマブ標準物質

20 µg/ml : 600mlのADに対して150µlの100 µg/mlリツキシマブ

0.4 µg/ml : 4.9mlのADに対して100mlの20 µg/mlリツキシマブ

0 µg/ml : AD単独

【0137】

3. 以下に示すように25mlをアッセイウェルに加える(表3)。

表3 リツキシマブ濃度のプレートレイアウト

	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0	0	0	0	100	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0	0	0	0	100	

【0138】

4. 表4に示すように、2通りのネガティブコントロール、低コントロール及び試料の25mlを各々加える。このプレートレイアウトは、24つの試料のためのスペースを有する。より多くのプレートを用いてもよいがここでは試験しない。

表4 コントロール及び試料のプレートレイアウト

	NEG	NEG	LO	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	
	NEG	NEG	LO	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	
	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	
	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	
	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24	RA25	NEG	NEG	
	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24	RA25	NEG	NEG	

【0139】

5. 緩やかに撈拌しながら室温で少なくとも2時間インキュベートして、血清精製抗体をリツキシマブに結合させ、中和させた。
6. 室温(RT)で補体血清を解凍して、氷上に置く。
7. フラスコからWIL2-S細胞を取り出し、フラスコの側壁を洗い落とし、50 mlのファルコンチューブに移す。10 μ lの細胞懸濁液を取り除いて、190 μ lのVIACOUNT(登録商標)を加える。2分後に細胞を計数して、#/ml(20 \times 希釈物)と%生存度を記録する。あるいは、血球計数器を用いて細胞を計数してもよい。
8. 1200回転数/分(150 \times g)にて8分間、細胞を遠心沈殿する。培地を別の容器へ移して、1 mlのADに細胞を再懸濁する。アッセイのために、0.25 \times 10⁶ / mlのWIL2-S細胞を含むAD 10~20 mlを調製する。
9. 50 μ lの補体を各々のウェルに加える。
10. ステップ9において調製した0.25 \times 10⁶ / mlのWIL2-S細胞を50 μ l加える。
11. RTで1分間プレートを撈拌して混合する。37 / 5%CO₂にて2時間インキュベートする。最後の10分は、RTにプレートを置く。
12. CELLTITER-GLO(登録商標)試薬をRTに戻す。100 μ lを各々のウェルに加える。CELLTITER-GLO(登録商標)バッファ及び基質を-20 に保存する。2つの成分を4~8 に終夜置いて解凍し、アッセイ日に混合して、使用の30~45分前に実験台に放置する。余った混合試薬は少なくとも1か月間-20 で保存することができる。
13. RTで10分間プレートを撈拌して混合する。
14. 1秒、ブランク減算なし(1 second, no blank subtraction)の集合時間(integration time)を用いたMolecular Devices LMAX(登録商標)読み取り機にて発光を読み取る。

10

20

【0140】

データ分析

1. すべての試料及びコントロールについてのアッセイ再現物から平均値を算出する。平均の%CVが25%より大きい場合、値を使用しない。
2. 以下の通りにカットポイントを算出する：
(0.4 μ g/mlリツキシマブの平均ネガティブコントロール CELLTITER-GLO(登録商標)値) \times 1.03

アッセイのカットポイントは、試料が陽性であることが決定する場合より大きく、陰性であることが決定する場合より小さいアッセイの応答レベルとして定められる。カットポイントは、(Mire-Sluis等 Journal of Immunological Methods 289: 1-16 (2004))に記載のアッセイの非特異的バックグラウンドのレベルから統計学的に決定される。このアッセイでは、10のRA個体ナープ血清を3日間にわたって検定することによって1.03のカットポイント因子を決定し、内部アッセイネガティブコントロール応答に対して3%の増加を表す。100個体の集団から10のRA個体血清を選択して、血清干渉及び非特異作用の全範囲を反映するものとした。各々のアッセイの一部として行われる血清前処理手順は、試料応答を正常化して、1.03の低カットポイント因子が適用されるようにした。1.03のカットポイント因子を用いて、すべてのリツキシマブナープなRA血清を陰性として定義するのに対して、1 μ g/mlのカニクイザル抗リツキシマブpAb又は0.25 μ g/mlのヤギ抗リツキシマブpAbを陽性として定義した。

30

40

3. 試料平均値を調べて、以下の判定基準に従って記録する：

試料平均値 < カットポイントの場合、試料を陰性とする。

試料平均値 > カットポイントの場合、試料を陽性とする。

4. 低コントロールの比率がカットポイントより大きい場合、及び0 μ g/mlと100 μ g/mlのリツキシマブアッセイ応答の間のシグナルに10倍の低下がある場合、アッセイは有効である。
5. 今回、内部アッセイカットポイントに基づいて、陽性又は陰性として試料を記録する。今後、試料の力価値を算出することが望ましいかもしれない。「力価」は、本方法において陽性反応を示す試料の最も高い希釈度の逆数である。それは、本方法において陽性

50

反応を示す試料の最も高い希釈度の常用対数として力価を表すのが一般的である。(Mire-Sluis等 Journal of Immunological Methods 289: 1-16 (2004))。これが行われた場合、高い力価コントロールも含まれうる。

【0141】

力価の書き込み

試料の力価は、アッセイのカットポイントに相当するアッセイ応答が生じる試料の希釈因子の \log_{10} として定められる。したがって、試料を $1/100$ に希釈した結果、カットポイントに相当するアッセイのシグナルが生じる場合、力価は $\log_{10} 100$ 又は 2.00 であろう。 $1/1000$ 希釈物を必要とする試料は、 3.00 の力価とするであろう。カットポイント応答が試料の2つの希釈物応答の間で下がる場合(通常起こる)、すべてのYポイントが既知(シグナル単位)であり、2つのXポイントが既知(「希釈単位」)であるとすると、力価は式を用いて算出し、X-Y軸上の直線上の未知のポイントについて解析する。

以下の式が使われる：

Let a = カットポイントより上の陽性試料又はコントロールのシグナル

Let b = カットポイントより下の陰性試料又はコントロールのシグナル

Let c = カットポイントのシグナル

Let d = カットポイントより上の陽性試料又はコントロールシグナルの希釈度

Let e = カットポイントより下の陽性試料又はコントロールシグナルの希釈度

力価を算出するために：

力価 = $\log(a - c) \cdot (e - d) + d(a - b)$ 。

6. 低コントロールの比率が 1.03 よりも高く、高コントロール力価が 2.0 よりも高い場合、アッセイは有効である。

7. 試料は中和活性力価値として記録する。 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリツキシマブの試料応答がアッセイ干渉を示す場合、「干渉物質のために決定されない」としてデータを記録する。

【0142】

WIL2-S細胞継代

1. リツキシマブ-CD C中和アッセイに、標的細胞としてBリンパ芽細胞株である、限りなく増殖するWIL2-Sを用いた。この細胞株は、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞/mlの密度に達した後に最適に継代される。細胞を維持するために、新たに播く密度は増殖培地中 $0.04 \sim 0.3 \times 10^6$ 個の細胞/mlとする。CD Cアッセイのために調製するために、細胞を、10%の増殖培地を含有するアッセイ希釈液中に 0.4×10^6 個の細胞/mlの密度で播く。細胞は少なくともP31まで継代することができる。理想的には、細胞は、 $0.25 \sim 2.5 \times 10^6$ 個の細胞/mlの細胞密度に維持されなければならない。

表5 継代のためのWIL2-S細胞の播種

再継代前の日数	# 増殖培地 20ml/細胞投与量
2	6×10^6
3	1.6×10^6
4	8×10^5

【0143】

結果及び考察

図4にリツキシマブCD C中和抗体アッセイを概略的に表す。図5は、リツキシマブ補体依存性細胞障害作用(CDC)がFab及びFcドメインの両方で中和されうることを示す。リツキシマブは用量に依存してCDCを媒介し、その結果 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で最大の細胞溶解が生じる(コントロールデータを示す)。このアッセイのもつ中和抗体を検

出する能力を試験するために、リツキシマブを、ヤギ抗ヒトFc (データを で示す)又はヤギ抗リツキシマブ(CDR特異的;データを で示す)ポリクローナル抗体とともに予めインキュベートした。2時間後に、正常ヒト血清補体と12500個の細胞を加えた。2時間後に、生きている細胞の数をCELLTITER GLO(登録商標)を用いて測定した。抗CDR又はFc抗体のいずれかの存在下において、リツキシマブ-CD C活性の作用強度は低減した。これは右への用量-応答曲線の推移によって示される。例えば、矢印に示されるように、1 μ g/mlのリツキシマブで残っている生細胞の割合は、コントロール(40%)と比較して、ヤギ抗CDRとともに予めインキュベートした試料(100%)、次いでヤギ抗Fc (70%)とともに予めインキュベートした試料の順で大きい。

作用強度から中和アッセイフォーマットへ変化する際の第一段階は、未処理の、薬剤ナイーブな血清を許容するアッセイ能力を試験することである。正常ヒト血清の存在下でのリツキシマブ-CD Cアッセイの初期試験は、20の雌雄個体の中で等しく用量依存的な成績を示した。しかしながら、NA bアッセイ標的集団である関節リウマチ(RA)患者ではアッセイは信用できず、個体間で非常に可変的なリツキシマブ-CD C細胞性応答を示した。いくつかの個体では、アッセイへのナイーブ血清の添加により、CD Cを媒介するリツキシマブの能力が完全に阻害された。

【0144】

図6は、リツキシマブ-CD Cアッセイの血清耐性を示す。リツキシマブ-CD Cアッセイでは、未処理の、薬剤ナイーブな血清を許容する能力について試験した。正常ヒト血清の存在下でのアッセイの初期試験は、10の雌雄個体の中で等しく用量依存的な成績を示した(左のプロット)。しかしながら、NA bアッセイ標的集団である関節リウマチ(RA)患者ではアッセイは信用できず、個体間で非常に可変的なリツキシマブ-CD C細胞性応答を示した(右のプロット)。いくつかの個体では、アッセイへのナイーブ血清の添加により、CD Cを媒介するリツキシマブの能力が完全に阻害された(例えば個体のデータを で示す)。

RA血清の存在下におけるリツキシマブ作用強度のアッセイ特異度及び可変性の欠失、いわゆる「血清干渉」により、リツキシマブCD Cアッセイに供する前の試料の「清浄」である血清前処理工程を追加した。

【0145】

血清前処理用に試験される方法は、操作のレベルを上げながら開発した。

第一に、最小の試料希釈率(少なくとも1/80)を増やすことによって干渉は最小にすることができるが、アッセイの感度は非常に大きく損なわれた(>5 μ g/mlの抗リツキシマブ抗体)。

第二に、いくつかの代替的なアッセイ情報を比較した。本アッセイでは、リツキシマブによって生じるCD Cの量は、生き残っている細胞数又は殺傷される細胞数により測定することができた。生きている細胞は、一般的に代謝性情報、例えばレドックス指示薬アラマブルー^{T M}又はATP指標であるCELLTITER GLOTMにより測定される。殺傷された細胞は、細胞質の内容物である内在性色素(例えばラクトース脱水素酵素)又は予めロードされた色素(例えばカルセイン)の放出で測定することができる。理論的には、試薬が10分後にアッセイに情報を与えるのであれば(例えばCELLTITER GLOTM)、16時間(例えばアラマブルー^{T M})と比較して、血清が非特異的に細胞代謝を妨げる時間が少ない。あるいは、試薬が外因的に加えられる場合、細胞代謝物(例えばカルセイン)に結合しないので干渉が少ないであろう。

【0146】

図7は、リツキシマブ-CD Cアッセイの代替的なアッセイ情報を表す。リツキシマブ-CD Cによって生じる細胞溶解の量は、生き残っている細胞数又は殺傷される細胞数により測定することができた。生きている細胞は、一般的に代謝性情報、例えばレドックス指示薬アラマブルー^{T M}又はATP指標であるCELLTITER GLOTMにより測定される。殺傷された細胞は、細胞質の内容物である内在性色素(例えばラクトース脱水素酵素)又は予めロードされた色素(例えばカルセイン)の放出で測定できる。アラマブルー^{T M}(データ

10

20

30

40

50

を×で示す)及びCELLTITER GLOTM(データを で示す)は類似のリツキシマブ-CD Cプロファイルを示し、その結果、CELLTITER GLO(登録商標)に明らかな動態範囲が改善された。また、カルセイン(データを で示す)はリツキシマブ-CD Cを測定することができるが、わずかに感度が低く動態範囲も小さかった。ラクトース脱水素酵素(データを で示す)は、リツキシマブ-CD Cの感度が高い指標ではなかった。

図8は、異なる情報を使用する場合の、リツキシマブ-CD CアッセイにおけるRA血清干渉の比較である。リツキシマブ-CD Cアッセイにおける関節リウマチ血清干渉を低減するために、5個体のRA血清に対して3つの異なるCD Cアッセイ情報(図7を参照)の許容を試験した。血清干渉は、3つすべての検出試薬、CELLTITER GLO(登録商標)、アラマーブルーTM(中間プロット)及びカルセインによって観察した。最も少ない血清干渉、最も良好な動態範囲及び最も均一な感度リツキシマブEC50を示すので、CELLTITER GLO(登録商標)を今後のアッセイ開発のための情報として選択した。

10

【0147】

本アッセイでは、図7及び図8に示すように、代替的な情報はRA血清干渉を解消しなかった。これは、本アッセイの早期、つまり細胞がリツキシマブ及び標準化した補体血清とともにインキュベートされる2時間の間に干渉が生じることを示唆する。残念なことに、リツキシマブのための代替的な好適な機能的MOAアッセイ、又はCD C測定のための代替的な経路は有用でない。

第3の手法は、干渉物質を取り除くことである。まず最初に試験される2つのかなり穏やかな方法には以下のものがある：小分子を取り除くための脱塩カラム(NAP-5TMカラム、Pharmacia Biotech)；及び、血清脂質を取り除くための脱脂手順(PHM-L LIPOSORBTM Calbiochem)。どちらの方法も、干渉物質を取り除くことができなかった。第3の可能性は、干渉サイトカインに対する阻害抗体、又は熱失活性の干渉サイトカインを加えることであろう。しかしながら、患者RA血清のサイトカインプロファイルが正常でないにもかかわらず、それらは特定のサイトカインレベルとアッセイ干渉との間の相互関係を示さなかった。優先して総免疫グロブリンを沈殿させる粗雑な方法は、飽和した硫酸アンモニウム(SAS)を33%の終容量で加えることによる「それらの塩析」である。それでもなお、SAS処理後に試料干渉の問題があった。最後に、リツキシマブ-CD Cアッセイにおいて試料をアッセイする前に血清免疫グロブリンを特異的に精製することが必要であると思われた。

20

30

【0148】

血清免疫グロブリンの特異的な精製は、(a)抗リツキシマブ抗体を特異的に精製する、又は(b)総免疫グロブリンを特異的に精製することによって行うことができた。

抗リツキシマブ-抗体の精製は最も直接的な手法であるようであり、すべての抗薬剤抗体アイソタイプの捕獲と患者試料中の残渣治療用薬剤により生じるリツキシマブ干渉の除去がさらに役立つ。いくつかのリツキシマブ-親和性精製方策は、以下のものを試験するが、これらに限定するものではない：リツキシマブ-GLY-CPGTM(Controlled Pore Glass Products Inc.)、リツキシマブ-BIOMAG(登録商標)(Bangs Laboratories, Inc.)及びリツキシマブ-EMPORETM(3M Bioanalytical Technologies)。カップリング、ブロッキング、結合及び溶出パラメータを高度に最適化した後、これらの方法は、回復が低い、特に1µg/ml未満(<25%回復)の血清特異的抗体濃度であるために中止した。

40

総免疫グロブリンの精製のための典型的な方法は、微生物起源の組換えタンパク質である、プロテインA及びプロテインGの使用である。プロテインGは4つすべてのIgGサブタイプ(IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4)と強く結合するのに対して、プロテインAはIgG1、IgG2及びIgG4には強く、IgG3、IgM、IgAには弱く、IgEに中程度に結合する。プロテインA及びプロテインGの両方の特性を組み合わせるとすべての抗薬剤抗体アイソタイプを捕獲するであろうが、IgG1、2、4サブタイプに対してはバイアスが生じる。この手法を用いて、リツキシマブに対する抗体の活性を中和することは、正常ヒト血清に等しく、CD Cアッセイにおける前処理し

50

た正常ヒト血清に等しかった。重要なことに、リツキシマブ-CD C活性の用量-応答性は、RA 個体(未処理の血清において極端なCD Cアッセイ変動性を示す個体)の前処理した血清に等しくなった。中和活性の低い感度は、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (適切な血清中濃度)のヤギ及びカニクイザル抗リツキシマブ抗体であることがそれぞれ決定された。最後に、細胞ベースのリツキシマブ-CD Cアッセイの血清反応陽性抗リツキシマブ抗体試料をアッセイする前にプロテインA+G精製を用いる手順は、開発され、最適化され、認定された。アッセイ成績特性は、有効と認められた臨床抗体特性アッセイに適することが明らかとなった。

【0149】

図9は、血清試料からの総免疫グロブリンを精製するために用いられる血清前処理手順を示す。総血清免疫グロブリンの精製のためのこの方法は、リツキシマブ-CD Cアッセイにおける血清干渉を取り除くために開発された。手順をまとめたフローチャートをこの図に示す。

血清前処理手順により干渉の問題が解消された。図10は、血清前処理手順の前後でのリツキシマブ-CD Cアッセイの実施を示す。NA bアッセイ標的集団、つまり関節リウマチ(RA)患者の中では、リツキシマブ-CD Cアッセイは信用できず、個体間で非常に可変的なリツキサン-CD C細胞性応答を示した(左のプロット)。10個体のRA血清は、血清前処理手順を行う前(左のプロット)及び行った後(右のプロット)のアッセイにおいて試験した。血清前処理は、干渉しているマトリックス成分を取り除いて、RA 個体間のリツキサン-CD C活性の用量-応答性を正常化した。

また、血清前処理手順の他に、中和抗体アッセイに様々な更なる改善が開発された。

【0150】

異なる細胞数を用いたアッセイの感度を評価した。図11は、より少ない細胞数での中和に対してリツキシマブ-CD Cアッセイのより高い感度を示す。材料を多く放出するために用いられるリツキシマブ-CD C作用強度アッセイは中和アッセイとして最適化された。中和アッセイ最適化の間、アッセイを厳しくしたまま、作用強度アッセイに用いられる細胞数の(左のプロット)4分の1の細胞数(右のプロット)を用いると感度の向上が観察された。 $0.125 \sim 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の漸増濃度のヤギ抗リツキシマブCD Rポリクローナル抗体を、アッセイの用量-応答の全範囲に対してリツキシマブとともに予めインキュベートした。用量-応答曲線の右への推移は、リツキシマブに対するpAbの濃度に正比例して増加した(左右のプロット線)。右への推移はより少ない細胞数で大きくなった(右のプロット線)。また、すべての中和抗体濃度で、コントロールと比較したときの推移が非線形であり、より低濃度のリツキシマブの範囲が大きくなった(左右のプロット線の上部)。

【0151】

また、リツキシマブ用量選別を、中和抗体アッセイの感度を向上させるための更なる手段として評価した。図12は、中和活性を評価するために使用するリツキシマブ濃度の選別を表す。患者試料の評価において、カットポイントと比較して単独のリツキシマブの選択された濃度での中和活性を記録することが望ましい。より低いリツキシマブ濃度での中和に対するリツキシマブ用量-応答曲線感度の向上に基づいて(図12)、リツキシマブ濃度を、漸増濃度のヤギ抗リツキシマブCD R pAb($0.1 \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$)と共に、 0.2 、 0.4 及び $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ で試験した。 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリツキシマブ濃度では、薬剤がない場合、CD C活性はわずかにバックグラウンドの細胞溶解を上回るだけであり、中和は統計的有意差以下である。 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリツキシマブ濃度では、薬剤がない場合、CD C活性はバックグラウンドの細胞溶解を25~30%上回り、中和は統計的に有意であり、中和抗体濃度に比例する。さらにリツキシマブ濃度を上げると、より低いレベルの中和抗体を検出するためのアッセイの感度が損なわれた。例えば、上記の示すように、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗リツキシマブCD R pAbは $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 並びに $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリツキシマブを中和しない。

【0152】

図13は、中和リツキシマブ-CDCAッセイに対する薬剤干渉の作用を示す。中和リツキシマブ-CDCAッセイにおいて試験するための患者血清は、残留する治療用リツキシマブを含んでもよい。中和抗体のレベルが生物学的に不活性な循環治療用抗体である場合、試料は活性なリツキシマブをアッセイに作用させ、異常に高いCDCA活性を生じさせてもよい。アッセイの中和活性は、内部アッセイ陰性及び低陽性コントロールに対して評価される。試料の異常に高いCDCA活性により偽陰性情報が生じるであろう。左のプロット線は、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のリツキシマブ()を正常なアッセイリツキシマブ用量-応答曲線()に加える効果を示す。基準毒性はより高く、EC50はより低い見かけの濃度に推移している。しかしながら、右のプロット線にて図示するように、同じ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のリツキシマブ濃度を5倍モル過剰量($5\mu\text{g}/\text{ml}$)のヤギ抗リツキシマブCDRポリクローナル抗体()とともに加える場合、基準毒性は標準に戻り、リツキシマブを上回る十分な中和抗体があり、アッセイにおいて陽性と測定される(用量-応答曲線の有意な右への推移によって示される)。

10

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1A】マウス2H7の軽鎖可変ドメイン(V_L)(配列番号1)、ヒト化2H7.v16変異体の軽鎖可変ドメイン(配列番号2)、及びヒト軽鎖サブグループIの軽鎖可変ドメイン(配列番号3)のアミノ酸配列を比較した配列アライメント。2H7及びhu2H7.v16の V_L のCDRは以下の通りである：CDR1(配列番号4)、CDR2(配列番号5)、及びCDR3(配列番号6)。それぞれの鎖のCDR1、CDR2、CDR3は大括弧で囲っており、フレームワーク領域であるFR1-FR4に隣接している。2H7はマウス2H7抗体を示す。2配列間にあるアスタリスクは2配列間で異なる箇所を示す。Kabat等, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に従って残基番号を示し、a、b、c、d、及びeで挿入を示す。

20

【図1B】マウス2H7の重鎖可変ドメイン(V_H)(配列番号7)、ヒト化2H7.v16変異体の重鎖可変ドメイン(配列番号8)、及び重鎖サブグループIIIのヒトコンセンサス配列の重鎖可変ドメイン(配列番号9)のアミノ酸配列を比較した配列アライメント。2H7及びhu2H7.v16の V_H のCDRは以下の通りである：CDR1(配列番号10)、CDR2(配列番号11)、及びCDR3(配列番号12)。それぞれの鎖のCDR1、CDR2、CDR3は大括弧で囲っており、フレームワーク領域であるFR1-FR4に隣接している。2H7はマウス2H7抗体を示す。2配列間にあるアスタリスクは2配列間で異なる箇所を示す。Kabat等, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に従って残基番号を示し、a、b、c、d、及びeで挿入を示す。

30

【図2】Kabatの可変ドメイン残基番号付け及びEu定常ドメイン残基番号付けを用いて、成熟2H7.v16及び2H7.v511の軽鎖(それぞれ配列番号13及び15)のアライメントを示す。

【図3】Kabatの可変ドメイン残基番号付け及びEu定常ドメイン残基番号付けを用いて、成熟2H7.v16及び2H7.v511の重鎖(それぞれ配列番号14及び16)のアライメントを示す。

40

【図4】補体依存性細胞障害作用(CDC)をリツキシマブについての中和抗体(NAb)アッセイとして示す。

【図5】以下の試料に関してNAbアッセイのCDCを示す：コントロール、ヤギ抗リツキシマブCDR抗体及びヤギ抗ヒトFc抗体。

【図6】正常ヒト被検体の血清(左)及び関節リウマチ(RA)被検体の血清(右)からの結果を比較したときの、CDC NAbアッセイにおける血清耐性を示す。

【図7】CELLTITER-GLO(登録商標)発光細胞生存率アッセイ、カルセイン、ラクトース脱水素酵素(LDH)及びアラマーブルー^{T.M.}(レサズリン)についてのCDC NAbアッセイからのアッセイ読み取りを表す。

50

【図8】アッセイ読み取りについて、アラマーブルーTM (レサズリン)(左)又はCELLTITE R-GLO(登録商標)(右)を含むRA血清干渉を比較する。

【図9】本明細書中の血清前処理のための好適な手順を例示する。

【図10】血清前処理なし(左)及び、血清前処理あり(右)のRA血清からの読み取りに対する血清前処理の効果を示す。

【図11】NAbアッセイに用いる細胞数を変化させる効果を表す。

【図12】NAbに感受性のあるリツキシマブ用量選別を表す。

【図13】NAb：リツキサン比が0：1(左)又は5：1(右)であるNAbアッセイにおける薬剤干渉を示す。

【図1A】

可変軽鎖ドメインの配列アライメント

	FR1	CDR1	
	10 20 30 40		
2H7	QIVLSQSPAILLSASPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
	* * * * *	* * *	
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
	FR2	CDR2	FR3
	50 60 70 80		
2H7	GSSPKPWIY	[APSNLAS]	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEA
	** *	*	*** **
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	[APSNLAS]	GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQP
	*	* * *	
hum KI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQP
	CDR3	FR4	
	90 100		
2H7	EDAATYYC	[QQWSPNPPT]	FGAGTKLELKR
	*	* * *	
hu2H7.v16	EDFATYYC	[QQWSPNPPT]	FGQGTKVEIKR
		* * * *	
hum KI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR

【図1B】

可変重鎖ドメインの配列アライメント

	FR1	CDR1	
	10 20 30 40		
2H7	QAYLQQSGAELVIRPGASVKMSCKAS	[GYTFPSYNMH]	WVKQT
	* * * * *	* * * * *	*
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS	[GYTFPSYNMH]	WVRQA
		* * * *	
hum III	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS	[GTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2	CDR2	FR3
	50 a 60 70 80		
2H7	PRQGLEWIG	[AIYPNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM
	** *		** * * * *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	[AIYPNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL
	*	* * * * * * * * *	**
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDDGTYADSVKRG]	RFTISRDNKNTLYL
	CDR3	FR4	
	abc 90 100abcde 110		
2H7	QLSSTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWFVDV]	WGIGTIVTVSS
	* * * * *		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWFVDV]	WQGGLTIVTVSS
		* * * * * * * * *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGSLSY---DY]	WQGGLTIVTVSS

【 図 2 】

軽鎖アライメント

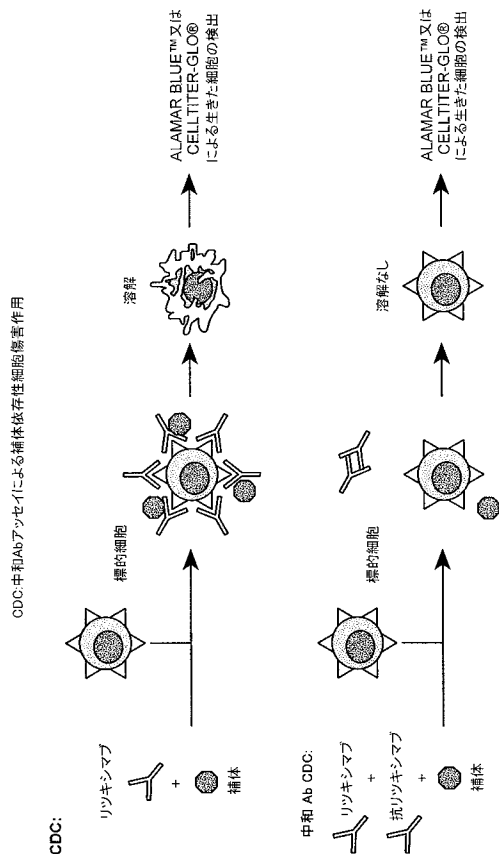
	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASSSVYMHYQKPKAKPLIYAP	*****
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASSSVYMHYQKPKAKPLIYAP	*****
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSPFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWFNPPFTFGQG	*****
hu2H7.v511	SNLASGVPSPFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWFNPPFTFGQG	*****
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	*****
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	*****
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	*****
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	*****
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	*****
hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	*****

【 図 3 】

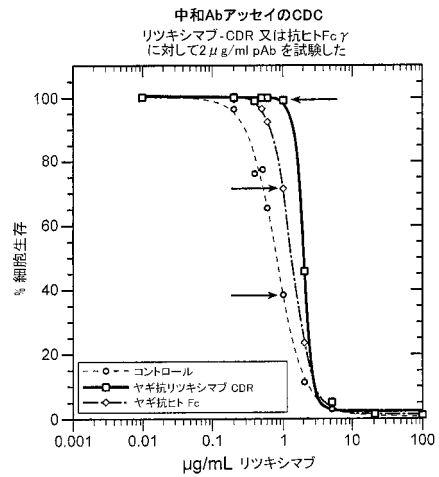
重鎖アライメント

	1		
hu2H7.v16	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYINMHW	*****	
hu2H7.v511	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYINMHW	*****	
	37	52a	82abc
hu2H7.v16	VRQAPGKGLVWVGAIVPGNGDTSYNQKPKGRFTISVDRSKNTLYLQMNLSL	*****	*****
hu2H7.v511	VRQAPGKGLVWVGAIVPGNGDTSYNQKPKGRFTISVDRSKNTLYLQMNLSL	*****	*****
	83	100abcde	113
hu2H7.v16	RAEDTAVYYCARVYVYISNSYWFYFDVWQGTLVTVSS	*****	*****
hu2H7.v511	RAEDTAVYYCARVYVYISNSYWFYFDVWQGTLVTVSS	*****	*****
	118		
hu2H7.v16	ASTKGPSVFPLAPSS	*****	
hu2H7.v511	ASTKGPSVFPLAPSS	*****	
	132		
hu2H7.v16	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	*****	
hu2H7.v511	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	*****	
	182		
hu2H7.v16	LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCTPCPA	*****	
hu2H7.v511	LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCTPCPA	*****	
	232		
hu2H7.v16	PELLGGPVSFLPPPKKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	*****	
hu2H7.v511	PELLGGPVSFLPPPKKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	*****	
	282		
hu2H7.v16	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	*****	
hu2H7.v511	VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	*****	
	332		
hu2H7.v16	IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	*****	
hu2H7.v511	IAATI SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	*****	
	382		
hu2H7.v16	ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRHQQGNVSCSVMHEA	*****	
hu2H7.v511	ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRHQQGNVSCSVMHEA	*****	
	432	447	
hu2H7.v16	LHNHYTQKSLSLSPGK	*****	
hu2H7.v511	LHNHYTQKSLSLSPGK	*****	

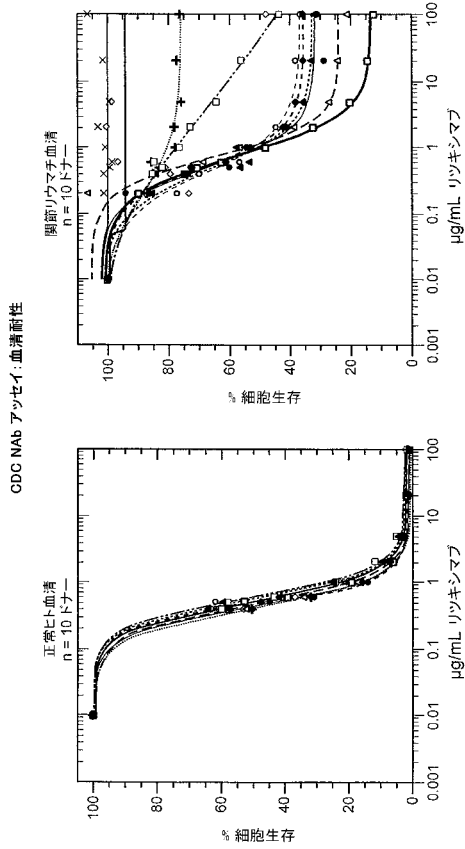
【 図 4 】



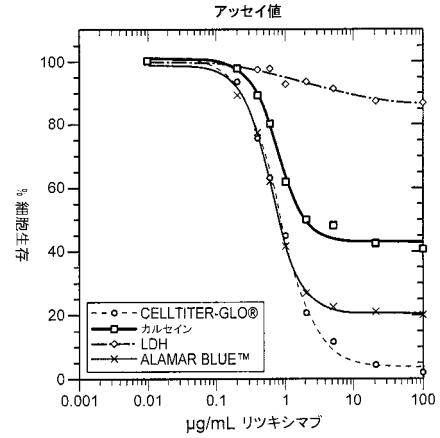
【 図 5 】



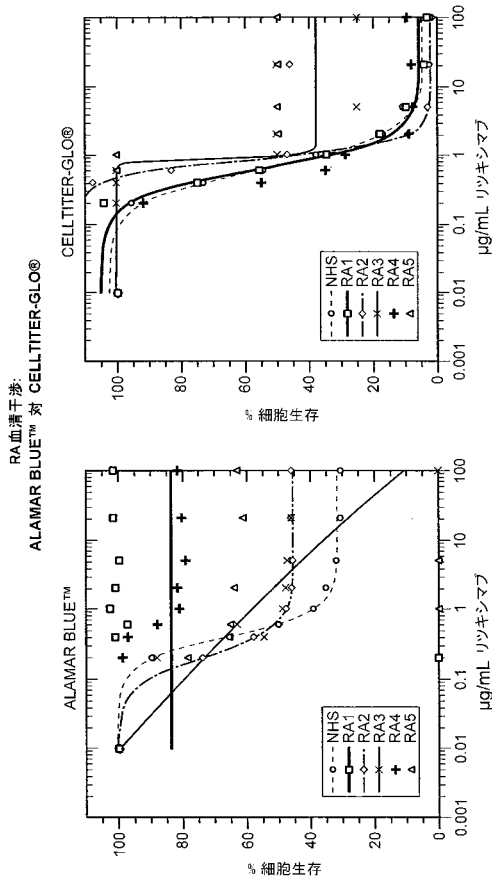
【 図 6 】



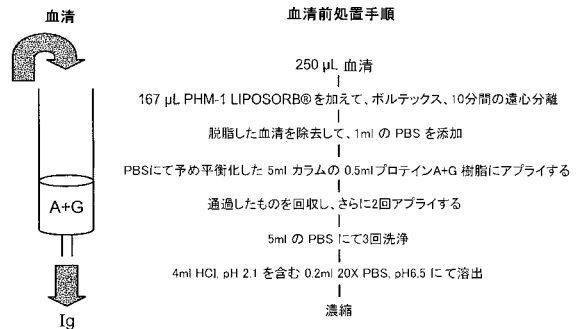
【 図 7 】



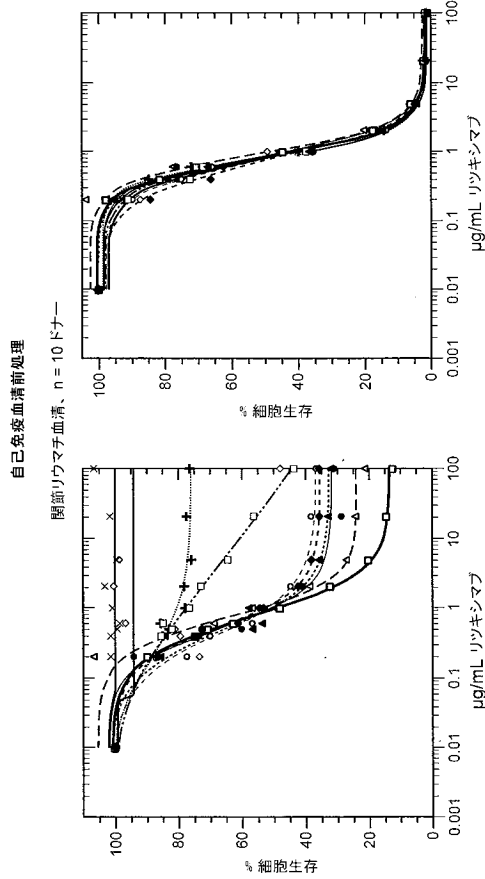
【 図 8 】



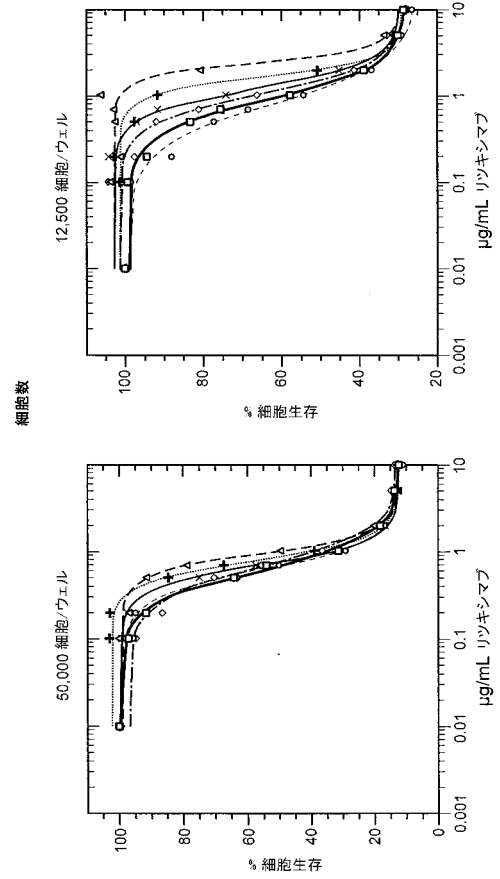
【 図 9 】



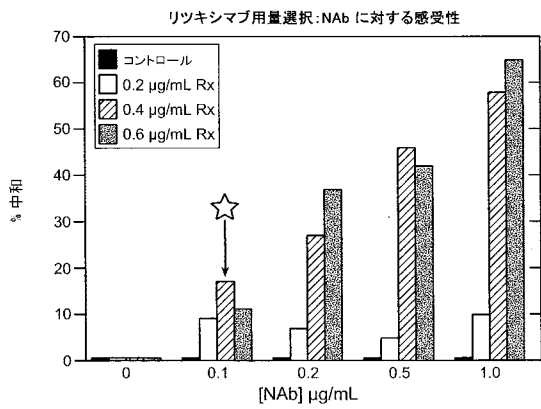
【 図 1 0 】



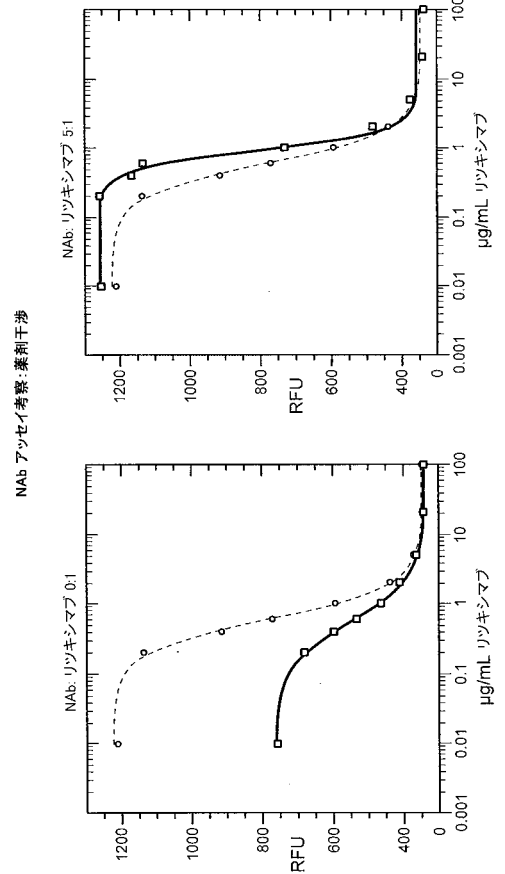
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/019576A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 G01N33/564 A61K39/00

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)
G01N 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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-/--	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 2006

Date of mailing of the international search report

19/12/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuynman, Antonin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/019576

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>TINCANI A ET AL: "The anti-beta2-glycoprotein I activity in human anti-phospholipid syndrome sera is due to monoreactive low-affinity autoantibodies directed to epitopes located on native beta2-glycoprotein I and preserved during species' evolution." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 DEC 1996, vol. 157, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 5732-5738, XP002409413 ISSN: 0022-1767 the whole document in particular: abstract page 5733, left-hand column, line 22 - right-hand column, line 52 page 5736, right-hand column, line 30 - line 32</p>	27,28
Y		1-22
X	<p>CHRISTEN U ET AL: "Immune response to a recombinant human TNFR55-IgG1 fusion protein: Auto-antibodies in rheumatoid arthritis (RA) and multiple sclerosis (MS) patients have neither neutralizing nor agonist activities" HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 60, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 774-790, XP002314027 ISSN: 0198-8859 the whole document in particular: page 775, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 776, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 page 777, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 2</p>	23-26
Y	<p>WO 2005/017529 A (GENENTECH INC [US]; BERESINI MAUREEN [US]; SONG AN [US]) 24 February 2005 (2005-02-24) example 1</p>	1-22
Y	<p>WO 92/21031 A (WECK ALAIN DE [CH]) 26 November 1992 (1992-11-26) abstract page 7, line 3 - line 10</p>	1-22
A	<p>DE 100 60 686 A1 (PREHM PETER [DE]) 13 June 2002 (2002-06-13) abstract</p>	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/019576

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 23-26 (in part)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 23-26 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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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/US2006/019576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005017529 A	24-02-2005	AU 2004264601 A1	24-02-2005
		BR PI0412217 A	22-08-2006
		CA 2532556 A1	24-02-2005
		CN 1860367 A	08-11-2006
		EP 1649288 A1	26-04-2006
		KR 20060052921 A	19-05-2006
		MX PA06001065 A	11-04-2006
WO 9221031 A	26-11-1992	NONE	
DE 10060686 A1	13-06-2002	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	

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

(72) 発明者 ソン , アン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 6 , パロ アルト , ミドルフィールド ロード
3 5 6 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 BB12 CA26 FB04
2G052 AA33 AB18 ED01 ED05 GA29
4C085 AA14 AA19 BB31 CC23
4H045 DA76 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008545958A5	公开(公告)日	2009-05-28
申请号	JP2008512557	申请日	2006-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	マカッチョンクリスタ ソンアン		
发明人	マカッチョン, クリスタ ソン, アン		
IPC分类号	G01N33/48 G01N1/28 G01N33/53 C07K16/28 C07K1/22 A61K39/395 A61P37/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/564 G01N33/6854 G01N2800/101 G01N2800/24 Y02A50/58 Y10S435/962 Y10S436/824 Y10S436/825 Y10T436/255		
FI分类号	G01N33/48.B G01N1/28.ZNA.J G01N33/53.N C07K16/28 C07K1/22 A61K39/395.N A61P37/06 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB12 2G045/CA26 2G045/FB04 2G052/AA33 2G052/AB18 2G052/ED01 2G052/ED05 2G052/GA29 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB31 4C085/CC23 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	60/682990 2005-05-20 US		
其他公开文献	JP2008545958A		

摘要(译)

本发明是生物样品自身免疫性疾病受试者的预处理方法，用于为了避免干扰，特别是那些其中样品进行基于细胞的生物活性测定，如中和抗体测定描述了一种方法。