

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5007409号  
(P5007409)

(45) 発行日 平成24年8月22日(2012.8.22)

(24) 登録日 平成24年6月8日(2012.6.8)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 L
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 U
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12

請求項の数 19 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-582397 (P2001-582397)	(73) 特許権者	512103343
(86) (22) 出願日	平成13年5月8日(2001.5.8)		セルデックス リサーチ コーポレーショ ン
(65) 公表番号	特表2003-532409 (P2003-532409A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 4 9 4 - 2 7 2 5 ニーダム フォース アベニュー 1 1 9
(43) 公表日	平成15年11月5日(2003.11.5)	(74) 代理人	100096987
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/015114		弁理士 金久保 勉
(87) 国際公開番号	W02001/085798	(72) 発明者	ケラー ティボー
(87) 国際公開日	平成13年11月15日(2001.11.15)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 8 9 4 2 オッツヴィル パーク ロード 3 0
審査請求日	平成20年4月17日(2008.4.17)		
(31) 優先権主張番号	60/203, 126		
(32) 優先日	平成12年5月8日(2000.5.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/230, 739		
(32) 優先日	平成12年9月7日(2000.9.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

樹状細胞上のヒトマクロファージマンノース受容体に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であって、前記抗体がSEQ ID NO:4に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、SEQ ID NO:2に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

## 【請求項 2】

樹状細胞上のヒトマクロファージマンノース受容体に結合する、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であって、前記抗体がSEQ ID NO:3に示したヌクレオチド配列にコードされた重鎖可変領域と、SEQ ID NO:1に示したヌクレオチド配列にコードされた軽鎖可変領域とを含む、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

## 【請求項 3】

前記抗体がヒト、ヒト化又はキメラである、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその抗原結合部分。

## 【請求項 4】

前記抗体重鎖がIgG1又はIgG3 重鎖である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。

## 【請求項 5】

前記抗体が抗体フラグメント又は一本鎖抗体である、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。

## 【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分と薬学的に許容可能な担体とを含む組成物。

## 【請求項 7】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分を治療薬に連結させて含む免疫複合体。

## 【請求項 8】

前記治療薬が細胞毒である、請求項 7 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 9】

前記治療薬が放射性同位体である、請求項 7 に記載の免疫複合体。

10

## 【請求項 10】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分と、標的細胞上のFc受容体又は抗原に対する第二の結合特異性部分とを含む二重特異的分子。

## 【請求項 11】

前記標的細胞が腫瘍細胞、微生物性病原体、ウイルス又はウイルス感染細胞から成る群より選択される、請求項 10 に記載の二重特異的分子。

## 【請求項 12】

SEQ ID NO: 3から成る重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 1から成る軽鎖可変領域とをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクタ。

## 【請求項 13】

アミノ酸配列SEQ ID NO: 4から成る重鎖可変領域と、アミノ酸配列SEQ ID NO: 2から成る軽鎖可変領域とをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクタ。

20

## 【請求項 14】

樹状細胞上のヒトマンノース受容体への病原体の結合を防ぐ、腫瘍成長を阻害する、あるいは抗原に対する免疫応答を誘導又は亢進する、あるいは自己免疫疾患を治療する又は防ぐための、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分のin vitroでの使用。

## 【請求項 15】

細胞上のヒトマンノース受容体への病原体の結合を阻害する又は防ぐための医薬の製造における、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分の使用。

30

## 【請求項 16】

前記病原体がウイルス又は細菌である、請求項 14 又は 15 に記載の使用。

## 【請求項 17】

対象において腫瘍成長を阻害するための医薬の製造における、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分の使用。

## 【請求項 18】

対象において自己免疫疾患を治療又は防止するための医薬の製造における、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分の使用。

## 【請求項 19】

前記疾患が移植片対宿主疾患である、請求項 14 又は 18 に記載の使用。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の背景

樹状細胞は免疫系の特化細胞であり、一次及び二次T及びBリンパ球応答を開始するという固有の能力を持つ。樹状細胞は専門的な抗原提示細胞（APC）とも特徴付けられ、MHCや、抗原刺激を受ける前のTリンパ球に刺激を与えるのに重要な共刺激分子を発現する。樹状細胞の持つこのような固有の性質は「天然の佐剤」とも呼ばれ、自己免疫疾患でのその役割や、多種の疾患の免疫治療でのその活用に、大きな関心が持たれてきた。

## 【0002】

樹状細胞の培養法が近年、大きく進歩したことから、この複雑な種類の細胞の我々の理解

50

が大きく向上した。樹状細胞には、細胞系譜、組織内での位置、表現型、及び機能で区別されるいくつかの種類がある。免疫応答の開始においてTリンパ球と最も関連性の高い樹状細胞の種類は骨髄細胞由来のものである。骨髄細胞由来樹状細胞はさらに分かれて、1)リンパ系由来であり、成熟中のTリンパ球の削除に特に関与していると思われる胸腺樹状細胞、2)骨髄細胞系譜であり、皮膚で特殊なAPC機能を有するランゲルハンス細胞、及び3)特に血液、脾臓及びリンパ節で見られる骨髄細胞系譜由来樹状細胞、となる。

【0003】

(ランゲルハンス細胞を含む)骨髄細胞系譜由来樹状細胞の特徴は以下の通りである。1)抗原取り込み能力、及び提示に向けたプロセッシング能力、2)組織内での選択的移動能力、及び3)(抗原刺激を受ける前及び後の)Tリンパ球を直接刺激する能力、である。

10

【0004】

樹状細胞は近年、その特徴付けが進んだとはいえ、樹状細胞特異的受容体又は分子については、ほとんど知られていない。他の骨髄系及び非骨髄系細胞とも共有する樹状細胞関連分子は数多くあるが、樹状細胞に特異的な、利用できる試薬は数が限られている。樹状細胞と特異的又は優先的に反応する試薬、特に抗体は、腫瘍又は感染性疾患抗原に対する強力な免疫応答を誘導するターゲティング剤として、可能性が大きい。さらに、このような細胞特異的ターゲティング剤を操作すれば、骨髄及び臓器移植や他の自己免疫疾患で、強力なAPC(例えば樹状細胞)が消失するよう、毒素を送達させることができるかも知れない。

【0005】

従って、樹状細胞特異的結合剤は、治療上及び診断上、大きな価値を有するであろう。

20

【0006】

発明の概要

本発明は、抗原提示細胞(APC)、特に樹状細胞に特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体や、このような抗体を単独又は他の治療薬又は診断用試薬と組み合わせて(混合又は連結させるなどして)含有する組成物を、提供するものである。従って、本発明の抗体及び組成物は、例えば抗原提示に影響を与えたり、又はAPCが媒介する疾患を治療するなど、樹状細胞を標的とする多種の治療に利用できる。

【0007】

いくつかの実施例では、本ヒト抗体は、樹状細胞に対する高親和性結合を特徴とし、さらに、定義された機能を持つ分子又は細胞(例えば腫瘍細胞、細菌、ウイルス、エフェクター細胞)を樹状細胞に狙わせることで、樹状細胞の成長及び/又は機能に影響を与える能力も、特徴とする。従って、本発明のヒトモノクローナル抗体は、インビボ及びインビトロで、診断薬又は治療薬として利用できる。

30

【0008】

他の実施例では、本ヒト抗体は、樹状細胞上の特定の新規なエピトープ(受容体など)に結合することを特徴とする。さらに他の実施例では、本ヒト抗体は、マクロファージマンノース受容体又は関連する受容体に結合することを特徴とする。

【0009】

本発明の単離されたヒト抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、及びIgEなどの様々な抗体アイソタイプを包含するものである。典型的には、これらには、IgG1(IgG1 など)及びIgMアイソタイプが含まれる。本抗体は完全長(IgG1又はIgG4抗体など)であってもよく、又は抗原結合部分(Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又は一本鎖Fvフラグメントなど)のみが含まれていてもよい。ある実施例では、本ヒト抗体は組換えヒト抗体である。別の実施例では、本ヒト抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物から得たB細胞を不死化細胞に融合させて含有するハイブリドーマにより産生される。

40

【0010】

本発明の具体的なヒト抗体には、ここでA3、A5、A23、A24、A33、B9、B11、B33、B47、C8、C10、C20、C28、C29、C30、C35、E1、E8、E10、E18、E20、E21及びE24と言及すること

50

とするハイブリドーマが産生したものがある。

【0011】

別の実施例では、本発明のヒト抗体は、樹状細胞に特異的に結合することと、以下の性質

a) 少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは約 $10^9 M^{-1}$ 、そしてより好ましくは約 $10^{10} M^{-1}$ 乃至 $10^{11} M^{-1}$ 又はそれ以上の結合親和定数；

c) 少なくとも約 $10^3$ 、より好ましくは約 $10^4$ 、そして最も好ましくは約 $10^5 M^{-1} S^{-1}$ の結合定数 ( $K_{assoc}$ )；

d) 約 $10^{-3} s^{-1}$ 、好ましくは約 $10^{-4} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-5} s^{-1}$ 、そして最も好ましくは $10^{-6} s^{-1}$ の解離定数 ( $K_{dis}$ )；

e) 樹状細胞をオプソニン化する能力；

f) 樹状細胞に結合した後に内部移行する能力；

g) 樹状細胞にインシッター（例えばヒト組織内など）で結合する能力；

h) 樹状細胞を活性化する能力（例えばサイトカイン放出、免疫調節性表面分子の発現を誘導する、など）；又は

i) 約 $10 \mu g/ml$ 以下の濃度で（インビトロなどで）、ヒトエフェクター細胞の存在下で、樹状細胞の成長を抑制する、及び/又は、樹状細胞のファゴサイトーシス及び致死を媒介する、能力、

のうちの一つ以上を有することを、特徴とする。

【0012】

実施例の一つでは、本発明の単離されたヒト抗体は、樹状細胞に、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは約 $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^9 M^{-1}$ 、そしてより好ましくは約 $10^{10}$ 乃至 $10^{11} M^{-1}$ 又はそれ以上強力な親和定数で結合する。

【0013】

別の態様では、本発明は、本発明の抗体又は抗原結合部分をコードする核酸分子を提供するものである。従って、本発明の抗体をコードする核酸を含有する組換え発現ベクターや、このようなベクターでトランスフェクトした宿主細胞、さらにこれらの宿主細胞を培養することで本発明の抗体を作製する方法は、本発明の包含するところである。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は、樹状細胞に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体の多様なアイソタイプ（例えばIgG、IgA及び/又はIgM）を発現することのできる、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物由来の単離されたB細胞を提供するものである。好ましくは、前記の単離されたB細胞は、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品で免疫化した、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物から得られるとよい。好ましくは、前記のトランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物が、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するとよい。こうして、この単離されたB細胞を不死化させて、樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体の供給源（ハイブリドーマなど）とする。

【0015】

従って、本発明はさらに、樹状細胞に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を産生できるハイブリドーマも提供するものである。実施例の一つでは、本ハイブリドーマには、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を由来とするB細胞を、不死化細胞に融合させたものが含まれる。非ヒトトランスジェニック動物を、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品で免疫化すれば、抗体産生性ハイブリドーマを作製することができる。本発明の具体的なハイブリドーマには、A3、A5、A23、A24、A33、B9、B11、B33、B47、C8、C10、C20、C28、C29、C30、C35、E1、E8、E10、E18、E20、E21 及びE24がある。

【0016】

さらに別の態様では、本発明は、（ここでは「HuMab」と言及する）トランスジェニックマウスなど、樹状細胞に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を発現する非ヒトトラ

10

20

30

40

50

ンスジェニック動物を提供するものである。ある具体的な実施例では、本非ヒトトランスジェニック動物は、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスである。当該非ヒトトランスジェニック動物は、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品で免疫化することができる。好ましくは、前記トランスジェニックマウスなどの本非ヒトトランスジェニック動物は、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、複数のアイソタイプ（例えばIgG、IgA及び/又はIgM）の抗樹状細胞ヒトモノクローナル抗体を産生できるとよい。アイソタイプ・スイッチングは、例えば古典的又は非古典的なアイソタイプ・スイッチングなどのいずれで起きてもよい。

【0017】

別の態様では、本発明は、樹状細胞に特異的に反応するヒトモノクローナル抗体を生成する方法を提供するものである。ある実施例では、本方法は、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品で免疫化するステップを含む。次に、この動物のB細胞（例えば脾B細胞）を得て骨髄腫細胞に融合させて、樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成する。

10

【0018】

本発明の単離された抗樹状細胞ヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を、誘導体化したり、又は、別のペプチド又はタンパク質（例えばFab'フラグメント）などの別の機能的分子に連結してもよい。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分を、一つ又は別の抗体（例えば二重特異的又は多重特異的抗体など）の一種以上の他の分子物質に、（例えば化学結合、遺伝子融合、非共役結合又は他の方法などにより）機能的に連結してもよい。従って、ある態様では、本発明は、例えば細胞傷害性薬物、酵素活性のある毒素、又はその一フラグメント、放射性同位体、又は、免疫調節性（例えば抗炎症性）化合物、又は抗癌剤などの小分子などの治療的部分に共役させたヒト抗樹状細胞抗体又はその一フラグメントを特徴とする。

20

【0019】

さらに本発明のヒト抗樹状細胞抗体を抗原に連結すれば、樹状細胞にこの抗原を狙わせてこの抗原を内部移行させ、プロセッシング及び提示させることができる。前記抗原は、例えば腫瘍細胞抗原、微生物抗原、ウイルス抗原又は自己抗原でもよい。

【0020】

さらに別の態様では、本発明は、抗原（例えば腫瘍細胞抗原、微生物抗原、又はウイルス抗原）に対する被験体の免疫応答を誘導又は向上する方法を提供する。本方法は、樹状細胞表面上の成分に対する少なくとも一つの結合特異的部分を、少なくとも一つの抗原に連結して含む分子複合体を、被験体に投与するステップを含むが、このとき、前記樹状細胞表面上の前記成分とは、結合特異的部分で結合した分子複合体の内部移行を媒介するものである。ある実施例では、当該免疫応答は、抗原に結合する抗体を含む。別の実施例では、当該免疫応答は、MHC-I又はMHC-II複合体の成分として抗原に結合するT細胞を含む。

30

【0021】

ある態様では、免疫応答の誘導に向けて、細胞全体（例えば腫瘍細胞、エフェクター細胞など）又は病原体を樹状細胞に狙わせるために、本抗樹状細胞抗体又はその一フラグメントを利用することができる。ある実施例では、本発明のヒト抗樹状細胞抗体をコードする核酸分子で細胞をトランスフェクト又は形質導入して、当該抗樹状細胞抗体がこの細胞の表面上に発現するようにすることができる。別の実施例では、本発明のヒト抗樹状細胞抗体を、ある細胞（例えば腫瘍細胞、細菌又はウイルス）の細胞表面に、直接化学的に、又は、他の方法で架橋する、繋ぎ止める又はタグ付けして、この細胞を樹状細胞が狙うようにすることもできる。

40

【0022】

更なる態様では、本発明は、樹状細胞の表面上の成分に対する少なくとも一つの結合特異的部分を少なくとも一つの抗原に連結して含む分子複合体を有効量、被験体に投与する

50

ステップを含む、被験体を免疫化する方法を提供するものであり、ただしこのとき前記樹状細胞の表面上の成分は、前記結合特異的部分で結合した分子複合体の内部移行を媒介するものである。

【0023】

別の態様では、本発明は、樹状細胞に対する少なくとも一つの第一結合特異的部分と、ヒトFc RI又はヒトFc 受容体などのFc受容体に対する第二結合特異的部分とを含む二重特異的又は多重特異的分子を特徴とする。別の態様では、本発明は、樹状細胞に対する少なくとも一つの第一結合特異的部分と、標的細胞上の抗原に対する第二結合特異的部分とを含む二重特異的又は多重特異的分子を特徴とする。標的細胞とは、例えば腫瘍細胞、微生物病原体、又はウイルスや、ウイルス感染細胞など、その消去がホストにとって有益であると思われる細胞である。

10

【0024】

さらに本発明の多重特異的分子には、三重特異的、四重特異的、及び他の多重特異的分子が含まれる。ある実施例では、本多重特異的分子は、例えば細胞傷害性活性に關与する表面たんぱくに結合する分子など、抗エンハンスメント因子(EF)部分を含有する。

【0025】

ある具体的な実施例では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、少なくとも一つの抗体又はそのフラグメント(例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又は一本鎖Fvなど)を含んで成る。ある具体的な実施例では、当該抗体又はそのフラグメントは、完全ヒト抗体又はその一部分、又は「キメリック」もしくは「ヒト化」抗体又はその一部分である(例えば、(マウスなどの)非ヒト抗体由来の可変領域又は少なくとも相補性決定領域(CDR)を有し、残りの部分がヒト由来になっているなど)。

20

【0026】

ある実施例では、本二重特異的又は多重特異的分子の前記少なくとも一つの抗体又はそのフラグメントは、例えばFc RI(CD64)、Fc RII(CD32)、及びFc RIII(CD16)などのFc-ガンマ受容体(Fc R)など、ヒトIgG受容体などのFc受容体に結合するものである。好適なFc 受容体は高親和性Fc 受容体である、Fc RIである。しかしながら、ヒトIgA受容体(例えばFc RI)などの他のFc受容体も標的とすることができる。このFc受容体は好ましくは、単球、マクロファージ、又は活性化した多核白血球などのエフェクター細胞の表面上に位置するものとよい。ある好適な実施例では、本二重特異的及び多重特異的分子は、Fc受容体に、この受容体の免疫グロブリンFc(例えばIgG又はIgA)結合部位とは異なる部位で結合する。従って、本二重特異的及び多重特異的分子の結合は、生理レベルの免疫グロブリンの遮断を受けない。

30

【0027】

別の態様では、本発明は、マクロファージ又は活性化PMN細胞など、Fc受容体を発現しているエフェクター細胞を、本発明の二重特異的又は多重特異的分子に連結した形で含む標的的特異的エフェクター細胞を提供する。この二重特異的又は多重特異的分子はエフェクター細胞にそのFc受容体を介して結合させるが、樹状細胞にも結合するため、エフェクター細胞の標的を樹状細胞に設定することになる。

【0028】

別の態様では、本発明は、薬学的に許容可能な担体と、樹状細胞に特異的に結合する、本発明による少なくとも一つのヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分と、を含んで成る、薬学的組成物及び診断用組成物などの組成物を提供するものである。実施例の一つでは、本組成物は、好ましくはそれぞれが異なるエピトープに結合する、複数のヒト抗体又はその抗原結合部分の組み合わせを含んで成る。例えば、エフェクター細胞の存在下で樹状細胞の高度に効果的な致死を媒介するようなヒトモノクローナル抗体を含んで成る薬学的組成物を、樹状細胞の成長を抑制する別のヒトモノクローナル抗体に組み合わせることができる。従って、このような組合せにより、治療上の利益を最大にするようテーラー・メイドされた複数の治療法が可能となる。本発明による少なくとも一つのヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分と、本発明の少なくとも一つの二重特異的又は多重特異

40

50

的分子又は他の治療薬（例えば細胞傷害性物質）との組み合わせを含んで成る、薬学的組成物などの組成物も、本発明の範囲内にある。

【0029】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合部分（即ち二重特異的もしくは多重特異的抗体）を用いて、樹状細胞の成長を抑制したり、及び/又は、ヒト多核白血球（PMN）、単球及びマクロファージなどのヒトエフェクター細胞による樹状細胞のファゴサイトーシス及び/又は致死を誘導することで、樹状細胞の増殖及び/又は分化を抑制する方法を提供する。ある実施例では、本方法は、樹状細胞を、インビトロ又はインピボで、一種又は組合せになった本発明のヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分に、ヒトエフェクター細胞の存在下で接触させるステップを含む。本方法を、例えばインビトロ又はエクスピボなど（例えば樹状細胞及びエフェクター細胞を含む培養株など）、培養で利用することもできる。例えば、樹状細胞及びエフェクター細胞を含有する試料をインビトロで培養し、本発明の抗体又はその抗原結合部分（又は本発明の二重特異的もしくは多重特異的分子）に組み合わせることができる。反対に、本方法を、例えばインピボ（治療又は予防などの）プロトコルの一部として、被験体内で行うこともできる。

10

【0030】

インピボ法の場合、本抗体又はその抗原結合部分（又は本発明の二重特異的もしくは多重特異的分子）を、樹状細胞が媒介する疾患に罹患した被験体に投与することができる。これらの疾患には、例えば自己免疫疾患、炎症性疾患、及び移植片対宿主疾患がある。本発明の方法及び組成物を用いて治療（例えば緩解）又は予防できる自己免疫疾患の例には、限定はしないが、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、糖尿病、重症筋無力症、悪性貧血、アジソン病、紅斑性狼瘡、ライター症候群、及びグレーブズ病がある。

20

【0031】

ある実施例としては、例えば被験体をサイトカインで処置するなど、Fc 受容体又はFc 受容体などのFc受容体の発現又は活性を、向上又は抑制するなど調節する作用物質で、被験体を追加処置することができる。本二重特異的又は多重特異的分子による治療中の投与に好適なサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン-（IFN-）、及び腫瘍壊死因子（TNF）、がある。

30

【0032】

本発明の単離されたヒトモノクローナル抗体組成物を、さらに、例えば抗炎症性又は免疫抑制性治療法、又は細胞毒など、他の公知の治療法と組み合わせて投与することもできる。

【0033】

さらに別の態様では、本発明は、例えば樹状細胞関連疾患について診断するためなど、試料中の樹状細胞の存在をインビトロ又はインピボで検出する方法を提供するものである。ある実施例では、本抗体と樹状細胞との間の複合体が形成できるような条件下で、本発明のヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分（即ち二重特異的もしくは多重特異的分子）に、テストしようとする試料を、コントロール試料と一緒に、接触させることでこれが行われる。次に、両試料中の複合体形成を（ELISAを用いるなどして）検出し、試料間に、複合体形成の何らかの統計上有意な違いがあれば、その違いはテスト試料中の樹状細胞の存在の指標となる。

40

【0034】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び請求の範囲から明白となるであろう。

【0035】

（発明の詳細な説明）

本発明は、抗原に対する免疫応答を調節すると共に、樹状細胞が媒介する疾患を治療及び診断するための、新規な抗体を基にした治療法を提供するものである。

【0036】

50

本発明の治療法は、抗原提示細胞（APC）上、特に樹状細胞及びそれに関連する細胞上に存在するエピトープに結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を利用するものである。ある実施例では、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことで樹状細胞に対する複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えばIgG、IgA及び/又はIgE）を産生できる、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物で、本ヒト抗体を生成させる。従って、本発明の様々な態様には、ヒト抗体、抗体フラグメント及び抗体ミメティック、その薬学的組成物や、このようなモノクローナル抗体を作製するための非ヒトトランスジェニック動物及びB細胞及びハイブリドーマが含まれる。本発明の抗体を利用して、樹状細胞又は樹状細胞抗原を発現する関連細胞種を検出したり、又は、樹状細胞の成長、分化及び/又は活性をインビトロ又はイン

10

【0037】

本発明をより容易に理解できるように、いくつかの用語をまず定義しておく。定義は他にも、詳細な説明の項で行うこととする。

【0038】

ここで用いる用語「樹状細胞」には、未成熟及び成熟樹状細胞や、樹状細胞に分化できる関連する骨髄前駆細胞、又は、樹状細胞と共通の抗原を発現するという点で関連する抗原提示細胞（例えば単球及びマクロファージなど）が含まれる。ここで用いる用語「関連する」には、共通の前駆細胞又は細胞系譜を由来とする細胞が含まれる。ある好適な実施例では、本発明の抗体が樹状細胞に結合すると、樹状細胞の成長が抑制される。別の好適な

20

【0039】

ここで用いる用語「抗体」とは、少なくとも二本の重（H）鎖及び二本の軽（L）鎖をジスルフィド結合で相互に接続して含む糖たんぱくを言う。各重鎖は、重鎖可変領域（ここではHCVR又はVHと省略）及び重鎖定常領域から成る。重鎖定常領域は、三つのドメイン、CH1、CH2及びCH3から成る。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ここでLCVR又はVLと省略する）及び軽鎖定常領域から成る。軽鎖定常領域は一つのドメイン、CLから成る。VH及びVL領域は

30

【0040】

ここで用いる場合の、抗体の「抗原結合部分」（又は単に「抗体部分」）とは、抗原（樹状細胞上の抗原など）に特異的に結合する能力の残った抗体の一つ以上のフラグメントを

言う。抗体が抗原に結合する機能は、完全長抗体のうちの数フラグメントが行っているとの示唆がある。ある抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合フラグメントの例には、（i）VL、VH、CL及びCH1ドメインから成る一価のフラグメントであるFabフラグメント；（ii）ヒンジ領域でジスルフィド架橋で連結された二つのFabフラグメントを含んで成る二価のフラグメントであるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント；（iii）VH及びCH1ドメインから成るFdフラグメント；（iv）一つの抗体の一本の腕のVL及びVHドメインから成るFvフラグメント；（v）VHドメインから成るdAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）；及び（vi）単離後の相補性決定領域（CDR）、がある。さらに、Fvフラグメントの二つのドメイン、VL及びVHは別々の遺伝子にコードされてはいるが、組換え法により合成のリンカーで繋げれば、VL及びVH領域を対にして一個のタンパク質の鎖として

40

50

一価の分子を形成させることもできる（一本鎖(scFv)として公知である；Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426；and Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883を参照されたい）。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることを、意図している。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を用いて得られており、それらフラグメントは、インタクト抗体と同じ態様で、実用性についてスクリーニングされている。

【0041】

用語「二重特異的分子」には、(a)樹状細胞、及び(b)エフェクター細胞の表面上のFc受容体、などと、結合又は相互作用するという二つの異なる結合特異性を有する、タンパク質、ペプチド、又は、タンパク質もしくはペプチド複合体など、あらゆる物質が含まれるものと、意図されている。別の実施例では、本発明の二重特異的分子は、(a)樹状細胞、及び(b)標的細胞(例えば腫瘍細胞)上の抗原、と、結合又は相互作用するという二つの異なる結合特異性を有する。用語「多重特異的分子」又は「ヘテロ特異的分子」には、(a)樹状細胞、及び(b)エフェクター細胞の表面上のFc受容体、及び(c)少なくとも一つの他の成分、などと、結合又は相互作用するという三つの以上の異なる結合特異性を有する、タンパク質、ペプチド、又は、タンパク質もしくはペプチド複合体など、あらゆる物質が含まれるものと、意図されている。従って、本発明は、限定はしないが、樹状細胞抗原などの細胞表面抗原、及び、エフェクター細胞上のFc受容体又は標的細胞(腫瘍細胞など)上の抗原を狙った、二重特異的、三重特異的、四重特異的、及び他の多重特異的分子を包含するものである。用語「二重特異的分子」には、さらにジアボディ(原語diabody)が含まれる。ジアボディとは、VH及びVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現しているが、これら同じ鎖上の二つのドメイン同士が対を成すには短すぎるリンカーを用いることで、これらドメインが別の鎖の相補ドメインと対を成すようにして、抗原結合部位を二つにしてあるような二価の二重特異的抗体である(Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123を参照されたい)。

【0042】

ここで用いる用語「ヘテロ抗体」とは、相互に連結した二つ以上の抗体、抗体結合フラグメント(例えばFab)、その誘導体、又は抗原結合領域であって、そのうちの少なくとも二つが異なる特異性を有するようなものを言う。このような異なる特異性には、樹状細胞に対する結合特異性や、エフェクター細胞上のFc受容体、又は、腫瘍細胞などの標的細胞上の抗原又はエピトープに対する結合特異性が含まれる。

【0043】

用語「ヒト抗体」とは、ここで用いる場合、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列を由来とする可変及び定常領域を有する抗体を包含するものであると、意図されている。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列がコードしていないアミノ酸残基(例えば、インピトロでランダムもしくは部位特異的変異誘発で導入した変異や、インピボでの体細胞変異など)が含まれていてもよい。しかしながら、ここで用いる用語「ヒト抗体」には、マウスなどの他のほ乳類種の生殖細胞を由来とするCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されているような抗体が含まれるとは、意図されていない。

【0044】

ここで用いる用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」とは、単一の分子組成の抗体分子の製剤を言う。モノクローナル抗体組成物は、ある特定のエピトープに対し、単一の結合特異性及び親和性を呈する。従って、用語「ヒトモノクローナル抗体」とは、単一の結合特異性を呈し、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列を由来とする可変及び定常領域を有するような抗体を言う。ある実施例では、本ヒトモノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物由来のB細胞を、不死化細胞に融合させて有するハイブリドーマが産生するものである。

【0045】

10

20

30

40

50

ここで用いる用語「組換えヒト抗体」には、組換え法により調製、発現、創製又は単離された全てのヒト抗体が含まれるものと意図されており、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体（下の項Iでさらに解説する）；宿主細胞にトランスフェクトされる組換え発現ベクターを用いて発現させた抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、又は、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む他の何らかの手段によって調製、発現、創製又は単離された抗体、である。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列を由来とする可変及び定常領域を有する。しかしながら、いくつかの実施例では、このような組換えヒト抗体に、インビトロ変異誘発（又は、ヒトIg配列がトランスジェニックになった動物を用いる場合、インビボ体細胞変異誘発）を行うことで、この組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列が、ヒト生殖細胞VH及びVL配列を由来とし、また関連はしているが、インビボのヒト抗体生殖細胞レパートリーには天然では存在しないであろう配列になっている。

10

**【0046】**

ここで用いる「異種抗体」とは、このような抗体を産生する非ヒトトランスジェニック生物に関連して定義されている。この用語は、当該非ヒトトランスジェニック動物を構成していない生物に見られるものに相当するアミノ酸配列又はコーディング核酸配列を有し、一般には当該非ヒトトランスジェニック動物の種以外の種を由来とするような抗体を言う。

**【0047】**

ここで用いる「異種ハイブリッド抗体」とは、異なる生物を由来とする軽鎖及び重鎖を有する抗体を言う。例えば、ヒト重鎖をマウス軽鎖に結合させて有する抗体は、異種ハイブリッド抗体である。異種ハイブリッド抗体の例には、上で解説したキメラ抗体及びヒト化抗体がある。

20

**【0048】**

ここで用いる「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体から略、切り離された抗体である（例えば、樹状細胞や関連する骨髄系由来抗原提示細胞（単球及びマクロファージなど）に特異的に結合し、樹状細胞以外の細胞種に特異的に結合する抗体から略、切り離されている、単離された抗体など）。しかしながら、樹状細胞に特異的に結合する単離された抗体は、樹状細胞上のコグネート抗原に関連する抗原を発現する細胞種など、他の細胞に対する交差反応性は有していてもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質から略、切り離されていてもよい。本発明の実施例の一つでは、異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組み合わせを、よく定義された組成物中に配合する。

30

**【0049】**

ここで用いる用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」とは、所定の抗原又は細胞種に結合する抗体の特異性を言う。ある特定の抗原又は細胞種に「特異的に結合する」又は「特異的である」抗体は、この抗原又は細胞種に、他の抗原又は細胞種に対する選択性を上回る選択性で結合する。本発明の抗体の各々は、ある特定の標的エピトープ（例えば樹状細胞表面上に存在するものなど）に特異的に結合するが、本発明の特異抗体は、いくつかの実施例では、他のAPCとも何らかの交差反応性を呈するものでもよい。他の実施例では、本特異抗体は、樹状細胞とのみ反応する。典型的には、本抗体は、少なくとも約 $1 \times 10^7 M^{-1}$ の親和性で結合し、そして所定の抗原には、この所定の抗原又は近い関係の抗原以外の非特異抗原（例えばBSA、カゼインなど）への結合親和性よりも少なくとも二倍高い親和性で結合する。「抗体が抗原を認識する」及び「ある抗原に特異的な抗体」という文言は、ここでは、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換可能に用いられている。

40

**【0050】**

ここで用いる用語、IgG抗体に対する「高親和性」とは、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 、又は

50

それ以上、例えば最高 $10^{13}M^{-1}$ 又はそれ以上など、の結合親和性を言う。しかしながら、「高親和」結合は、他の抗体アイソタイプについては多様である。例えばIgMアイソタイプに対する「高親和」結合とは、少なくとも約 $10^7M^{-1}$ の結合親和性を言う。

## 【0051】

ここで用いる用語「 $K_{assoc}$ 」とは、ある特定の抗体 - 抗原相互作用の結合定数を言うものと、意図されている。

## 【0052】

ここで用いる用語「 $K_{dis}$ 」とは、ある特定の抗体 - 抗原相互作用の解離定数を言うものと、意図されている。

## 【0053】

ここで用いる「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子にコードされた抗体クラス（例えばIgM又はIgG1）を言う。

## 【0054】

ここで用いる「アイソタイプ・スイッチング」とは、ある抗体のクラス又はアイソタイプが、一つのIgクラスから他のIgクラスの一つへと変化する現象を言う。

## 【0055】

ここで用いる「スイッチングのないアイソタイプ」とは、アイソタイプ・スイッチングが起きなかったときに産生する重鎖のアイソタイプクラスを言う。スイッチングのないアイソタイプをコードするCH遺伝子は、典型的には、機能的再編成の起きるVDJ遺伝子からすぐ下流の一番目のCH遺伝子である。アイソタイプ・スイッチングは、古典的もしくは非古典的アイソタイプ・スイッチングに分類されてきた。古典的アイソタイプ・スイッチングは、導入遺伝子中の少なくとも一つのスイッチ配列領域に關与する組換え事象が起きたときに起きる。非古典的アイソタイプ・スイッチングは、例えばヒト  $\mu$  とヒト  $\mu$  との間に相同組換えが起きたときに起きることがある（ 関連欠失）。導入遺伝子同士及び / 又は染色体同士の間組換えなど、別の非古典的スイッチングの仕組みが起きて、アイソタイプ・スイッチングにつながることもある。

## 【0056】

ここで用いる用語「スイッチ配列」とは、スイッチ組換えを担うようなDNA配列を言う。典型的には $\mu$ スイッチ領域である「スイッチ・ドナー」配列は、スイッチ組換え中に欠失することになるコンストラクト領域の5'末端（即ち上流）にあるであろう。「スイッチ・アクセプター」領域は、欠失することになるコンストラクト領域と、置換定常領域（例えば、 、 等々）との間にあるであろう。組換えが必ず起きるという特定の部位はないため、最終的な遺伝子配列は、コンストラクトからは予測できないことが多いであろう。

## 【0057】

ここで用いる「糖鎖形成パターン」とは、タンパク質、より具体的には免疫グロブリンたんぱくに共有結合する糖単位のパターンであると、定義しておく。ある異種抗体の糖鎖形成パターンが、導入遺伝子のCH遺伝子の由来となった種よりも、当該非ヒトトランスジェニック動物の種の糖鎖形成パターンの方に類似していると、当業者が認識する場合、この異種抗体の糖鎖形成パターンは、当該非ヒトトランスジェニック動物の種が産生する抗体上に天然で起きる糖鎖形成パターンに略、類似であると特徴付けることができる。

## 【0058】

ここで用いる、ある物質に適用する用語「天然の」とは、その物質が天然に見られるという事実を言う。例えば、（ウィルスを含む）生物中に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列であって、天然の源から単離でき、研究室で人の手による改変を意図的に行っていないような配列は、天然のものである。

## 【0059】

ここで用いる用語「再編成した」とは、Vセグメントが、D-J又はJ部分のすぐ隣に位置して、それぞれ基本的に完全なVHもしくはVLドメインをコードするコンフォメーションになっているような重鎖又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の配置を言う。再編成のあった免疫グロブリン遺伝子座は、生殖細胞DNAに比較すれば判別することができる。再編成のあ

10

20

30

40

50

た遺伝子座は、少なくとも一つの組換えのあった七量体／九量体ホモロジー配列を有するであろう。

【0060】

Vセグメントに関してここで用いる用語「再編成していない」又は「生殖細胞配置」とは、Vセグメントに、D又はJセグメントのすぐ隣に来るような組換えが起きていない配置を言う。

【0061】

ここで用いる用語「核酸分子」には、DNA分子及びRNA分子が含まれるものと、意図されている。核酸分子は一本鎖でも、二本鎖でもよいが、好ましくは二本鎖DNAであるとよい。

【0062】

樹状細胞に結合する抗体又は抗体部分（例えばVH、VL、CDR3）をコードする核酸に関してここで用いる用語「単離された核酸分子」とは、当該抗体又は抗体部分をコードする当該ヌクレオチド配列が、樹状細胞以外の細胞に結合する抗体又は抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列を含まないような核酸分子を言うものと意図されている。このとき、この他の配列は、ヒトゲノムDNA中で当該核酸を天然でフランクしているものでもよい。

【0063】

核酸について、用語「実質的な相同性」とは、二つの核酸、又はそのうちの指定した配列が、最適にアライメントして比較したときに、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常では少なくとも約90%乃至95%、そしてより好ましくはヌクレオチドの少なくとも約98%乃至99.5%が、適当なヌクレオチド挿入又は欠失を持ちながらも同一であることを指す。あるいは、それらの部分が選択的ハイブリダイゼーション条件下で相補鎖にハイブリダイズするときに、実質的な相同性があることになる。

【0064】

二つの配列間のパーセント同一性は、これら二つの配列を最適にアライメントするのに導入せねばならないギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れたときの、これら配列に共通の同一位置の数の関数である（即ち、%相同性 = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）。二つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、以下の非限定的な例に解説するように、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

【0065】

二つのヌクレオチド間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手できる）のGAPプログラムを用い、NWSgapdna.CMP 行列を用いて、ギャップ・ウェイトを40、50、60、70、又は80にし、そしてレンジス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして決定することができる。二つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた E. マイヤース及びW. ミラーのアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）を用い、PAM120 ウェイト残基表を用いて、ギャップ・レンジス・ペナルティを12、そしてギャップ・ペナルティを4にして、決定することもできる。さらに、二つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手できる）のGAPプログラムに組み込まれたニードルマン及びワンシュ（J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)）のアルゴリズムを用い、Blossum 62 行列又はPAM250行列を用いて、ギャップ・ウェイトを16、14、12、10、8、6、又は4にし、レンジス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして、決定することができる。

【0066】

さらに本発明の核酸及びタンパク質の配列を「クエリー配列」として利用して、公開データベースの検索を行って、例えば関連する配列を同定することなどができる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLAST 及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を利用すれば行える。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラムを用い、スコア= 100、ワード長= 12 にして行くと、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラムを用い、スコア= 50、ワード長= 3にして行くと、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を得ることができる。比較を目的としてギャップのあるアライメントを行うには、ギャップドBLASTをAltschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402が解説するとおりに利用できる。BLAST及びギャップドBLASTプログラムを利用する場合、各プログラムの(例えばXBLAST及びNBLAST)のデフォルト・パラメータを利用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> を参照されたい。

【0067】

当該核酸は全細胞であっても、細胞ライセート中であっても、又は部分的に精製された形又は概ね純粋な形で存在してもよい。核酸が「単離された」又は概ね「純粋にされた」とは、アルカリ/SDS処置、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動法、及び当業で公知の他の手法を含め、標準的技術により、他の細胞中の核酸又はタンパク質など、他の細胞成分又は他の混入物質が取り除かれていることを言う。F. A usubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

10

【0068】

cDNA、ゲノム又は混合物から採った、(改変した制限部位等々を除き)しばしば天然配列のままである本発明の核酸組成物には、遺伝子配列をもたらず標準的技術により、変異を起こさせてもよい。このような変異は、コーディング配列の場合、希望通りのアミノ酸配列への影響を与えるものでもよい。具体的には、天然V、D、J、定常、スイッチ及び他のここに解説したような配列に略、相同な又は由来とするDNA配列が考えられる(このとき「由来とする」とは、ある配列が別の配列と同一であるか、又は変更されていることを指す)。

20

【0069】

用語「作用的に連結した」又は「作用可能に連結した」とは、当該分子同士が相互に機能的に結び付いているために、一方の分子の活性又は状態に変化があると、他方の分子の活性又は状態に変化が起きるようなことを意味すると、意図されている。核酸が「作用的に連結している」とは、別の核酸配列と機能的な関係に配置されていることを言う。例えば、プロモータ又はエンハンサが、あるコーディング配列の転写に影響を与える場合、そのプロモータ又はエンハンサはこの配列に作用的に連結していることになる。転写調節配列に関する場合、作用的に連結した、とは、連結したDNA配列が連続しており、さらに二つのタンパク質コーディング領域を接合する必要がある場合、連続していると同時に読み枠内にあることを意味する。スイッチ配列の場合、作用的に連結したとは、これらの配列がスイッチ組換えを起こせることを指す。典型的には、作用的に連結した二つのポリペプチドは、ペプチド結合を介して共有結合していることが多い。

30

【0070】

ここで用いる「ベクター」という用語は、連結された先の別の核酸を輸送することのできる核酸分子を言うものと、意図されている。ベクターの種類の一つは、追加するDNAセグメントをライゲートできる環状の二本鎖DNAループを言う「プラスミド」である。もう一つのベクターの種類は、追加するDNAセグメントをウィルスゲノム中にライゲートさせることのできるウィルスベクターである。ベクターのいくつかは、導入された先の宿主細胞内で自律的複製が可能である(例えば、細菌性の複製開始点を有する細菌ベクターや、エピソード性ほ乳類ベクターなど)。他のベクター(例えばエピソード以外のほ乳類ベクター)は、宿主細胞に導入されるや宿主細胞のゲノムに組み込まれて、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、いくつかのベクターは、作用的に連結された先の遺伝子の発現を命令することができる。このようなベクターをここでは「組換え発現ベクター(又は単に「発現ベクター」)と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で実用性のある発現ベクターは、しばしばプラスミドの形である。プラスミドが最も普通に用いられている形のベクターであるため、本明細書では「プラスミド」及び「ベクター」を互換可能に用いている場合がある。しかしながら、本発明は、例えばウィルスベクター(例えば複製欠陥レトロウィルス、アデノウィルス、及びアデノ随伴ウィルスなど)、同等の機能を果たす他の形の発現ベクターも包含することを、意図している。

40

50

## 【 0 0 7 1 】

ここで用いる用語「組換え宿主細胞」(又は単に「宿主細胞」)とは、組換え発現ベクターを導入した先の細胞を言うものと、意図されている。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の後代も言うことを意図していると、理解されたい。突然変異又は環境による影響が原因で、後の世代に何らかの改変が起きることがあるため、このような後代は、実際には親細胞と同一ではないかも知れないが、それでも尚、ここで用いる用語「宿主細胞」の範囲内に包含されている。

## 【 0 0 7 2 】

本発明の多様な態様を、以下の小項でさらに詳述する。

## 【 0 0 7 3 】

## I. 樹状細胞に対するヒト抗体の生成

本発明のヒトモノクローナル抗体(mAb)を作製する特に好適な方法をここで詳述するが、例えばケーラー及びミルスタインの標準的体細胞ハイブリッド形成技術 *Nature* 256: 495 (1975) など、従来モノクローナル抗体法を含め、多様な他の技術も利用できる。体細胞ハイブリッド形成法が好ましいが、例えばBリンパ球のウィルス又は腫瘍遺伝子による形質転換など、モノクローナル抗体を生成する他の技術も利用できる。

## 【 0 0 7 4 】

ハイブリドーマを作製するのに好適な動物系はマウス系である。マウス系でのハイブリドーマ作製は、良く確立された手法である。融合用の脾細胞の免疫化プロトコール及び免疫化した脾細胞の分離技術は当業者に公知である。融合相手(例えばマウス骨髄腫細胞)及び融合法も公知である。

## 【 0 0 7 5 】

ある好適な実施例では、樹状細胞を狙ったヒトモノクローナル抗体を、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を持つトランスジェニックマウスを用いて生成する。ここでは「HuMab」マウスと呼ぶこれらのトランスジェニックマウスは、再編成していないヒト重( $\mu$ 及び $\lambda$ )鎖及び軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン微小遺伝子座を、内因性 $\mu$ 及び $\lambda$ 鎖遺伝子座を不活性化する標的変異と一緒に含有する(Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859)。従って、このマウスは、低下したマウスIgM又は $\lambda$ 鎖の発現を呈し、免疫化に应答して、導入したヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子がクラス・スイッチング及び体細胞変異を行って、高親和ヒトIgGモノクローナルを生成する(Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMabマウスのこの製剤は下記の項II及びTaylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851(これら全参考文献の内容全体を、言及をもってここに編入することとする)に詳述されている。さらに、すべてLonberg及びKay及びGenPharm Internationalの米国特許第5,545,806号; 第5,569,825号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,789,650号; 第5,877,397号; 第5,661,016号; 第5,814,318号; 第5,874,299号; 及び第5,770,429号; Suraniらの米国特許第5,545,807号; 1998年6月11日公開の国際公報WO 98/24884; 1994年11月10日公開のWO 94/25585; 1993年6月24日公開のWO 93/1227; 1992年12月23日公開のWO 92/22645; 1992年3月19日公開のWO 92/03918(これら全部の開示全体を、言及をもってここに編入する

10

20

30

40

50

こととする)も参照されたい。

【0076】

HuMab免疫化

樹状細胞に対する完全ヒトモノクローナル抗体を生成するには、HuMabマウスを、Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851及びWO 98/24884が解説したように、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品で免疫化することができる。好ましくは、このマウスは一回目の免疫化時点で生後6乃至16週であるとよいであろう。例えば、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品(100万乃至1000万個の細胞)を用いて、HuMabマウスを腹腔内で免疫化することができる。樹状細胞の精製もしくは濃縮標品を用いた免疫化で抗体が生成されない場合、マウスにさらに、樹状細胞のライセートで免疫化を行って、免疫応答を促進することもできる。

10

【0077】

多様な抗原を用いて蓄積した経験から、HuMabトランスジェニックマウスは、まず抗原を完全フロイントアジュバントに入れて腹腔内(IP)注射して免疫化し、一週間おきに(最高6回)抗原の不完全フロイントアジュバント溶液でIP免疫化したときに、最も良く応答することが示されている。免疫応答は、眼窩後方の血液から得た血漿試料で、免疫化プロトコル期間中、観察することができる。血漿を例えばELISA又はフローサイトメトリで(以下に解説するように)スクリーニングして、十分な抗体価の抗樹状細胞ヒト免疫グロブリンを持つマウスを融合に利用することができる。マウスに抗原を腹腔内注射して追加刺激してから3日後に死亡させ、脾臓を摘出してよい。各抗原について2乃至3回の融合を行わねばならないだろうと予測できる。数匹のマウスを各抗原について免疫化することになるであろう。例えば、合計12匹のHC07及びHC012株HuMabマウスを免疫化してもよい。

20

【0078】

樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

マウス脾細胞を分離し、PEGでマウス骨髄腫細胞株に標準的プロトコルに基づいて融合させることができる。次に、こうして得られたハイブリドーマを、抗原特異抗体を産生しているか、スクリーニングする。例えば、免疫化したマウスの脾臓リンパ球の単個細胞懸濁液を、50%PEGで、P3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL 1580)の数の6分の1に融合させる。細胞を約 $2 \times 10^5$ になるように底の平らな微量定量プレートに塗った後、2週間、20%胎児クローン血清、18%「653」調整培地、5%オリゲン(アイゲン社製)、4 mM L-グルタミン、1 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50 単位/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml ゲンタマイシン及び $1 \times \text{HAT}$ (シグマ社製; HATは融合から24時間後に加える)を含有する選択培地でインキュベートする。二週間後、細胞を、HATをHTに置き換えた培地で培養する。次に、個々の細胞をELISAでヒト抗樹状細胞モノクローナルIgM及びIgG抗体についてスクリーニングする。広汎なハイブリドーマ成長があったら、培地を通常10乃至14日後に観察する。抗体を分泌しているハイブリドーマを再度塗り、再度スクリーニングし、抗樹状細胞モノクローナル抗体であるヒトIgGについてやはり陽性であったら、少なくとも二回、限界希釈でサブクローンしてもよい。こうして安定なサブクローンをインビトロで培養して、少量の抗体を組織培養培地で生成させてから、特徴付けを行う。

30

40

【0079】

ヒトモノクローナル抗体の樹状細胞への結合の特徴付け

本発明のヒトモノクローナル樹状細胞抗体の結合を特徴付けするために、ハイブリドーマを、例えばフローサイトメトリで樹状細胞との能動的反応性についてスクリーニングすることができる。

【0080】

簡単に説明すると、樹状細胞を採集して洗浄した後、96ウェルプレートに加え、ハイブリドーマ上清の希釈液(又は、0.1%のトゥイーン80及び20%マウス血清を含有するモ

50

ノクローナル抗体PBS溶液)と一緒に、4℃で1時間、インキュベートする。次にプレートを洗浄し、二次抗体(例えばFITC又はPEで標識した抗ヒトIgG)と一緒にさらに1時間、4℃でインキュベートする。洗浄後、細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定し、解析する。試料の解析は、FACScan装置により、単個細胞に当たる光及び側光散乱性質を用いて行うことができる。(フローサイトメトリ検定に加え、又はその代わりに、)蛍光顕微鏡法を用いた代替的な検定を利用してよい。細胞を上に乗せた後に染色し、蛍光顕微鏡法で調べることができる。この方法により、個々の細胞を可視化できるが、抗原濃度によっては、感受性が低くなることがある。

#### 【0081】

樹状細胞に強力に結合するハイブリドーマをサブクローンし、さらに特徴付けることになる。各ハイブリドーマから、親細胞の反応性の残った一個のクローンを(フローサイトメトリで)選び出し、5乃至10個のバイアルの細胞銀行を作って、-140℃で保存し、抗体精製に利用することができる。

10

#### 【0082】

ヒト抗樹状細胞抗体を精製するには、選別したハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製の2リットル入りのスピナーフラスコで成長させることができる。上清を濾過し、濃縮してから、プロテインA-セファロース(ニュージャージー州ピスカタウェイ、ファルマシア社製)でアフィニティ・クロマトグラフィを行ってもよい。溶離したIgGをゲル電気泳動法及び高速液体クロマトグラフィで調べて、純度を確認することもできる。バッファ溶液をPBSに替え、濃度をOD280で吸光係数1.43を用いて決定してもよい。モノクローナル抗体をアリコートし、-80℃で保存してもよい。

20

#### 【0083】

選別したヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを調べるには、各抗体を市販の試薬(イリノイ州ロックフォード、ピアース社製)を用いてビオチン化することができる。未標識のモノクローナル抗体と、ビオチン化したモノクローナル抗体とを用い、フローサイトメトリを上述のように利用して、競合実験を行うことができる。ビオチン化モノクローナル抗体の結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼをプローブにして検出できる。

#### 【0084】

精製後の抗体のアイソタイプを決定するには、アイソタイプELISAを行うことができる。微量定量プレートのウェルを10µgの抗ヒトIgGで一晩かけて4℃で被膜してもよい。5%BSAで遮断した後、このプレートを10µg/mlのモノクローナル抗体又は精製済みのアイソタイプコントロールに、周囲温度で2時間、反応させる。次に、このウェルを、ヒトIgG1又はヒトIgM特異的アルカリホスファターゼ共役プローブに反応させることができる。洗浄後、プレートをpNPP基質(1mg/ml)で展開させて、405-650の光学密度で解析する。

30

#### 【0085】

さらに抗樹状細胞ヒトIgGを、ウェスタンブロットで樹状細胞との反応性についてテストしてもよい。簡単に説明すると、樹状細胞の細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。電気泳動後、分離した当該抗原をニトロセルロース・メンブレンに写し取り、20%マウス血清で遮断し、テスト対照のモノクローナル抗体でプローブすることとなる。ヒトIgGの結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出でき、BCIP/NBT基質タブレット(ミズーリ州セントルイス、シグマ・ケミカル社製)で展開させることができる。

40

#### 【0086】

ヒトモノクローナル抗体の樹状細胞に対するファゴサイトーシス及び細胞致死活性。樹状細胞に対する特異的結合に加え、ヒトモノクローナル抗樹状細胞抗体を、樹状細胞のファゴサイトーシス及び致死を媒介するその能力についてテストすることもできる。モノクローナル抗体活性をインビトロでこのようにテストすると、インビボモデルでテストする前の予備的スクリーニングとなる。簡単に説明すると、健康なドナーから採取した多核白血球(PMN)又は他のエフェクター細胞を、フィッコール・ハイバック密度遠心分離法

50

で精製し、次に、混入した赤血球を溶解させる。洗浄後のPMNを、10%熱不活化ウシ胎児血清を補ったRPMI中に懸濁させ、 $^{51}\text{Cr}$ で標識した樹状細胞に、様々なエフェクター細胞対樹状細胞比（エフェクター細胞：樹状細胞）で混合してもよい。次に、精製済みのヒト抗樹状細胞IgGを多様な濃度で加えてもよい。無関係のヒトIgGを陰性のコントロールとして用いてもよい。検定は0乃至120分間、37で行うことができる。 $^{51}\text{Cr}$ の培養上清中への放出を測定すると、試料の細胞溶解を検定することができる。また、複数のモノクローナル抗体があったときに細胞溶解を促進できるかを判定するために、抗樹状細胞モノクローナルを相互に組み合わせてテストしてもよい。

#### 【0087】

また、樹状細胞に結合するヒトモノクローナル抗体をインビボモデル（例えばマウス）でテストして、樹状細胞のファゴサイトーシス及び致死を媒介する上でのそれらの有効性について調べてもよい。これらの抗体は、限定はしないが例えば以下の基準に基づいて選別することができる。

- 1.) 生きた樹状細胞への結合；
- 2.) 樹状細胞への高親和結合；
- 3.) 樹状細胞上の固有のエピトープへの結合（補完的な活性を持つモノクローナル抗体を組み合わせて用いた場合に、同じエピトープへの結合をめぐって競合する可能性をなくすため）；
- 4.) 樹状細胞のオプソニン化；
- 5.) ヒトエフェクター細胞の存在下における樹状細胞の成長抑制、ファゴサイトーシス及び/又は致死の媒介；
- 6.) 樹状細胞への結合後の内部移行；
- 7.) インシター（例えばヒト組織での）での樹状細胞への結合
- 8.) 樹状細胞の活性化（例えばサイトカイン放出、免疫調節性表面分子（例えばCD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD40、及びCD54(ICAM)）の発現を誘導する、など）；
- 9.) 樹状細胞上のヒトマンノース受容体への結合；及び
- 10.) 霊長類間で保存されている樹状細胞抗原への結合。

#### 【0088】

本発明の好適なヒトモノクローナル抗体は、これらの基準の一つ以上、そして好ましくは全てに、合致するものである。ある具体的な実施例では、本ヒトモノクローナル抗体を、例えば二種以上の抗樹状細胞モノクローナル抗体又はそのフラグメントを含む医薬組成物としてなど、組み合わせて用いる。例えば、所望の治療効果又は診断効果を得るために、異なる、しかし補完的な活性を有する複数のヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体を単一の治療で組み合わせてもよい。その一例は、樹状細胞内部に急速に移行する抗樹状細胞ヒトモノクローナル抗体を、免疫刺激性サイトカインの放出など、樹状細胞の抗原提示細胞活性を誘導する別のヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体と組み合わせた形で含有する組成物であろう。

#### 【0089】

II. ヒトモノクローナル抗樹状細胞抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物の作製

さらに別の態様では、本発明は、樹状細胞に特異的に、好ましくは高親和性で結合するヒトモノクローナル抗体を発現できる、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を提供するものである。ある好適な実施例では、トランスジェニックマウス（HuMabマウス）などの本非ヒトトランスジェニック動物は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するものである。ある実施例では、トランスジェニックマウスなどの当該非ヒトトランスジェニック動物は、樹状細胞の精製されたもしくは濃縮された標品及び/又は樹状細胞ライセートで、免疫化してある。好ましくは、トランスジェニックマウスなどの当該の非ヒトトランスジェニック動物が、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、樹状細胞に対する複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えばIgG、IgA及び/又はIgEなど）を産生できるとよい。アイソタ

10

20

30

40

50

イブ・スイッチングは、例えば古典的又は非古典的アイソタイプ・スイッチングで起きるものでよい。

【0090】

外からの抗原刺激に異種の抗体レパートリーで応答する非ヒトトランスジェニック動物を設計するには、そのトランスジェニック動物に含めた異種の免疫グロブリン導入遺伝子が、B細胞発生の経路全体を通じて適正に機能することが必要である。ある好適な実施例では、異種の重鎖導入遺伝子の適正な機能に、アイソタイプ・スイッチングが含まれる。従って、本発明の導入遺伝子は、アイソタイプ・スイッチングを行い、さらに以下のうちの一つ以上を起こすように構築される。即ち、(1)高レベル及び細胞種特異的な発現、(2)機能的な遺伝子再編成、(3)対立遺伝子排除の活性化及び対立遺伝子排除に対する応答、(4)十分な一次的レパートリーの発現、(5)シグナル伝達、(6)体細胞超変異、及び(7)免疫応答中に導入遺伝子抗体遺伝子座が優性になること、である。

10

【0091】

前記の基準全てが合致されねばならない訳ではない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座を機能的に破壊したような実施例では、導入遺伝子が対立遺伝子排除を活性化する必要はない。さらに、導入遺伝子が、機能的に再編成した重鎖及び/又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む実施例では、機能的遺伝子再編成という二番目の基準は、少なくともその導入遺伝子が既に再編成しているために、必要ではない。分子免疫学の背景については、言及をもってここに編入することとする Fundamental Immunology, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.を参照されたい。

20

【0092】

いくつかの実施例では、本発明のヒトモノクローナル抗体を生成させるのに用いる非ヒトトランスジェニック動物は、再編成した、再編成していない、又は、再編成したものと未再編成のものが組み合わせになった、異種の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖導入遺伝子を、このトランスジェニック動物の生殖細胞に含有している。重鎖導入遺伝子のそれぞれは少なくとも一つのC<sub>H</sub>遺伝子を含む。加えて、この重鎖導入遺伝子には、トランスジェニック動物のB細胞で複数のC<sub>H</sub>遺伝子をコードする異種導入遺伝子のアイソタイプ・スイッチングが起きるのに役立つ機能的なアイソタイプ・スイッチ配列が含まれていてもよい。このようなスイッチ配列は、導入遺伝子C<sub>H</sub>遺伝子を供給する側の種由来の生殖細胞免疫グロブリン遺伝子座に天然で存在するものでも、又は、このようなスイッチ配列は、トランスジェニック・コンストラクトを受け取る側(トランスジェニック動物)の種にあるものを由来としてもよい。例えば、トランスジェニックマウスを作製するのに用いるヒト導入遺伝子コンストラクトは、マウス重鎖遺伝子座に天然で存在するものと類似のスイッチ配列を取り入れた方が、より高頻度でアイソタイプ・スイッチングを行うであろう。これはおそらく、マウススイッチ配列は、マウススイッチリコンビナーゼ酵素系で機能するのに最適になっており、ヒトスイッチ配列はそうでないからである。スイッチ配列は、従来のクローニング法で分離及びクローンしてもよいが、又は、免疫グロブリンスイッチ領域配列に関して公開された配列情報に基づいて設計された重複合成オリゴヌクレオチドから、デノボ合成してもよい(言及をもってここに編入することとするMills et al., Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Sideras et al., Intl. Immunol. 1:631-642 (1989))。前述のトランスジェニック動物のそれぞれについて、機能的に再編成した異種の重鎖及び軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子は、トランスジェニック動物のB細胞に有意な比率で見られる(少なくとも10%)。

30

40

【0093】

本発明のトランスジェニック動物を作製するのに用いる導入遺伝子には、少なくとも一つの可変遺伝子セグメント、一つの多様性遺伝子セグメント、一つのジョイニング遺伝子セグメント、及び少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る重鎖導入遺伝子が含まれる。免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子は、少なくとも一つの可変遺伝子セグメント、一つのジョイニング遺伝子セグメント、及び少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。重鎖及び軽鎖遺伝子セグメントをコ

50

ードする遺伝子セグメントは、非ヒトトランスジェニック動物にとって異種である。それはなぜならこれらが、この非ヒトトランスジェニック動物を構成していない種由来の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAを由来とするか、又はそれに相当するからである。本発明の一態様では、個々の遺伝子セグメントが未再編成のままであるよう、即ち、機能的免疫グロブリン軽鎖又は軽鎖をコードするような再編成はされないよう、当該導入遺伝子が構築される。このような未再編成の導入遺伝子は、樹状細胞に暴露したとき、V、D、及びJ遺伝子セグメントの組換え（機能的再編成）に役立ち、そして好ましくはD領域遺伝子セグメントの全部又は一部分が、非ヒトトランスジェニック動物の再編成後の免疫グロブリン重鎖に組み込まれるのに役立つ。

#### 【0094】

代替的な実施例では、当該導入遺伝子が再編成のない「ミニ遺伝子座」を含む。このような導入遺伝子は典型的には、C、D、及びJセグメントのかなりの部分や、V遺伝子セグメントの一部を含む。このような導入遺伝子コンストラクトでは、例えばプロモータ、エンハンサ、クラススイッチ領域、RNAプロセシングのためのスプライシング供与側配列及びスプライシング受容側配列、リコンビネーション・シグナル、等々の多様な調節配列は、異種のDNAを由来とする相当する配列を含むこととなる。このような調節配列を、本発明で用いる非ヒト動物の種と同じ又は関連する種から取り出して、導入遺伝子に取り入れてもよい。例えば、ある導入遺伝子において、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントをげっ歯類免疫グロブリンエンハンサー配列と組み合わせ、トランスジェニックマウスで使用してもよい。あるいは、ほ乳類のゲノムに天然で存在することが公知の機能的DNA配列に対して同種ではない合成の調節配列を導入遺伝子に取り入れてもよい。合成の調節配列は、例えばスプライシング受容側部位又はプロモータ/エンハンサモチーフの許容可能な配列などを決めるコンセンサスの規則に基づいて、設計する。例えば、ミニ遺伝子座とは、ゲノミック免疫グロブリン遺伝子座のうちの一部を含んで成るものであり、その内側（つまり前記部分の末端ではない）の少なくとも一箇所で、天然型の生殖細胞Ig遺伝子座に比較して、必須ではないDNA部分（例えば介在配列；イントロン又はその一部など）を欠失させたものである。

#### 【0095】

本発明のある好適な実施例では、樹状細胞に対するヒト抗体を産生させるのに用いるトランスジェニック動物は、（例えばpHC1 又はpHC2を）WO 98/24884の実施例5、6、8、又は14に解説された軽鎖導入遺伝子を一コピー含有する動物と交配した、WO 98/24884の実施例12に解説された導入遺伝子のコピーを少なくとも一つ、典型的には2乃至10、そして時には25乃至50又はそれ以上、含有し、そしてその仔を、WO 98/24884の実施例10で解説したJ<sub>H</sub>欠失動物と交配させる（これら参考文献の内容を言及を持ってここに編入することを明示しておく）。動物はこれら三つの形質の各々についてホモ接合型になるように交配する。このような動物は以下の遺伝子型を有することになる：（WO98/24884の実施例12に解説された）ヒト重鎖未再編成のミニ遺伝子座を一コピー（染色体半数体一組当たり）、再編成したヒトK軽鎖コンストラクトを（染色体半数体一組当たり）一コピー、及び（WO98/24884の実施例10に解説した）各内因性マウス重鎖遺伝子座において機能的J<sub>H</sub>セグメントの全てを除去する欠失。このような動物を、J<sub>H</sub>セグメントの欠失がホモ接合型になったマウスと交配し（WO98/24884の実施例10）て、このJ<sub>H</sub>欠失がホモ接合型、そしてヒト重鎖及び軽鎖コンストラクトがヘミ接合型になった仔を得る。その結果得られる動物に抗原を注射し、これらの抗原に対するモノクローナル抗体の生成に用いる。

#### 【0096】

このような動物から分離されたB細胞は、ヒト重鎖及び軽鎖について、各遺伝子のコピーを一つしか含有していないために、一重特異的である。さらにこれらは、WO98/24884の実施例9及び12が解説するように、J<sub>H</sub>領域全体に欠失が導入されているために、内因性マウス重鎖遺伝子の両方のコピーが非機能的になっており、従ってヒト又はマウス重鎖についても一重特異的であろう。B細胞のうちのかなりの割合が、ヒト又はマウス軽鎖について一重特異的になっているであろう。なぜなら、大部分のB細胞で、再編成したヒト 軽鎖

10

20

30

40

50

遺伝子のコピー一個が発現することで、内因性マウス及びラムダ鎖遺伝子の再編成が対立遺伝子上及びアイソタイプ上、排除されるからである。

【0097】

前記好適な実施例のトランスジェニックマウスは、著しいレパートリー、理想的には天然マウスのそれと略類似のレパートリーの免疫グロブリン産生を呈するであろう。従って、例えば内因性Ig遺伝子を失活させてある実施例では、総免疫グロブリンレベルは血清中約0.1乃至10mg/ml、好ましくは0.5乃至5mg/mlの範囲内にあり、理想的には少なくとも約1.0mg/mlであろう。IgMからIgGへスイッチングを行うことのできる導入遺伝子をこのトランスジェニックマウスに導入した場合、成体マウスの血清IgG対IgM比は好ましくは約10:1である。IgG対IgM比は、未成熟マウスではずっと低いであろう。一般に、脾臓及びリンパ節B細胞のうちの約10%を越えるもの、好ましくは40乃至80%が、ヒトIgGたんぱくのみを発現する。

10

【0098】

このレパートリーは理想的には、非トランスジェニックマウスで見られるものに近いものであり、通常は、少なくとも約10%、好ましくは25乃至50%又はそれ以上がそうである。一般に、少なくとも約千種類の異なる免疫グロブリン（理想的にはIgG）、好ましくは $10^4$ 乃至 $10^6$ 種又はそれ以上が、主にマウスゲノムに導入された異なるV、J及びD領域の数に応じて、産生されるであろう。これらの免疫グロブリンは、典型的には、樹状細胞たんぱくなど、抗原性の高いタンパク質の約半分又はそれ以上を認識するであろう。典型的には、これら免疫グロブリンは、所定の抗原に対して、少なくとも約 $10^7M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約 $10^9M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^{10}M^{-1}$ 、 $10^{11}M^{-1}$ 、 $10^{12}M^{-1}$ 、又はそれ以上、例えば最高で $10^{13}M^{-1}$ 、又はそれ以上など、の親和性を呈するであろう。

20

【0099】

いくつかの実施例では、所定の抗原種に対する抗体応答に表れるV遺伝子の選択幅が制限されるよう、所定のレパートリーを持つマウスを作製するのが好ましいかも知れない。所定のレパートリーを有するある重鎖導入遺伝子が、例えば、ヒトにおいて所定の抗原種に対する抗体応答で優先的に用いられるようなヒトVH遺伝子を含んでいてもよい。あるいは、様々な理由（例えば、所定の抗原に対して親和性の高いV領域をコードしている可能性が低い；体細胞変異及び親和性尖鋭化を行う性向が低い；又は、特定のヒトにとって免疫原性がある、など）から、いくつかのVH遺伝子を、定義されたレパートリーから除外してもよい。このように、様々な重鎖又は軽鎖遺伝子セグメントを含有する導入遺伝子に再編成が起きる前に、このような遺伝子セグメントを、例えばトランスジェニック動物以外の生物の種由来のものと同様、ハイブリダイゼーション又はDNA配列決定などにより、容易に同定できるであろう。

30

【0100】

前に解説したように、本発明のトランスジェニックマウスは、樹状細胞の精製もしくは濃縮標品及び/又は樹状細胞ライセートで、免疫化することができる。このマウスが生ずるB細胞は、導入遺伝子内スイッチ組換え（cisスイッチング）を通じてクラス・スイッチングを行うと共に、樹状細胞に対して反応性の免疫グロブリンを発現するであろう。この免疫グロブリンは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドがヒト導入遺伝子にコードされたヒト配列抗体になっている可能性があり、またその配列には、体細胞変異及びV領域組換えジョイントを由来とする配列や、生殖細胞にコードされた配列が含まれているであろう。このようなヒト配列免疫グロブリンには、体細胞変異が起きたりV-J及びV-D-J組換えジョイントに差があるために、他の非生殖細胞配列も含まれているかも知れないが、ヒトV<sub>L</sub>又はV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>L</sub>又はJ<sub>L</sub>セグメントにコードされたポリペプチド配列に略、同一であると言うことができる。このようなヒト配列抗体については、各鎖の可変領域は、典型的には、ヒト生殖細胞V、J、そして重鎖の場合にD遺伝子セグメントに、少なくとも80%コードされている。しばしばこの可変領域の少なくとも85%が、導入遺伝子上にあるヒト生殖細胞配列にコードされている。また、この可変領域のうちのしばしば90又は95%又はそれ以上が、導入遺伝子上のヒト生殖細胞配列にコードされている。しかし、

40

50

体細胞変異やVJ及びVDJジョイニングでは非生殖細胞配列が導入されるため、このヒト配列抗体は、マウスの生殖細胞中のヒト導入遺伝子に見られる通りのヒトV、D、又はJ遺伝子セグメントにはコードされていない可変領域配列（及び頻度は低いが定常領域配列）をしばしば有しているであろう。典型的には、このような非生殖細胞配列（又は個々のヌクレオチド位置）はCDR中又はCDR付近に集まっていたり、又は、体細胞変異が起こりやすいことが知られている領域に集まっているであろう。

#### 【0101】

所定の抗原に結合するヒト配列抗体が、アイソタイプ・スイッチングの結果生ずることもあり、その結果、ヒト配列鎖（例えば 1、2a、2B、又は 3）及びヒト配列軽鎖（例えばK）を含むようなヒト抗体が産生されることがある。このようなアイソタイプ・スイッチングが起きたヒト配列抗体は、親和性成熟や、抗原によるB細胞選択、特に二次（又は後続の）抗原刺激によるB細胞選択の結果、しばしば一箇所以上の体細胞変異を、典型的には可変領域に、そしてしばしばCDR内又はCDRのうちの約10残基以内に、含有している。これらの高親和ヒト配列抗体は、少なくとも $1 \times 10^9 M^{-1}$ 、典型的には少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、しばしば $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 、そして時には $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 乃至 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 又はそれ以上の結合親和性を有しているであろう。

10

#### 【0102】

本発明の別の態様は、樹状細胞に高親和性（例えば $2 \times 10^9 M^{-1}$ を越える親和性など）で結合するヒトモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを作製するのに利用できるマウス由来のB細胞に関するものである。このように、本発明の別の実施例では、これらのハイブリドーマを用いて、樹状細胞に対する少なくとも $2 \times 10^9 M^{-1}$ の親和定数（ $K_a$ ）を有する免疫グロブリンを含む組成物を作製し、このとき前記免疫グロブリンは、

20

(1) ヒト $V_L$ 遺伝子セグメント及びヒト $J_L$ セグメントにコードされたポリペプチド配列に略、同一なポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域、及び(2) ヒト $C_L$ 遺伝子セグメントにコードされたポリペプチド配列に略、同一なポリペプチド配列を有する軽鎖定常領域、から成るヒト配列軽鎖と；

(1) ヒト $V_H$ 遺伝子セグメント、選択的にD領域、及びヒト $J_H$ セグメントにコードされたポリペプチド配列に略、同一なポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及びヒト $C_H$ 遺伝子セグメントにコードされたポリペプチド配列に略、同一なポリペプチド配列を有する定常領域、から成るヒト配列重鎖と、

30

を含んで成る。

#### 【0103】

樹状細胞に対する高親和ヒトモノクローナル抗体の開発は、ヒト免疫グロブリン導入遺伝子を組み込んで含むゲノムを有するトランスジェニックマウスのうちで、ヒト可変領域遺伝子セグメントのレパトリーを拡張する方法により、促進されるが、このとき、当該の方法は、前記の組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子には存在しないV領域遺伝子セグメントを含むV遺伝子導入遺伝子をゲノムに導入するステップを含む。しばしば、前記V領域導入遺伝子は、ヒトゲノムで天然で起きたり、組換え法で別々にスプライシングされたりして、V遺伝子セグメントの順序が狂ったり省略されたりすることがあるように、ヒト $V_H$ 又は $V_L$  ( $V_K$ ) 遺伝子セグメントアレイの一部を含む酵母人工染色体である。しばしば少なくとも5個又はそれ以上の機能的V遺伝子セグメントがこのYAC（酵母人工染色体）上に含まれることがある。この違いにより、Vレパトリー拡張法でトランスジェニックマウスを作製することも可能であるが、このとき、このマウスは、V領域導入遺伝子上に存在するV領域遺伝子セグメントにコードされた可変領域配列と、ヒトIg導入遺伝子上にコードされたC領域と、を含む免疫グロブリン鎖を発現することとなる。Vレパトリー拡張法により、少なくとも5個の異なるV遺伝子を有するトランスジェニックマウスや、少なくとも約24個又はそれ以上のV遺伝子を含有するマウスも作製できる。いくつかのV遺伝子セグメントは、非機能的（例えば偽遺伝子である、等々）であってもよく、このようなセグメントは、残しても、又は必要に応じ、当業者に公知の組換え法で選択的に削除してもよい。

40

50

## 【0104】

マウス生殖細胞を操作して、J及びC遺伝子セグメントを含有するヒトIg導入遺伝子には実質的に存在しないような拡張されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACを含有させたら、この形質を伝播させ、他の遺伝的背景に交配してもよい。このような他の遺伝的背景には、拡張されたVセグメントレパートリーを有する機能的YACを、異なるヒトIg導入遺伝子を有するマウス生殖細胞に交配することが含まれる。拡張されたVセグメント・レパートリーを有する複数の機能的YACを、ある一つの(又は複数の)ヒトIg導入遺伝子で働くよう、生殖細胞に交配してもよい。ここではYAC導入遺伝子と言及するが、このような導入遺伝子は、ゲノムに組み込まれたときに、酵母の自律的複製に必要な配列など、酵母配列を実質的に欠いてもよく、このような配列は、選択に応じ、酵母の複製後、必要でなくなった時点で(即ち、マウスES細胞又はマウスプロザイゴート(原語: prozygote)に導入する前に)、遺伝子操作(例えば制限消化、及びパルス-フィールド・ゲル電気泳動又は他の適した方法など)で、取り除いてもよい。ヒト配列免疫グロブリン発現という形質を伝播させる方法には、ヒトIg導入遺伝子と、選択によっては、拡張されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACも有するトランスジェニックマウスを交配させる方法がある。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>遺伝子セグメントの両方がYAC上にあってもよい。トランスジェニックマウスを、ヒトIg導入遺伝子及び/又は他のヒトリンパ球たんぱくをコードする導入遺伝子を含め、他のヒト導入遺伝子を持つバックグラウンドなど、担当医が希望する何らかのバックグラウンドに交配してもよい。さらに本発明は、拡張されたV領域レパートリーYAC導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスが産生する高親和ヒト配列免疫グロブリンも提供する。前述の記載では、本発明のトランスジェニック動物のある好適な実施例を解説したが、以下の4つの種類に分類された他の実施例も、考察するところである:

- I . 未再編成の重鎖及び再編成した軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物;
- II . 未再編成の重鎖及び未再編成の軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物;
- III . 再編成した重鎖及び未再編成の軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物; 及び
- IV . 再編成した重鎖及び再編成した軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物。

## 【0105】

これらの種類のトランスジェニック動物のうち、好適な優先順は以下の通り: III > I > III > IV (ただしこのとき内因性の軽鎖遺伝子(又は少なくともK遺伝子)は、相同組換え(又は他の方法)でノック・アウトしてある)及び I > II > III > IV (このとき内因性軽鎖遺伝子は、ノック・アウトされており、対立遺伝子排除で劣性となつてなくてはならない)である。

## 【0106】

III . 樹状細胞に結合する二重特異的/多重特異的分子  
 本発明のさらに別の実施例では、樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体、又はその抗原結合部分を誘導体化するか、又は別の機能分子、例えば別のペプチド又はタンパク質(例えばFab'フラグメント)に連結して、複数の結合部位又は標的エピトープに結合する二重特異的又は多重特異的分子を作製することができる。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分を、例えば別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド又は結合ミメティックなどのも一種以上の他の結合分子に、(例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合による結合、又は他の結合などで)機能的に連結することができる。

## 【0107】

従って、本発明は、樹状細胞に対する少なくとも一つの第一結合特異的部分と、第二標的エピトープに対する第二結合特異的部分とを含む二重特異的及び多重特異的分子を包含するものである。本発明のある好適な実施例では、前記第二標的エピトープは、例えば腫瘍

10

20

30

40

50

細胞抗原、微生物抗原、ウイルス抗原又は自己抗原など、標的細胞上の抗原である。これらの二重特異的及び多重特異的分子は、標的細胞を樹状細胞の標的に決定することで、このような標的細胞又は標的細胞抗原に対する免疫応答を樹状細胞が調節できるようにする。

【0108】

本発明の別の実施例では、前記第二標的エピトープはFc RI (CD64) 又はヒトFc 受容体 (CD89) などのFc受容体である。従って、本発明は、Fc R、Fc R又はFc R発現エフェクター細胞 (例えば単球、マクロファージ又は多核白血球 (PMN))、と樹状細胞の両方に結合できる二重特異的及び多重特異的分子も包含する。これらの二重特異的及び多重特異的分子は、エフェクター細胞の標的を樹状細胞に決定することで、本発明のヒトモノクローナル抗体同様、例えば樹状細胞のファゴサイトーシス、抗体依存性細胞媒介型細胞傷害性 (ADCC)、サイトカイン放出、又はスーパーオキシドアニオンの生成などのFc受容体媒介性エフェクター細胞活性を惹起できるであろう。

10

【0109】

本発明の二重特異的及び多重特異的分子には、高Fc結合特異的部分又は抗標的細胞抗原や抗樹状細胞結合特異的部分に加え、さらに第三結合特異的部分を含めることもできる。ある実施例では、この第三結合特異的部分は、例えば細胞傷害活性に関与する表面タンパクに結合して標的細胞に対する免疫応答を増加させる分子など、抗エンハンスメント因子 (EF) 部分である。この「抗エンハンスメント因子部分」は、抗原又は受容体などの特定の分子に結合することで、Fc受容体、標的細胞抗原又は樹状細胞に対する結合決定基の作用を高めるような、抗体、機能的抗体フラグメント又はリガンドであってよい。この「抗エンハンスメント因子部分」はFc受容体、標的細胞抗原又は樹状細胞に結合するものでもよい。あるいは、抗エンハンスメント因子部分は、第一及び第二結合特異的部分が結合する先の物質とは異なる物質に結合してもよい。例えば、抗エンハンスメント因子部分は、標的細胞に対する免疫応答増加につながるような (CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1) を介して) 細胞傷害性T細胞又は他の免疫細胞に結合してもよい。

20

【0110】

一実施例では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又は一本鎖Fvなどを含め、少なくとも一つの抗体又はその抗体フラグメントを結合特異的部分として含んで成る。当該抗体はさらに、(言及をもってその内容をここに編入することを明示しておく) ラドナーらの1990年8月7日発行の米国特許第4,946,778号に解説されたFv又は一本鎖コンストラクトなど、軽鎖又は重鎖二量体、又は何らかのその最小フラグメントであってよい。

30

【0111】

ある実施例では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えば腫瘍細胞抗原、微生物抗原、ウイルス抗原又は自己抗原など、標的細胞上の抗原に対する結合特異的部分と、樹状細胞に対する第二結合特異的部分とを含んで成る。

【0112】

別の実施例では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、エフェクター細胞の表面上にあるFc R又はFc Rに対する結合特異的部分と、樹状細胞に対する第二結合特異的部分とを含んで成る。

40

【0113】

ある一つの実施例では、Fc受容体に対する結合特異的部分を、その結合がヒト免疫グロブリンG (IgG) の遮断を受けないヒトモノクローナル抗体で提供する。ここで用いる用語「IgG受容体」とは、1番染色体上にある8個の鎖遺伝子のいずれかを言う。これらの遺伝子は、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、及びFc RIII (CD16) という三種類のFc受容体に分類される合計12種の膜貫通又は可溶性受容体アイソホームをコードしている。ある好適な実施例では、当該Fc受容体はヒト高親和性Fc RIである。このヒトFc RIは72kDaの分子であり、単量体IgGに高い親和性 ( $10^8 - 10^9 M^{-1}$ ) を呈する。

【0114】

50

これらの好適なモノクローナル抗体の生成及び特徴付けは、ファンガーらのPCT 出願WO 88/00052 及び米国特許第4,954,617号(これらの教示全体を言及をもってここに編入する)に解説されている。これらの抗体は、Fc RI、Fc RII又はFc RIIIに、その受容体のFc 結合部位とは異なる部位にあるエピトープで結合するため、生理レベルのIgGの遮断を実質的に受けない。本発明で有用な具体的な抗Fc RI抗体は、mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62及びmAb 197である。mAb32を産生するハイブリドーマはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションATCCから受託番号No. HB9469で入手できる。抗Fc RI mAb 22、mAb22のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントはメダレックス社(ニュージャージー州アナンデール)から得ることができる。他の実施例では、抗Fc 受容体抗体はヒト化型のモノクローナル抗体22 (H22)である。H22抗体の生成及び特徴付けは、Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 及びPCT/US93/10384に解説されている。H22 抗体産生細胞系はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1992年11月4日に指定番号HA022CL1で寄託されており、受託番号CRL 11177を受けている。

#### 【0115】

さらに別の好適な実施例では、Fc受容体に対する結合特異的部分を、その結合は免疫グロブリンA (IgA)の遮断を受けないことが好ましい、例えばFcアルファ受容体(Fc RI (CD89))などのヒトIgA受容体に結合する抗体に提供させる。用語「IgA」には、19番染色体上にある一個の遺伝子(Fc RI)の遺伝子産物が含まれるものと、意図されている。この遺伝子は、55乃至110kDaの、選択的スプライシングが起きる複数の膜貫通型アイソホームをコードしていることが知られている。Fc RI (CD89)は単球/マクロファージ、好酸性及び好中性顆粒球上に構成的に発現するが、非エフェクター細胞集団には発現しない。Fc RIは中程度の親和性(ほぼ $5 \times 10^7 M^{-1}$ )を両IgA1及びIgA2に対して有するが、この親和性は、G-CSF又はGM-CSFなどのサイトカインに暴露したときに上昇する(Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。A3、A59、A62及びA77と同定された四種類のFc RI特異的モノクローナル抗体が、Fc RIにIgAリガンド結合ドメイン以外の箇所では結合するが、その解説がMonteiro, R.C. et al., 1992, J. Immunol. 148:1764になされている。

#### 【0116】

Fc RI及びFc RIIは本発明で用いるのに好適なトリガー受容体である。なぜならこれらは(1)主に、単球、PMN、マクロファージ及び樹状細胞などの免疫エフェクター細胞上で発現し；(2)高レベル(例えば細胞一個当たり5,000-100,000)で発現し；(3)細胞傷害性活性(例えばADCC、ファゴサイトーシスなど)の媒介因子であり；(4)自己抗原を含め、それらが標的とする抗原の抗原提示促進を媒介する、からである。

#### 【0117】

他の実施例では、さらに本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、樹状細胞上の抗原など、樹状細胞を、結合などにより認識する結合特異的部分を含んで成る。ある好適な実施例では、当該結合特異的部分を、本発明のヒトモノクローナル抗体に提供させる。

#### 【0118】

ここで用いる「エフェクター細胞特異抗体」とは、エフェクター細胞のFc受容体に結合する抗体又は機能的抗体フラグメントを言う。本発明で用いるのに好適な抗体は、エフェクター細胞のFc受容体に、内因性免疫グロブリンが結合しない箇所では結合するものである。

#### 【0119】

ここで用いる用語「エフェクター細胞」とは、免疫応答の認識段階及び活性化段階ではなく、免疫応答のエフェクター段階に参与する免疫細胞を言う。免疫細胞の例には、骨髄系又はリンパ球などのリンパ系由来の細胞(例えばB細胞及び細胞溶解性T細胞(CTL)を含むT細胞など)、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多核白血球、顆粒球、マスト細胞、及び好塩基球、がある。いくつかのエフェクター細胞は、特異的Fc受容体を発現して、特異的免疫機能を行う。好適な実施例では、エフェクター細胞は、例えば抗体依存的細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)を誘導できる好中球など、ADCCを誘導できるものである。例えば、FcRを発現する単球、マクロファージは

、標的細胞の特異的致死や、免疫系の他の成分に対する抗原提示、又は抗原を提示した細胞への結合に関与している。他の実施例では、エフェクター細胞は、標的抗原、標的細胞又は微生物を貪食することができるものである。エフェクター細胞上の特定のFcRの発現は、サイトカインなどの体液性因子で調節されることがある。例えば、Fc RIの発現は、インターフェロンガンマ（IFN- $\gamma$ ）で上方調節されることが判明している。このように発現が高められると、標的に対するFc RI担持細胞の細胞傷害活性が増す。エフェクター細胞は標的抗原又は標的細胞を貪食又は溶解させることができる。

#### 【0120】

「標的細胞」とは、本発明の組成物（例えばヒトモノクローナル抗体、二重特異的又は多重特異的分子など）の標的とすることのできる、被験体（ヒト又は動物など）内の何らかの好ましくない細胞を意味する。ある実施例では、当該標的細胞は樹状細胞である。別の実施例では、標的細胞には、腫瘍細胞、微生物病原体、ウイルス、又はウイルス感染細胞が含まれる。

10

#### 【0121】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異的又は多重特異的分子に利用できる他の抗体は、マウス、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体である。

#### 【0122】

キメラマウス - ヒトモノクローナル抗体（即ちキメラ抗体）は、当業で公知の組換えDNA技術により作製できる。例えば、マウス（又は他の種の）モノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子を制限酵素で消化して、マウスFcをコードする領域を取り除き、ヒトFc定常領域をコードする遺伝子の同等の部分に置換する。（例えばロビンソンらの国際特許公報PCT/US86/02269；アキラらのヨーロッパ特許出願184,187号；タニグチ M.らのヨーロッパ特許出願171,496号；モリソンらのヨーロッパ特許出願173,494号；ノイベルガーらの国際出願WO 86/01533；キャビリーらの米国特許第4,816,567号；キャビリーらのヨーロッパ特許出願125,023号；Better et al. (1988 Science 240:1041-1043)；Liu et al. (1987) PNAS 84:3439-3443；Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526；Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218；Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005；Wood et al. (1985) Nature 314:446-449；及びShaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559を参照されたい）。

20

#### 【0123】

キメラ抗体はさらに、Fv可変領域のうちで抗原結合に直接関与しない配列を、ヒトFv可変領域由来の同等の配列に置換することでも、ヒト化することができる。ヒト化キメラ抗体の総括的レビューはMorrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207 及びOi et al., 1986, BioTechniques 4:214に記載がある。これらの方法には、重鎖又は軽鎖の少なくとも一方の免疫グロブリンFv可変領域の全部又は一部をコードする核酸配列を分離、操作及び発現させることが含まれる。このような核酸の供給源は当業者に公知であり、例えば抗GP II<sub>b</sub>III<sub>a</sub>抗体産生ハイブリドーマである7E3から得てもよい。次に、このキメラ抗体又はそのフラグメントをコードする組換えDNAを、適当な発現ベクタ内にクローンしてよい。あるいは、適したヒト化抗体は、CDR置換法、米国特許第5,225,539号；Jones et al. 1986 Nature 321:552-525；Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534；及びBeidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060で作製することもできる。

30

40

#### 【0124】

ある特定のヒト抗体のCDRの全てを、非ヒトCDRの少なくとも一部分に置換したり、又は、CDRのうちの一つかだけを、非ヒトCDRに置換してもよい。必要なのは、ヒト化抗体をFc受容体へ結合させるのに必要な数のCDRを置換するだけである。

#### 【0125】

ヒト抗体のCDRの少なくとも一部分を、非ヒト抗体を由来とするCDRに置換できれば、いかなる方法でも、抗体をヒト化することができる。ウィンター氏は本発明のヒト化抗体を調製するのに利用できそうな方法を解説している（言及をもってその内容をここに編入することを明示しておく、1987年3月26日出願の英国特許出願GB 2188638A）。ヒトCDR

50

は、非ヒトCDRに、オリゴヌクレオチド部位指定変異誘発法を利用して、国際出願WO 94/10332 題名: Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytesが解説するとおりに置換してもよい。

【0126】

さらに、特定のアミノ酸を置換、欠失又は追加したようなキメラ及びヒト化抗体も、本発明の範囲内にある。具体的には、好適なヒト化抗体は、アミノ酸置換をフレームワーク領域に有することで、抗原への結合を高めるなどを狙ったものである。例えば、マウスCDRを有するヒト化抗体では、ヒトフレームワーク領域にあるアミノ酸を、マウス抗体の相当する位置にあるアミノ酸に置換することができる。このような置換により、場合によっては、抗原に対するヒト化抗体の結合が高まることが知られている。アミノ酸を追加、欠失、又は置換してある抗体をここでは、改変された抗体又は変更された抗体と言及する。

10

【0127】

改変された抗体という用語には、さらに、例えばモノクローナル抗体、キメラ抗体、及びヒト化抗体など、抗体のうちの数部分を欠失、追加又は置換することで改変された抗体が含まれるものと、意図されている。例えば、定常領域を欠失させて、抗体の血清半減期などの半減期、安定性又は親和性を高めるはずの定常領域と置換する改変を、抗体に行うことができる。いかなる改変も、その二重特異的及び多重特異的分子が、Fc Rに特異的な少なくとも一つの抗原結合領域を有し、かつ、少なくとも一つのエフェクター機能を惹起するものであれば、本発明の範囲内にある。

【0128】

本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、化学的技術(例えばD. M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807)、「ポリオーマ」技術(レディングの米国特許第4,474,893号を参照されたい)、又は組換えDNA技術を用いて、作製できる。

20

【0129】

具体的には、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、構成する結合特異的部分、例えば抗FcR及び抗樹状細胞結合特異的部分など、を当業で公知の、ここに開示した実施例に解説した方法を用いて共役させることで、調製できる。例えば、当該二重特異的及び多重特異的分子の各結合特異的部分を別々に作製してから、後に相互に共役してもよい。当該結合特異的部分がタンパク質又はペプチドである場合、多種のカップリング又は架橋剤を共有結合的な共役に利用できる。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、及びスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)(例えばKarpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照されたい)。他の方法には、ポーラスの説いた方法(Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229:81-83)、及びGlennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375)がある。好適な共役剤は、両者ともピアース・ケミカル社(イリノイ州ロックフォード)から入手可能なSATA及びスルホ-SMCCである。

30

【0130】

結合特異的部分が複数の抗体(例えば二つのヒト化抗体など)である場合、これらは、二本の重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して共役させることができる。特に好適な実施例では、このヒンジ領域に奇数、好ましくは一つ、のスルフヒドリル残基を含有させる修飾を、共役前に行う。

40

【0131】

あるいは、両方の結合特異的部分を同じベクターにコードさせ、同じ宿主細胞で発現及び集合させることもできる。この方法は、当該二重特異的及び多重特異的分子が mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')<sub>2</sub>又はリガンドx Fab融合たんぱくである場合に、特に便利である。本発明の二重特異的及び多重特異的分子、例えば二重特異的分子、は、一本鎖分子でもよく、例えば一本鎖二重特異的抗体や、一本鎖抗体及び結合決定基を含んで成る一

50

本鎖二重特異的分子や、又は、二つの結合決定基を含んで成る一本鎖二重特異的分子であってもよい。さらに二重特異的及び多重特異的分子は一本鎖分子でもよく、又は、少なくとも二つの一本鎖分子を含んで成るものでもよい。二重特異的及び多重特異的分子を調製する方法は、例えば米国特許第5,260,203号；米国特許第5,455,030号；米国特許第4,881,175号；米国特許第5,132,405号；米国特許第5,091,513号；米国特許第5,476,786号；米国特許第5,013,653号；米国特許第5,258,498号；及び米国特許第5,482,858号に解説されている。

#### 【0132】

本二重特異的及び多重特異的分子の、それらの特異的標的への結合は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACS解析、バイオ検定(例えば成長抑制)、又はウェスタン・ブロット検定法で確認できる。これらの検定法のそれぞれは、一般に、関心の対象であるタンパク質-抗体複合体の存在を、目的の複合体に特異的な標識付試薬(例えば抗体)を利用して検出するものである。例えば、前記FcR-抗体複合体は、例えば抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する酵素結合抗体又は抗体フラグメントなどを利用して、検出できる。あるいは、複合体は多種の他の免疫検定法のいずれかを利用して、検出できる。例えば、抗体を放射性標識し、ラジオイムノアッセイ(RIA)で用いることもできる(例えば言及をもってここに編入することとするWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい)。この放射性同位体を、  
カウンター又はシンチレーションカウンターを利用したり、又はオートラジオグラフィなどの手段で、検出することができる。

#### 【0133】

##### IV. 抗体共役体ノイムノトキシン

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物又は放射性同位体などの治療的部分に共役させたヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体又はそのフラグメントを特徴とする。細胞毒に共役してあるようなこれらの抗体共役体は「イムノトキシン」と呼ばれる。細胞毒又は細胞傷害性薬剤の例には、細胞にとって(例えば殺すなど)有害なあらゆる物質が含まれる。例には、タキソール、シトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びプロマイシン及びこれらの類似体又は同族体がある。治療的作用物質には、限定はしないが、代謝拮抗物質(例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシル、デカルバジン)、アルキル化剤(例えばメクロレトアミン(原語mechlorethamine)チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ミトマイシンC、及びcis-ジクロロジアミンプラチナム(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(前のダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC))、及び抗有糸分裂剤(例えばピンクリスチン及びピンブラスチン)がある。本発明の抗体を、放射性ヨウ素などの放射性同位体に共役させて、自己免疫又は炎症性疾患や移植片対宿主疾患などの樹状細胞関連疾患を治療する細胞傷害性放射性医薬品を作製することもできる。

#### 【0134】

本発明の抗体共役体は、所定の生物学的応答を改変するのに利用できるが、その薬物成分は、古典的な化学的治療薬に制限されるものと、捉えられてはならない。例えば、本薬物成分は所望の生物学的活性を持つタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えば、酵素活性のある毒素、又はその活性フラグメント、例えばアブリン、リシンA、シュードモナスエキソトキシン、又はジフテリア毒素；腫瘍壊死因子

10

20

30

40

50

又はインターフェロン - などのタンパク質；又は、例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、又は他の成長因子などの生物学的応答修飾因子、が含まれよう。

【0135】

このような治療的成分を抗体に共役させる技術は当業で公知であり、例えばArnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 及び Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。

10

【0136】

別の態様では、樹状細胞に特異的なヒト抗体は、例えば腫瘍細胞、エフェクター細胞又は微生物病原体などの標的細胞を、樹状細胞に直接狙わせるのに利用できる。抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば本発明のヒト樹状細胞特異抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸配列を含有するベクターで細胞をトランスフェクト又は形質導入するなどにより、細胞表面上に直接発現させることができる。これは、例えば、膜貫通ドメインとヒト抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントとを含有する融合タンパク質をコードする核酸で、標的細胞をトランスフェクトすれば、可能である。このような核酸、融合タンパク質、及びこのような融合タンパク質を発現する細胞の作製法は、例えば米国特許第09/203,958号（その内容全文を、この言及をもってここに編入することとする）に解説されている。あるいは、抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントを、細胞又は病原体に、化学的リンカー、脂質タグ、又は他の関連法を利用して、結合させることもできる (deKruif, J. et al. (2000) Nat. Med. 6:223-227; Nizard, P. et al. (1998) FEBS Lett. 433:83-88)。表面に抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントが繋ぎ止められた細胞を用いると、腫瘍細胞又は微生物病原体など、その細胞に対する特異的免疫応答を誘導できよう。

20

30

【0137】

V. 薬学的組成物

別の態様では、本発明は、一種又は組合せになった本発明のヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を、薬学的に許容可能な担体と一緒に調剤された形で含有する薬学的組成物などの治療用組成物を提供するものである。このような組成物には、さらに、例えば他の抗体、細胞毒又は薬物（免疫抑制剤など）などの他の治療用試薬を含めることができ、単独で投与しても、又は、放射線などの他の治療法と併用してもよい。

40

【0138】

ある実施例では、二種以上のヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体を含んで成る、補完的活性を有するヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体を、医薬組成物などとして組み合わせる。例えば、エフェクター細胞の存在下で樹状細胞の高度に効果的な致死を媒介するヒトモノクローナル抗体を、樹状細胞の成長を抑制する別のヒトモノクローナル抗体と組み合わせることができる。別の実施例では、樹状細胞の内部に素早く移行するヒトモノクローナル抗体を、例えば免疫刺激性サイトカインの放出など、樹状細胞の抗原提示細胞活性を誘導する別のヒトモノクローナル抗体と、組み合わせることもできる。

【0139】

50

別の実施例では、本組成物は、（例えばFc受容体に対する少なくとも一つの結合特異的部分と、樹状細胞に対する少なくとも一つの結合特異的部分とを含有するなどの）本発明の二重特異的又は多重特異的分子を、一種又は組み合わせて含む。

【0140】

さらに別の実施例では、本組成物は、樹状細胞に対する少なくとも一つの結合特異的部分を、別の分子、例えば細胞毒、又は標的細胞上の抗原などの抗原、に機能的に連結させて含む。

【0141】

ここで用いる「薬学的に許容可能な担体」には、生理学的に適合性ある、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤、等々が包含される。好ましくは、当該担体は、（注射又は輸注などによる）静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は表皮投与に適しているとよい。投与経路によっては、有効化合物、即ち抗体、二重特異的及び多重特異的分子、を、当該化合物を失活させそうな酸又は他の天然条件の作用から当該化合物を保護する物質で被膜してもよい。

10

【0142】

「薬学的に許容可能な塩」とは、親化合物の所望の生物学的活性が残っており、望ましくない毒性作用を与えないような塩を言う（例えば Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい）。このような塩の例には、酸添加塩及び塩基添加塩がある。酸添加塩には、無毒性の無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン、等々から誘導されるものや、脂肪族モノカルボン酸及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、水酸化アルカン酸、芳香族の酸、脂肪族及び芳香族のスルホン酸、等々の非毒性の無機酸から誘導されるものがある。塩基添加塩には、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等々のアルカリ土類金属から誘導されるものや、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン、等々の非毒性の有機アミンから誘導されるものがある。

20

【0143】

本発明の組成物は、当業で公知の多種の方法で投与することができる。当業者であれば理解されるであろうが、投与の経路及び/又は形態は、所望の結果に応じて様々であろう。有効化合物は、インプラント、経皮用パッチ、及びマイクロ封入送達系を含め、制御放出製剤など、有効化合物が急速に放出されないように保護する担体と一緒に調製することができる。酢酸ビニルエチレン、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸など、生分解性、生体適合性のポリマーを利用できる。このような製剤を調製する数多くの方法に特許が認められているか、又は、当業者に公知である。例えば Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

30

【0144】

特定の投与経路で本発明の化合物を投与する場合、当該化合物を、その失活を防ぐような物質で被膜するか、又は当該化合物をそのような物質と同時に投与することが必要かも知れない。例えば、当該化合物をリポソーム又は希釈剤などの適した担体に入れて、被験体に投与してもよい。薬学的に許容可能な希釈剤には、生理食塩水及び緩衝水溶液がある。リポソームには、水中油中水CGFエマルジョンや、従来のリポソームがある (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

40

【0145】

薬学的に許容可能な担体には、無菌の水溶液又は分散液や、無菌の注射用溶液又は分散液の即時調製用の無菌粉末がある。薬学的に活性な物質のためのこのような媒質及び作用薬の利用は当業者に公知である。従来の媒質又は作用薬が当該有効化合物にとって不適合でない限り、本発明の医薬組成物中へのその利用は考察されたところである。補助的な有効化合物も、当該組成物中に組み込んでよい。

【0146】

50

治療用組成物は、典型的には、製造及び保管条件下で無菌かつ安定でなければならない。当該組成物は、高い薬物濃度に適した溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は他の秩序ある構造として調製することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール、等々）及びこれらの適した混合物などを含有する溶媒又は分散媒であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを利用したり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を利用するなどして、維持できる。多くの場合、糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましいであろう。注射用組成物の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸塩及びゼラチンなど、吸収を遅らせる作用薬を組成物中に含めるとよい。

10

**【 0 1 4 7 】**

無菌の注射用溶液は、必要量の有効化合物を、必要に応じて上に列挙した成分のうちの一つ又は組合せと一緒に適した溶媒に組み込んだ後、滅菌マイクロ濾過を行うことで、調製できる。一般に、分散液は、塩基性の分散媒と上に列挙したうちの必要な他の成分を含有する無菌の賦形剤に、有効化合物を取り入れて調製されている。無菌の注射用溶液の調製の無菌粉末の場合、好適な調製法は、有効成分と、予め無菌濾過されたその溶液から出た付加的な所望の成分との粉末が生ずる真空乾燥及び凍結乾燥（凍結乾燥）である。投薬計画は、最適な所望の応答（例えば治療上の応答）が得られるよう、調節する。例えば、一回の大量投与を行ってもよいが、複数回に分けた用量を時間をかけて投与してもよく、又は、用量を、治療状況の緊急度が示す通りに比例的に増減させてもよい。非経口用組成物を単位剤形で調合すると、投与が容易となり、また投薬量が均一となって特に便利である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする被験体に特に単位投薬量として合わせた物理的に個別の単位を言う。このとき各単位は、必要な薬学的担体と関連して所望の治療的効果を得よう計算された所定量の有効化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、（ a ）当該有効化合物の固有の性質、及び、達成しようとする特定の治療効果、及び（ b ）このような有効化合物を個人の感受性処置のために調合する当業に内在する限界、の支配を受け、また直接依存する。

20

**【 0 1 4 8 】**

薬学的に許容可能な抗酸化剤の例には、：（ 1 ）アスコルビン酸、塩酸システイン、二硫化ナトリウム、重二硫化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、等々の水溶性抗酸化剤、（ 2 ）アスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール（ B H A ）、ブチルヒドロキシトルエン（ B H T ）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ - トコフェロール、等々の油性抗酸化剤、及び、（ 3 ）例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ E D T A ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸、等々といった金属キレート剤、がある。

30

**【 0 1 4 9 】**

治療用組成物の場合、本発明の調剤には、経口、鼻孔、局所（バツカル及び舌下剤を含む）、直腸、膣及びノ又は非経口投与に適したものが含まれる。調剤は便利なように単位剤形で提供してもよく、製薬業で公知のいずれの方法で調製してもよい。一回分の用量型を作製するのに担体材料と組み合わせることのできる有効成分の量は、治療しようとする被験体、及び特定の投与形態に応じて様々であろう。一回分の用量型を作製するのに担体材料と組み合わせることのできる有効成分の量は、一般的には、治療効果を生じる組成物量となるであろう。概して、100パーセントのうち、この量は有効成分で約0.01パーセントから約99パーセント、好ましくは約0.1パーセントから約70パーセント、最も好ましくは約1パーセントから約30パーセントの範囲になるであろう。

40

**【 0 1 5 0 】**

膣投与に適した本発明の調剤には、に当業で適していることが公知である担体をさらに含有するペッサリ、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、又はスプレー調剤がある。本発明の組成物の局所又は経皮投与に向けた投薬形には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、及び吸入剤が含まれる。有効化合物は無菌条件下で薬学的に許容可能な担体に混合してもよく、そして、必要であれば何

50

らかの保存剤、緩衝剤、及び推進薬に混合してもよい。

【0151】

ここで用いられる「非経口投与」及び「非経口的に投与する」という文言は、多くの場合注射による、腸内及び局所投与以外の投与形態を意味し、限定的な意味はないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外及び胸骨内注射及び輸注が含まれる。

【0152】

本発明の医薬組成物中に用いてよい適した水性及び非水性の担体の例には、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、等々）、及びこれらの適した混合物、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルがある。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料を利用したり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、界面活性剤を用いるなどして維持することができる。

10

【0153】

これらの組成物には、さらに、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などのアジュバントを含めてもよい。微生物の存在を防止するには、上記の滅菌法と、多様な抗菌剤、及び抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸、等々などを含めることの両方を行うと確実にできよう。さらに、糖類、塩化ナトリウム、等々の等張剤を組成物中に含めるのも好ましいかも知れない。加えて、注射可能な薬剤形の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど、吸収を送らせる作用薬を含めれば可能である。

20

【0154】

本発明の化合物を、ヒト及び動物に医薬として投与する場合、それらを、単独で与えても、又は、薬学的に許容可能な担体と組み合わせて0.01から99.5%（より好ましくは0.1から90%）の有効成分を含有する医薬組成物として与えてもよい。

【0155】

選択した投与経路に関係なく、適した水和化形で用いてもよい本発明の化合物、及び/又は、本発明の医薬組成物は、当業者に公知の従来の方法によって薬学的に許容可能な剤形に調合する。

【0156】

本発明の医薬組成物中の有効成分の実際の投薬量は、患者にとって毒性となることなく、特定の患者、組成物、及び投与形態にとって所望の治療的応答を得るのに効果的である有効成分量が得られるように、変更してもよい。選択される投薬量は、用いる本発明の特定の組成物又はそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いる特定の化合物の排出速度、治療期間、用いる特定の化合物と組み合わせて用いるその他の薬物、化合物及び/又は材料、治療しようとする患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康及び医療歴、及び、医薬で公知の同様のファクターを含め、様々な薬物動態学的ファクターに依存するであろう。

30

【0157】

当業で通常の技術を有する医師又は獣医であれば、必要な医薬組成物の効果的な量を容易に決定でき、処方することができる。例えば、この医師又は獣医は、医薬組成物中で用いる本発明の化合物の量を、所望の治療効果を得るには少ない量から開始し、所望の効果を得られるまでこの投薬量を次第に増加させていってもよいであろう。一般的には、本発明の組成物の適した一日当たりの用量は、治療効果を生じるには最も少ない量である当該化合物量となるであろう。このような有効量は、一般的には、上述したようなファクターに依存することであろう。投与は静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下的に行われるのが好ましく、好ましくは標的部位に近位で行われるとよい。必要に応じて、効果的な一日当たりの用量の治療用組成物を、一日かけて、選択に応じて単位剤形で、適当な間隔で2回、3回、4回、5回、6回又はそれ以上の小用量に、別々に分割して投与してもよい。本発明の化合物を単独で投与することも可能であるが、当該化合物を薬剤調剤（組成物）として

40

50

投与することが好ましい。

【0158】

治療用組成物を、当業で公知の医療器具で投与してもよい。例えば、ある好適な実施例では、本発明の治療用組成物を、例えば米国特許第5,399,163号;第5,383,851号;第5,312,335号;第5,064,413号;第4,941,880号;第4,790,824号;又は第4,596,556号に解説された器具など、針のない皮下注射器具で投与することができる。本発明で有用な公知のインプラント及びモジュールの例には、制御された速度で投薬するインプラント可能なマイクロ輸注ポンプを開示する米国特許第4,487,603号;皮膚を通じて薬剤を投与する治療用器具を開示する米国特許第4,486,194号;高精度な輸注速度で医薬を送達する薬剤輸注ポンプを開示する米国特許第4,447,233号;継続的な薬物送達用のインプラント可能な可変流量式輸注装置を開示する米国特許第4,447,224号;複数のチャンパー区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号;及び浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号、がある。これらの特許を、言及をもってここに編入することとする。このようなインプラント、送達システム、及びモジュールは他にも数多く、当業者に公知である。

10

【0159】

実施例によっては、本発明のヒトモノクローナル抗体を、インビボで確実に適切に分散するように調合してもよい。例えば、血液脳関門(BBB)は数多くの親水性の高い化合物を排除する。本発明の治療用化合物が、(必要であれば)BBBを確実に通過できるようにするには、これらを例えばリポソーム中に調合することができる。リポソームの製造法については、例えば米国特許第4,522,811号;第5,374,548号;及び第5,399,331号を参照されたい。このリポソームには、特定の細胞又は臓器に選択的に輸送されて、目的の薬物送達を高めるような一種以上の成分を含めてもよい(例えばV.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい)。標的決定成分の例には、葉酸又はビオチン(例えばロウらの米国特許第5,416,016号を参照されたい);マンノシド(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038);抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180);サーファクタントプロテインA受容体(Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)、本発明の調剤や、本発明の分子の成分を含められそうな様々な種;p120(Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)があるが、さらにK. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい。本発明の実施例の一つでは、本発明の治療用化合物を、リポソーム中に調剤する。より好適な実施例では、前記リポソームが、標的決定成分を含む。最も好適な実施例では、前記リポソーム中の本治療用化合物を、腫瘍又は感染部位近位に大量注射して送達する。本組成物は、注射筒による注入が容易な程度に流動的でなくてはならない。また、製造及び保管条件下で安定でなくてはならず、細菌及びカビなどの微生物の混入作用から守られていなければならない。

20

30

【0160】

「治療上有効な投薬量」は、樹状細胞の成長及び/又は活性を、未処置の被験体に比較して、少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも約80%、調節することが好ましい。化合物が、樹状細胞の成長及び/又は活性を調節する能力は、抗原提示及び/又は免疫調節での効験を予測する動物モデル系で評価することができる。あるいは、ある組成物のこのような性質は、ここに解説した、かつ当業の開業医に公知の検定法でインビトロなどで、樹状細胞による免疫細胞刺激を当該化合物が調節する能力を調べても、評価できる。ある実施例では、治療用化合物の治療上有効量とは、被験体において、樹状細胞の成長及び/又は活性を抑制できるか、又は、自己免疫の症状などの症状を改善できるものである。別の実施例では、治療用化合物の治療上有効量とは、樹状細胞による抗原プロセッシング及び提示を高め、ひいては、免疫原又は標的抗原に対する免疫応答を高めることができるものである。当業者であれば、このような量を、被験体の体格、症状の重篤度

40

50

、被験体の免疫活性、及び選択した特定の組成物又は投与経路といった因子に応じて、決定できることであろう。

【0161】

本組成物は無菌でなければならず、本組成物を注射筒で送達できる程度に流動的でなければならない。担体は、水に加え、等張の緩衝生理食塩水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール、等々）、及びこれらの適した混合液であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を利用するなどにより、維持できる。多くの場合、例えば糖類、マンニトール又はソルビトールなどの多価アルコール、及び塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に加えることが好ましい。注射用組成物の吸収を長期に渡らせるには、例えばモノステアリン酸アルミニウム又はゼラチンなど、吸収を遅らせる作用薬を組成物中に含めると、可能である。

10

【0162】

有効化合物が上に記載したとおりに適宜保護されていれば、当該化合物を例えば不活性の希釈剤又は同化可能な食用担体などと一緒に、経口投与してもよい。

【0163】

VI. 発明の用途及び方法

本発明の組成物（例えば、樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体及びその誘導体/共役体）は、インビトロ及びインビボで診断上及び治療上の実用性を有する。

【0164】

例えば、種々の疾患を治療、予防又は診断する目的で、これらの分子を、例えばインビトロ又はエクスピボで培養細胞に投与したり、又は、例えばインビボなどで被験体に投与することができる。ここで用いる用語「被験体」には、ヒト及び非ヒト動物が含まれるものと、意図されている。本発明の「非ヒト動物」という用語は、例えばヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類、等々、ほ乳類及び非ほ乳類などのあらゆる脊椎動物を包含するものである。

20

【0165】

ある具体的な実施例では、種々の樹状細胞媒介性又は樹状細胞関連疾患を治療、予防又は診断するために、本ヒト抗体及びその誘導体をインビボで用いる。

【0166】

ある一実施例では、好適なヒト動物には、樹状細胞が媒介する又は樹状細胞が関連する疾患を有するヒトの患者が含まれる。例えば、本発明の方法及び組成物を、例えば樹状細胞による免疫調節に関係した異常な又は不要な免疫活性を特徴とする疾患など、自己免疫、免疫系又は炎症性疾患の患者を治療するのに利用できる。本発明のヒト抗樹状細胞を用いた治療が有効であろう自己免疫、免疫系及び炎症性疾患には、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、糖尿病、重症筋無力症、悪性貧血、アジソン病、紅斑性狼瘡、ライター症候群、及びグレーブズ病、がある。例えば、自己免疫疾患患者には、樹状細胞が媒介する自己抗原提示を抑制するのが有効であろう。

30

【0167】

本発明のヒト抗樹状細胞抗体を用いて治療できる疾患の他の例には、移植片拒絶及び移植片体宿主疾患がある。

40

【0168】

移植片拒絶

近年、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、肺、膵臓及び骨髄などの組織及び臓器を移植する外科的技術の効果が大きく進歩した。おそらく現在ある問題の大きなものは、移植された同種移植片又は臓器に対するレシピエントの免疫寛容を誘導するのに満足のいく薬剤がないことであろう。同種細胞又は臓器をホスト（即ち提供者及び受容者が、同じ種の異なる個体である）に移植するとき、ホストの免疫系が移植片中の外来抗原に対して免疫応答（宿主対移植片疾患）してしまい、移植組織の破壊が起きる可能性が高い。CD8+細胞、CD4+細胞及び単球のすべてが、この移植組織拒絶に関与している。本発明の治療用薬剤は、受容者

50

において樹状細胞により媒介される、同種抗原が誘導する免疫応答を抑制し、ひいてはこのような細胞を、移植組織又は臓器の破壊に参加させなくするのに有用である。

【0169】

移植片対宿主疾患

本発明の治療用薬剤の関連する用途の一つは、「移植片対宿主」疾患（GVHD）に関する免疫応答の調節においてである。GVHDは、致命的になる可能性のある疾患であり、免疫適格細胞を、同種のレシピエントに移植したときに起きる。この場合、ドナーの免疫適格細胞はレシピエントの組織を攻撃しているのであろう。GVHDの過程においては皮膚、腸管上皮及び肝臓の組織がしばしば標的となり、破壊されることがある。この疾患は骨髄移植など、免疫組織を移植する場合に特に重篤な問題となるが、心臓及び乾燥移植を含め、他の場合にはそれほど重篤なGVHDが報告されたことはない。本発明の治療用薬剤は、樹状細胞などの宿主抗原提示細胞の活性を抑制するのに用いられる。

10

【0170】

別の実施例では、本発明の方法及び組成物を用いて、被験体の抗原に対する免疫応答を調節することができる。本発明のヒト抗樹状細胞抗体を用いると、抗原を樹状細胞に狙わせ、ひいては、抗原に対する免疫応答が誘導されるよう、抗原提示及びプロセッシングを調節することができる。この抗原は、腫瘍抗原でも、又は微生物病原体などの病原体由来の抗原でもよい。前記病原体はウイルス（例えばHIV）、細菌、真菌、又は寄生物であってもよい。さらに当該抗原は、アルツハイマー病患者などの患者のアミロイド沈着物の成分であってもよく、抗原がA ペプチドであるなどでもよい。

20

【0171】

例えば、樹状細胞の表面上の一成分に対する少なくとも一つの結合特異的部分を、ある抗原に連結して含むような分子複合体であって、この複合体が樹状細胞に結合すると、この分子複合体の内部移行が媒介されるような分子複合体、を被験体に投与すれば、この抗原に対する免疫応答を誘導又は向上させることができる。抗原に対して生ずるこの免疫応答には、当該抗原に結合する抗体と、MHC-I又はMHC-II複合体の一成分として当該抗原に結合するT細胞とが含まれる。従って、本発明のヒト抗樹状細胞抗体を利用して、樹状細胞により標的決定される被験体免疫化を媒介させることもできる。例えば、樹状細胞の表面上の一成分に対する少なくとも一つの結合特異的部分を、ある抗原に連結して含むような分子複合体であって、この複合体が樹状細胞に結合すると、この分子複合体の内部移行が媒介されて、この抗原のプロセッシング及び提示が促進されるような分子複合体、で、被験体を免疫化することができる。

30

【0172】

別の態様では、樹状細胞に特異的なヒト抗体を、腫瘍細胞、エフェクター細胞又は微生物病原体などの細胞全体を、樹状細胞に直接狙わせるのに利用することができる。抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば本発明のヒト樹状細胞特異抗体をコードする核酸配列を含有するベクターで、細胞をトランスフェクト又は形質導入するなどにより、細胞表面上に直接発現させることができる。代わりに、抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントを、化学的リンカー、脂質のタグ、又は他の関連する方法で、細胞又は病原体に結合させることもできる。抗樹状細胞抗体又はその抗原結合フラグメントを表面に繋げた形で有する細胞を、腫瘍細胞又は微生物病原体などの細胞に対する特異的免疫応答を誘導するのに利用できよう。

40

【0173】

このように、本発明の抗体を用いて、病原体、毒素又は自己抗原に対する免疫応答を刺激することができる。この治療法が特に有用であろう病原体の例には、現在効果的なワクチンがない病原体や、従来のワクチンが競合的に効果が低い病原体がある。これらには、限定はしないが、HIV、肝炎（A型、B型及びC型）、インフルエンザ、疱疹、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、スタフィロコッカス・アウレウス、シュードモナス・アエルギノサ、がある。

【0174】

50

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）をまず、治療上又は診断上の利用に係る結合活性についてインビトロでテストしてもよい。例えば、本発明の組成物は、下の実施例の項で解説するフロー・サイトメトリ及び内部移行検定でテストすることができる。さらに、樹状細胞の細胞溶解も含め、少なくとも一つのエフェクター媒介型エフェクター細胞活性を惹起する上でのこれら分子の活性についても検定してよい。エフェクター細胞が媒介するファゴサイトーシス及び細胞溶解を検定するプロトコルは、当業で公知である。

【0175】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、樹状細胞媒介又は樹状細胞関連疾患の治療及び診断において、更なる実用性を有する。例えば、本ヒトモノクローナル抗体、多重特異的又は二重特異的分子は、以下：樹状細胞のオプソニン化；ヒトエフェクター細胞存在下における、樹状細胞のファゴサイトーシス又は細胞溶解の媒介；樹状細胞の成長の抑制；樹状細胞内部への移行；又は抗原を樹状細胞に狙わせること、といった生物学的活性の一つ以上をインビボ又はインビトロで惹起するのに利用できる。

10

【0176】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）を投与する方法は、当業で公知である。使用する分子の適した投薬量は、被験体の年齢及び体重や、用いる特定の薬物に依存することであろう。本分子を、例えば $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、等々の放射性核種に、Goldenberg, D.M. et al. (1981) Cancer Res. 41: 4354-4360、及びEP 0365 997

20

【0177】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）に連結されたエフェクター細胞など、標的特異的エフェクター細胞は治療薬としても利用できる。標的設定するエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球又は単球などのヒト白血球であってもよい。他の細胞には、好酸球、ナチュラルキラー細胞及び他のIgG又はIgA受容体担持細胞がある。必要に応じ、エフェクター細胞を、治療しようとする被験体から得てもよい。この標的特異的エフェクター細胞は、生理学的に許容可能な溶液に細胞を含有させた懸濁液としても、投与できる。投与する細胞の数は、 $10^8$ - $10^9$ のオーダーであってもよいが、治療の目的に応じて様々であろう。ある実施例では、前記の量は、樹状細胞などの局在化を起こして、ファゴサイトーシスなどによる細胞致死を行わせるのに十分な量となるであろう。別の実施例では、本発明の組成物に連結した樹状細胞などの標的特異的樹状細胞を治療薬として用い、腫瘍細胞、微生物病原体、ウイルス又はウイルス感染細胞などの標的細胞への局在化を行わせたり、又は、抗原を狙わせたりして、抗原プロセッシング及び提示などによるこのような標的細胞又は標的抗原に対する免疫応答を行わせることができる。投与経路も様々であってよい。

30

【0178】

標的特異的エフェクター細胞又は標的特異的樹状細胞を用いた治療は、標的細胞を除去する他の技術と一緒にしてもよい。例えば、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子など）及び/又はこれらの組成物で武装したエフェクター細胞を用いた抗樹状細胞治療法を、抗炎症性又は免疫抑制治療など、化学療法又は免疫調節的治療法と併用することができる。さらに、コンビネーション免疫治療法を用いて、二つの異なる細胞傷害性エフェクター集団に樹状細胞を狙わせてもよい。例えば、抗Fcガンマリ又は抗CD3に連結した抗樹状細胞抗体を、IgG又はIgA受容体特異的結合剤と一緒に用いてもよい。

40

【0179】

別の実施例では、本発明のヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子で標的決定した樹状細胞を免疫調節的治療法と併用して、例えば標的細胞又は標的抗原に対する免疫応答を高める免疫刺激などを行うことができる。樹状細胞を標的決定する治療法は、他の形の免疫

50

治療、例えばサイトカイン処置（例えばインターフェロン、TNF、GM-CSF、G-CSF、IL-2 など）と組み合わせることもできる。

【0180】

さらに本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、抗原プロセッシング及び提示などの樹状細胞活性を調節したり、細胞表面上の受容体にキャップをする及び消失させるなどにより樹状細胞上の認識抗原のレベルを調節するのにも、利用できる。

【0181】

補体に結合する、例えばIgG1、-2、又は-3又はIgM由来の部分などの補体結合部位を有する本発明の組成物（ヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子など）も、補体の存在下で利用することができる。実施例の一つでは、標的細胞を含む細胞集団を、本発明の結合作用物質及び適したエフェクター細胞でエクスピボで処置するとき、補体又は補体を含有する血清を添加することで、これを補ってもよい。本発明の結合作用物質で覆われた標的細胞のファゴサイトーシスは、補体たんぱくを結合させると向上させることができる。別の実施例では、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子など）で覆われた標的細胞を、補体により溶解させることもできる。

【0182】

さらに本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子など）を、補体と一緒に投与してもよい。従って、ヒト抗体、多重特異的又は二重特異的分子と、血清又は補体とを含んで成る組成物も、本発明の範囲内にある。これらの組成物は、当該の補体はそのヒト抗体、多重特異的又は二重特異的分子の近くにあるために、有利である。あるいは、本発明のヒト抗体、多重特異的又は二重特異的分子と、補体又は血清とを、別々に投与することもできる。

【0183】

他の実施例では、被験体をサイトカインで処置するなど、免疫細胞の活性及び/又はFc又はFc受容体の発現又は活性を、向上又は抑制するなど、調節するような作用物質で、被験体をさらに処置することができる。本多重特異的分子で治療中に投与するのに好適なサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン-（IFN-）及び腫瘍壊死因子(TNF)、がある。

【0184】

さらに本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子など）は、樹状細胞などに標識を付けるためなど、このような細胞を標的に設定するのにも利用できる。このような用途では、検出の可能な分子に当該結合作用物質を結合させてもよい。従って、本発明は、樹状細胞をエクスピボ又はインビトロで位置確認する方法も提供するものである。この検出可能な標識は、例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素、又は酵素コファクターなどであってよい。

【0185】

ある実施例では、本発明は、樹状細胞又は樹状細胞抗原の存在を試料中で検出する方法、又は、樹状細胞又は樹状細胞抗原の量を測定する方法を提供するものである。当該方法は、試料及びコントロール試料を、樹状細胞又は樹状細胞抗原に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分に、この抗体又はその部分と樹状細胞又は樹状細胞抗原との間の複合体形成が可能な条件下で、接触させるステップを含む。こうして複合体の形成を検出し、コントロール試料と比較したときに、当該試料に複合体形成の違いがあれば、この試料中に樹状細胞又は樹状細胞抗原が存在することの指標となる。

【0186】

さらに別の実施例では、本発明は、インビボ又はインビトロで樹状細胞の存在を検出する又は樹状細胞の量を定量する方法を提供するものである。本方法は、(i)検出可能なマーカーに共役させた本発明の組成物（例えば多重又は二重特異的分子）又はそのフラグメントを被験体に投与するステップと、(ii)前記検出可能なマーカーを検出する手段に、前記被験体を暴露して、樹状細胞を含有する区域を特定するステップと、を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 7 】

さらに本発明の範囲内には、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子など）と、使用上の指示とを含むキットも含まれる。本キットには、さらに、サイトカイン又は補体や、又は、一種以上の本発明の別のヒト抗体（例えば、樹状細胞上の、第一のヒト抗体とは異なるエピトープに結合する、補完的活性を有するヒト抗体など）など、少なくとも一つの更なる試薬を含めることもできる。

## 【 0 1 8 8 】

さらに本発明を以下の実施例で解説するが、以下の実施例を更なる限定として捉えられてはならない。本出願全体を通じて引用された全図面及び全参考文献、特許及び公開済み特許出願の内容を、その言及をもってここに編入することを明示しておく。

## 【 0 1 8 9 】

## 参考文献

1. G.Kobler and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
2. G.L. Boulianne, Hozum N., and Shulman M.J. (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* 312: 643-646.
3. P.T. Jones, Dear P.H., Foote J., Neuberger M.S., and Winter G. (1989) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those of a mouse. *Nature* 321: 522-525.
4. J.D. Marks et al. (1991) By-passing Immunization Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.
5. N. Lonberg, et al. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368(6474): 856-859.
6. G.Gafie, Howe S.C., Butcher M.C. C. W., and Howard H.C. (1997) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266:550-552.

## 【 0 1 9 0 】

## 実施例

## 実施例 1 樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体の作製

HuMAbマウスのHC07株を、樹状細胞の標品で免疫化して、ヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体を生成させた。HC07 HuMAbマウスは、言及をもってその全開示をここに編入することとする米国特許第5,770,429号及び第5,545,806号に記載された通りに作製した。

## 【 0 1 9 1 】

具体的には、フロイント・アジュバントに乳化させたヒト樹状細胞を4回、腹腔内注射してHC07マウスを免疫化した。簡単に説明すると、樹状細胞を以下のように調製した。全血又はロイコパック血小板アフェレーシス標品を密度勾配遠心分離して、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を得た。組織培養フラスコに2時間接着させて単球を分離し、続いて、2 ng/ml GM-CSF 及び10 ng/ml IL-4 を加えたマクロファージ無血清培地（ギブコ社製）で5乃至9日間、インキュベートして、樹状細胞に分化させた。免疫化用の細胞は、新鮮なまま用いるか、又は - 80 で凍結保存した。マウスは2乃至3週間毎に免疫化した。最後に、リン酸緩衝生理食塩水に樹状細胞を含めて静脈注射してから、脾臓摘出を行った。応答のあるマウスの脾臓を採取し、単個細胞に分散させた。

## 【 0 1 9 2 】

抗樹状細胞抗体を産生するハイブリドーマを作製するには、抗樹状細胞抗体を含有する血漿を持つマウスの脾細胞を、P3X63-Ag8.653骨髓腫細胞（ATCCに指定番号ATCC CRL 1580で寄託された非分泌性マウス骨髓腫細胞にPEGで融合させた。HAT含有培地による成長で、ハイブリドーマを淘汰した。ハイブリドーマが成長した後（約10乃至14日）、ハイブリドーマを含有する各ウェルを、抗ヒトIgG ELISAを用いて調べて、ヒトIgGの産生についてスクリーニングした。

## 【 0 1 9 3 】

陽性のハイブリドーマを以下の性質：（１）ヒトIgG抗体の産生、及び（２）樹状細胞への結合、に基づいてスクリーニング及び選択した。

【 0 1 9 4 】

ヒトIgGを分泌するハイブリドーマを、多種の血球との反応性について、フローサイトメトリで調べた。GM-CSF及びIL-4を補った培地で5乃至7日間培養して、接着した単球から樹状細胞を調製した。顆粒球（PMN）、単球及びリンパ球を、ヘパラン処置した全血から得た。これらの細胞を、IgG陽性クローンのハイブリドーマ上清と一緒に4℃でインキュベートした。結合はFITC標識ヤギ抗ヒトIgG（Fc）プローブを用いて検出した。当該細胞に関連した蛍光は、FACScalibur装置を用いた解析で決定した。

【 0 1 9 5 】

スクリーニングしたいくつかのハイブリドーマが、フローサイトメトリで評価したときに下の表1に示すような樹状細胞との反応性を実証したヒトIgG1抗体を産生した（例えばA3、A5、A23、A24、A33、B9、B11、B33、B47、C8、C10、C20、C28、C29、C30、C35、E1、E8、E10、E18、E20、E21及びE24）。いくつかのヒト抗体は、他の血球種と比較して大変高くかつ優先的な反応性を、樹状細胞に対して示した。

【 0 1 9 6 】

【表1】

**TABLE 1** 樹状細胞に対する反応性を有するヒトモノクローナル抗体

ヒトMAb	リンパ球	単球	PMN	樹状細胞
A3	-	+/-	+/-	+
A5	-	+/-	-	+/-
A23	-	+	-	+/-
A24	-	++	+	++
A33	-	+/-	-	+/-
B9	+/-	+++	+	+++
B11	-	+/-	-	+++
B33	-	+/-	-	+/-
B47	-	+/-	+/-	+/-
C8	-	+/-	-	+/-
C10	-	+/-	+/-	+
C20	-	+/-	+/-	++
C28	-	+/-	-	+/-
C29	-	+/-	+/-	++
C30	-	-	-	+/-
C35	-	+/-	-	++
E1	-	+/-	-	+
E8	-	+	+	++
E10	-	+	+	+++
E18	-	+	+	++
E20	+	++	+/-	+++
E21	+/-	++	+/-	+++
E24	-	+/-	-	+/-

10

20

30

40

検索表：－ 結合は検出されず  
 +/- 弱/不定の結合  
 + 低/有意な結合  
 ++ 高い結合  
 +++ 非常に高い結合

【0198】

実施例2 抗樹状細胞ヒトモノクローナル抗体の特徴付け

I . 精製されたヒト抗樹状細胞抗体の樹状細胞への結合特異性

樹状細胞に対する特異性を持つヒトIgG抗体を分泌したいいくつかのハイブリドーマを精製に向けてサブクローン及び展開させた。5%のCO2を含有する加湿したインキュベータ内の回転フラスコで成長させたハイブリドーマ培養株の上清から、モノクローナル抗体を分離した。抗体は、メーカーの指示により(イリノイ州ロックフォード、ピアース社製)、プロテインA - アガロースカラムでクロマトグラフィを行って精製した。

10

【0199】

次に、樹状細胞と、多種の他の造血細胞種の代表である細胞株との反応性について、精製済みのヒト抗体をフローサイトメトリで調べた。簡単に説明すると、上に解説したように、GM-CSF及びIL-4を補った培地で5乃至7日間培養して、接着した単核細胞から樹状細胞を調製した。U937、CEM、THP-1及びL540細胞株を、10%ウシ胎児血清を補った培地で培養した。細胞を回収し、洗浄し、飽和濃度のヒトモノクローナル抗体B11、C20、E21又はアイソタイプコントロール(ヒトIgG1)と一緒に、振盪させながら4で1時間、インキュベートした。さらに、FITCで標識したヤギ抗ヒトIgG(Fc)プローブと一緒に1時間、4でインキュベートして、抗体結合を検出した。細胞を洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞に伴う蛍光を、FACScalibur(ベクトン・ディッキンソン社製)装置を用いてCellQuestソフトウェアで解析した。

20

【0200】

図1に示すように、ヒトモノクローナル抗体B11は樹状細胞だけに結合した。モノクローナル抗体C20は樹状細胞に特異的に結合し、低レベルの反応性を単球様細胞株U937及びTHP-1及びホジキンリンパ腫細胞株L540に対して見せた。同様に、ヒトモノクローナル抗体E21は樹状細胞に優先的に結合したが、L540細胞及びTHP-1細胞に対しても低レベルだが反応した。これらのデータは、ヒトモノクローナル抗体B11、C20及びE21が異なる抗原を認識すること、そしてこれらは造血系譜の他の細胞に比較して、樹状細胞に優先的に結合することを実証するものである。

30

【0201】

II . 精製されたヒト抗樹状細胞抗体の樹状細胞に対する用量依存的結合

精製されたヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体B11、C20、及びE21の樹状細胞との用量依存的反応性をフローサイトメトリで調べた。

【0202】

樹状細胞を、上に解説したように接着性単核細胞から調製した。細胞を回収し、多様な濃度のモノクローナル抗体B11、C20、E21又はアイソタイプコントロールと一緒に4でインキュベートした。FITCで標識したヤギ抗ヒトIgG(Fc)プローブで抗体結合を検出し、細胞に伴う蛍光を、FACScalibur装置を用いてCellQuestソフトウェアで調べた。

40

【0203】

各モノクローナル抗体は、図2に示すように、アイソタイプを合わせたコントロールIgG抗体と比較して、用量依存的な結合を樹状細胞に対して示した。これらのデータは、精製されたヒトモノクローナル抗体B11、C20及びE21が濃度依存的態様で樹状細胞に結合することを実証している。これら抗樹状細胞抗体間で結合強度に違いがあることは、これらが樹状細胞上の固有の分子又はエピトープを認識することを示す。

【0204】

III . ヒト抗体B11のCD34+幹細胞由来樹状細胞への結合

循環血単球から分化させた樹状細胞は、その利用が可能であるために、研究及び臨床の両

50

方の用途で、最もよく用いられている種類の樹状細胞である。しかしながら、前駆幹細胞を由来とする樹状細胞も利用が可能であり、ヒト組織の樹状細胞をより正確に反映したものであろう。従って、次の研究では、Cd34+前駆細胞から分化した樹状細胞を、ヒトモノクローナル抗体B11との反応性について、フローサイトメトリで評価した。

#### 【0205】

精製済みのモノクローナル抗体B11を、蛍光イソチオシアネート (FITC) で標識するために、0.3M炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.5 でよく透析した。FITCのストック溶液は、1mgの固形FITCを1mlのDMSOに溶解させて調製した。ストックFITCを、継続的に混合しながら滴下で加えて、抗体たんぱく1mg当たり50µgのFITCとした。FITC添加後、溶液を暗室で1乃至3時間、室温でインキュベートした。FITCで標識された抗体を、PBSで平衡させたセファデックスG-10カラムでゲル濾過して分離した。

10

#### 【0206】

Cd34+前駆細胞及び樹状細胞分化培地は、ポエティック・テクノロジーズ社 (メリーランド州ガイザーズバーグ) から得た。細胞は、このメーカーの指示に従って分化させた。樹状細胞を回収し、様々な濃度のB11-FITC又はアイソタイプコントロール抗体 (ヒトIgG-FITC) と一緒に、4 でインキュベートした。細胞に伴う蛍光度は、FACScalibur 装置を用い、CellQuestソフトウェアで解析して調べた。

#### 【0207】

結果を図3に示すが、この結果は、ヒトモノクローナル抗体B11が、CD34+幹細胞から分化した樹状細胞に用量依存的態様で結合することを実証している。従って、B11標的抗原は、単球由来及び前駆幹細胞由来の樹状細胞上で発現しているのである。

20

#### 【0208】

IV. ヒト抗体B11のマクロファージ及び樹状細胞への結合

ヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体B11が、樹状細胞に対して相対的にマクロファージに結合する能力を、フローサイトメトリで評価した。

#### 【0209】

樹状細胞を上記に解説したように接着性単核細胞から調製した。マクロファージは、接着性単核細胞から、5乃至7日間、M-CSFと一緒に培養することで調製した。細胞を回収し、10µg/mlのモノクローナル抗体B11又はアイソタイプコントロールと一緒に、4 でインキュベートした。ヒト抗体結合は、FITC標識付ヤギ抗ヒトIgG (Fc) プロープで検出した。細胞に伴う蛍光は、FACScalibur装置を用いてCellQuestソフトウェアで解析して調べた。

30

#### 【0210】

その結果を図4に示すが、この結果は、ヒト抗体B11がマクロファージに、樹状細胞に結合するより低い程度で結合することを実証している。このように、B11標的抗原は、マクロファージ上にも発現しているが、発現レベルは、樹状細胞で観察されるものよりも低い。モノクローナル抗体B11のマクロファージとのこの反応性は、樹状細胞とマクロファージの類似性から見ても、驚くほどのことではない。これら二つの細胞種には、T及びBリンパ球応答を刺激する能力を含め、構造上及び機能上の両方で共通の性質があるため、抗体B11のマクロファージとの交差反応性は、抗原提示細胞を狙うのに有利であろう。

40

#### 【0211】

V. THP-1細胞上のヒト抗体B11標的抗原の誘導

ヒトモノクローナル抗体B11を、ヒト単球性白血病由来の単球様細胞株であるTHP-1細胞との結合について、THP-1細胞を樹状細胞表現型に向かって分化していくよう誘導する前後に、フローサイトメトリで調べた。

#### 【0212】

簡単に説明すると、THP-1細胞を標準的培養培地か、又は、GM-CSF及びIL-4を補った培地で成長させた。この細胞を、10µg/mlのモノクローナル抗体B11-FITC 又はアイソタイプコントロール抗体 (ヒト IgG-FITC) と一緒に4 でインキュベートした。この細胞に伴う蛍光を、FACScalibur装置を用いてCellQuestソフトウェアで解析して調べた。その結果

50

を図5に示す。

【0213】

これらのデータは、正常な成長条件下では、THP-1細胞はB11標的抗原を発現しないことを実証している。しかしながら、THP-1細胞をGM-CSF及びIL-4を含有する培地で培養して樹状細胞表現型に向かって誘導すると、B11標的抗原の発現が同時に誘導される。従って、これらの結果は、樹状細胞に特異的に伴う標的抗原(B11)に対する、B11ヒト抗体の特異性をさらに裏付けるものである。

【0214】

V I . ヒト抗体B11のマカク樹状細胞への結合

カニクイザルマカクの動物(サル)モデルは、標的抗原が霊長類間で保存されている限り、抗体の臨床上的用途に関する適切な情報を提供することができる。従って、ヒトモノクローナル抗体B11の、カニクイザル由来の樹状細胞との交差反応性をフローサイトメトリで評価した。

10

【0215】

新鮮なカニクイザルの血液を、シエラ・バイオメディカルズ社から入手し、接着性単核細胞をGM-CSF及びIL-4と一緒に培養して樹状細胞を調製した。樹状細胞を、10µg/mlモノクローナル抗体B11-FITC又はアイソタイプコントロール抗体(ヒトIgG-FITC)と一緒に4でインキュベートした。細胞に伴う蛍光を、FACScalibur装置を用いて解析して調べた。

【0216】

図6に示すように、ヒトモノクローナル抗体B11は、カニクイザルマカク由来の樹状細胞に結合したことから、B11標的抗原が霊長類間で保存されていることが示唆された。

20

【0217】

V I I . ヒト抗体B11のヒト組織内樹状細胞への結合

ヒトモノクローナル抗体B11の、ヒト組織由来の樹状細胞との反応性を免疫組織化学法で評価した。これらの実験は、抗体B11の、ヒト組織の他の細胞又は抗原との何らかの交差反応性も評価できるよう、設計されていた。

【0218】

剖検又は外科的生検でヒト組織の凍結切片を得て、ティッシュ-テックO.C.T.培地に寝かせ、-70 未満で凍結保存した。組織を5mm切片とし、アセトンで10分間固定し、一晩かけて乾燥させた。染色前に、スライドを10%中性緩衝ホルマリンで10秒間かけて固定した。間接的な免疫ペルオキシダーゼ技術を用いた。まず、Fc依存的結合を遮断するために熱凝集IgGを含有するPBSで希釈したB11-FITC又はアイソタイプを適合させたFITC抗体で、切片を染色した。ウサギ抗FITC抗体を用い、次にペルオキシダーゼで標識した抗ウサギ試薬を用いて、一次抗体を検出した。各スライドを、認定病理学者に読み取ってもらい、結合を以下の検索表：±(不定)、1+(弱い)、2+(中程度)、3+(強い)、4+(非常に強い)、Neg.(陰性)、に基づいて格付けした。下の表2に示す結果は、調べたすべての組織で、樹状細胞及びいくつかのマクロファージにはっきりとした染色があったことを示す。特異的染色はアイソタイプコントロール抗体では観察されなかった。

30

【0219】

これらのデータは、ヒトモノクローナル抗体B11がヒト組織の樹状細胞だけでなく、程度は低いヒト組織のマクロファージにも結合することを示している。脾臓中の単核細胞及び骨髄中の前駆細胞にも、僅かなB11の結合が見られたことは、未成熟樹状細胞への結合を表すものかも知れない。ヒト抗体B11は調べた試料中の他の細胞種又は組織とは交差反応しなかったことから、この抗体の樹状細胞への特異性、さらに程度は低いマクロファージへの特異性が実証された。

40

【0220】

【表2】

**TABLE 2** ヒトモノクローナル抗体B11のヒト組織への結合の免疫組織化学検査

抗体	組織及び反応性
B11-FITC (2 µg/ml)	皮膚：皮膚樹状細胞 3+、他の要素はすべて陰性。
“	扁桃：間質及び/又は表皮下樹状細胞 2+、他の要素はすべて陰性。
“	肝臓：間質樹状細胞 2+、クッパー細胞 2+、他の要素はすべて陰性。
“	乳房：皮膚/皮下/間質樹状細胞 3乃至 4+、他の要素はすべて陰性。
“	脾臓：間質樹状細胞 3乃至 4+、ヒルス帯の裏層になった細網腫上皮細胞 2+、 周辺帯のところどころの単核細胞 2+、 PALLS/小胞のまれ乃至ところどころの単核細胞 2+、 他の要素は陰性。
“	腎臓：間質樹状細胞 3乃至 4+、他の要素は陰性。
“	リンパ節：被膜樹状細胞 3乃至 4+、被膜下樹状細胞/マクロファージ 3+、 小胞樹状細胞 2乃至 3+、皮質傍野樹状細胞 2乃至 3+、 髄洞樹状細胞/マクロファージ 1乃至 2+、他の要素は陰性。
“	脳：髄膜/周皮樹状細胞 3乃至 4+、他の要素はすべて陰性。
“	精巣：間質樹状細胞 3乃至 4+、他の要素はすべて陰性。
“	膵臓：間質樹状細胞 3乃至 4+、他の要素はすべて陰性。
“	心臓：間質樹状細胞 3乃至 4+、他の要素はすべて陰性。
“	小腸：間質樹状細胞 3乃至 4+、 粘膜固有層樹状細胞/マクロファージ 2乃至 3+、 ハイル斑樹状細胞/マクロファージ 2乃至 3+、 他の要素は陰性。
“	骨髄：間質樹状細胞 3乃至 4+、造血前駆細胞 2+、他の要素は陰性。
“	肺：間質細胞 3乃至 4+、肺胞マクロファージ 3乃至 4+、他の要素は陰性。
IgG1-FITC (2 µg/ml)	検査された全組織：要素はすべて陰性。

10

20

【 0 2 2 1 】

組織交差反応性検査は、メリーランド州フレデリックのパソロジー・アソシエーツ・インターナショナルの研究室IM598で行われた。

【 0 2 2 2 】

V I I I . ヒト抗体B11の一本鎖Fv ( ScFv ) フラグメントのヒト樹状細胞への結合  
ヒトモノクローナル抗体B11の一本鎖Fvフラグメントの、ヒト組織由来樹状細胞に対する反応性を、フローサイトメトリで評価した。

【 0 2 2 3 】

B11 ScFvは、ヒトモノクローナル抗体B11のVL (SEQ ID NO:1 及び2) 及び VH (SEQ ID NO : 3 及び4) ドメインを、図9に示すように連結することで構築された。ScFvの樹状細胞への結合を抗EFG抗体を用いて検出できるよう、EGF配列も含めた。樹状細胞をB11-ScFvと一緒に1時間、4 でインキュベートした後、洗浄してから、抗EFG-FITC プローブと一緒に1時間、4 でインキュベートした。この試料をFACS解析で解析した。

40

【 0 2 2 4 】

FACS解析の結果は、このヒトモノクローナル抗体B11のB11 -ScFv フラグメントがヒト樹状細胞に結合したことを実証した。従って、ScFvを所定の抗原又は毒素に連結すると、ScFvをそれぞれワクチン又はイムノトキシンとして利用できるのである。

【 0 2 2 5 】

I X . ヒト抗体B11のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのヒト樹状細胞への結合  
ヒトモノクローナル抗体B11のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの、ヒト組織由来樹状細胞に対する反応性を、フローサイトメトリで評価した。これらの実験は、ヒト抗体B11のFc部分が、B11

50

の樹状細胞への結合に大きく関与しているかどうかとも評価できるよう、設計されていた。

【0226】

F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、精製されたB11mAbをペプシンで標準的条件下で消化することで調製した。このF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを、プロテインLクロマトグラフィで精製した。ヒト単球をGM-CSF及びIL-4中で培養して調製したばかりの樹状細胞を、抗体全体又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントと一緒に1時間、4℃でインキュベートした。この細胞を洗浄してから、抗ヒトIgG-F(ab')<sub>2</sub>-PEプローブと一緒に1時間、4℃でインキュベートした。この細胞を再度洗浄し、FACScalibur装置及びCellquestソフトウェアを用いて解析した。

【0227】

図10に示すように、FACS解析の結果では、ヒトモノクローナル抗体B11全体及びB11のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントが、同じ様な動態で樹状細胞に結合したことが示され、このモノクローナル抗体全体のうちのこのFc部分は、B11の樹状細胞への結合にあまり寄与していないことが分かった。

【0228】

実施例3 B11標的抗原の特徴付け

I. 樹状細胞のヒトモノクローナル抗体B11標的抗原の免疫沈降

ヒトモノクローナル抗体B11を用いて、それが認識する標的抗原を樹状細胞から免疫沈降させた。

【0229】

簡単に説明すると、樹状細胞の細胞ライセートを調製し、モノクローナル抗体B11又はアイソタイプコントロールIgG抗体と一緒に4℃でインキュベートした。抗体-抗原複合体を、抗ヒトIgG-アガロースで捕獲し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。

【0230】

分子量約180キログルトンに相当するバンドが、二つの異なる樹状細胞ライセートの標品を由来とする抗体B11免疫沈降物で見られたが、コントロール試料では見られなかった。従って、これらの免疫沈降研究では、ヒトモノクローナル抗体B11が、SDS-PAGEで解析したときの分子量が180キログルトンの標的抗原を樹状細胞上で認識することが示された。

【0231】

II. 樹状細胞のヒトモノクローナル抗体B11標的抗原のN末端配列決定

上述の免疫沈降後に、B11標的抗原のN末端アミノ酸配列決定をして、公知のタンパク質とのホモロジーを調べた。

【0232】

細胞ライセートを樹状細胞から調製し、モノクローナル抗体B11と一緒に4℃でインキュベートした。抗体-抗原複合体を抗ヒトIgG-アガロースで捕獲し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。ゲルのタンパク質をニトロセルロースに写し取り、モノクローナル抗体B11標的抗原に相当するバンドをN末端アミノ酸配列決定用に溶離させた。このN末端配列決定及びデータベース検索は、ミッドウェスト・アナリティカル社(ミズーリ州セントルイス)で行った。

【0233】

モノクローナル抗体B11標的抗原のN末端の15個のアミノ酸残基を配列決定したところ、以下：

DDXXQFLIIXEDXKR (SEQ ID NO:5) B11抗原

LDTRQFLIYNEDHKR (SEQ ID NO:6) マクロファージマンノース受容体

のように、ヒトマクロファージマンノース受容体とのタンパク質配列ホモロジーがみとめられた。

【0234】

ヒトタンパク質データベースをコンピュータ検索したところ、B11抗原に対して有意なホモロジーを有するタンパク質は他には明らかにならなかった。

【0235】

10

20

30

40

50

さらなる研究では、樹状細胞ライセートを一晩かけて、抗マウスIgGを添加したアガロースと一緒にインキュベートして、非特異的な結合たんぱくを取り除いた。このアガロースを遠心し、透明になった上清を回収し、予め抗体B11を加えてある抗ヒトIgG-アガロースと一緒に一晩、インキュベートした。このアガロースをPBSで洗浄し、還元性充填バッファと一緒に沸騰させた。最後にこのアガロースを遠心し、その上清をゲルに充填した。抗体B11は約150乃至180kDのタンパク質を免疫沈降させた。このタンパク質をPVDFメンブレンにプロットし、ミッドウェスト・アナリティカル社に送ってマイクロ配列決定を行ってもらった。

#### 【0236】

モノクローナル抗体B11標的抗原をN末端マイクロ配列決定した結果、以下のタンパク質配列：LLDTR QFLIY LEDTK RCVDA (SEQ ID NO:7)が判明した。この配列もやはり、ヒトマクロファージマンノース受容体のそれ (GenBank受託番号NP\_002429) と適合し、20個のアミノ酸にわたって100%の同一性があることが、ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーションのウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のBLASTアルゴリズムを用いて分かった。これらのデータは、ヒトモノクローナル抗体B11が認識する、樹状細胞上の標的分子は、マクロファージマンノース受容体であることを示している。

#### 【0237】

III. B11は樹状細胞によるFITC-デキストラン取り込みを抑制する  
以下の実験は、抗体B11がマンノース受容体を遮断するかどうか、ひいては、病原体とこのマンノース受容体との相互作用 (細胞感染など) を防止又は抑制するのに、この抗体を利用できるか、を調べるよう設計された。

#### 【0238】

樹状細胞を、FITC-デキストラン (500 µg/ml) と、アイソタイプコントロールヒトIgG又はB11 HuMAb (25 µg/ml) のいずれかと一緒に、30分間、図11に示す温度でインキュベートした。デキストラン分子は、マンノース受容体を通じて樹状細胞に特異的に内部移行することが公知である (F. Sallusto et. al. J. Exp. Med. 1995, 185:389-400)。標識 (FITC) 付デキストランの取り込みを、FACS解析 (即ちFACScalibur装置を用いた樹状細胞試料中の蛍光強度) で調べた。FITC-デキストラン取り込みのパーセントを、37で100%に、そして4で0%に設定した。

#### 【0239】

図11に示すように、抗体B11は、これらの条件下で、FITC-デキストランの取り込みを61.5%遮断した。これらの結果は、ヒトモノクローナル抗体B11を用いると、マンノース受容体との病原体の相互作用を遮断できることを示唆している。

#### 【0240】

実施例4 ヒト抗樹状細胞抗体の活性

I. ヒトモノクローナル抗体B11の樹状細胞への内部移行

樹状細胞への結合後にヒト抗体B11が内部移行する程度をフローサイトメトリで評価した。

#### 【0241】

樹状細胞は上述したように接着性単核細胞から調製した。この細胞を飽和濃度のモノクローナル抗体B11-FITCと一緒に4で1時間インキュベートしてこの抗体を最大に表面結合させ、低温のPBSで洗浄して過剰な抗体を取り除き、さらに37で多様な時間、インキュベートして、抗体に内部移行させた。次に試料を低温のPBSで洗浄して反応を停止させ、さらに0.1% PBA、pH 2.5で洗浄して表面に結合した抗体を細胞から剥がした。残った蛍光は、内部移行した抗体B11-FITCである。コントロール細胞はすぐに0.1% PBA、pH 2.5で洗浄して4に維持して、内部移行が最小の場合とするか、又は、0.1% PBA、pH 7のみで洗浄して、抗体-FITCの最大負荷があった場合とした。抗体内部移行のパーセントを以下の式：

% 内部移行 = (試料の平均蛍光強度 - 酸で洗浄した4のコントロールの平均蛍光強度) /

(PBSで洗浄した4 のコントロールの平均蛍光強度 - 酸で洗浄した4 のコントロールの平均蛍光強度)

で計算した。

【0242】

図7に示すその結果は、ヒトモノクローナル抗体B11が樹状細胞への結合後に効率的に内部移行することを実証している。ヒト抗樹状細胞モノクローナル抗体B11のこのようなこれまで未知の性質から、この抗体を用いて、抗原及び毒素などの作用物質を、樹状細胞の内部に送達できることが分かる。

【0243】

II. 樹状細胞へのB11-FITCの内部移行

さらに顕微鏡検査も用いて、抗体B11が樹状細胞への結合後に内部移行することを確認した。

【0244】

単球をGM-CSF (10 ng/ml) 及びIL-13 (50 ng/ml) と一緒に非接着性条件下で7日間、インキュベートして、樹状細胞を生じさせた。これらを、mAb B11-FITC (1 µg) に、ヒトIgG (600 µg) 及び抗CD32 mAb IV.3 (10 µg) の存在下で配合して非特異的取り込みを遮断し、37 °C でインキュベートした。コントロール細胞はこの全過程にわたって氷上でインキュベートした。37 °C に15分間及び60分間置いた後、樹状細胞を氷上に置き、抗CD11c-PE (1 µg) で染色した。mAb B11 の内部移行を、共焦点顕微鏡法で、BioRad MRC1024 レーザースキャニング共焦点顕微鏡を用いて調べた。細胞は、蛍光について、15 mW KrAr レーザーから出る488 nmの光線と、二つの光検出子 (FITCの蛍光には522/35 nm の二色、そしてPE蛍光には605/32 nm の二色) とを用いてスキャンした。63倍のPlan-APO 1.4 NA 対物レンズ (ニューヨーク州ソーンウッド、カール・ツァイス社製) を、絞りを2.1に設定して用いると、約1.0 µmの厚さの蛍光像の光切片を検出できた。細胞全体を切片にした後に、細胞中央のスライスから代表となる像を選んだ。

【0245】

これらの結果から、B11 mAbは、マンノース受容体への結合後に樹状細胞内部に急速に移行することが裏付けられ、この抗体は抗原又は毒素を抗原提示細胞内に効率的に送達できることがやはり示唆された。FACSデータと一致して、この内部移行は15分以内に明かとなり、1時間でほぼ終了した。

【0246】

III. 標的設定された抗原が送達された後の樹状細胞による抗原提示のヒトモノクローナル抗体B11による促進

樹状細胞による抗原のプロセッシング及び提示を促進するのにヒトモノクローナル抗体B11を利用できるかを調べるために、化学的架橋試薬SMCCを用いてこの抗体を破傷風トキソイド (TT) 抗原に共役させた。

【0247】

樹状細胞は接着性単核細胞から上述のように調製したが、例外として、細胞はテフロン (登録商標) 容器内で培養した。樹状細胞を回収し、96ウェル微量定量プレートに、1ウェル当たり5000個の細胞になるように、10%のウシ胎児血清を加えたマクロファージ無血清培地中に再プレーティングした。破傷風トキソイドに共役させたモノクローナル抗体B11、又は、破傷風トキソイド単独、を、多様な濃度でこの樹状細胞に加えた。単核細胞に破傷風トキソイドを加え、さらにIL-2を加えて一緒にインキュベートして生成させた自己由来の破傷風トキソイド特異T細胞を、1ウェル当たり50,000個の細胞になるように、樹状細胞を含有する各ウェルに添加した。細胞を7日間、37 °C で一緒に培養し、生存細胞数を、MTTを基にした検定法を利用して、メーカーの指示 (ウイスコンシン州マジソン、プロメガ社) に従って検定した。破傷風トキソイド特異的Tリンパ球を特異的に刺激する上での、樹状細胞を誘導する能力を、破傷風トキソイド又は抗体B11-破傷風トキソイドに細胞を暴露してから比較した。その結果 (図8)、破傷風トキソイドをモデル抗原としてB11に共役させると、抗原特異的T細胞増殖で測定する限りでは、有意により効率的な抗原

10

20

30

40

50

提示が起きることが示された。

【0248】

別の実験では、樹状細胞に、破傷風トキソイド (TT) を共役させたB11か、又は、B11抗体と混合した破傷風トキソイド (共役させていないコントロール) を負荷した後に、<sup>3</sup>H-チマジン (Thymidine) をT細胞増殖の読み取り値として用いた。もう一つのコントロールとして、Fc RII (CD32) の遮断抗体であるmAb IV-3を、B11-TT共役体の入ったいくつかのウェルに加えて、このFc受容体がB11-TTによる抗原プロセッシング及び提示の促進に寄与するかどうかを調べた。翌日、細胞に、解凍したばかりの、予め樹立された破傷風トキソイド特異的T細胞を4日間、配合した。その最後の日は一日中、細胞を、<sup>3</sup>H-チマジンと一緒に37℃で共インキュベートした。T細胞に取り込まれた<sup>3</sup>Hの量を検定した。

10

【0249】

前の実験と同様、その結果 (図12) は、破傷風トキソイドをモデル抗原としてB11に共役させると、抗原特異的T細胞増殖で測定したときに、有意により効率的な抗原提示が起きることを示した。過剰量のmAb IV.3を加えても、B11-TT共役体による抗原提示の促進に有意な変化はなかったことから、B11-TTのFc RIIとの相互作用はこの活性には必要ではないことが分かった。

【0250】

まとめると、図8及び12に示したこれらの研究結果は、破傷風トキソイド単独に比べ、同じレベルのT細胞刺激を達成するのに必要な、抗体B11に共役させる破傷風トキソイドの量は10分の1乃至100分の1であることを示している。加えて、図8で見る限り、T細胞刺激の絶対度は、破傷風トキソイドを抗体B11で樹状細胞に標的設定したときに2倍高かった。このように、これらのデータは、抗原をヒトモノクローナル抗体B11に共役させられること、そして、抗体で標的決定された抗原は、標的決定されていない抗原よりもより効率的にプロセッシング及び提示され、ひいては、抗原特異的T細胞応答が促進されることを実証している。

20

【0251】

実施例5 樹状細胞に対するヒトモノクローナル抗体E21の特徴付け

I. ヒト抗体E21抗原の分子量解析

樹状細胞ライセートを培養ヒト樹状細胞から調製した。簡単に説明すると、樹状細胞を洗浄し、溶解緩衝液を含有する4%のトリトンX-100に再懸濁させた。分画していないこのライセートを4-15% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加した後、このタンパク質をニトロセルロースに写し取った。そのプロットを10 µg/ml E21と一緒にインキュベートし、続いて抗ヒトIgGアルカリホスファターゼプローブと一緒にインキュベートしてから、西洋わさびペルオキシダーゼを用いて視覚化した。

30

【0252】

この実験の結果から、ヒトモノクローナル抗体E21抗原は分子量で約36乃至40キロダルトンであることが分かった。

【0253】

II. ヒト抗体E21のヒト皮膚及び表皮ヒト樹状細胞への結合

図1に示すように、ヒトモノクローナル抗体Ab E21は樹状細胞に優先的に結合した。この実験は、ヒト抗体E21の皮膚及び表皮樹状細胞への反応性を、凍結皮膚のE21を用いた免疫組織化学解析で調べられるよう、設計された。

40

【0254】

ヒト皮膚の凍結切片をFITC-E21 又はFITC-huIgGコントロールで染色し、ウサギ抗FITCプローブを用いて検出した。

【0255】

免疫組織化学解析の結果は、ヒト抗体E21は、ヒト皮膚切片中の皮膚樹状細胞/マクロファージ及び表皮樹状細胞 (ランゲルハンス細胞) の両方と反応することを実証している。

【0256】

III. ヒト抗体E21のマカク樹状細胞への結合

50

カニクイザル・マカクの動物（サル）モデルは、標的抗原が霊長類間で保存されていることを前提に、抗体の臨床上の用途に関する適切な情報を提供することができる。従って、ヒトモノクローナル抗体E21の、カニクイザル由来樹状細胞との交差反応性をフローサイトメトリで評価した。

【0257】

カニクイザル単球をGM-CSF及びIL-4処置で樹状細胞に分化させ、E21との結合についてフローサイトメトリで調べた。樹状細胞をE21と一緒に1時間、4℃でインキュベートした後、洗浄し、さらに、ヒト抗IgG-FITCプローブと一緒に1時間、4℃でインキュベートした。試料を、FACScalibur装置を用いて解析した。

【0258】

結び

以上の実施例は、高い親和性で樹状細胞に特異的に反応するヒトモノクローナル抗体の作製を解説したものである。

【0259】

具体的には、ヒトモノクローナル抗体B11は、樹状細胞上のヒトマクロファージマンノース受容体の特異的に認識する。さらに、ヒトモノクローナル抗体B11は、樹状細胞内部へ効率的に移行し、樹状細胞による抗原プロセッシング及び提示を促進する。

【0260】

ヒトモノクローナル抗体E21は、B11とは異なるヒト樹状細胞上抗原に結合する。E21はまた、カニクイザル・マカク（サル）由来の樹状細胞とも交差反応することから、E21抗原が霊長類間で保存されており、更なる抗体開発のための適切な動物モデルを提示した。

【0261】

これらの結果は、本発明の完全ヒトモノクローナル抗体は、そのフラグメント、共役体及び二重特異的分子も含め、樹状細胞が関連する疾患の診断及び治療に利用できるという結論を裏付けている。

【0262】

同等物

当業者であれば、ごく日常的な実験を利用するのみで、ここに解説された本発明の具体的実施例の同等物を数多く認識され、又は確認できることであろう。このような同等物は以下の請求の範囲の包含するところと、意図されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒトモノクローナル抗体B11、C20及びE21の、樹状細胞及び造血細胞系U937、CEM、THP-1及びL540との反応性を、フローサイトメトリで評価して示す。結合は平均蛍光強度で測定した。

【図2】 図2は、ヒトモノクローナル抗体B11、C20及びE21の樹状細胞への用量依存的な結合を、フローサイトメトリで評価して示す。結合は平均蛍光強度で測定した。

【図3】 図3は、ヒトモノクローナル抗体B11のCD34+幹細胞由来樹状細胞との用量依存的な反応性を、フローサイトメトリで評価して示す。結合は平均蛍光強度で測定した。

【図4】 図4は、ヒトモノクローナル抗体B11の樹状細胞及びマクロファージとの結合を、フローサイトメトリで評価して示す。

【図5】 図5は、樹状細胞表現型に分化するよう誘導されたTHP-1へのヒトモノクローナル抗体B11の結合を、フローサイトメトリで評価して示す。

【図6】 図6は、ヒトモノクローナル抗体B11のマカク樹状細胞への結合をフローサイトメトリで評価して示す。結合は平均蛍光強度で測定した。

【図7】 図7は、ヒトモノクローナル抗体B11の樹状細胞へのパーセント内部移行を、37℃で経時的に示す。

【図8】 図8は、抗原単独に比較して、抗体B11により上昇した抗原提示を、破傷風トキシイド特異的T細胞の刺激で測定して示す。

【図9】 図9は、ヒトモノクローナル抗体B11のV<sub>L</sub> (SEQ ID NO:1 及び 2) 及び V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 3 及び 4) ドメインを連結して作製されたB11 ScFvコンストラクトを示す。

10

20

30

40

50

【図10】 図10は、FACS解析で測定したときのヒトモノクローナル抗体B11全体及びB11のF(ab')<sub>2</sub>フラグメント間の樹状細胞への結合の比較を示す。

【図11】 図11は、樹状細胞内部へのFITC-デキストラン移行のパーセントを示す。

【図12】 図12は、抗原をB11に共役させると抗原提示が促進されるため、破傷風トキソイド単独で見られるのと同じレベルのT細胞刺激を達成するのに必要な、抗体B11に共役させる破傷風トキソイドの量が10乃至100分の1に少なくなることを示す。

【図13】 図13は、抗体B11の可変軽鎖(V<sub>L</sub>)及び可変重鎖(V<sub>H</sub>)のヌクレオチド及び相当するアミノ酸配列を示す。

【図1】

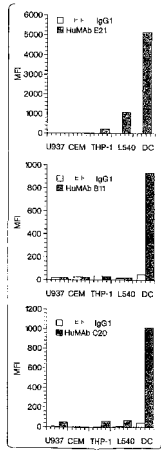


Fig. 1

【図2】

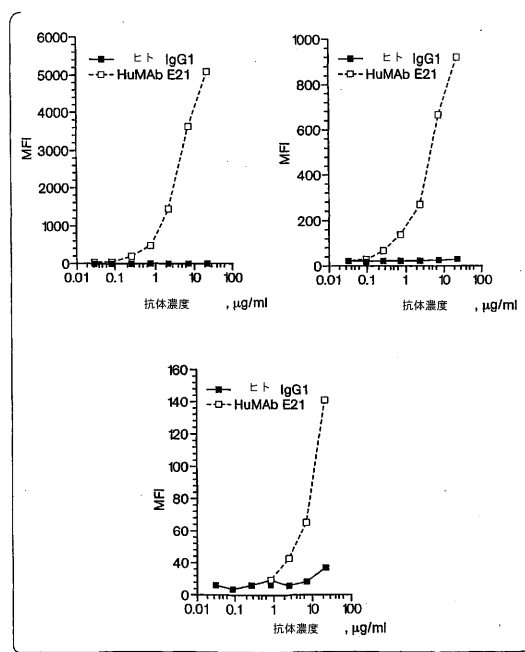


Fig. 2

【 図 3 】

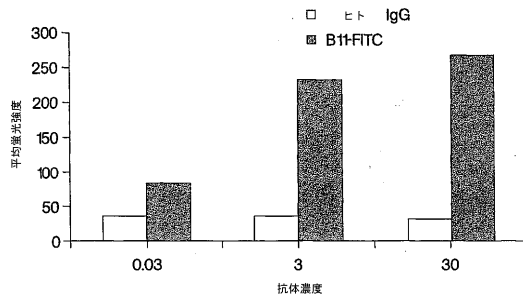


Fig. 3

【 図 4 】

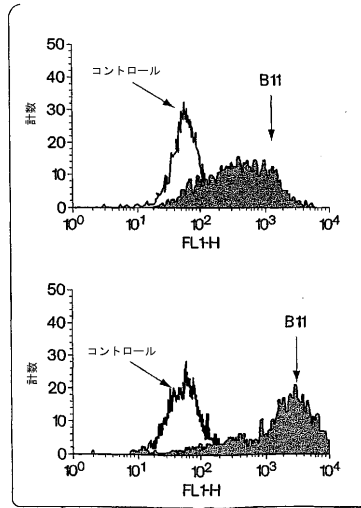


Fig. 4

【 図 5 】

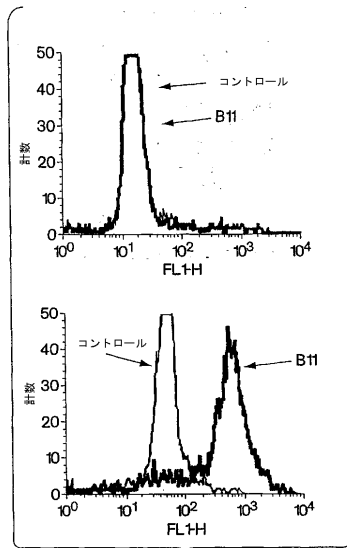


Fig. 5

【 図 6 】

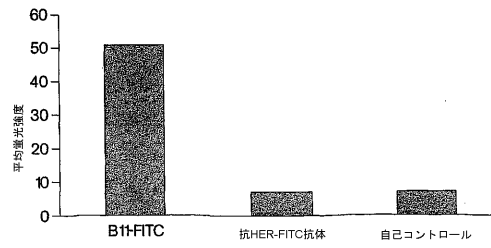


Fig. 6

【 図 7 】

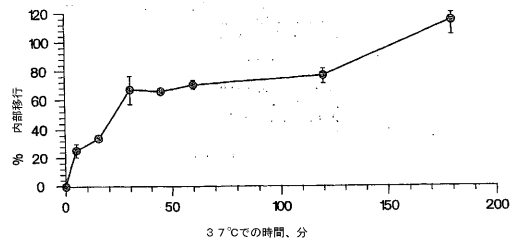


Fig. 7

【 図 8 】

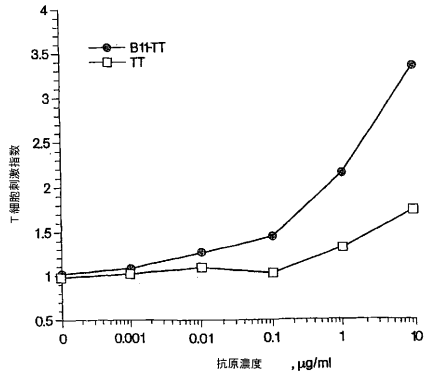


Fig. 8

【 図 9 】

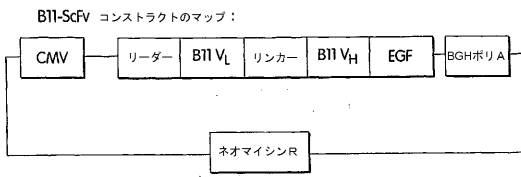


Fig. 9

【 図 1 2 】

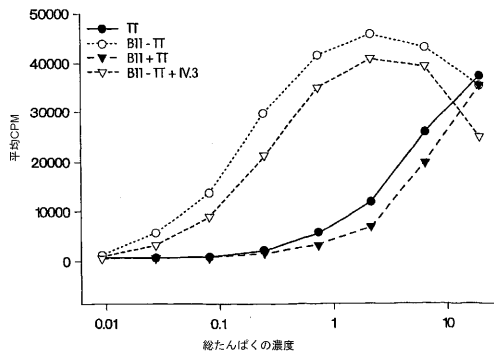


Fig. 12

【 図 1 0 】

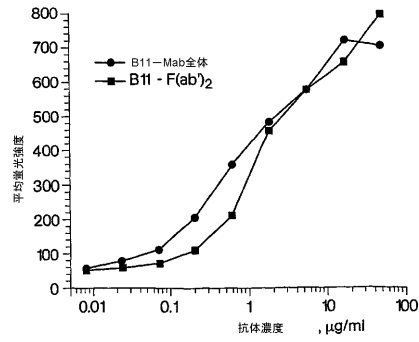


Fig. 10

【 図 1 1 】

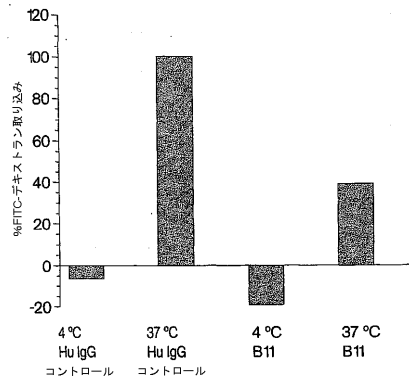


Fig. 11

【 図 1 3 】

B11 HuMab SEQUENCE DATA:

B11 VL DNA:  
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACA  
GAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGTCA  
GGGTATTAGCAGGTGGTTAGCTGGTATCAGCAGAAACCAGAAAGCCCT  
AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT  
TGC AAGTGGGTCCCATCAAGTTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT  
CACTCTCACCATCAGCGGCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGC AACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTACCTCGGACGTT  
CGGCCAAGGGCAAGGTGGAATCAA  
A

B11 VL PROTEIN:  
DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ  
SGVPSRFSGSGSDFTFLTISGLQP  
EDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK

B11 VH DNA:  
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCGGGAGTCT  
CTGAGGATCTCTCTAAGGGTCTGGAGA  
CAGTTTTACCACCTACTGGATCGGCTGGGTGCCGACAGATGCCGGGAAGGC  
CTGGAGTGGATGGGATCATCTATCCTG  
GTGACTCTGATACCATATACAGCCGTCCTTCCAAGCCAGTCCACCATCTCA  
GCCGACAAGTCCATCAGCACCCCTAC  
CTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCTCGGACACCCGATGTATTACTGTACGA  
GAGGGACCGGGCGTGTACTACTGGG  
CCAGGGAACCTGGTACCCTCTCTCA

B11 VH PROTEIN:  
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGDSFTTYWIGWVRQMPGKLEWMIITYPG  
DSDTIYSPSPFQGVTVISADKSI STAY  
LQWSSLKASDPTAMYCYTRGDRVDYWGQTLVTVSS

Fig. 13

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/577	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
		G 0 1 N 33/577	B

(72)発明者 デオ ヤシュウォント エム  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 1 6 イースト ブランズウィック コートランド  
 ドライブ 3 5

(72)発明者 ジョン トレムル  
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 4 3 フィラデルフィア パイン ストリート 4 7  
 0 1 アパートメント A 1 2

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 米国特許第0 5 8 7 6 9 1 7 ( U S , A )  
 国際公開第1 9 9 8 / 0 1 5 5 7 9 ( W O , A 1 )  
 国際公開第1 9 9 5 / 0 1 5 3 4 0 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)  
 C12N 15/00  
 C07K 16/00  
 C12P 21/08  
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	抗人树突状细胞的人单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5007409B2</a>	公开(公告)日	2012-08-22
申请号	JP2001582397	申请日	2001-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	米德列斯公司		
申请(专利权)人(译)	Medarex公司油墨		
当前申请(专利权)人(译)	细胞指数研究公司		
[标]发明人	ケラーティボー デオヤシウオントエム ジョントレムル		
发明人	ケラー ティボー デオ ヤシウオント エム ジョントレムル		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577 A01K67/027 A61K39/00 A61K47/48 C07K14/705 C07K16/46 C12N5/06 C12N5/10 G01N33/564		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K47/6849 A61K2039/505 A61K2039/515 A61K2039/6056 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/54 C07K2317/622 C07K2317/77 C07K2319/00 G01N33/564 A61K39/395		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.L A61K39/395.U A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/00.C C12P21/08 G01N33/53.Y G01N33/577.B		
优先权	60/203126 2000-05-08 US 60/230739 2000-09-07 US		
其他公开文献	JP2003532409A JP2003532409A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了分离的人单克隆抗体及其特异性结合树突细胞的抗原结合部分。还公开了包括抗体或抗体部分的双特异性抗体，免疫毒素和抗原缀合物。人抗体可以在非人转基因动物中产生，例如转基因小鼠，其能够通过进行V-D-J重组和同种型转换产生多种人单克隆抗体同种型。还公开了包含人抗体，非人转基因动物和产生人抗体的杂交瘤的药物组合物，以及使用人抗体的治疗和诊断方法。

ヒトMAB	リンパ球	単球	PMN	樹状細胞
A3	-	+/-	+/-	+
A5	-	+/-	-	+/-
A23	-	+	-	+/-
A24	-	++	+	++
A33	-	+/-	-	+/-
B9	+/-	+++	+	+++
B11	-	+/-	-	+++
B33	-	+/-	-	+/-
B47	-	+/-	+/-	+/-
C8	-	+/-	-	+/-
C10	-	+/-	+/-	+
C20	-	+/-	+/-	++
C28	-	+/-	-	+/-
C29	-	+/-	+/-	++
C30	-	-	-	+/-
C35	-	+/-	-	++
E1	-	+/-	-	+
E8	-	+	+	++
E10	-	+	+	+++
E18	-	+	+	++
E20	+	++	+/-	+++
E21	+/-	++	+/-	+++
E24	-	+/-	-	+/-