

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 17349

(P2002 - 17349A)

(43)公開日 平成14年1月22日 (2002.1.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/02	ZNA	A 6 1 K 39/395	U 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 6 4
39/395		A 6 1 P 29/00	101 4 C 0 8 4
45/00		31/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P 29/00	101	31/14	4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 35 O L (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 136657(P2001 - 136657)
(62)分割の表示 特願平5 - 501569の分割
(22)出願日 平成4年6月16日(1992.6.16)

(31)優先権主張番号 723,617
(32)優先日 平成3年6月27日(1991.6.27)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 391015708
ブリistol - マイヤーズ スクイブ カン
パニー
B R I S T O L - M Y E R S S Q U I
B B C O M P A N Y
アメリカ合衆国, ニュー ジャージー 0
8543, ピー.オー.ボックス 4000
(72)発明者 リンスレイ, ピーター エス.
アメリカ合衆国,ワシントン 98110,シアト
ル,ナインス アベニュー ウエスト 2430
(74)代理人 100077517
弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C T L A 4 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体

(57)【要約】

【課題】 C T L A 4 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の提供。

【解決手段】 配列番号： 4 に示す C T L A 4 の細胞外ドメインに結合し、且つ C T L A 4 と B 7 抗原との結合を阻害するモノクローナル抗体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 CTLA4の細胞外ドメインを認識し、そして結合するモノクローナル抗体であって、前記結合がB7抗原へのCTLA4の結合を妨げることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】 前記CTLA4の細胞外ドメインが、T-細胞増殖を阻止するCTLA4の細胞外ドメインのフラグメントを含んで成るアミノ酸配列を含んで成るCTLA4融合タンパク質内に存在する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 前記CTLA4の細胞外ドメインが、CTLA4の細胞外ドメインを表す配列番号14のアミノ酸位置1でのアラニンにより開始し、そしてアミノ酸位置125でのアスパラギン酸で終結するアミノ酸配列を含んで成るCTLA4融合タンパク質内に存在する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 前記CTLA4の細胞外ドメインが、CTLA4の細胞外ドメインを表す配列番号14のアミノ酸位置2でのメチオニンにより開始し、そしてアミノ酸位置125でのアスパラギン酸で終結するアミノ酸配列を含んで成るCTLA4融合タンパク質内に存在する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項6】 医薬組成物への請求項1～4のいずれか1項記載の組成物の使用。

【請求項7】 免疫疾患の処理のための医薬組成物への請求項1～4のいずれか1項記載の組成物の使用。

【請求項8】 前記免疫患者が、自己免疫疾患である請求項7記載の使用。

【請求項9】 前記免疫患者が、同種移植片拒絶である請求項7記載の使用。

【請求項10】 前記免疫患者が、慢性アレルギー反応である請求項7記載の使用。

【請求項11】 前記免疫患者が、移植片拒絶である請求項7記載の使用。

【請求項12】 前記免疫患者が、移植片対宿主疾患である請求項7記載の使用。

【請求項13】 前記免疫患者が、リウマチ様関節炎である請求項7記載の使用。

【請求項14】 癌の処理のための医薬組成物への請求項1～4のいずれか1項記載の組成物の使用。

【請求項15】 T細胞増殖の調節のための医薬組成物への請求項1～4のいずれか1項記載の組成物の使用。

【請求項16】 ウイルス感染の処理のための医薬組成物への請求項1～4のいずれか1項記載の組成物の使用。

【請求項17】 前記ウイルス感染が、HIV感染である請求項16記載の使用。

【請求項18】 前記ウイルス感染が、HTLV1感染である請求項16記載の使用。

【請求項19】 細胞介在性免疫応答を調節するための医薬組成物への請求項1～4のいずれか1項記載の組成物の使用。

【請求項20】 前記免疫応答が、リンパ球とのB7相互反応を阻止することによって調節される請求項19記載の使用。

【請求項21】 B7陽性B細胞とのCTLA4陽性T細胞相互作用を調節するための方法であって、CTLA4-陽性T細胞と、CTLA4と反応性のモノクローナル抗体、Fab又はF(ab')サブクラス2フラグメントとを接触し、それによりB7陽性B細胞とCTLA4-陽性T細胞との相互作用を阻害し、そして従って、B7陽性B細胞とのCTLA4-陽性T細胞相互作用を調節することを含んで成る方法。

【請求項22】 B7-陽性細胞との機能的なCTLA4-陽性T細胞相互作用を調節するための方法であって、前記B7-陽性細胞と、前記B7抗原のためのリガンドとを、CTLA4との内因性B7抗原の反応を妨げるための有効量で接触せしめることを含んで成る方法。

【請求項23】 前記B7リガンドが、可溶性CTLA4分子である請求の範囲第44項記載の方法。

【請求項24】 前記B7リガンドが、可溶性変異体CTLA4分子である請求の範囲第44項記載の方法。

【請求項25】 前記B7陽性細胞が、B細胞である請求の範囲第44項記載の方法。

【請求項26】 前記B7陽性細胞と前記CTLA4-陽性T細胞との相互作用が阻害される請求の範囲第22項記載の方法。

【請求項27】 前記B7リガンドが、B7を結合する、CTLA4の細胞外ドメインの一部を含む融合タンパク質である請求の範囲第22項記載の方法。

【請求項28】 前記リガンドが、CTLA4の細胞外ドメインに対するアミノ酸配列の位置1～125のアミノ酸残基を含む第1アミノ酸配列、及びヒト免疫グロブリンC1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応するアミノ酸残基を含む第2アミノ酸配列を有するCTLA4Ig融合タンパク質である請求の範囲第27項記載の方法。

【請求項29】 前記リガンドがB7抗原と反応性のモノクローナル抗体である請求の範囲第22項記載の方法。

【請求項30】 前記抗体が抗-BB1モノクローナル抗体である請求の範囲第29項記載の方法。

【請求項31】 前記リガンドが、CTLA4受容体の細胞外ドメインの一部に対応する第2アミノ酸配列に融合されるCD28受容体の細胞外ドメインの一部に対応する第1アミノ酸配列、及びヒト免疫グロブリンC1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応する第3アミノ酸配列を有する、B7を結合するCD28Ig/CTLA4Ig融合タンパク質ハイブリッドである請求の範囲第22項記載の方法。

【請求項32】 他の細胞とのCTLA4-陽性T細胞相互作用

用を調節するためのインビトロ方法であって、B7陽性細胞とのCTLA4 - 陽性T細胞の相互作用を、前記T細胞とCTLA4のためのリガンドとを接触することによって阻害することを含んで成る方法。

【請求項33】 前記リガンドがB7抗原である請求の範囲第32記載の方法。

【請求項34】 前記リガンドがB7融合タンパク質である請求の範囲第32項記載の方法。

【請求項35】 前記リガンドが、B7の細胞外ドメイン及びヒト免疫グロブリンC 1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応するアミノ酸配列を含んで成るB7Ig融合タンパク質である請求の範囲第34項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、CTLA4レセプター遺伝子、前記レセプターとB7抗原を発現する細胞との間の相互作用の同定、およびCTLA4レセプターを含む細胞の相互作用を調節する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】脊椎動物の免疫系の特徴は、「自己」と「非自己」とを区別する能力である。この性質は、最適な免疫活性化を達成するために多数のシグナルを必要とする系の進化に導いた(Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54 : 1-14(1989))。T細胞 B細胞の相互作用は免疫応答に対して必須である。T細胞およびB細胞上に見いだされる多数の付着分子のレベルは、免疫応答の間に増加する(Springerら、(1987)、前掲;およびShimizu, Current Opinion in Immunology, KindtおよびLong編、1 : 92-97 (1988)) ;およびHemler, Immunology Today 9 : 109-113 (1988))。

【0003】これらの分子のレベルの増加は、活性化されたB細胞が、抗原特異的T細胞の増殖を刺激するとき、休止のB細胞よりもいっそう有効である理由の説明を促進することができる(Kaiuchi ら、J. Immunol. 131 : 109-114 (1983) ; Krcigerら、J. Immunol. 135 : 2937-2945 (1985) ; McKenzie, J. Immunol. 141 : 2907-2911 (1988) ; およびHawrylowicz およびUnanue, J. Immunol. 141 : 4083-4088 (1988))。

【0004】Tリンパ球(「T細胞」)の免疫応答の発生は、細胞-細胞の相互作用(Springerら、A. Rev. Immunol. 5 : 223-252 (1987))、とくにT細胞とアクセサリ細胞、例えば、B細胞との間の相互作用、および可溶性伸介因子(サイトカインまたはリンホカイン)の生産を含む複雑なプロセスである(Dinarelli およびMier, New Engl. Jour. Med. 317 : 940-945 (1987))。この応答は、T細胞レセプター複合体(Weiss ら、Ann. Rev. Immunol. 4 : 593-619 (1986)) および他の「アクセサリ」表面分子(Springerら、(1987)前掲)を含む、いくつかのT細胞表面レセプターにより調節される。これらのアクセサリ分子の多数は、細胞の表面上

のモノクローナル抗体の反応性により定められる、天然に見いだされる細胞表面の分化(CD)抗原である(McMichael 編、Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press、オックスフォード、ニューヨーク(1987))。

【0005】リンパ球のアクセサリ分子を含む抗原独立の細胞間の相互作用は、免疫応答に対して必須である(Springerら、(1987)前掲)。例えば、T細胞関連タンパク質CD2のそのリガンドLFA 3(広く発現される糖タンパク質(ShawおよびShimuz、前掲の中に概観されている))への結合は、抗原特異的T細胞の活性化を最適化するために重要である(Moigcon ら、Nature 339 : 314 (1988))。他の重要な付着系は、リンパ球、マクロファージ収量顆粒球上に見いだされるLFA-1糖タンパク質(Springerら、(1987)前掲;ShawおよびShimuz (1988)前掲)のそのリガンドICAM-1(Makgoba ら、Nature 311 : 86-88 (1988)) およびICAM-2(Staunton ら、Nature 339 : 61-64 (1989)) への結合を含む。

【0006】T細胞のアクセサリ分子CD8およびCD4は、それぞれ、MHCクラスI(Norment ら、Nature 336 : 79-81 (1988)) およびクラスII(Doyle およびStrominger, Nature 330 : 256-259 (1987)) 分子との相互作用により、T細胞の付着を強化する。「ホーミング・レセプター(homing receptor)」はリンパ球の移動のコントロールのために重要である(Stoolman, Cell 56 : 907-910 (1989))。VLA糖タンパク質は、細胞外マトリックス成分への付着を必要とするリンパ球の機能を伸介するように思われるインテグリン(integrin)である(Hemler、前掲)。CD2/LFA-3, LFA-1/ICAM-1、およびVLA付着系は、広範な種類のタイプの細胞上に存在する(Springerら、(1987)、前掲;ShawおよびShimuz、(1989)、前掲およびHemler、(1988))、前掲)。

【0007】B-リンパ球の活性化は2つのシグナルを必要とすることがかなり以前に提案され(Bretscher およびCohn, Science 169 : 1042 - 1049 (1970))そして現在すべてのリンパ球はそれらの最適な活性化のための2つのシグナル、抗原特異的またはクローナルシグナル、ならびに抗原非特異的シグナルを必要とすると信じられている(Janeway、前掲)。Freeman ら(J. Immunol. 143 (8) : 2714-2722(1989))は、mAB B7により認識されるB細胞活性化抗原をコードするcDNAクローンを単離しそして配列決定した(Freeman ら、J. Immunol. 138 : 3260 (1987))。

【0008】このcDNAでトランスフェクションしたCOS細胞は、標識化mAB B7およびmAB BB-1の両者により染色されることが示された(Clark ら、Human Immunol. 16 : 100-113 (1986) ; Yokochi ら、J. Immunol. 128 : 823 (1981)) ; Freeman ら、(1989)前掲;およびFreeman ら、(1987)、前掲)。さらに、この抗原の発現は他の系統の細胞、例えば、単球上に検出された(Freeman ら、前掲)。

【0009】Tヘルパー細胞(T_h)抗原の応答のために要求されるシグナルは、抗原を提示する細胞(APC)により提供される。T細胞レセプター複合体(Weiss, J. Clin. Invest. 86: 1015 (1990))を、APC上のクラスIIの主要な組織適合性複合体(MIIC)分子に関して提示された抗原と相互作用させることによって、第1シグナルは開始される(Allen, Immunol. Today 8: 270 (1987))。この抗原特異的シグナルは完全な応答を発生するために不十分であり、そして第2シグナルの存在下に、クローナルの不活性化またはアネルギーに実際に導くことがある(Schwartz, Science 248: 1349 (1990))。

【0010】MHCにより提供される第2「共同刺激(costimulatory)」シグナルについての要件は、ある数の実験の系において証明された(Schwartz, 前掲; WeaverおよびUnanue, Immunol. Today 11: 49 (1990))。これらの1または2以上のシグナルの分子の性質は完全には理解されないが、ある場合において、可溶性分子、例えば、インターロイキン(IL)-1(WeaverおよびUnanue, 前掲)および細胞間付着に関係する膜レセプターの両者は共同刺激シグナルを提供できることが明らかである。

【0011】CD28抗原、すなわち、免疫グロブリン上科のホモ2量体の糖タンパク質(AruffoおよびSeed, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 8573-8577 (1987))は、ほとんどの成熟ヒトT細胞上に見いだされるアクセサリー分子である(Damleら, J. Immunol. 131: 2296-2300 (1983))。現在の証拠が示唆するように、T細胞反応複合体により開始されるものと区別される別のT細胞活性化の経路において、この分子は機能する(Juneら, Mol. Cell Biol. 7: 4472-4481 (1987))。CD28抗原と反応性のモノクローナル抗体(mAb)は、種々のポリクローナルの刺激により開始されるT細胞の応答を増強することができる(Juneら、前掲、の中に概観されている)。

【0012】これらの刺激作用はmAb誘発サイトカインの生産(Thompsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 1333-1337 (1989); およびLindstenら, Science 244: 339-343 (1989)から、mRNA安定化の増加(Lindstenら、(1989)、前掲)の結果としてを生ずることができる。抗CD28mAbは、また、阻止作用を有することができ、すなわち、それらはオートログス混合リンパ球反応(Damleら, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 5096-6001 (1981))および抗原特異的T細胞クローンの活性化(Lesslauerら, Eur. J. Immunol. 16: 1289-1296 (1986))をブロックすることができる。

【0013】CD28はB細胞活性化抗原であるB7/BB-1のための対レセプターであることが研究において示された(Linsleyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5031-5035 (1990))。便宜上、B7/BB-1抗原を以後「B7抗原」と呼ぶ。CD28とB7抗原との間の相互作用は、B7抗

原およびCD28レセプターの細胞外部分、および免疫グロブリン(Ig)C1(一定領域の重鎖)の遺伝学的融合を使用して特徴づけられた(Linsleyら, J. Exp. Med. 173: 721-730 (1991))。

【0014】同定化B7Ig融合タンパク質ならびにB7陽性CHO細胞は、T細胞の増殖を共同刺激(costimulate)することが示された。B7陽性CHO細胞によるT細胞の刺激は、また、IL-2のための転写レベルの増加を特異的に刺激する。追加の研究において、抗CD28mAbは、ある種のT細胞白血病細胞系においてB細胞系白血病系統との細胞の相互作用により誘発されたIL-2の生産を阻止することが示された(Kohnoら, Cell Immunol. 131-1-10 (1990))。

【0015】CD28は単一の細胞外の可変領域(V)様ドメインを有する(AruffoおよびSeed、前掲)。相同性分子のCTLA4は、ネズミ細胞溶解性T細胞のcDNAライブラリーの分別スクリーニングにより同定された(Brunetら, Nature 328: 267-270 (1987))。この分子の転写は細胞障害活性を有するT細胞の集団の中に見いだされ、CTLA4が細胞溶解性応答において機能するであろうことを示唆した(Brunetら、前掲; およびBrunetら, Immunol. Rev. 103-21-36 (1988))。

【0016】研究者らの報告によると、CTLA4のヒトの対(Dariavachら, Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988))の遺伝子はクローニングされそしてCD28と同一の染色体領域(2g 33-34)にマッピングされた(Lafage-Pochitaloddら, Immunogenetics 31: 198-201 (1990))。このヒトCTLA4のDNAとCD28タンパク質をコードするものとの間の配列の比較は、膜近傍領域および細胞質領域において最高度の相同性をもつ、配列の有意な相同性を明らかにする(Brunetら、1988、前掲; Dariavachら、1988、前掲)。

【0017】CD28とCTLA4との間の高度の相同性は、これらの遺伝子の共同局在化と一緒に、これらの分子がまた機能的に関係するかどうかという問題を発生する。しかしながら、CTLA4のタンパク質生産物はまだ首尾よく発現されてきていないので、これらの問題は未解決のままである。

【0018】免疫グロブリン遺伝子上科における細胞表面の糖タンパク質の可溶性誘導体の発現は、CD4、HIV-1のレセプター、およびCD28およびB7のレセプターについて、ハイブリッド融合分子を使用して活性化され、これらのハイブリッド融合分子は抗体ドメインに融合されたCD4レセプターの細胞外ドメインの部分に相当するアミノ酸をコードするDNA配列から成る(免疫グロブリン1(Caponら, Nature 337: 525-531 (1989)(CD4)およびLinsleyら, J. Exp. Med., 前掲)(CD28およびB7)。

【0019】従来発現されていないCTLA4遺伝子の可溶性タンパク質生産物を得ること、およびT細胞の機能的

応答に係るCTLA 4のための天然のリガンドを同定することは有用であろう。次いで、可溶性タンパク質生産物を使用してT細胞のin vivo 応答を調節して病理学的状態を処置することができるであろう。

【0020】発明の要約

したがって、本発明はCTLA 4レセプタータンパク質に相当するアミノ酸配列をコードする完全なかつ正しいDNA配列を提供し、そしてCTLA 4レセプターのために天然のリガンドとしてB7抗原を同定する。本発明は、また、CTLA 4免疫グロブリン(Ig)融合タンパク質生産としてDNAを発現する方法を提供する。本発明の態様は、CTLA 4 Ig融合タンパク質、およびCD28Ig/CTLA 4 Ig融合タンパク質を包含するハイブリッドの融合タンパク質を包含する。また、CTLA 4融合タンパク質、B7Ig融合タンパク質、およびそれらの断片および/または誘導体、例えば、CTLA 4およびB7抗原と反応性のモノクローナル抗体を使用して細胞の相互作用および免疫応答を調節する方法が提供される。

【0021】本発明のヒトCTLA 4レセプタータンパク質は187アミノ酸によりコードされ、そして新しく同定されたN連鎖グリコシル化部位を包含する。本発明のCTLA 4 Ig融合タンパク質は、活性化B細胞、および他の系統上に発現されたB7抗原、T細胞上のCD28レセプターのためのリガンドと結合する。CTLA 4 Igは、CD28レセプターに結合するB7よりも有意により高い親和性でB7抗原と結合する。

【0022】CTLA 4 Ig構成体は、ヒトIgC₁ドメインに相当する第2アミノ酸配列に融合したCTLA 4レセプターの細胞外ドメインに相当する第1アミノ酸配列を有する。第1アミノ酸配列は、アミノ酸配列の約位置1から約位置125のアミノ酸残基を含有し、これらのアミノ酸残基はヒトIgC₁のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列に接合したCTLA 4の細胞外ドメインに相当する。融合タンパク質は好ましくは2量体の形態で生産される。可溶性CTLA 4 IgはTおよびBリンパ球の応答の効力のあるin vivo インヒビターである。

【0023】また、本発明において、ハイブリッド融合タンパク質、例えば、第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA 4 Ig融合タンパク質が包含され、この第1アミノ酸配列はCTLA 4 Igの細胞外ドメインの断片に相当する第2アミノ酸配列およびヒトIgC₁のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当する第3アミノ酸配列に接合したCD28の細胞外ドメインの断片に相当する。

【0024】ハイブリッド融合タンパク質の1つの態様は、CD28の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1から約94のアミノ酸残基を含有する第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA 4 Ig融合タンパク質であり、CD28の細胞外ドメインはCTLA 4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置94から約位置125のアミノ酸

残基を含有する第2アミノ酸配列を接合し、CTLA 4の細胞外ドメインはヒトIgC₁のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸残基を含有する第3アミノ酸配列に接合している。

【0025】また、本発明において、T細胞をCTLA 4レセプターのリガンドと反応させることによって、CTLA 4陽性T細胞とB7陽性細胞との相互作用を阻止することによる、他の細胞とのT細胞の相互作用を調節する方法が包含される。リガンドはB7Ig融合タンパク質、CTLA 4レセプターと反応性のモノクローナル抗体、および抗体断片を包含する。本発明は、また、B7抗原のためのリガゼを使用する、B7陽性細胞とのT細胞の相互作用を調節する方法を提供する。このようなリガンドは、本発明のCTLA 4 Ig融合タンパク質、その断片または誘導体、CD28Ig/CTLA 4 Ig融合タンパク質のハイブリッド、またはB7抗原と反応性のモノクローナル抗体である。

【0026】本発明は、さらに、B7抗原と反応性のリガンドを投与してB7陽性細胞とのT細胞の相互作用を調節することによって、B7陽性細胞とのT細胞の相互作用により仲介される免疫系の疾患を処置する方法を包含する。このリガンドは、CTLA 4 Ig融合タンパク質、CD28Ig/CTLA 4 Ig融合タンパク質のハイブリッド、またはB7抗原と反応性のモノクローナル抗体である。

【0027】CTLA 4 Ig融合タンパク質と反応性のモノクローナル抗体およびCD28Ig/CTLA 4 Ig融合タンパク質と反応性のモノクローナル抗体を、細胞の相互作用の調節における使用について記載する。CTLA 4 Ig融合タンパク質を安定に発現する新規なチャイニーズハムスター卵巢細胞系をまた開示する。

【0028】発明の実施の形態

ここに記載する本発明を完全に理解することができるように、次の説明を記載する。本発明は、T細胞表面上に見いだされ、活性化B細胞および他の系統の細胞上に発現されたB7抗原に結合する、ヒトCTLA 4レセプターの単離およびクローニング、およびCTLA 4レセプター遺伝子の可溶性融合タンパク質生産物の発現に関する。本発明は、また、発現されたCTLA 4レセプターを使用して、B7陽性細胞とのT細胞の相互作用を包含する細胞の相互作用を調節する方法を提供する。

【0029】好ましい態様において、本発明のヒトCTLA 4レセプタータンパク質に相当するアミノ酸配列をコードする完全なかつ正しいDNA配列をPCRによりクローニングする。CTLA 4の完全な予測されたコーディング配列を含有するcDNAを、下の実施例の中に詳細に記載されているように、H38RNAから増幅されたPCR断片からアセンブリングし、そして発現ベクターCDM8の中に挿入した。単離物をCOS細胞の中にトランスフェクションし、そしてB7Ig、すなわち、Linsleyら、J. Exp. Med.173:721-730(1991)記載されているように、B7の細胞外ドメインおよびヒト免疫グロブリン(Ig)C₁領域に相当

するアミノ酸配列を有する可溶性融合タンパク質の結合について試験した。

【0030】次いで、OMCTLA4と表示する1つの単離物のDNA配列を決定し、そしてN末端においてオンコスタチンMからのシグナルペプチドに融合した、予測されたヒトCTLA4配列に正確に相当することが発見された。CTLA4レセプターは187アミノ酸(シグナルペプチドおよび停止コドンを除く)によりコードされ、そしてアミノ酸位置109-111に新しく同定されたN連鎖グリコシル化部位を含む(下の第3図を参照)。オンコスタチンMのシグナルペプチドを使用して、CTLA4レセプターを発現させる。

【0031】他の好ましい態様において、CTLA4の細胞外ドメインに相当する第1アミノ酸配列およびヒトIgC1ドメインに相当する第2アミノ酸配列を有する融合タンパク質を使用して、CTLA4レセプター遺伝子(CTLA4Ig)のタンパク質生産物の可溶性の形態を調製する。ここに記載するcDNA配列に基づくヒトCTLA4レセプターに相当するアミノ酸配列の部分をコードするcDNAを含有するクローニングおよび発現のプラスミド(CDM8およびLN)を構成し、ここでCTLA4レセプター遺伝子の細胞外ドメインの断片に相当する第1アミノ酸配列をコードするcDNAを、発現されたCTLA4タンパク質の可溶性の変更によりCTLA4レセプター遺伝子の発現を可能とするIgC領域に相当する第2アミノ酸配列をコードするDNAに接合する。

【0032】こうして、可溶性CTLA4Ig融合タンパク質は第1アミノ酸配列によりコードされ、この第1アミノ酸配列はヒトIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列に接合したCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1~約125のアミノ酸残基を含有する。融合タンパク質は好ましくは2量体の形態で生産される。次いでこの構成体をCOSまたはCHO細胞の中にトランスフェクションし、そしてCTLA4Igを精製しそして2量体として同定した。

【0033】CTLA4Ig融合タンパク質に相当するアミノ酸配列をコードするDNAは、ブダベスト条約の規定に従いアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)(ATCC)(米国マリランド州ロックビル)に1991年5月31日に受託され、そしてATCC受け入れ番号68629を与えられた。本発明は、可溶性融合タンパク質の形態でCTLA4転写体の第1タンパク質生産物を提供する。CTLA4タンパク質はほぼ50,000サブユニットのM_rのジサルファイド連鎖の2量体を形成し、天然のCTLA4がT細胞表面上にジサルファイド連鎖ホモ2量体として多分存在することを示す。

【0034】B7抗原はT細胞上のCD28レセプターのためのリガンドであることが示された(Linsleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、前掲)。CTLA4レセプター分子

はCD28レセプターに機能的にかつ構造的に関係すると思われる；両者はB細胞活性化抗原のためのレセプターであるが、CTLA4は、リンパ系付着系についてこれまで報告された最高のもので、B7に対するより高い親和性を有するように思われる。しかしながら、CTLA4IgはCD28IgよりB7陽性(B7⁺)細胞系にいつそう強く結合することが示された。他の実験において、CTLA4はB7抗原に対してCD28レセプターより高い親和性のレセプターであることが証明された。さらに、CTLA4IgはB7抗原に大きさが類似するリンパ芽球細胞上の単一のタンパク質に結合することが示された。CTLA4IgはT細胞増殖を阻止し、そしてT_H誘発IgM生産を阻止した。

【0035】他の好ましい態様において、異なるレセプタータンパク質の断片に相当するアミノ酸配列を有するハイブリッド融合タンパク質を構成した。例えば、CD28およびCTLA4の細胞外ドメインの選択した断片に相当するアミノ酸配列を連鎖して、CD28Ig/CTLA4Igハイブリッド融合タンパク質を形成した。こうして、第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA4Ig融合タンパク質が得られ、この第1アミノ酸配列はCTLA4Igの細胞外ドメインの断片に相当する第2アミノ酸配列およびヒトIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当する第3アミノ酸配列に接合した、CD28の細胞外ドメインの断片に相当するアミノ酸残基を含有する。

【0036】ハイブリッド融合タンパク質の1つの態様は第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA4Ig融合構成体であり、この第1アミノ酸配列はCD28の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1~約位置94のアミノ酸残基を含有し、CD28はCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置94~約位置125のアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列に接合し、CTLA4はヒトIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当する第3アミノ酸配列に接合している。

【0037】CTLA4レセプタータンパク質、可溶性融合タンパク質およびハイブリッド融合タンパク質に相当するアミノ酸配列をコードするDNA配列をクローニングしそして発現する技術、例えば、オリゴヌクレオチドの合成、PCR、細胞の形質転換、ベクターの構成、発現系などはこの分野においてよく確立されており、そしてほとんどの熟練者は特定の条件および手順のための標準的原材料をよく知っている。しかしながら、必要に応じて便利および変更の注釈のために次の節を準備し、そしてこれらの節はガイドラインの役Hをするであろう。

【0038】レセプターおよび融合タンパク質のためのコーディング配列のクローニングおよび発現

本発明のCTLA4Igを特性決定しかつCD28Ig/CTLA4Ig融合ハイブリッドを調製するためのCD28IgC1およびB7IgC1に相当する融合タンパク質の構成体を、Linsleyら、J. Exp. Med. 173: 721-730 (1991)(これを引用によって加える)に記載されているように調製した。あ

るいは、B7抗原およびCD28レセプターを発現する細胞から、これらのタンパク質について発表された知識 (AruffoおよびSccd、およびFreeman、前掲) に基づいて標準的手順を使用して、cDNAクローンを調製することができる。

【0039】CTLA4の細胞外ドメインおよびヒトIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するに相当するアミノ酸配列をコードするDNAから成るCTLA4 Ig融合体を、PCR断片の結合により構成した。アミノ酸をコードするcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)技術に従い増幅する(米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,202号(Mullisら)、およびMullisおよびFaloona, *Methods Enzymol.* 154 : 335-350 (1987)を参照のこと)。CTLA4 Ig融合ポリペプチドを構成し、これらのポリペプチドはCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1~約位置125のアミノ酸残基を含有するアミノ酸配列をコードするDNA、およびIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするDNAを有した。

【0040】ヒトリンパ系細胞の中のCTLA4レセプタータンパク質の発現は従来報告されてきていないので、CTLA4のmRNA源を探ることが必要であった。いくつかのヒト白血病細胞系の全体の細胞のRNAから作ったPCRのcDNAを、プライマーとして、CTLA4遺伝子の発表された配列かオリゴヌクレオチドを使用してスクリーニングした(Dariavachら、前掲)。試験したcDNAのうちで、H38細胞(HTLV II関連白血病系統)は期待したサイズを有するPCR生産物の最良の収量を提供した。

【0041】CTLA4の単一のペプチドはCTLA4遺伝子の中で同定されなかったため、CTLA4の予測された配列のN末端をオンコスタチンMのシグナルペプチド(Malikら、*Molec. and Cell. Biol.* 9 : 2847 (1989))に、下の実施例に記載するオリゴヌクレオチドを使用して融合した。PCR反応の生産物を、IgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするcDNAを使用して、発現ベクター、例えば、CDM8またはLNの中に結合した。

【0042】全長のヒトCTLA4をコードするDNAを得るために、CTLA4のトランスメンブレンおよび細胞質ドメインをコードするcDNAをH38細胞からPCRにより構成し、そしてCTLA4のN末端に融合したオンコスタチンMシグナルペプチドをコードする、前述したように構成した、CTLA4 Igからの断片と、下の実施例に記載するオリゴヌクレオチドのプライマーを使用して接合した。PCR断片をプラスミドCDM8の中に結合して、全長のCTLA4をコードする発現プラスミドを生成し、そしてこれをOMCTLA4と表示した。

【0043】ハイブリッド融合タンパク質に相当するアミノ酸配列をコードするDNAを構成するために、1つのレセプター遺伝子の細胞外ドメインの部分に相当するア

ミノ酸をコードするDNAを、他のレセプター遺伝子の細胞外ドメインの部分に相当するアミノ酸をコードするDNA、およびヒトIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするDNAに、B7Ig、CD28IgおよびCTLA4 Ig構成体について前述した手順を使用して接合する。こうして、例えば、CD28レセプターの細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約1位置~約94位置のアミノ酸残基をコードするDNAを、CTLA4レセプターの細胞外ドメインのアミノ酸配列の約位置94~約位置125のアミノ酸残基をコードするDNA、およびヒトIgC1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするDNAに接合する。

【0044】大量のクローニングしたDNAを生産するために、本発明の融合構成体をコードするDNAを含有するベクターを適当な宿主細胞、例えば、細菌細胞系の大腸菌(E. coli) MC1061/p3株(Invitrogen Corp.、カリフォルニア州サンディエゴ)の中に標準的手順を使用して形質転換し、そしてコロニーを適当なプラスミドについてスクリーニングする。

【0045】次いで、前述したようにして得られた融合構成体をコードするDNAを含有するクローンを、発現のために適当な宿主細胞の中にトランスフェクションする。使用する宿主細胞に依存して、このような細胞に適当な標準的技術を使用してトランスフェクションを実施する。例えば、哺乳動物細胞中のトランスフェクションは、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、CaPO₄共沈、リポフェクション(lipofection)、エレクトロポレーションまたは原形質体の融合、および他のこの分野において知られている方法により達成し、ここで後者の方法は次のものを包含する：リゾチームの融合または赤血球の融合、スクレイピング、直接的吸収、浸透圧またはスクロースのショック、直接的マイクロインジェクション、間接的マイクロインジェクション、例えば、赤血球仲介技術を介するマイクロインジェクション、および/または宿主細胞を電流に暴露する。遺伝的情報を細胞の中に導入する他の手順は疑いなく開発されるであろうから、上に列挙したトランスフェクションの技術は網羅的であるお考えられない。

【0046】多細胞の生物から誘導化された真核生物の宿主細胞の培養物の中の発現は好ましい(*Tissue Cultures*, Academic Press, CruzおよびPatterson編、(1973)を参照のこと)。これらの系はイントロンをスプライスする能力をもつという追加の利点を有し、こうしてゲノム断片の発現に直接使用することができる。有用な宿主細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、サル腎臓(COS)細胞、VERO細胞およびHeLa細胞を包含する。本発明において、融合構成体を安定に発現する細胞系は好ましい。

【0047】このような細胞のための発現ベクターは、通常、哺乳動物細胞と適合性のプロモーターおよびコン

トロール配列、例えば、CMV プロモーター (CDM8ベクター) および鳥類の肉腫ウイルス (ASV) (LNベクター) を包含する。他の普通に使用される前期および後期のプロモーターは、サルウイルス40 (SV40) (Fiersら、*Nature* 273 : 113 (1973))、または他のウイルスのプロモーター、例えば、ポリオーマから誘導化されたもの、アデノウイルス2、およびウシ乳頭腫ウイルスを包含する。

【0048】コントロール可能なプロモーター、hMTII (Karin ら、*Nature* 299 : 797-802(1982))をまた使用 10 することができる。哺乳動物細胞の宿主系の形質転換についての一般的面は、Axel (米国特許第4,399,216号、1983年8月16日発行)により記載された。現在明らかのように、「エンハンサー」領域は発現を最適化するとき重要である；これらは、一般に、非コーディング領域の中のプロモーター領域の上流または下流に見いだされる配列である。必要に応じて、複製の由来をウイルス源から得ることができる。しかしながら、染色体中の組み込みは真核生物におけるDNAの複製のための普通のメカニズムである。

【0049】融合構成体の発現のために好ましい真核生物の細胞、例えば、COS またはCHO細胞を包含するが、他の真核生物の微生物を使用できる。サッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、イーストの実験室用菌株をたいてい使用するが、他の菌株、例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)を使用できる。例えば、Broach, *Methods Enzymol.* 101 : 307 (1983) の2 μ の複製由来、または他の酵母適合性の複製由来 (例えば、Stinchcombら、*Nature* 282 : 39 (1979)) ; Tschempeら、*Gene* 10 : 157 (1980) ; およびClarkeら、*Methods Enzymol.* 101 : 300 (1983)を参照のこと)を用いるベクターを使用することができる。

【0050】酵母のベクターのためのコントロール配列は、グリコール分解酵母の合成のためのプロモーターを包含する (Hessら、*J. Adv. Enzyme Reg.* 7 : 149 (1968) ; Hollandら、*Biochemistry.* 17 : 4900 (1978))。この分野において知られている追加のプロモーターは、CDM8ベクターの中に提供されたCMV プロモーター (Toya 10 maおよびOkayama, *FEBS* 268 : 217-221 (1990)) ; 3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター (Hitzemanら、*J. Biol. Chem.* 255 : 2073))、および他のグリコール分解酵素のためのプロモーターを包含する。

【0051】成長条件によりコントロールされる転写の追加の利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素の代謝に関連する分解酵素、およびマルトースおよびガラクトースの利用に係る酵素のためのプロモーター領域である。また、ターミネーター配列はコーディング配列の3'末端において望ましいと信じられ 50

る。このようなターミネーターは、酵母誘導化遺伝子の次の3' - 非翻訳領域の中に見いだされる。

【0052】あるいは、原核生物の細胞を発現のための宿主として使用することができる。原核生物の細胞は、大腸菌 (*E. coli*) の種々の株により最も頻繁に発現される；しかしながら、他の微生物の菌株も使用できる。ここにおいて転写開始のためのプロモーターを、必要に応じてオペレーターとともに含むと定義される、普通に使用される原核生物のコントロール配列は、リボソーム結合部位の配列と一緒に、ベクターラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトース (*lac*) プロモーター系 (Chang 10 ら、*Nature* 198 : 1056 (1977))、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 (Goeddel 10 ら、*Nucleic Acids Res.* 8 : 4057 (1980)) およびラムダ誘導化P₁ プロモーターおよびN-遺伝子リボソーム結合部位 (Shimatake 10 ら、*Nature* 292 : 128 (1981))のような普通に使用されているプロモーターを包含する。

【0053】CD28IgおよびCTLA4 Igタンパク質、および融合ハイゾリッドタンパク質、例えば、CD28Ig/CTLA4 20 Igを後述するように種々の系の中で発現することができる。cDNAを適当な制限酵素で切り出し、そしてこのような発現について適当な原核生物または真核生物の発現ベクターの中に結合することができる。CD28およびCTLA4レセプターのタンパク質は天然に2量体として存在するので、これらのタンパク質の首尾よい発現はこれらのタンパク質を2量体として形成することを可能とする発現系を必要とすると信じられる。これらのタンパク質の切頭バージョン (すなわち、タンパク質のトランスメンブレン領域より上流の位置において配列の中に停止コドン 30 を導入することによって形成される) は発現されると思われぬ。CD28およびCTLA4レセプターの融合タンパク質としての発現は、これらのタンパク質の2量体の形成を可能とする。こうして、CTLA4タンパク質の融合生産物としての発現は、本発明において好ましい。

【0054】チャイニーズハムスター卵巣細胞系CTLA4 Ig-24と表示する本発明の安定なCHO系はCTLA4 Igの発現のために好ましく、そしてブダベスト条約の規定に従いATCCに1991年5月31日に受託され、そしてATCC受け入れ番号10762を与えられた。本発明のCTLA4レセプターの発現は、細胞系、例えば、COS細胞をトランスフェクションし、そしてCTLA4トランスフェクションした細胞をCTLA4レセプターに結合することによって、例えば、細胞のB7Ig融合タンパク質への結合について経験することによって、発現を検出して達成される。

【0055】生ずる構成体の配列は、既知の手順、例えば、Sangerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463 (1977)に記載されている、さらにMcisingら、*Nucleic Acids Res.* 9 : 309 (1981)に記載されている手順を使用するDNAの配列決定によるか、あるいはMaxam 10 ら、*Methods Enzymol.* 65 : 499 (1980)の方法により確認さ

れる。

【0056】タンパク質生産物の回収

前述したように、CD28およびCTLA 4 レセプターの遺伝子は、切頭タンパク質をコードするDNA の直接の発現を使用して成熟タンパク質として容易に発現されない。ホモ2量体の形成を可能とするために、CD28およびCTLA 4 の細胞外ドメインに相当し、そしてシグナル配列、例えば、適当なプロセッシングを行うことができる細胞中のオンコスタチンMの配列のためのコドンを含むアミノ酸配列をコードするDNA を、天然に2量体のタンパク質のFcドメインに相当するアミノ酸配列をコードするDNA と融合する。こうして、細胞から分泌された後のこれらの融合タンパク質の生産物の精製は、融合タンパク質の抗免疫グロブリン部分と反応性の抗体を使用して促進される。融合タンパク質の生産物は、培地の中に分泌されると、タンパク質の標準的精製技術、例えば、プロテインAカラムへの適用により回収される。

【0057】使用

CTLA 4 Ig融合タンパク質および/またはその融合タンパク質の断片を使用してB7陽性細胞、例えば、B細胞と反応させて、B7抗原陽性細胞とのT細胞の相互作用により仲介される免疫応答を調節することができる。CTLA 4 Ig融合タンパク質およびCTLA 4 Ig / CD28Igハイブリッドタンパク質、および/またはこれらのタンパク質の断片および誘導体を、また、使用して、B7陽性細胞、例えば、B細胞と反応させて、T細胞依存性B細胞の応答により仲介される免疫応答を調節することができる。用語「断片」は、ここにおいて使用するとき、「CTLA 4」と呼ぶタンパク質をコードするアミノ酸配列の部分の意味する。使用できるCTLA 4 Ig融合のタンパク質の断片は、ここに記載するCTLA 4 Ig融合タンパク質を得るために使用するCTLA 4 レセプターに相当するアミノ酸配列のある部分に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0058】活性化されたB細胞および他の系統の細胞上で発現されたB7抗原、およびT細胞上で発現されたCD28レセプターを互いに直接結合することができ、そしてこの相互作用は細胞-細胞の相互作用を仲介することができる。このような相互作用は、T細胞の増殖、および免疫グロブリン生産細胞へのB細胞の分化に導く、T細胞の中のCD28活性化経路を直接トリガーする。起こるB細胞の活性化は、B7抗原の発現を増加し、さらにCD28を刺激して、慢性の炎症の状態、例えば、自己免疫疾病、異種移植の拒絶、移植片対宿主の疾患または慢性のアレルギー反応に導くことがある。この反応をブロックまたは阻止することは、T細胞のサイトカインの調製を防止し、こうして炎症反応を防止または逆転するとき有効であることがある。

【0059】CTLA 4 Igは、ここにおいて、T細胞およびB細胞の相互作用を必要とするin vitroリンパ球機能の

効力のあるインヒビターであることが示された。これはB7抗原およびその対レセプター、CTLA 4 および/またはCD28の間の相互作用の重要性を示す。ネズミおよびヒトのCTLA 4 の細胞質ドメインは類似し(Dariavachら、前掲、1988)、この領域が重要な機能的性質を有することを示唆する。また、CD28およびCTLA 4 の細胞質ドメインは相同性を共有する。

【0060】CTLA 4 は、抗BB 1または抗CD28モノクローナル抗体よりも、いっそう効力のあるリンパ球の応答のin vitroインヒビターである。CTLA 4 Igは、その阻止作用と反作用するT細胞の増殖に対する直接の刺激作用をもたない。したがって、CTLA 4 Ig融合タンパク質は抗CD28モノクローナル抗体よりもすぐれたin vivo インヒビターとして働くことができる。CTLA 4 Igのin vitro免疫抑制作用は、異常なT細胞の活性化またはIgの生産を包含する自己免疫疾患の処置の治療におけるその使用を示唆する。

【0061】CTLA 4 Ig融合タンパク質は、in vivo 阻止性質を示すことが期待された。こうして、CTLA 4 Igは、同様なin vivo 条件下に抗CD28抗体について観察される作用に類似する方法で、T細胞を阻止する作用をすることが期待される。T細胞/B細胞の相互作用がT細胞とB細胞との間の接触の結果として起こる条件下に、B7抗原陽性細胞、例えば、B細胞と反応させるために導入されたCTLA 4 Igの結合は、T細胞/B細胞の相互作用を妨害、すなわち、阻止して免疫応答の調節を生ずることができる。この独占的な阻止作用のために、CTLA 4 Igは生体内でT細胞の活性のインヒビターとして、非特異的インヒビター、例えば、シクロスポリンまたはグルコステロイドよりも有用であることが期待される。

【0062】1つの態様において、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはCTLA 4 Ig / CD28Igハイブリッドタンパク質は、適当な製剤学的担体と組み合わせてin vivo 導入する、すなわち、病理学的状態、例えば、免疫系の疾患または癌の処置のためにヒトの投与することができる。融合タンパク質のin vivo 導入は、T細胞と他の細胞、例えば、B細胞との相互作用を、B7陽性細胞へのリガンドの結合の結果として、妨害することが期待される。正常のT細胞の相互作用の防止は、T細胞の活性を減少し、例えば、T細胞の増殖を減少することができる。

【0063】さらに、融合タンパク質のin vivo 投与はサイトカインのin vivoレベルの調節して被検体において所望の作用を促進することが期待され、ここでサイトカインは次のものを包含するが、これらに限定されない：インターロイキン、例えば、インターロイキン(「IL」)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, 成長因子、例えば、腫瘍成長因子(「TFG」)、コロニー刺激因子(「CSF」)、インターフェロン(「IFN」)および腫瘍壊死因子(「TNF」)。例えば、融合タンパク質をin vivo 導入するとき、それは悪性の増殖、例え

ば、腫瘍細胞の増殖に寄与するサイトカインの生産をブロックすることができる。融合タンパク質は、また、T細胞の活性化に依存するウイルス、例えば、エイズを引き起こすウイルス、HTLV 1 の増殖をブロックすることができる。

【0064】ある環境下に、前述したように、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはその断片のin vivo 投与の作用は阻止であり、T細胞/B細胞の接触から生ずるCTLA 4およびCD28のトリガーの融合タンパク質によるブロッキングから生ずる。例えば、CTLA 4 Igタンパク質はT細胞の増殖をブロックすることができる。こうして、CTLA 4 Ig融合タンパク質のin vivo 導入は、T細胞およびB細胞の両者が仲介する免疫応答に対する作用を生成するであろう。また、融合タンパク質をサイトカインまたは他の治療用試薬の導入と組み合わせて被検体に投与することができる。

【0065】本発明の追加の態様において、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはCTLA 4 レセプターと反応性の誘導体を包含する他の試薬を使用してT細胞の相互作用を調節する。例えば、CTLA 4 レセプターと反応性の抗体および/または抗体断片をスクリーニングして、B7抗原へのCTLA 4 Ig融合タンパク質の広いスペクトルのを阻止することができるものを同定することができる。次いで、抗体または抗体断片、例えば、Fab またはF(ab)₂断片を使用して、例えば、T細胞と反応させてT細胞の増殖を阻止することができる。

【0066】CTLA 4 レセプターと反応性のモノクローナル抗体は、既知の手順、例えば、KohlerおよびMilstein (KohlerおよびMilstein, Nature, 256 : 495-97 (1975))により導入された手順、およびその変更により生成して、細胞の相互作用を調節することができる。

【0067】これらの技術は、特定の抗体を生産するようにプライミングした動物の使用を包含する。動物は免疫原(例えば、B7Ig融合タンパク質、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはCD28Ig/CTLA 4 Igハイブリッド融合タンパク質)の注入によりプライミングして、所望の免疫応答、すなわち、プライミングされた動物からの抗体の生産を引き出すことができる。また、プライミングされた動物は疾患を発現する動物である。

【0068】プライミングされた病気の動物のリンパ節、脾臓または末梢血液から誘導化されたリンパ球を使用して、特定の抗体を探索することができる。所望の免疫グロブリンをコードするリンパ球の染色体を、一般に融合剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)の存在下に、リンパ球を骨髄腫細胞と融合することによって、永久分裂能化する。ある数の骨髄腫細胞系、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8, 653, Sp2/0-Ag14、またはHLI-653骨髄腫系統の任意のものを、標準的技術に従い、融合相手として使用することができる。これらの骨髄腫系統はATCC(米国マリランド州口

ックビル)から入手可能である。

【0069】次いで、所望のハイブリドーマを包含する生ずる細胞を選択培地、例えば、HAT培地の中で成長させ、ここで未融合の親の骨髄腫またはリンパ球の細胞は究極的に死亡する。ハイブリドーマ細胞のみは生き残り、そして制限希釈の条件下に成長して単離されたクローンを得ることができる。ハイブリドーマの上澄み液を、例えば、免疫化に使用したCTLA 4 Igタンパク質を使用するイムノアッセイ技術により、所望の選択性の存在についてスクリーニングする。次いで、陽性のクローンを制限希釈の条件下にサブクローニングし、そして生成したモノクローナル抗体を単離することができる。

【0070】モノクローナル抗体の単離および精製の種々の普通の方法を使用して、他のタンパク質および汚染物質を含有しない抗体を得ることができる。モノクローナル抗体を精製する普通に使用されている方法は、硫酸アンモニウム沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、およびアフィニティクロマトグラフィーを包含する(Zolaら、Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications, Hurell編、p. 51-52 (CRC Press, 1982)を参照のこと)。これらの方法に従い生産されたハイブリドーマは、この分野において知られている技術を使用してin vitroまたはin vivo(腹水の中で)増殖することができる(一般に、Finkら、Prog. Clin. Pathol., 9 : 121-33 (1984), Fig. 6-1, p. 123を参照のこと)。

【0071】一般に、個々の細胞系を、例えば、実験室用容器の中でin vivo 増殖させ、そして高い濃度の単一の特定のモノクローナル抗体を含有する培地をデカンテーション、濾過または遠心により収穫することができる。さらに、CTLA 4 レセプターの細胞外ドメインと反応性の活性結合領域を含有するこれらの抗体の断片、例えば、Fab, F(ab)₂およびFv断片を生成することができる。このような断片は、この分野においてよく確立された技術を使用して生成することができる(例えば、Rousseauxら、Methods Enzymol. 121 : 663-69, Academic Press (1986)を参照のこと)。

【0072】前述したようにして調製した抗B7モノクローナル抗体を使用してB7抗原に結合させて、CD28陽性またはCTLA 4陽性のT細胞とB7陽性細胞との相互作用を阻止することができる。抗CTLA 4モノクローナル抗体を使用してCTLA 4レセプターと結合させて、CTLA 4陽性T細胞と他の細胞との相互作用を阻止することができる。他の態様において、CTLA 4 Ig融合タンパク質を使用して、CTLA 4とB7抗原との間の相互作用を調節できる追加の化合物を同定することができる。このような化合物は、B細胞および/またはT細胞と反応させるために使用できる天然に見いだされる小さい分子を包含することができる。例えば、発酵プロセスをCTLA 4/B7の相互作用を阻止する能力について試験することができる。

【0073】さらに、前述のCTLA4 Ig融合タンパク質の誘導体を使用してT細胞の増殖を調節することができる。例えば、断片または誘導体を使用して、異種移植の骨髄の移植に伴う移植片対宿主 (GVH)の疾患におけるT細胞の増殖をブロックすることができる。CD28仲介T細胞増殖経路は、CD3 / T細胞のレセプター複合体により与えられる増殖 (Juneら、1987、前掲)と対照的に、シクロスポリン耐性である。シクロスポリンはGVH 疾患のための処置として比較的無効である (Storb, Blood68 : 119-125 (1986))。GVH 疾患は、CD28抗原を発現する Tリンパ球により仲介されると考えられる (Storb および Thomas, Immunol. Rev. 88 : 215-238 (1985))。こうして、CTLA4 Ig融合タンパク質は、単独で、あるいは免疫抑制剤、例えば、シクロスポリンと組み合わせて、GVH 疾患におけるT細胞の増殖のブロッキングに有用であることができる。

【0074】こうして、B細胞を包含するB7陽性細胞とのCTLA4陽性T細胞の相互作用の本発明の方法による調節を使用して、病理学的状態、例えば、自己免疫性、移植、感染症および新形成を処置することができる。次の実施例によって、本発明をさらに説明しかつ当業者による本発明の実施および使用を助ける。これらの実施例は本発明を限定しない。

【0075】例 1

B7Ig及びCD28Ig融合タンパク質の調製

レセプター - 免疫グロブリン C (IgC) 融合タンパク質B7Ig及びCD28Igを、本発明において引用により組込まれる、Linsley など、, J. Exp. Med. 173 : 721 ~ 730 (1991)により記載されているようにして調製した。簡単に言えば、それぞれのレセプタータンパク質 (たとえ B7) に対応するアミノ酸配列をコードするDNA を、ヒトIgC 1のヒンジ、CH2 及びCH3 領域に対応するアミノ酸配列をコードするDNA に連結した。これは次のようにして達成される。

【0076】ポリメラーゼ鎖反応 (PCR)。PCR のために、DNA フラグメントを、個々の融合タンパク質について下記のようにしてプライマー対を用いて増幅した。PCR 反応 (0.1 mlの最終体積) を、Tag ポリメラーゼ緩衝液 (Stratagene, La Jolla, CA) において行ない、ここで前記緩衝液は、個々のdNTP20 μモル; 前記に示されたプライマー-50~100 pモル; 鋳型 (引用により本明細書において組込まれる、Kauasaki, PCR Protocols, Academic Press, 21 ~ 27ページ (1990) により記載されるようにして、ランダムヘキサマープライマーを用いて合計 1 μgのRNA から合成されたプラスミド又はcDNA 1 ng) ; 及びTag ポリメラーゼ (Stratagene)を含んだ。反応は、16~30回のサイクル (典型的なサイクルは、94 で1分、50 で1~2分及び72 で1~3分の段階から成る) のためにサーモサイクラー (Perkin Elmer Corp. Norwalk, CT) 上で行なわれた。

【0077】プラスミドの構成。Aruffo and Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 8573 (1987)により記載されるような、CD28をコードするcDNAを含む発現プラスミドが、Dr. Aruffo and Seed (Mass General Hospital Boston, MA)により供給された。Aruffo, Cell 61 : 1303 (1990) により記載されるような、CD5をコードするcDNAを含むプラスミドがDr. Aruffoにより供給された。Freeman など、, J. Immunol. 143 : 2714 (1989) により記載されるような、B7をコードするcDNAを含むプラスミドは、Dr. Freeman (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA)により供給された。

【0078】CD28及びB7の可溶性形の発現での初期試みのために、構成体をLinsley など、, J. Exp. Med. 前記により記載されているようにして製造し (OMCD28及びOMB7)、ここで停止コドンがトランスメンブランドメインの上流に導入され、そして生来のシグナルペプチドがオンコスタチンM (oncostatin M) (Malik など、, Mol. Cell Biol. 9 : 2847 (1989)) からのシグナルペプチドにより置換された。それらは、再構成のための合成オリゴヌクレオチド (OMCD28) を用いて又はPCRのためのプライマー (OMB7) として製造された。OMCD28は、シグナルペプチドをオンコスタチンMからの類似領域により置換することによってより効果的な発現のために変性されたCD28 cDNA である。CD28Ig及びB7Ig融合構成体を2つに分けて製造した。

【0079】5 部分を、鋳型としてOMCD28及びOMB7及び前方プライマーとしてオリゴヌクレオチド、CTAGCCACTGAAGCTTACCATGGGTGTACTGCTCACAC (配列番号1) (オンコスタチンMシグナルペプチドに対応するアミノ酸配列をコードする) 及び逆方向プライマーとして

TGGCATGGCTCCTGATCAGGCTTAGAAGGTCGGGAAA (配列番号2)

又は、TTTGGGCTCCTGATCAGGAAAATGCTCTTGCTTGGTTGT (配列番号3)

のいずれかをそれぞれ用いて製造した。PCR 反応の生成物を、PCR プライマーに導入される部位として制限エンドヌクレアーゼ (HindIII 及びBcl I) により切断し、そしてゲル精製した。

【0080】ヒトIgC 1配列に対応する融合構成体の3 部分を、鋳型として、ヒト - マウスキメラmAB L6を生成する骨髓細胞系 (Dr. P. Fell and M. Gayle, Bristol-Myers Squibb Conyany, Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WA により供給される) からのRNA を用いて、連結された逆転写酵素 (トリ骨髓芽症ウィルスからの; Life Sciences Associates, Bayport, NY) -PCR反応により製造した。

【0081】オリゴペプチド、すなわちAAGCAAGAGCATTTTCCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTG (配列番号4) を前方プライマー

及びCTTCGACCAGTCTAGAAGCATCCTCGTGGACCGCAGAGC (配列番号5)を逆方向プライマーとして使用した。反応生成物をBcl I及びXba Iにより切断し、そしてゲル精製した。最終生成物を、IgC 1配列を含む、Bcl I/Xba I切断されたフラグメントと共に、CD28又はB7配列を含む、HindIII/Bcl I切断されたフラグメントを、HindIII/Xba I切断されたCD28中に連結することによってアセンブリーした。連結生成物を用いてMC1061/p3E. コリ細胞を形質転換し、そしてコロニーを適切なプラスミドのためにスクリーンした。得られた構成体の配列を、DNA配列決定により確認した。B7をコードする構成体は、B7の細胞外ドメインの約1位~約215位のアミノ酸残基に対応するアミノ酸をコードするDNを含んだ。CD28をコードする構成体は、CD28の細胞外ドメインの約1位~約134位のアミノ酸残基に対応するアミノ酸をコードするDNAを含んだ。

【0082】CD5 Igを、前方プライマーとしてCATTGCACAGTCAAGCTCCATGCCATGGTTCTCTGGCCACCTTG (配列番号6)及び逆方向プライマーとしてATCCACAGTGCAGTGATCATTTGGATCCTGGCATGTGAC (配列番号7)を用いて、同じ態様で構成した。PCR生成物を制限エンドヌクレアーゼ消化し、そして上記のようにしてIgC 1フラグメントにより連結した。得られた構成体(CD5 Ig)は、CD5に対応する配列の1位~347位のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有する成熟タンパク質、前記構成工程により導入された2つのアミノ酸(アミノ酸DQ)、次にIgC 1領域に対応するアミノ酸をコードするDNAをコードした。

【0083】細胞培養及びトランスフェクション。COS(モンキー腎細胞)を、引用により本発明に組込まれる、Seed and Aruffo (Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 3365 (1987))の方法の変法を用いて、CD28及びB7を発現する発現プラスミドによりトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクトする18~24時間前、10cmの直径の培養皿当たり 10^6 個で接種した。プラスミドDNAを、0.1mMのクロロキン(cloroquine)及び600 μ g/mlのDEAE Dextranを含む血清フリーDMEM 5mlに添加し(約15 μ g/皿)、そして細胞を37°Cで3~3.5時間インキュベートした。

【0084】次に、トランスフェクトされた細胞をすぐに、PBS中、10%ジメチルスルホキシドにより処理し(約2分)、そして10%FCSを含むDMEMにおいて37°Cで16~24時間インキュベートした。トランスフェクションの24時間後、培養培地を除去し、そして血清フリーDMEMにより変換した(6ml/皿)。インキュベーションを37°Cで3時間続け、この時点で、古い培地を集め、そして新鮮な血清フリー培地を添加した。37°Cでさらに3日後、古い培地を再び集め、そして細胞を捨てた。

【0085】CD28, CD5又はB7を発現するCHO細胞を、次の通りに、Linsleyなど., (1991)前記により記載さ

れるようにして単離した:簡単に言及すれば、CD28, CD5又はB7を発現する安定したトランスフェクタントを、適切な発現プラスミド及び選択マーカー、pSV2dhfr(Linsleyなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5031(1990))の混合物によるジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣(dhfr⁻CHO)細胞の同時トランスフェクションの後次に、トランスフェクトを、1 μ Mの最終レベルまでメトトレキヤートの徐々に高まる濃度で増殖し、そして10%ウシ胎児血清(FBS)、0.2mMのプロリン及び1 μ Mのメトトレキヤートにより補充されたDMEMに維持した。

【0086】高レベルのCD28(CD28⁺CHO)又はB7(B7⁺CHO)を発現するCHO系を、mAbs9.3又はBB-1による間接的な免疫染色に従って、複数回の蛍光活性化細胞ソーチング(FACS(R))により単離した。CD28又はB7の表面発現のために陰性の増幅されたCHO細胞をまた、CD28-トランスフェクトされた集団からFACS(R)により単離した。

【0087】免疫染色及びFACS(R)分析。トランスフェクトされたCHO又はCOS細胞又は活性化されたT細胞を、間接的免疫染色法により分析した。染色の前、CHO細胞を、10mMのEDTAを含むPBSにおけるインキュベーションによりそれらの培養器から除去した。細胞をまず、ネズミmAbs9.3(Hansenなど., Immunogenetics 10:247 (1980))又はBB-1(Yokochiなど., J. Immunol. 128: 823 (1981))と共に、又はIg融合タンパク質(10%のFCSを含むDMEMにおいて10 μ g/mlで)と共に4°Cで1~2時間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、そしてさらに0.5~2時間、4°Cで、FITC-接合の第2段階試薬(ネズミmAbsのためにヤギ抗-マウスIg血清又は融合タンパク質のためにヤギ抗-ヒトIgC血清(Tag o, Inc., Burlingame, CA))と共にインキュベートした。蛍光を、40対数増幅器(four decade logarithmic amplifier)を備えたFACS IV(R)細胞ソーター(Becton Dickinson and Co., Mountain View, CA)上で分析した。

【0088】Ig融合タンパク質の精製。トランスフェクトされたCOS細胞からの古い血清フリー培養培地の第1, 第2及び第3回収集物を、Ig融合タンパク質の精製のための源として使用した。高速遠心分離により細胞残骸物を除去した後、培地を、0.05Mのクエン酸ナトリウム溶液(pH8.0)により平衡化された、固定されたプロテインA(Repligen Corp., Cambridge, MA)のカラム(約200~400mlの培地/ml充填層体積)に適用した。その培地の適用の後、カラムを1 μ Mのリン酸カリウム溶液(pH8)により洗浄し、そして結合されたタンパク質を0.05Mのクエン酸ナトリウム溶液(pH3)により溶出した。

【0089】画分を集め、そしてすぐに、2Mのトリス(pH8)1/10体積の添加により中和した。A₂₈₀ 吸収

材料のピークを含む画分をプールし、そして使用前、PBSに対して透析した。それぞれCD28Ig及びB7Igのための吸光係数は、既知の吸光度の溶液のアミノ酸分析により2.4及び2.8 ml/mgであった。精製されたCD28Ig及びB7Ig結合活性の回収率は、B7⁺及びCD28⁺ CHO 細胞の間接的な蛍光染色の後、FACS (R) 分析により判断される場合、ほぼ定量的であった。

【0090】例 2

CTLA 4 Ig融合タンパク質の調製

CTLA 4 の細胞外ドメインとIgC 1 ドメインとの間にCTLA 4 Igをコードする可溶性遺伝子融合体を、CD28Ig構成体についての上記方法に類似する方法で構成した。CTLA 4 遺伝子の細胞外ドメインを、公開された配列 (Darivach など., *Eur. Jour. Immunol.* 18 : 1901~1905 (1988)) に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いてPCR によりクローン化した。

【0091】CTLA 4 のためのシグナルペプチドはCTLA 4 遺伝子において同定されていないので、CTLA 4 の示された配列のN - 末端を、オーバーラップオリゴヌクレオチドを用いて2段階で、オンコスタチンM (Melik など., *Mol. and Cell. Biol.* 9: 2847 (1989)) のシグナルペプチドに融合せしめた。第1段階に関しては、オリゴヌクレオチド、CTCAGTCTGGTCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCC (配列番号8) (CTLA 4 のN末端側の7個のアミノ酸に融合されるコンスタチンMシグナルペプチドからのC末端側の15個のアミノ酸をコードする) を、前方プライマーとして、及びTTGGGCTCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (配列番号9) (Bcl I 制限酵素部位を含み、そしてCTLA 4 レセプターをコードするアミノ酸配列のアミノ酸残基119 ~ 125 をコードする) を逆方向プライマーとして使用した。

【0092】この段階のための鋳型は、H38 細胞 (Drs. Salahudin and Gallo, NCI, Bethesda, MDにより供給されるHTLVIII感染性T細胞白血球細胞系) からの合計1 µg のRNA から合成されたcDNAであった。第1段階からのPCR 生成物の一部を、オンコスタチンMシグナルペプチドのN末端部分をコードし、そしてHindIII 制限エンドヌクレアーゼ部位を含むオーバーラップ前方プライマー、CTAGCCACTGAAGCTTACCAATGGGTGTAAGTCTCACACAGAGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACTC (配列番号10) 及び同じ逆方向プライマーを用いて再増幅した。PCR 反応の生成物をHindIII 及びBcl I により消化し、そしてBcl I / Xha I により切断された、IgC 1 のヒンジ、CH2 およびCH3 領域に対応するアミノ酸配列をコードするcDNAフラグメントと共に、HindIII / Xha I 切断された発現ベクター、CDM8又はHindIII / Xba I 切断された発現ベクター、LN (Dr. Aruffolにより供給される) 中に連結した。

【0093】得られたCTLA 4 Ig融合構成体の地図は図1に示される。その図に示される配列は、CTLA 4 (上方の

文字、黒くない部分) とコンスタチンMのシグナルペプチドSP (黒い部分) 及びIgC 1 のヒンジH (点描模様部分) との間の連結を示す。括弧内のアミノ酸は、構成の間に導入された。星印 () は、IgC ヒンジ領域に導入されたシステイン~セリン変異を示す。CTLA 4 に存在する免疫グロブリンスーパーファミリーV - 株ドメインは、IgC 1 のCH2 及びCH3 ドメインであるように示される。

【0094】次に、CTLA 4 Igを含む発現プラスミド、CDM8を、Seed and Aruffo, 1987, 前記により記載される方法の変法 (Linsley など., 1991, 前記) により、DEAE / テキストランソフエクションを用いてCOS 細胞中にトランスフェクトした。CTLA 4 Igのアミノ酸配列をコードするcDNAを含む発現プラスミド構成体 (LN又はCDM8) を、標準方法を用いてのりポフエクションによりdhfr^r CHO 系中にトランスフェクトし、CTLA 4 Igを安定して発現する新規細胞系を得た。CTLA 4 Igに対応するアミノ酸配列をコードするDNA は、1991年5月31日、ブタペスト条約に基づいてATCCに寄託され、そしてATCC受託番号68629 を得た。

【0095】チャイニーズハムスター卵巣細胞系CTLA 4 Ig - 24と称する、CTLA 4 Igを発現する好ましい安定性のトランスフェクタントを、免疫染色法を用いて、培地におけるB7結合活性についてB7陽性CHO 細胞系をスクリーンすることによって製造した。トランスフェクタントは、10%ウシ胎児血清 (FBS)、0.2 mMのプロリン及び1 µMのメトトレキヤートにより補充されたDMEMに維持された。CTLA 4 Ig - 24CHO 細胞系は、1991年5月31日、ブタペスト条約に基づいてATCCに寄託され、そしてATCC受託番号10762 を得た。

【0096】CTLA 4 Igを、血清フリーに条件付けられた上清液からプロテインAクロマトグラフィー処理により精製した (図2)。CTLA 4 Igの濃度を、280 nmで1.6の吸光係数 (既知の吸光度の溶液のアミノ酸分析により実験的に決定された) を仮定して、決定した。CTLA 4 Igのサンプル (1 µg) (レーン2及び4) 及び分子量標準 (レーン1及び3、図2) を、非還元条件 (- ME、レーン1及び2) 又は還元条件 (+ ME、レーン3及び4) 下でSDS-PAGE (4~12%のアクリルアミドグラジエント) にゆだねた。タンパク質は、クーマシーブリリアンドブルーによる染色により可視化された。

【0097】非還元条件下で、CTLA 4 IgはMrが約100,000である種として移動し、そして還元条件下でそれは、Mrが約50,000である種として移動した (図2)。IgC ヒンジのジスルフィドが構成の間に排除されたので、CD28IgのようなCTLA 4 Igは、生来のジスルフィド結合を通してたぶん連結されたダイマーである。

【0098】例 3

CTLA 4 レセプター

十分な長さのヒトCTLA 4 遺伝子に対応するアミノ酸をコ

ードするDNAを再構成するために、CTLA4のトランスメンブラン及び細胞質ドメインのフラグメントに対応するアミノ酸をコードするcDNAを、PCRによりクローン化し、そして次に、CTLA4のN-末端に融合されるオンコスタチンMシグナルペプチドに対応する、CTLA4 Igからのフラグメントに対応するアミノ酸をコードするcDNAにより連結した。PCRのための方法、及び細胞培養及びトランスフェクションは、COS細胞及びDEAE-デキストラントランスフェクションを用いて、例1に記載されている通りであった。

【0099】ヒトリンパ球細胞におけるCTLA4レセプタータンパク質の発現はこれまで報告されていないので、CTLA4 mRNAの源を示す必要はなかった。上記に示されるような、H38細胞の全体の細胞RNAから逆転写されるPCR cDNAを、PCRによるクローニングのために使用した。この目的のためには、オリゴヌクレオチド、GCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTAGTG (配列番号11) (推定されるコード配列に初めの11個のアミノ酸をコードする)を、前方プライマーとして及び逆方向プライマーとして、TGATGTAACATGTCTAGATCAATTGATGGGAATAAAATAAGGCTG (配列番号12) CTLA4における最後の8個のアミノ酸に相同であり、且つXba I部位を含む)を使用した。

【0100】鋳型は再び、H38細胞からの1µgのRNAから合成されたcDNAであった。PCR反応の生成物を制限エンドヌクレアーゼNco I及びXba Iにより切断し、そして得られた316 bpの生成物をゲル精製した。上記CTLA4 Ig融合からの340 bpのHindIII / Nco Iフラグメントをまたゲル精製し、そして両制限フラグメントを、HindIII / Xba I切断されたCDM8中に連結し、OMCTLAを形成した。

【0101】得られる構成体は、完全な長さのCTLA4 (配列番号13及び14)及びオンコスタチンMシグナルペプチドに対応した。その構成体は図3に示され、そしてOMCTLA4と称した。図3に示されるCTLA4のための配列は、示されるアミノ酸配列のアミノ酸位置111でのこれまで達告されたアラニンがトレオニンをコードするような塩基変化により、推定されるヒトCTLA4 DNA配列 (Dariavach など、前記)とは異なる。このトレオニンは、融合タンパク質の好結果をもたらす発現のために重要である、新しく同定されたN-連結グリコシル化部位の一部である。連結生成物を用いて、MC1061/p3 E. コリ細胞を形質転換し、そしてコロニーを適切なプラスミドについてスクリーンした。得られる構成体の配列を、DNA配列分析により確かめた。

【0102】例4

CTLA4 Igの特徴化

CTLA4 Ig構成体の特徴づけるために、いくつかの単離体、CD28Ig, B7Ig及びCD5 Igを上記のようにして調製し、そして例2及び3に記載されるようにしてCOS細胞をトランスフェクトし、そしてB7Igの結合のためにFACS

(R)分析により試験した。上記構成体の他に、Aruffo and Seed (EMBO Jour. 6 : 3313~3316 (198))により記載されるようなCD7をコードするcDNAを含むCDM8プラスミドをまた使用した。

【0103】mAbs. ネズミモノクローナル抗体 (mAb) 9.3 (抗-CD28)及びG19-4 (抗-CD3)、G3-7 (抗-CD7)、BB-1 (抗-B7抗原)及びラットmAb 187.1 (抗-マウスK鎖)はこれまで記載されており (Ledbetter など、Pruc. Natl. Acad. Sci. 84 : 1384 ~1388

(1987); Ledbetter など、Bloud 75 : 1531 (1990); Yokochi など、前記)、そして使用の前、腹水から精製した。mAb OKT8を生成するハイブリドーマをATCC, Rockville, MD から得、そしてmAbをまた、使用の前、腹水から精製した。mAb 4G9 (抗-CD19)は、Dr. E. Engleman (Stanford University, Palo Alto, CA)により提供された。精製されたヒト-マウスキメラmAb L6 (ヒトC1Fc部分を有する)は、Dr. P. Fell and M. Gayle (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WA)の贈与である。

【0104】免疫染色及びFACS (R)分析。染色の前、COS又はCHO細胞を、10mMのEDTAを含むPBSにおいてインキュベートすることによってそれらの培養容器から除去した。細胞をまず、mAbs又はIg融合タンパク質と共に、10%FBSを含むDMEMにおいて10µg/mlで4で1~2時間インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、そしてFITC-接合ヤギ抗-マウス免疫グロブリン又はFITC-接合ヤギ抗-ヒトIgC血清 (両者とも、Tago, Burlingame, CAからである)と共に、4でさらに0.5~2時間インキュベートした。両mAbs及びIg融合タンパク質の結合が同じ実験において測定される場合、FITC-接合抗-マウス及び抗-ヒト第2段階試薬を、使用の前、一緒に混合した。合計10,000個の細胞に基づく蛍光を次に、FACS (R)により分析した。

【0105】末梢血液リンパ球分離及び刺激。末梢血液リンパ球 (PBLs)を、リンパ球分離媒体 (Litton Bionetics, Kensington, MD)を通しての遠心分離により単離した。アロ反応性T細胞を、一次混合リンパ球反応 (MLR)におけるPBLの刺激により単離した。PBLを、 10^6 /mlの照射された (5000ラド) T51 LCLで培養した。EBV-形質転換リンパ球芽細胞系 (LCL), PM (Bristol-Myers Squibb Co.)及びT51 (Bristol-Myers Squibb Co.)を、10%FBSにより補充されたRPMIに維持した。6日後、アロ反応性“幼芽”細胞を凍結保存した。

【0106】二次MLRを、mAbs及びIg融合タンパク質の存在及び不在下で、新鮮な照射T51LCLと共に融解されたアロ反応性幼芽を培養することによって行なった。細胞を、10%FBSを含むRPMIを有する96ウェル平底プレート (0.2mlの体積、 4×10^4 個のアロ反応性幼芽及び 1×10^4 個の照射T51 LCL細胞/ウェル)において培養した。四重培養物の細胞増殖を、2~3日の培養の最後の

6時間、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの摂取により測定した。

【0107】PHA-活性化されたT細胞を、 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のPHA (Wellcome, Charlotte, NC)と共にPBLを5日間、培養することによって、及びPHAを欠く培地において1日間、培養することによって調製した。生存細胞を、使用の前、リンパ球分離媒体を通しての沈殿により集めた。細胞をmAbsにより刺激し、又はCHO細胞により37で4~6時間トランスフェクトせしめ、遠心分離により集め、そしてRNAを調製するために使用した。

【0108】 $\text{CD}4^+$ T細胞を、健康なドナーからのPBLを、羊赤血球ロゼット技法を用いてT及び非-T細胞に分離し、そしてさらに、Damleなど、*J. Immunol.* 139 : 1501 (1987) (引用により本明細書に組込まれる)により記載されるように $\text{CD}4^+$ 細胞をパンニングすることによりT細胞を分離することによってPBLsから単離した。B細胞をまた、抗- $\text{CD}19\text{mAb}$ 4G9を用いて、Wysocki and Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 : 2844 (1978) (引用により本明細書に組込まれる)により記載されるようにパンニングすることにより末梢血液から精製した。

【0109】 T_h -誘発されたIg生成を測定するために、 10^6 個の $\text{CD}4^+$ T細胞を、10%のFBSを含むRPMI 1mlにおいて 10^6 個の $\text{CD}19^+$ B細胞と共に混合した。37での6日間の培養に続いて、ヒトIgMの生成を、Volkmanなど、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 2528 (1981) (引用により本明細書に組込まれる)により記載されるようにして固相ELISAを用いて培養上清液において測定した。簡単に言及すれば、96-ウェル平底マイクロタイターELISAプレート(Corning, Corning, NY)を、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィニティー精製されたヤギ抗-ヒトIgG又はIgM抗体(Tago, Burlingame, CA)を含む $200\ \mu\text{l}$ /ウェルの炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)により被覆し、4で一晩インキュベートし、そして次に、PBSにより洗浄し、そしてウェルをさらに、PBS中、2%BSA (BSA-PBS)によりブロックした。

【0110】アッセイされるべきサンプルを、それらのウェルに適切な希釈度で添加し、そして $200\ \mu\text{l}$ /ウェルの1:1000希釈度のアフィニティー精製されたヤギ抗-ヒトIgG又はIgM抗体(Tago)のホスラディシュペルオキシダーゼ(HRP)-接合F(ab)₂画分と共にインキュベートした。次に、プレートを洗浄し、そして $100\ \mu\text{l}$ /ウェルのo-フェニレンジアミン(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)溶液(pH5のクエン酸-リン酸緩衝液1ml当たり0.6ng及び0.045%の過酸化水素)を添加した。色の進行を、2Nの硫酸により止めた。

【0111】490nmでの吸光度を、自動ELISAプレートリーダーにより測定した。試験及び対照サンプルは3通り行なわれ、そして吸光度の値を、培養上清液におけるIgの濃度が定量化される標準曲線を生成するために、上清液サンプルにより同時に行なわれた既知のIgG又はIg

M標準により得られた値と比較した。データを、三重反復又は四重反復培養物の $\text{Ig} \pm \text{SEM}$ のng/mlとして表わされる。

【0112】免疫沈殿分析及びSDS-PAGE。細胞を、 ^{125}I により表面ラベル化し、そして免疫沈殿分析にゆだねた。簡単に言及すれば、PHA-活性化されたT細胞を、Vittettaなど、*J. Exp. Med.* 134 : 242 (1971) (引用により本明細書に組込まれる)により記載されるように、ラクトペルオキシターゼ及び H_2O_2 を用いて ^{125}I により表面ラベル化した。SDS-PAGEクロマトグラフィー処理を、5%のアクリルアミドの積み重ねゲルを有する直線アクリルアミドグラジエントゲル上で行なった。ゲルをクーマシーブルにより染色し、脱色し、そして写真を取り、又は乾燥せしめ、そしてX線フィルム(Kodak XAR-5)に露光せしめた。

【0113】結合アッセイ。B7Igを、約 2×10^6 cpm/pモルの比活性に ^{125}I によりラベルした。96のウェルのプラスチック皿を、CTLA4Ig(10mMのトリス(pH8)0.05mlの体積において $0.5\ \mu\text{g}$)を含む溶液により16~24時間、被覆した。ウェルを、競争体の存在又は不在下で、 ^{125}I -B7Ig(約 5×10^5 cpm)を含む溶液(0.09ml)の添加の前、結合緩衝液(50mMのBES(Sigma Chemical Co), pH6.8, 0.1%BAS及び10%FCSを含むDMEM)によりブロックした。23で2~3時間のインキュベーションに続いて、ウェルを結合緩衝液により1度洗浄し、そしてPBSにより4度洗浄した。次に、結合された放射能を0.5NのNaOHの添加により溶解し、そしてr計数により定量化した。

【0114】B7Igへの結合。完全なヒトCTLA4DNA遺伝子をコードするOMCTLA4構成体の官能多活性が、図4に示される実験に示される。COS細胞を、上記のようにして発現プラスミドCD7, OMCD28及びOMCTLA4によりトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を集め、そして培地のみ(添加なし)と共に又はmAbs 9.3, B7Ig, CD5Ig又はG3-7と共にインキュベートした。次に細胞を洗浄し、そして結合性を、FITC-接合ヤギ抗-マウスIg及びFITC-接合ヤギ抗-ヒトIg第2段階試薬の混合物により検出した。トランスフェクトされた細胞を、間接的免疫染色法により適切な細胞表面マーカーの発現について試験し、そして蛍光を上記のようにしてFACS(R)分析を用いて測定した。

【0115】図4に示されるように、mAb 9.3は、CD28-トランスフェクトされたCOS細胞に結合したが、しかしCTLA4-トランスフェクトされる細胞には結合しなかった。対照的に、B7Ig融合タンパク質(但し、対照のCD5Ig融合タンパク質ではない)は、CD28-及びCTLA4-トランスフェクトされた細胞の両者に結合した。CD7-トランスフェクトされたCOS細胞は、mAb 9.3にも融合タンパク質のいづれにも結合しなかった。これは、CD28及びCTLA4の両者がB細胞活性化抗原、B7を結合するこ

とを示唆する。さらに、mAb 9.3は検出できるほどは、CTLA4を結合しなかった。

【0116】B7陽性CHO細胞上へのCTLA4 Igの結合。CTLA4 Ig及びB7の結合をさらに特徴づけるために、B7⁺ CHO細胞及びリンパ芽球細胞系(PMLCL)上への精製されたCTLA4 Igの結合活性を、図5に示される実験において測定した。増幅された、トランスフェクトされたCHO細胞系及びPMLCLを、培地のみ(添加なし)又はCD5 Ig、CD28 Ig又はCTLA4 Igの同濃度のヒトIgC₁-含有タンパク質(10 µg/ml)と共にインキュベートした。結合性を、FITC-接合ヤギ抗-ヒトIg第二段階試薬の添加に続いて、FACS(R)により検出した。合計10,000個の染色された細胞を、FACS(R)により分析した。

【0117】図5に示されるように、CD28 IgはB7⁺ CHO細胞に結合するが、しかしPMLCLには結合せず、すなわち細胞系は比較的低レベルのB7抗原を発現する(Linsleyなど、前記、1990)。CTLA4 IgはCD28 Igよりも両細胞系により強く結合し、これは、それが高い親和性を伴って結合することを示唆する。CD28 IgもCTLA4 Igも、CD28⁺ CHO細胞に結合しなかった。

【0118】CTLA4 Ig及びB7 Igの結合の親和性。次に、CTLA4 IgとB7 Igとの間の相互作用の見掛け親和性を、固相競争結合アッセイを用いて測定した。96-ウェルプラスチック皿を、上記のようにしてCTLA4 Igにより被覆した。B7 Igを¹²⁵I(5 × 10⁵ cpm, 2 × 10⁶ cpm/pモル)により放射ラベルし、そして添加し、示される濃度(図6を参照のこと)のラベルされていないキメラmAb L6, mAb 9.3, mAb BB-1又はB7 Igの存在下で、4 nMの濃度にした。プレート-結合放射能を測定し、そして競争体なしに処理されたウェルに結合される放射能の百分率として表わされた(28,300 cpm)。個々の点は二重反復測定の平均を示し;反復試験は一般的に平均から20%以下変化した。濃度を、mAbに関して結合部位当たり75,000のMrに基づいて及びB7 Igに関して結合部位当たり51,000のMrに基づいて計算した。

【0119】図6に示されるように、mAb BB-1及びラベルされていないB7 Igが¹²⁵I-B7 Ig結合のために有意に競争した(それぞれ約22 nM及び約175 nMで最大の半分の効果)。キメラmAb L6もmAb 9.3も、試験された濃度で効果的に競争しなかった。他の実験においては、使用されるmAbの濃度は、固定されたCD28 Ig又は90%以上、CD28を発現する細胞表面への¹²⁵I-B7 Igの結合を阻害するのに十分であった。図6からの競争データがスキッチャートプロットでプロットされる場合、約12 nMの解離定数Kdが、固定されたCTLA4 Igへの¹²⁵I-B7の結合性について計算した(図7)。この値は、¹²⁵I-B7 IgとCD28との間で前測定されたKdよりも約20倍低く(約200 nM)(Linsleyなど、(1991), 前記)、これは、CTLA4がCD28レセプターよりもB7抗原のためにより高い親和性レセプターであることを示唆する。

【0120】CTLA4 Igを結合したリンパ芽球細胞上の分子を同定するために(図7)、¹²⁵I-表面ラベルされた細胞を、免疫沈殿分析にゆだねた(図8)。B7⁺ CHO及びPMLCL細胞を¹²⁵Iにより表面ラベルし、そして上記のようにして非イオン性界面活性剤溶液により抽出した。約1.5 × 10⁷ cpmを有する、0.1 mlの体積での抽出物のアリコート、添加を伴わないで、又はそれぞれ2 µgのCD28 Ig、CTLA4 Ig又はCD5 Igを伴って、上記のようにして免疫沈殿分析にゆだねた。

【0121】次に、洗浄された免疫沈殿物を、還元条件下でSDS-PAGE(10~20%のアクリルアミドグラジエント)により分析した。次に、ゲルを乾燥せしめ、そしてオートラジオグラフィにゆだねた。図8の左側のパネルは、1日間の暴露の後に得られたオートラジオグラムを示す。図8の右側のパネルは、10日間の暴露の後の同じゲルのオートラジオグラムを示す。図8の中央のパネルにおけるオートラジオグラムはまた、10日間、暴露された。分子量標準の位置はまた、この図に示される。

【0122】図8により示されるように、分散的に移動する(約50,000~75,000;約60,000での中央)、放射性ラベルされたタンパク質を、CTLA4 Igにより(但し、CD28 Ig又はCD5 Igによってではない)免疫沈殿せしめた。この分子は、CTLA4 Igにより、B7⁺ CHO細胞から免疫沈殿されたB7と共に同時移動し、そしてCD28 Igより免疫沈殿されたB7と共に、より一層弱く同時移動した。これらの発見は、CTLA4 Igが、B7抗原に大きさが類似する、リンパ芽球細胞上の単一タンパク質を結合することを示唆する。

【0123】CTLA4 Igによるインビトロでの免疫応答の阻害

増殖の阻害。これまでの研究は、抗-CD28 mAb, 9.3及び抗-B7 mAb, BB-1が、アロ抗原を表わすB細胞により、アロ抗原特異的T_Hの増殖及び免疫グロブリン分泌を阻害することを示している(Damle, など、Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 5096 (1981); Lesslauerなど、Eur. J. Immunol. 16: 1289 (1986))。CTLA4は本明細書に示されるようにB7抗原のために高い親和性レセプターであるので、可溶性CTLA4 Igは、それらの応答を阻害するその能力について試験された。T細胞増殖に対するCTLA4 Igの効果は、図9に示される実験で試験された。

【0124】一次混合リンパ球反応(MLR)幼若を、ネズミ mAb 9.3 Fabフラグメント、又はB7 Ig、CD28 IgもしくはCTLA4 Ig免疫グロブリンC融合タンパク質の濃縮物の不在又は存在下で、照射されたT51リンパ芽球細胞(IC)により刺激した。細胞増殖を、4日後、[³H]-チミジン組込みにより測定し、そして未処理の培養物による組込みの百分率として表わす、(21,000 cpm)。図9は、4重反復測定の平均を表わす(SEM 10%)。

【0125】図9に示されるように、CTLA4 Igは、約30

ng/ml (約0.8 nM)で、1/2最大応答を伴って最大90%以上、投与量-依存性態様でMLR反応を阻害した。完全なmAb 9.3よりもより可能性あるMLRのインヒビターであることがこれまでで示されている、mAb 9.3のFabフラグメント(Damleなど., *J. Immunol.* 140: 1753~1761 (1988))はまた、MLRを阻害したが、しかしその濃度は、より高い濃度(約800 ng/ml又は1/2最大応答のためには約30nM)であった。B7Ig及びCD28Igは、高濃度でさえ、MLRを有意に阻害しなかった。他の実験においては、CTLA4 Igと共にB7Igの添加は、CTLA4 IgによるMLRの阻害を一部克服し、この事は、その阻害がB7抗原との特異的な相互作用によることを示唆する。

【0126】免疫グロブリン分泌の阻害。ヘルパーT細胞(T_H)-誘発性免疫グロブリン分泌に対するCTLA4 Igの効果をまた試験した(図10)。CD4⁺T細胞を、上記のようにして、指示された免疫グロブリン分子の存在又は不在下で、同種CD19⁺B細胞と共に混合した。ネズミmAbs OKT8, 9.3及びBB-1を20 µg/mlで添加し、そしてIg融合タンパク質を10 µg/mlで添加した。6日間の培養の後、培養上清液におけるヒトIgMの濃度(SEM < 5%)を、上記のようにして酵素イムノアッセイ(ELISA)により測定した。CD4⁺T細胞の不在下で培養されたB細胞によるIgM生成は11ng/mlであった。

【0127】図10に示されるように、CD4⁺T細胞は同種CD19⁺B細胞によるIgM生成を刺激した(CD4⁺T細胞の不在下で、IgMレベルは93%減じられた)。mAbs 9.3及びBB-1は、 T_H -誘発されたIgM生成を有意に阻害した(それぞれ63%及び65%の阻害率)。CTLA4 Igは、それらのmAbsよりもインヒビターとしてより効果的であった(89%の阻害率)。対照分子、mAb OKT8及びCD5 Igによる阻害は、より低かった(30%以下の阻害率)。それらの分子は、スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*)エンテロトキシンBの存在下で測定されるIg生成を有意に阻害しなかった。類似する結果が、他のドナーに由来するB細胞及びCD4⁺T細胞により得られた。それらの結果は、CTLA4 Igによる阻害が特異的であることを示す。

【0128】上記データはまた、CTLA4及びCD28レセプターが機能的及び構造的に関連していることを示す。CD28のように、CTLA4はまた、B細胞活性化抗原、B7のためのレセプターでもある。CTLA4 Igは、約12nMの親和性定数Kdを伴って¹²⁵I-B7を結合し、その値は、CD28とB7 Igとの間の親和性よりも20倍高い(約200 nM)。従って、CTLA4及びCD28は、同じリガンド、すなわちB7抗原のために、それぞれ高い及び低い親和性レセプターとして考えられる。

【0129】CD28とB7との間の見掛け親和性は、ネズミT細胞ハイブリドーマのT細胞レセプターへの可溶性アロ抗原の結合について報告される親和性に類似し(約100 nM; Schnekなど., *Cell* 56: 47 (1989))、そしてCD2

とLFA3との間(Recnyなど., *J. Biol. Chem.* 265: 8542 (1990))又はCD4とMHCクラスII分子との間(Claytonなど., *Nature* 339: 548 (1989))の相互作用よりも高い親和性である。

【0130】CTLA4とB7との間の見掛け親和性定数Kdはさらに大きく、そして好都合には、より高い親和性のmAbsに匹敵する(K_D 2-10,000nM; Alzariなど., *Ann. Rev. Immunol.* 6: 555 (1988)) CTLA4とB7との間のKdは、インテグリンレセプター及びそれらのリガンドのKdに類似するか又はその値よりも大きい(10~2000nM: Hautanenなど., *J. Biol. Chem.* 264: 1437~1442 (1989); Di Minnoなど., *Blood* 61: 140~148 (1983); Thiagarajan and Kelley, *J. Biol. Chem.* 263: 3035~3038 (1988))。従って、CTLA4とB7との間の相互作用の親和性は、リンパ芽球付着システムについて報告される中で最高である。

【0131】それらの結果は、CTLA4転写体の官能的タンパク質生成物の最初の発現を示す。CTLA4 Ig、すなわちIgC1ドメインに融合されるCTLA4の細胞外ドメインを含む融合構成体は、約50,000サブユニットのMrのジスルフィド結合ダイマーを形成する(図1)。鎖間ジスルフィドはこの融合のIg部分において形成することが予期されないため、CTLA4からのシステインはジスルフィド結合形成に包含される。同種CD28Ig融合タンパク質(Linsleyなど, 前記, 1991)はまた鎖間ジスルフィド結合を含む。それらの結果は、CD28のようにCTLA4レセプター(Hansenなど., *Immunogenetics* 10: 247~260 (1980))がジスルフィド結合ホモダイマーとしてT細胞表面上に存在することを示唆する。CD28及びCTLA4は高い相同性のタンパク質であるが、それらは免疫学的に異なっている。なぜならば抗-CD28 mAb, 9.3はCTLA4を認識しないからである(図4及び5)。

【0132】CTLA4が、CD28に類似するシグナル化路によりT細胞を活性化できるかどうかについては知られていない。ネズミ及びヒトCTLA4の細胞質ドメインは同一であり(Dariavach., 前記 1988)、これは、この領域が重要な官能性質を有することを示唆する。CD28及びCTLA4の細胞質ドメインはまた、相同性を共有す。但し、これが2つの分子に類似するシグナル性質を付与するために十分であるかについては不明である。

【0133】CTLA4 IgはT細胞及びB細胞協力を必要とするインビトロリンパ球機能の可能性あるインヒビターである(図9及び10)。前記研究と共に、これらの発現は、T及びBリンパ球応答を調節することにおいて、B7抗原とそのカウンターレセプター、CD28及び/又はCTLA4との間に相互作用の基本的重要性を示唆する。CTLA4 Igは、免疫応答の間、それらの相互作用の役割上、未来の調査のために有用な試薬であるべきである。

【0134】CTLA4 Igは、mAb BB-1又はmAb 9.3のいづれよりもインビトロリンパ球応答のより可能性あるイ

ンヒターである(図9及び10)。mAb BB-1よりもよりCTLA4 Igの高い能力は、ほとんどそれらの分子間でのB7のための親和性の差異によると思われる(図6)。CTLA4 Igはまた、mAb 9.3よりも可能性がある。なぜならば、たぶん、mAbとは異なって、それはその阻害効果を妨害するために、T細胞増殖に対して直接的な刺激効果を有さないからである(Juneなど., Immunology Today 11 : 211 (1989))。インビトロでのCTLA4 Igの免疫抑制効果は、未来の研究が、異常なT細胞活性化又はIg生成*

*を包含する自己免疫疾患の処置のために、この分子の可能な治療効果を保証されることを示唆する。

【0135】本発明が関与する当業者に明らかなように、本発明は、本発明の範囲内で、上記に特別に開示されるもの以外の形で具体化され得る。従って、上記本発明の特定の態様は例示的であると考えられるべきである。本発明の範囲は、例示的であって、本発明を制限するものではない。

【0136】

配列の列挙

(1) 一般情報

(i) 出願者: Linsley, Peter S

Ledbetter, Jeffrey A

Damle, Nitin K

Brady, William

(ii) 発明の表題: CTLA4 レセプター及びその使用方法

(iii) 配列の数: 14

(iv) 通信住所:

(A) あて先: Sheldon & Mak

(B) 通り: 201 South Lake Avenue, Suite 8

00

(C) 市: パサデナ

(D) 州: カリフォルニア

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 91101

(v) コンピューター読取りフォーム:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC compatible

(C) 操作システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: Patent In Release 1.0, Version

rsion 1.25

(vi) 現在の出願日:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(viii) アトニー/エージェントの情報:

(A) 名称: Mandel, SaraLynn

(B) 登録番号: 31,853

(C) 参照/ドケット番号: 7848

(ix) 電信情報:

(A) 電話: (818) 796-4000

【0137】

(2) 配列番号及びその情報(8) 795-6321

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 39個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号 1:

CTAGCCACT~~35~~ AAGCTTCACC ATGGGTGTAC TGCT
CACAC 39

【0138】

(2) 配列番号 2 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長 さ: 39個の塩基対

(B) 型 : 核 酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号 2:

TGGCATGGGC TCCTGATCAG GCTTAGAAGG TCCG
GGAAA 39

【0139】

(2) 配列番号 3 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長 さ: 39個の塩基対

(B) 型 : 核 酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号 3:

TTTGGGCTCC TGATCAGGAA AATGCTCTTG CTTG
GTTGT 39

【0140】

(2) 配列番号 4 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長 さ: 84個の塩基対

(B) 型 : 核 酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号 4:

AAGCAAGAGC ATTTTCCTGA TCAGGAGCCC AAAT
CTTCTG ACAAACTCA CACATCCCCA 60

【0141】

CCGTCCCCAG CACCTGA ACT CCTG

(2) 配列番号 5 についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 41個の塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号5:

CTTCGACCA~~36~~ TCTAGAAGCA TCCTCGTGCG ACCG
CGAGAG C 41

【0142】

(2) 配列番号6についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 47個の塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号6:

CATTGCACAG TCAAGCTTC ATGCCCATGG GTTC
TCTGGC CACCTTG 47

【0143】

(2) 配列番号7についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 39個の塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配 列: 配列番号7:

ATCCACAGTG CAGTGATCAT TTGGATCCTG GCAT
GTGAC 39

【0144】

(2) 配列番号8についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 65個の塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (vi) 起 源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配列: 配列番号8:

CTCAGTCTGG TCCTTGCACT CCTGTTTCCA AGCA
TGGCGA GCGTGGCAAT GCACGTGGCC 60
CAGCC

【0145】

(2) 配列番号9についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配列: 配列番号9:

TTTGGGCTCC TGATCAGAAT CTGGGCACGG TTG

【0146】

33

(2) 配列番号10についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 72個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配列: 配列番号10:

CTAGCCACTG AAGCTTCACC AATGGGTGTA CTGC
TCACAC AGAGGACGCT GCTCAGTCTG 60
GTCCTTGCAC TC

【0147】

(2) 配列番号11についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33個の塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: Homo sapiens

(xi) 配列: 配列番号11:

GCAATGCACG TGGCCCAGCC TGCTGTGGTA GTG

【0148】

33

(2) 配列番号12についての情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 45個の塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (vi) 起 源:
 - (A) 生物名: Homo sapiens
- (xi) 配 列: 配列番号12:

TGATGTAAC~~38~~ TGTCTAGATC AATTGATGGG AATA
AAATAA GCCTG 45

【0149】

- (2) 配列番号13についての情報:

- (i) 配列の特徴:
 - (A) 長さ: 561 個の塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (vi) 起 源:
 - (A) 生物名: Homo sapiens
- (ix) 特 徴:
 - (A) 名称/キー: CDS
 - (B) 位 置: 1..561
- (xi) 配 列: 配列番号13:

GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA
CTG GCC AGC AGC CGA GGC 48

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val
Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

ATC GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT GCA TCT
CCA GGC AAA GCC ACT GAG 96

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser
Pro Gly Lys Ala Thr Glu

20 25 30

GTC CGG GTG ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC
AGC CAG GTG ACT GAA GTC 144

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp
Ser Gln Val Thr Glu Val

35 40 45

TGT GCG GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG
TTG ACC TTC CTA GAT GAT 192

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu
Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60

TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT
CAA GTG AAC CTC ACT ATC 240

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn
Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

されたN連鎖グリコシル化部位(位置109 ~ 111)を含む、完全なアミノ酸配列を示す。

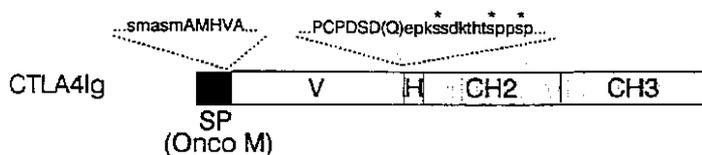
【図4】第4図は、下の実施例4に記載する、CD28およびCTLA4でトランスフェクションしたCOS細胞へのB7Ig融合タンパク質の結合のFACS^R分析の結果を示す。

【図5】第5図は、下の実施例4に記載する、B7抗原陽性(B7⁺) CHO細胞およびリンパ芽球様細胞系(PM-LCL)上の精製したCTLA4 Igの結合のFACS^R分析の結果を示す。

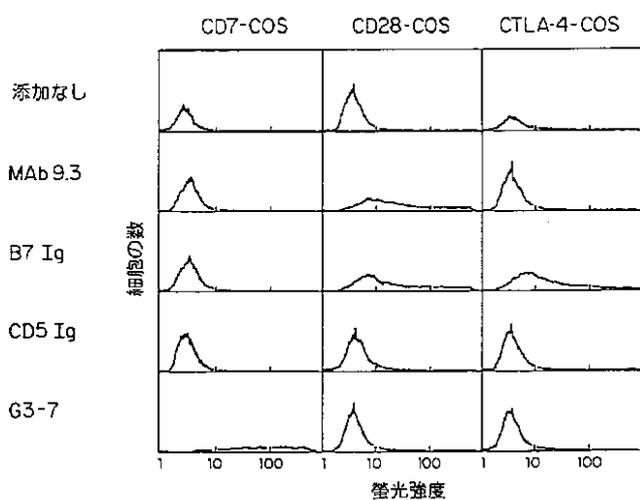
【図6】第6図は、下の実施例4に記載する、同定化CTLA4 Igへの¹²⁵I標識化B7Igの競争結合の分析を示すグラフである。

【図7】第7図は、下の実施例4に記載する、同定化CTLA4 Igへの¹²⁵I標識化B7Igの競争結合の分析を示すグラフである。

【図1】



【図4】



【図2】

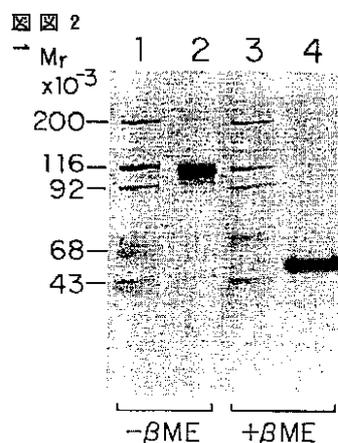
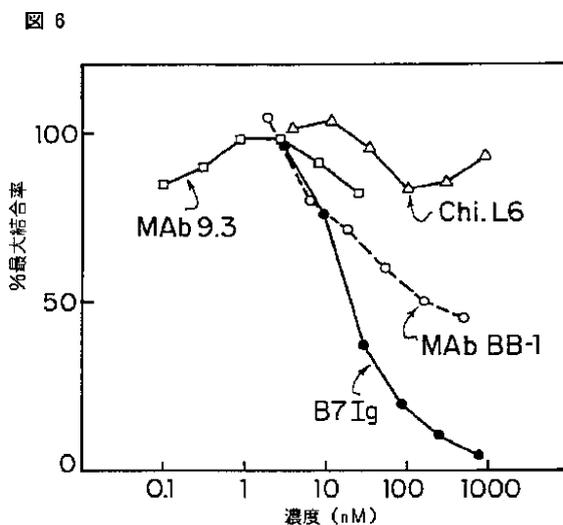
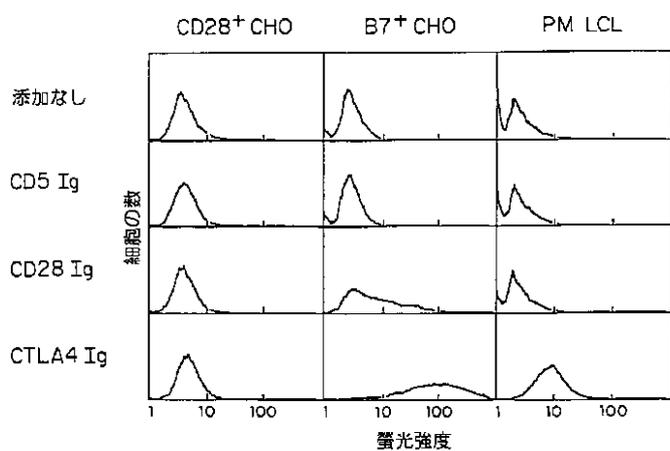


図 4

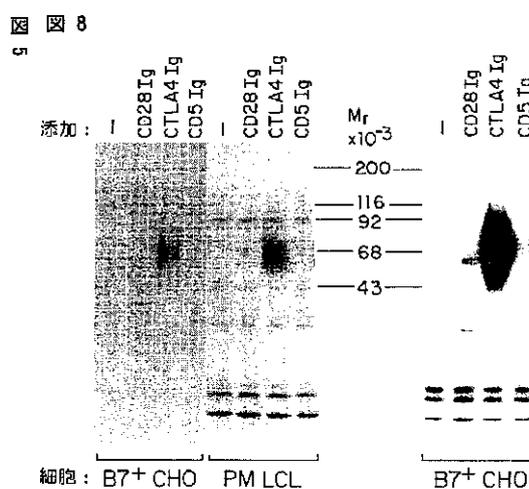
【図6】



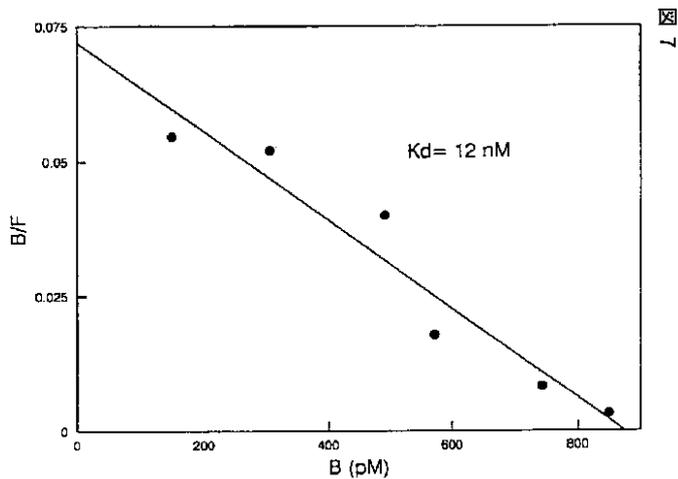
【図5】



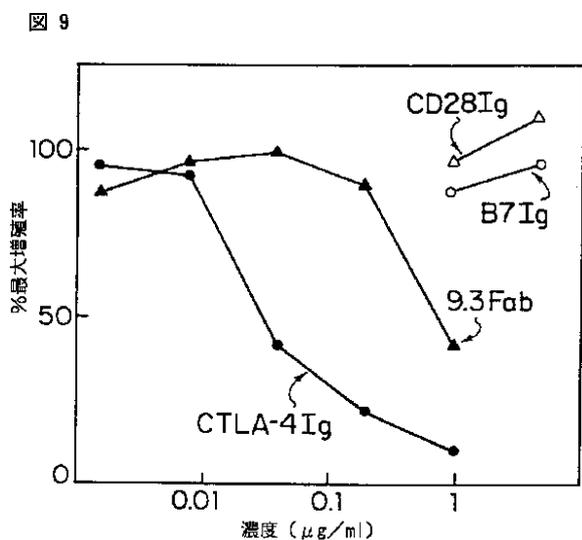
【図8】



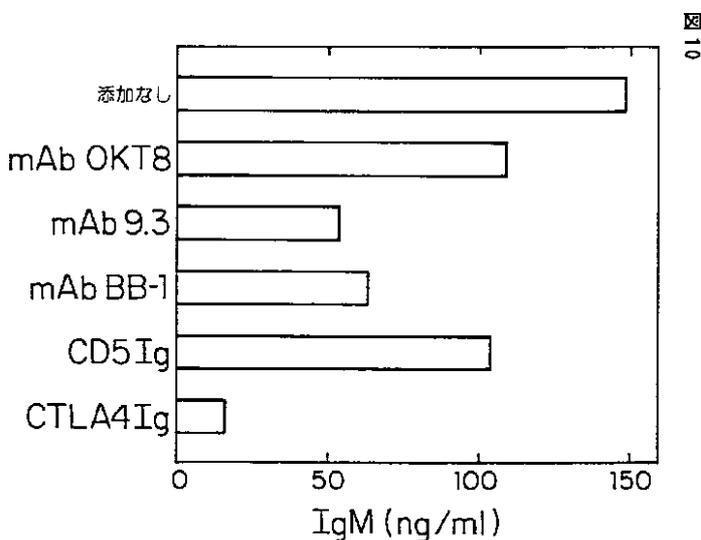
【図7】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁸ (参考)
A 6 1 P	31/12	A 6 1 P	31/18
	31/14		35/00
	31/18		37/06
	35/00		37/08
	37/06	C 0 7 K	16/28
	37/08		19/00
C 0 7 K	16/28	C 1 2 P	21/08
	19/00	G 0 1 N	33/53
C 1 2 P	21/08		33/564
G 0 1 N	33/53		Y
	33/564		Z
	33/566		33/566
	33/577		33/577
			B
		C 1 2 N	15/00
		A 6 1 K	37/02
			Z N A C
(72)発明者	レッドベター, ジェフリー エー. アメリカ合衆国, ワシントン 98117, シ アトル, ノースウェスト ワンハンドレッ ドサーティーンズ プレイス 306	F タ-ム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA41 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11 HA01 HA15 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
(72)発明者	ダムル, ナイティン ケイ. アメリカ合衆国, ワシントン 98056, レ ントン, サウスイースト シックスティス プレイス 11717		4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA22 BA41 CA18 CA26 CA53 DA58 NA14 ZB082 ZB132 ZB152 ZB262 ZB332 ZC552 ZC802
(72)発明者	ブラディ, ウィリアム アメリカ合衆国, ワシントン 98021, ボ セル, トゥハンドレッドナインティーンズ プレイス サウスウェスト 618		4C085 AA14 AA19 BB18 CC03 CC12 DD62 4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 EA51

专利名称(译)	抗ctla4胞外域的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002017349A	公开(公告)日	2002-01-22
申请号	JP2001136657	申请日	2001-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	リンスレイピーターエス レッドベタージェフリーエー ダムルナイティンケイ ブラディウィリアム		
发明人	リンスレイ,ピーター エス. レッドベター,ジェフリー エー. ダムル,ナイティン ケイ. ブラディ,ウィリアム		
IPC分类号	A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K C07K14/00 C07K14/705 C07K14/715 C07K14/725 C07K16/00 C07K16/28 C07K16/42 C07K19/00 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/13 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/70521 C07K14/7155 C07K16/00 C07K16/2818 C07K16/2827 C07K2317/73 C07K2319/02 C07K2319/30 C07K2319/32 Y10S530/866 Y10S530/868		
FI分类号	A61K39/395.U A61K45/00 A61P29/00.101 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/28 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/53.Y G01N33/564.B G01N33/564.Z G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.C A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA41 4C084/CA18 4C084/CA26 4C084/CA53 4C084/DA58 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZC552 4C084/ZC802 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB18 4C085/CC03 4C085/CC12 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51		
优先权	07/723617 1991-06-27 US		
其他公开文献	JP4159266B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供抗CTLA4细胞外结构域的单克隆抗体。与SEQ ID NO：4所示的CTLA4的胞外域结合并抑制CTLA4与B7抗原之间结合的单克隆抗体。

圖 6

