

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4459810号
(P4459810)

(45) 発行日 平成22年4月28日 (2010. 4. 28)

(24) 登録日 平成22年2月19日 (2010. 2. 19)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 P 1/00 (2006. 01)

A 6 1 P 11/06 (2006. 01)

A 6 1 P 13/12 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 11/06

請求項の数 29 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-529382 (P2004-529382)
 (86) (22) 出願日 平成15年8月14日 (2003. 8. 14)
 (65) 公表番号 特表2006-506977 (P2006-506977A)
 (43) 公表日 平成18年3月2日 (2006. 3. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/025399
 (87) 国際公開番号 W02004/016750
 (87) 国際公開日 平成16年2月26日 (2004. 2. 26)
 審査請求日 平成18年8月14日 (2006. 8. 14)
 (31) 優先権主張番号 60/403, 266
 (32) 優先日 平成14年8月14日 (2002. 8. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-4591

微生物の受託番号 ATCC PTA-4592

(73) 特許権者 504438727
 マクロジェニクス、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 20850 メリーラン
 ド州、ロックヴィル、イースト グード
 ドライブ 1500
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FcγRIIB 特異的抗体とその利用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

FcγRIIA と結合するよりも少なくとも 10 倍大きい親和性で FcγRIIB の細胞外ドメインと特異的に結合する可変領域を含む単離された IgG 抗体であって、当該可変領域がヒト細胞の表面に内在的に発現する FcγRIIB と特異的に結合する上記抗体、または当該可変領域を含むそのフラグメント。

【請求項 2】

Ig-Fc の FcγRIIB との結合をブロックする、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 3】

B 細胞の活性化、B 細胞増殖、細胞内カルシウム流入、または FcγRIIB シグナル伝達経路における下流シグナル伝達分子の活性を抑制する、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4】

B 細胞の活性化、B 細胞増殖、細胞内カルシウム流入、または FcγRIIB シグナル伝達経路における下流シグナル伝達分子の活性、または抗体依存性細胞応答を増強する、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

前記抗体が、B 細胞受容体を介するシグナル伝達を活性化するか、または FcεRI により誘導される肥満細胞活性化を抑制する、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 6】

前記抗体が、ATCC受託番号がPTA-4591であるクローン2B6により産生される抗体またはATCC受託番号がPTA-4592であるクローン3H7により産生される抗体とのFc γ RIIBの結合に対して競合する、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 7】

前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体、1 本鎖抗体、またはヒト抗体である、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 8】

前記フラグメントが、F(ab')₂フラグメントまたはF(ab)フラグメントである、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の抗体フラグメント。

10

【請求項 9】

前記抗体が、その可変領域がFc γ RIIAと結合するより少なくとも100倍大きい親和性でFc γ RIIBの細胞外ドメインに結合する、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 10】

前記抗体が、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する第 1 の重鎖-軽鎖対および腫瘍抗原と特異的に結合する第 2 の重鎖-軽鎖対を含む、二重特異的抗体である、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 11】

前記抗体が、治療薬、細胞毒、または異種ポリペプチドに機能しうる形で連結しており、上記異種ポリペプチドが細胞表面受容体と免疫特異的に結合する抗体である、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント。

20

【請求項 12】

前記細胞表面受容体が腫瘍抗原である、請求項 11 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 13】

前記抗体のFc域のFc γ Rに対する親和性を変更する少なくとも一つの改変をFc域にさらに含む、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 14】

上記Fc域が、野生型Fc域を含む比較しうる抗体がFc γ RIIIAに結合するよりも高い親和性でFc γ RIIIAに結合する、請求項 13 に記載の抗体。

30

【請求項 15】

癌患者の癌を治療するための医薬の製造における、請求項 4 に記載の治療上有効量の抗体またはそのフラグメントの使用。

【請求項 16】

前記使用が、癌患者の癌を治療するための医薬の製造のための、癌抗原に特異的に結合しかつ細胞障害性である第 2 の抗体との併用であり、上記癌が上記癌抗原によって特徴づけられるものである、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

前記癌抗原がMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、pI5、 β -カテニン、MUM-1、CDK4、HER-2/neu、ヒトパピローマウイルスウイルス-E6、ヒトパピローマウイルスウイルス-E7、またはMUC-1である、請求項 16 に記載の使用。

40

【請求項 18】

前記使用が、患者の疾患を治療するための医薬の製造における、細胞死滅によらないで治療効果を媒介する第 2 の抗体との併用である、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 19】

前記第 2 の抗体が抗Fas抗体である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

患者の B 細胞悪性腫瘍を治療するための医薬の製造における、請求項 3 に記載の治療上有

50

効量の抗体またはそのフラグメントの使用。

【請求項 2 1】

前記 B 細胞悪性腫瘍が非ホジキンリンパ腫である、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

それを必要とする患者の自己免疫障害を治療するための医薬の製造における、請求項 3 に記載の治療上有効量の抗体またはそのフラグメントの使用。

【請求項 2 3】

前記自己免疫障害が慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬、またはエリテマトーデスである、請求項 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 4】

それを必要とする患者の IgE を介するアレルギー障害を治療または予防するための医薬の製造における、請求項 3 に記載の治療上有効量の抗体またはそのフラグメントの使用。

【請求項 2 5】

前記 IgE を介するアレルギー障害が喘息、アレルギー鼻炎、胃腸アレルギー、好酸球増加症、結膜炎、または糸球体腎炎である、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

請求項 1 に記載の治療上有効量の抗体またはそのフラグメント、およびワクチン組成物の使用であって、上記抗体またはそのフラグメントが、被験者におけるワクチン組成物に対する免疫応答を増強するための医薬組成物の製造において、上記ワクチン組成物に対する上記被験者の免疫応答を増強するのに有効な量である、上記使用。

【請求項 2 7】

被験者の自己免疫疾患を検査する方法であって、

(a) 上記被験者からの生物学的サンプルを請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメントの有効な量と接触させるステップ；および

(b) 上記抗体またはそのフラグメントの結合を検出し、検出可能なマーカーのバックグラウンドまたは標準レベルを超える検出は上記被験者が自己免疫疾患を有することを示すとするステップを含む上記方法。

【請求項 2 8】

(i) 治療上有効な量の請求項 1 ～ 1 4 のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント；および

(ii) 製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 2 9】

前記抗体またはそのフラグメントが、B 細胞の活性化、B 細胞増殖、細胞内カルシウム流入、または Fc γ RIIB シグナル伝達経路における下流シグナル伝達分子の活性、または抗体依存性細胞応答を増強するものであり、

(i) 癌抗原に特異的に結合する細胞傷害抗体；および

(ii) 製薬上許容される担体を含む医薬組成物を含む、請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、参照により本明細書にその全文が組み入れられる 2002 年 4 月 14 日に提出された米国特許仮出願第 60/403,266 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

1. 発明の分野

本発明は、Fc γ RIIA、特にヒト Fc γ RIIA と結合するより大きい親和性で、Fc γ RIIB、特にヒト Fc γ RIIB と特異的に結合する抗体またはそのフラグメントに関する。本発明は、本発明の抗体を投与して治療抗体のエフェクター機能を増強することにより、治療抗体の治療効果を増強する方法を提供する。本発明はまた、本発明の抗体を投与することにより、ワクチン組成物の効力を増強する方法も提供する。

【背景技術】

【0003】

2. 発明の背景

2.1 Fc受容体と免疫系におけるその役割

抗体-抗原複合体の免疫系細胞との相互作用は、広範囲の系列の応答をもたらし、その範囲はエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞傷害性、肥満細胞脱顆粒、および食作用から、免疫調節シグナル、例えばリンパ球増殖および抗体分泌にまで及ぶ。全てのこれらの相互作用は、抗体または免疫複合体のFcドメインの、造血性細胞上の特定の細胞表面受容体との結合を介して開始される。抗体と免疫複合体がトリガーする細胞応答の多様性は、Fc受容体の構造的不均一性からもたらされる。Fc受容体は、細胞内シグナル伝達を媒介すると思われる構造的に関係のあるリガンド結合ドメインを共有する。

10

【0004】

タンパク質の免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーであるFc受容体は、免疫グロブリン分子のFc部分と結合することができる表面糖タンパク質である。このファミリーの各メンバーは、Fc受容体の鎖上の認識ドメインを介して1以上のアイソタイプの免疫グロブリンを認識する。Fc受容体は免疫グロブリンサブタイプに対するその特異性によって定義される。IgGに対するFc受容体はFc γ R、IgEに対するFc受容体はFc ϵ R、そしてIgAに対するFc受容体はFc α Rと呼ばれる。異なるアクセサリ細胞は異なるアイソタイプの抗体に対するFc受容体を持ち、抗体のアイソタイプが所与の応答にどのアクセサリ細胞が関わるかを決定する (Ravetch J. V.ら 1991, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J. S.ら 2001 Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D. D.ら 2002, The J 20
ournal of Clinical Investigation, 2(109):161-1681; Ravetch J. V.ら 2000, Science, 290:84-89; Ravetch J. V.ら, 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J. V. 1994, Cell, 78(4):553-60に総括されている)。色々なFc受容体、それを発現する細胞、およびそのアイソタイプ特異性を表1にまとめる (「免疫生物学：健康と病気における免疫系 (Immunobiology: The Immune System in Health and Disease)」, 第4版. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New Yorkから引用)。

【0005】

Fc γ 受容体

このファミリーの各メンバーは、免疫グロブリン関係ドメインのC2セットに関係する細胞外ドメイン、1回膜貫通ドメインおよび可変長の細胞質内ドメインを持つ内在性膜糖タンパク質である。3種の公知のFc γ Rがあり、それぞれFc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、およびFc γ RIII (CD16) と呼ばれる。3種の受容体は異なる遺伝子によりコードされる; しかし3種のファミリーメンバー間の広範な相同性は、これらが共通の祖先から、恐らくは遺伝子複製により生じたことを示唆する。本発明は具体的にFc γ RII (CD32) に焦点を合わせる。

30

【0006】

Fc γ RII (CD32)

Fc γ RIIタンパク質は40KDa内在性膜糖タンパク質であり、モノマーIgに対して低親和性 (10^6M^{-1}) であるので複合したIgGとだけ結合する。この受容体は、単球、マクロファージ、B細胞、NK細胞、好中球、肥満細胞、および血小板を含む全ての造血細胞上に存在する最も広く発現されるFc γ Rである。Fc γ RIIは、その免疫グロブリン結合鎖中に2つだけの免疫グロブリン様領域を有し、従って、IgGに対してFc γ RIより遥かに低い親和性を有する。3種のヒトFc γ RII遺伝子 (Fc γ RII-A、Fc γ RII-BおよびFc γ RII-C) が存在し、それらは全て凝集体または免疫複合体のIgGと結合する。

40

【0007】

Fc γ RII-AとFc γ RII-Bの細胞質内ドメイン内には明確な相違があるので、受容体ライゲーションに対して2つの機能的に異種の応答を創出する。基本的な相違は、A-アイソタイプが細胞活性化、例えば食作用および呼吸バーストに至る細胞内シグナル伝達を開始するのに対して、B-アイソタイプは抑制的シグナルを開始し、例えばB細胞活性化を抑制することにある。

50

【0008】

Fc γ Rを介するシグナル伝達

活性化と抑制の両方のシグナルは、ライゲーション後にFc γ Rを介して伝達される。これらの正反対の機能は、異なる受容体アイソタイプ間の構造的相違からもたらされる。受容体の細胞質内シグナル伝達ドメイン内の2つの異なるドメイン、すなわち、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (ITAM) または免疫受容体チロシン系抑制モチーフ (ITIM) が、この異なる応答を説明する。これらの構造へ補給される細胞質酵素の相違が、Fc γ R媒介細胞の応答結果を規定する。ITAMを含有するFc γ R複合体はFc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIAであるが、ITIMを含有する複合体はFc γ RIIBだけである。

【0009】

ヒト好中球はFc γ RIIA遺伝子を発現する。免疫複合体または特異的抗体架橋を経由するFc γ RIIAクラスター形成は、ITAMとともにITAMリン酸化を容易にする受容体関連キナーゼを凝集するのに役立つ。ITAMリン酸化はSykキナーゼとのドッキング部位として役立ち、その活性化は下流の基質（例えば、PI₃K）の活性化をもたらす。細胞活性化により前炎症性メディエーターが放出される。

【0010】

Fc γ RIIB遺伝子はBリンパ球上に発現され；その細胞外ドメインはFc γ RIIAと96%同一であって、識別できない形でIgG複合体と結合する。Fc γ RIIBの細胞質ドメイン中のITIMの存在がFc γ Rの抑制サブクラスを規定する。最近、この抑制の分子的原理が確立された。活性化Fc γ Rと同時にライゲートすると、Fc γ RIIBのITIMはリン酸化されて、イノシトールポリリン酸5'-ホスファターゼ (SHIP) のSH2ドメインを引き付け、これがホスホイノシトールメッセンジャー (ITAMを含有するFc γ Rを介するチロシンキナーゼ活性化の結果として放出される) を加水分解し、その結果、細胞内Ca⁺⁺の流入を抑制する。従って、Fc γ RIIBの架橋は、Fc γ Rライゲーションに対する活性化応答を消失し、細胞応答性を抑制する。このようにしてB細胞活性化、B細胞増殖および抗体分泌が停止する。

【表1】

免疫グロブリンアイソタイプのFc域に対する受容体

受容体	Fc γ RI (CD64)	Fc γ RII-A (CD32)	Fc γ RII-B2 (CD32)	Fc γ RII-B1 (CD32)	Fc γ RIII (CD16)	Fc ϵ RI	Fc α RI (CD89)
結合	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2x10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 2x10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 2x10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 5x10 ⁵ M ⁻¹	IgG1 10 ¹⁰ M ⁻¹	IgG1、IgA2 10 ⁷ M ⁻¹
細胞型	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞 血小板 ランゲルハンス細胞	マクロファージ 好中球 好酸球	B細胞 肥満細胞	NK細胞 好酸球 マクロファージ 好中球 肥満細胞	肥満細胞 好酸球 好塩基球	マクロファージ 好中球 好酸球
ライゲーションの効果	取込み 刺激 死滅の呼吸 バースト誘導の活性化	取込み 顆粒放出	取込み 刺激の抑制	取込みなし 刺激の抑制	死滅の誘導	顆粒の分泌	取込み 死滅の誘導

【0011】

2.2 関連疾患

10

20

30

40

50

2.2.1 癌

新生物または腫瘍は、異常な無制御の細胞増殖から生じる新生物質であり、良性または悪性でありうる。良性腫瘍は一般的に局在化したまま残る。悪性腫瘍はまとめて癌と名付けられる。用語「悪性」は一般的に、腫瘍が近隣の体構造を侵害かつ破壊し、そして離れた部位まで拡大して死を引き起こしうることを意味する（総括は、RobbinsおよびAngell, 1976, 「基礎病理学 (Basic Pathology)」, 第2版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp.68-122を参照）。癌は身体多くの部位に生じうるものであって、その起源に依存して異なる挙動を示す。癌細胞は、その起源となる身体部位を破壊し、次いで他の身体部分に拡大し、そこで新しい増殖を開始してさらに破壊を引き起す。

【0012】

10

毎年120万人以上の米国人が癌に罹っている。癌は米国における死因の第2位であり、もし現在の傾向が続くと、癌は2010年には第1の死因になると予想される。肺および前立腺癌が米国における男性の癌死因のトップである。肺および乳癌が米国における女性の癌死因のトップである。米国の男性2人のうちの1人は、人生のある時期に癌と診断されうる。米国の女性3人のうちの1人は、人生のある時期に癌と診断されうる。

【0013】

癌の治療法はまだ見出されていない。現在の治療選択肢、例えば手術、化学治療および放射線治療は、しばしば効果がないかまたは重症の副作用を示す。

【0014】

癌治療

20

現在、癌治療は患者の新生物細胞を根絶する外科手術、化学治療、ホルモン治療および／または放射治療に関わりうる（例えば、Stockdale, 1998, 「癌患者管理の原理 (Principles of Cancer Patient Management)」, in Scientific American: Medicine, vol.3, RubensteinおよびFederman, 編, 第12章, 第IV節を参照）。最近、癌治療はまた、生物学的治療または免疫治療にも関わりうる。これらの手法は全て、患者にとって大きい欠点を有する。例えば、外科手術は、患者の健康によっては禁忌であるかまたは患者に受入れられない。さらに、外科手術は完全に新生物組織を除去することができない。放射治療は、新生物組織が放射線に対して正常組織より高い感受性を有するときのみ有効であり、かつ放射治療はしばしば厳しい副作用を誘引しうる。ホルモン治療は単独の薬物として投与することは稀であり、たとえ有効でありうるとしても、他の治療法により癌細胞の大部分を除去した後に、癌の再発を予防または遅延するためにしばしば使用される。生物学的治療／免疫治療は数が限られており、発疹もしくは腫脹、発熱、悪寒および疲労を含むインフルエンザ様症候、消化器問題、またはアレルギー反応などの副作用を生じうる。

30

【0015】

化学治療については、癌治療に利用しうる様々な化学治療薬が存在する。癌化学治療薬の大部分は、DNA合成を直接、またはデオキシリボヌクレオチド三リン酸前駆体の生合成を抑制することにより間接的に抑制して、DNA複製および随伴する細胞分裂を防止することにより作用する（例えば、Gilmanら, 「グッドマンとグリマンの、治療薬の薬理学的基礎 (Goodman and Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics)」, 第8版 (Pergamon Press, New York, 1990) を参照）。これらの薬物はアルキル化薬、例えばニトロソ尿素、抗代謝物、例えばメトトレキセートおよびヒドロキシ尿素、ならびに他の薬物、例えばエトポシド、カンプトテシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダウノルビシンなどを含み、必ずしも細胞周期特異的でないが、DNA複製に対するそれらの効果によってS期に細胞を死滅させる。他の薬物、具体的にはコルヒチンおよびビンカアルカロイド、例えばビンブラスチンは、微小管アセンブリーを妨害して有糸分裂停止をもたらす。化学治療プロトコルは一般的に、治療効力を増加するために化学治療薬の組み合わせを投与することに関わる。

40

【0016】

様々な化学治療薬を利用しうるが、化学治療は多数の欠点を有する（例えば、Stockdale, 1998, 「癌患者管理の原理 (Principles Of Cancer Patient Management)」 in 「科

50

学的なアメリカの医薬 (Scientific American Medicine) 』, vol.3, RubensteinおよびF ederman編、第12章、第10節を参照)。ほとんど全ての化学治療薬は毒性があり、化学治療は、厳しい吐気、骨髄抑制、免疫抑制などの顕著な、かつしばしば危険な副作用を起こす。さらに、化学治療薬を組合わせて投与しても多くの腫瘍細胞は化学治療薬に耐性があるかまたは耐性を発現する。実際、治療プロトコルで使用される特定の化学治療薬に耐性のあるこれらの細胞が、特定の処置に使用される薬物の作用機構と異なる機構により作用する他の薬物に対しても耐性のあることがしばしば立証されていて；この現象は多面的薬物または多剤耐性と呼ばれる。このように、薬物耐性があるため、多くの癌は標準の化学治療処置プロトコルに抵抗性のあることが判っている。

【0017】

代わりの癌治療法、特に標準の癌治療、例えば外科手術、放射治療、化学治療、およびホルモン治療に抵抗性があることが証明されている癌の治療法の必要性は非常に大きい。希望が持てる代替法は免疫治療であり、この方法では癌抗原特異的抗体が癌細胞を特異的に標的とする。免疫応答の特異性を装備することに向けて大きな努力がなされていて、例えばハイブリドーマ技術が腫瘍選択的モノクローナル抗体の開発を可能にしている (Green M. C.ら, 2000 Cancer Treat Rev., 26:269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(suppl. 14):43-51を参照)、この数年間、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration) は最初の癌治療用のモノクローナル抗体：非ホジキンリンパ腫用のリツキシニン (Rituxin) (抗CD20) および転移性乳癌用のヘルセプチン (Herceptin) [抗(c-erb-2/HER-2)] を認可している (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90)。しかし抗体エフェクター機能、例えば抗体依存性細胞傷害活性 (「ADCC」) を媒介する能力は、このような治療に対する妨げとなる。このような免疫治療の有効性を改善する方法が、従って必要である。

【0018】

2.2.2 炎症性疾患と自己免疫疾患

炎症は、身体の白血球と化学品が我々の身体を、外来物質、例えば細菌およびウイルスによる感染から保護するプロセスである。通常、痛み、腫脹、罹患域の熱と赤みを特徴とする。サイトカインおよびプロスタグランジンとして知られる化学品がこのプロセスを制御し、指定されかつ自己限定的なカスケードで血液または罹患組織中に放出される。この化学品の放出は傷害または感染域への血流を増加し、そして赤みと熱を生じる。化学品のいくらかは組織中への液の漏れを引起して、腫脹をもたらす。この保護プロセスは神経を刺激し、痛みを生じる。これらの変化は、関係領域で限られた期間だけ起こるときは身体の利益に働く。

【0019】

自己免疫および／または炎症性障害において、免疫系は、戦うべき外来物質が無いと炎症性応答をトリガーし、身体の通常は保護性の免疫系が間違っって自身を攻撃することによりそれ自身の組織に障害を与える。多くの色々な自己免疫障害が身体を色々な方法で冒している。例えば、多発性硬化症の個体は脳が冒され、クローン病の個体は腸が冒され、そして慢性関節リウマチの個体は様々な関節の滑膜、骨および軟骨が冒されている。自己免疫障害は1以上のタイプの身体組織の破壊を進めるので、器官の異常な増殖、または器官機能の変化が生じうる。自己免疫障害は、1つの器官もしくは組織だけを冒しうるまたは複数の器官と組織を冒しうる。自己免疫障害により通常冒される器官および組織としては、赤血球、血管、結合組織、内分泌腺 (例えば、甲状腺または膵臓)、筋肉、関節、および皮膚が挙げられる。自己免疫障害の例としては、限定されるものでないが、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、全身エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、エリテマトーデス、多発性硬化症、自己免疫内耳疾患、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブズ病、自己免疫肝炎、家族性腺腫様ポリープ症および潰瘍性大腸炎が挙げられる。

【0020】

慢性関節リウマチ (RA) および若年性慢性関節リウマチは炎症性関節炎である。関節炎は

10

20

30

40

50

、関節における炎症を記載する一般用語である。全てではないが、いくつかのタイプの関節炎は狙いの間違った炎症の結果起こる。慢性関節リウマチに加えて、炎症に関連する他のタイプの関節炎としては、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎関節炎、および痛風性関節炎が挙げられる。慢性関節リウマチは、身体の内側の関節（例えば、両方の手、手首または膝）で起こる慢性関節炎のタイプである。この対称性が慢性関節リウマチをその他の関節炎から識別するのに役立つ。関節を冒すだけでなく、慢性関節リウマチは時折、皮膚、眼、肺、心臓、血液または神経を冒しうる。

【0021】

慢性関節リウマチは、世界の人口の約1%を冒し、そして潜在的に障害を与えている。米国における慢性関節リウマチの発生率はほぼ290万である。女性は男性より2～3倍多く冒されている。慢性関節リウマチが発症する典型的な年齢は25～50である。若年性慢性関節リウマチは、71,000人の若い米国人（18歳以下）を冒しており、少年より6倍多くの少女を冒している。

10

【0022】

慢性関節リウマチは、身体の免疫系が関節の潤滑液を分泌する滑膜を外来として誤って同定する場合に起こる自己免疫障害である。炎症が生じ、関節内および周囲の軟骨と組織が損傷または破壊される。重症の事例では、この炎症が他の関節組織および周囲の軟骨に広がり、骨と軟骨を侵食または破壊して関節変形をもたらす。身体は損傷した組織を癒傷組織と置き換え、その結果、関節内の正常な空間は狭小になって、骨はお互いに融合する。慢性関節リウマチは硬直、腫脹、疲労、貧血、体重減少、発熱、およびしばしば、身体不自由な苦痛を創出する。慢性関節リウマチの共通の症候群の数例としては、覚醒時の1時間以上継続する関節硬直；特定の指または手首の腫脹；関節周囲の軟組織の腫脹；および関節の内側の腫脹が挙げられる。腫脹は痛みを伴うかまたは伴わずに起こることもあり、かつ進行して悪化するかまたは進行前に数年間同じ状態で留まることもある。

20

【0023】

慢性関節リウマチの診断は、複数の因子の組み合わせに基づいて行われ、その因子としては、痛みのある関節の具体的な位置と対称性、朝の関節硬直の存在、皮膚下の瘤および小節（リウマチ小節）の存在、慢性関節リウマチを示すX線試験結果、および／またはリウマチ因子と呼ばれる血液試験の陽性結果が挙げられる。全てではないが、慢性関節リウマチを患う多くの人は、リウマチ様因子抗体を血液中に有する。リウマチ様因子は慢性関節リウマチを患っていない人にも存在しうる。他の疾患もリウマチ様因子を血液中に産生しうる。このような訳で、慢性関節リウマチの診断は複数因子の組み合わせに基づいて行われ、血液中のリウマチ様因子の存在だけによらない。

30

【0024】

該疾患の典型的な経過は持続性であるが振動性の関節症候群の1つであって、ほぼ10年後に患者の90%は骨と軟骨に構造的障害を示しうる。小パーセントは完全に消滅する短期の病気を有し、そして他の小パーセントは多数の関節変形および時折は他の疾患の徴候を伴う非常に重い疾患を有する。炎症プロセスは関節内の骨と軟骨の侵食または破壊を生じる。慢性関節リウマチでは、自己免疫周期の持続性抗原提示、T細胞刺激、サイトカイン分泌、滑膜細胞活性化、および関節破壊が存在する。疾患は個体および社会の両方に対して大きな影響を与え、顕著な痛み、障害性機能および能力障害だけでなく、数百万ドルに値する保健費用および賃金損失も生じる（例えば、NIHウェブサイトおよびNIAIDウェブサイト参照）。

40

【0025】

現在、関節炎に利用しうる治療法は、抗炎症薬または免疫抑制薬を用いて関節の炎症を軽減することに重点が置かれている。関節炎に最初に使われる治療薬は、通常、抗炎症薬、例えばアスピリン、イブプロフェンおよびCox-2阻害剤、例えばセレコキシブおよびロフェコキシブである。「2番目に使われる薬物」は、金、メトトレキセートおよびステロイドを含む。これらは十分確立された関節炎の治療薬であるが、これらの治療薬だけではごく僅かの患者しか治らない。最近、慢性関節リウマチの病原の理解が進んで、メトトレ

50

キセートが、サイトカインまたは組換え可溶性受容体に対する抗体と組合わせて使用されている。例えば、腫瘍壊死因子 (TNF) α に対する組換え可溶性受容体が、関節炎の治療でメトトレキセートと併用して使用されている。しかし、メトトレキセートと抗TNF α 薬、例えばTNF- α に対する組換え可溶性受容体の組合わせで治療した患者のほぼ50%しか臨床上有意な改善を示さない。多数の患者は、治療にも関わらず不応のまま留まっている。慢性関節リウマチを患う患者にとって困難な治療問題はまだ残っている。多くの現行治療法は高度の副作用発症があるかまたは疾患進行を完全に防止することができない。今までのところ、治療は理想的でなく、そして治癒はあり得ない。もっと効果的に慢性関節リウマチおよび他の自己免疫障害を治療する新規の治療薬が必要とされている。

【0026】

10

2.2.3 アレルギー

免疫を介するアレルギー（過敏症）反応は、アレルギー症候群の発現をもたらす原因となる機構によって4つの型（I～IV）に分類される。I型アレルギー反応は、IgEを介する、肥満細胞および好塩基球からの血管作用性物質、例えばヒスタミンの放出により特徴付けられる。これらの物質の放出と続いてのアレルギー症候群の徴候は、アレルゲンに結合したIgEの、肥満細胞および好塩基球の表面上のその受容体との架橋により開始される。I型アレルギー反応に罹った個体において、2回目のアレルゲンへの曝露は、IgE産生に必要な3細胞相互作用にメモリーBおよびT細胞が関わる結果として、アレルゲンに特異的なIgE抗体の高レベルの産生をもたらす。産生される高レベルのIgE抗体は、肥満細胞および好塩基球上のIgE受容体のアレルゲンに結合したIgEによる架橋の増加をもたらし、これは順に、これらの細胞の活性化、および薬理学的メディエーターの放出をもたらし、これがI型アレルギー疾患の臨床徴候に関わる。

20

【0027】

IgEに対する親和性の異なる2種の受容体が同定されかつ特徴付けられている。高親和性受容体 (Fc ϵ RI) は肥満細胞および好塩基球の表面上に発現される。低親和性受容体 (Fc ϵ RII/CD23) は、B細胞、T細胞、マクロファージ、好酸球およびランゲルハンス細胞を含む、多くの細胞型上に発現される。高親和性IgE受容体は3つのサブユニット (α 、 β および γ 鎖) から成る。複数の研究は、 α 鎖だけがIgEの結合に関わり、 β および γ 鎖（膜貫通または細胞質タンパク質である）はシグナル伝達イベントに必要であることを実証している。IgEが肥満細胞および好塩基球上のFc ϵ RIと結合するために必要なIgE構造の同定は、IgEを介するアレルギーを治療または予防する方法を工夫する上で非常に重要である。例えば、IgE受容体結合部位を解明すると、IgEの受容体保持細胞との結合をin vivoでブロックするペプチドまたは小分子を同定することができる。

30

【0028】

現在、IgEを介するアレルギー反応は、抗ヒスタミンおよび副腎皮質ステロイドなどの薬物を用いて治療され、この治療法は、アレルギー反応に関連する症候群を、肥満細胞および好塩基球から放出される血管作用性物質の効果を相殺することにより軽減することを企てている。高用量の抗ヒスタミンと副腎皮質ステロイドは有害な効果（例えば、中枢神経系障害、便秘など）がある。従って、I型アレルギー反応を治療する他の方法が必要とされる。

40

【0029】

I型アレルギー障害を治療するための一手法は、血清中の可溶性（遊離した）IgEと反応し、IgEを肥満細胞および好塩基球上のその受容体との結合からブロックし、そして受容体に結合したIgEとは結合しない（すなわち、これらは非アナフィラキシー誘発性である）モノクローナル抗体の産生である。2種のこのようなモノクローナル抗体が、IgEを介するアレルギー反応を治療する臨床開発の進んだ段階にある（例えば、Chang, T. W., 2000, Nature Biotechnology 18: 157-62を参照）

IgEを介するアレルギー反応の最も有望な治療薬の1つは、内在性IgEの適当な非アナフィラキシー誘発性エピトープに対する能動免疫である。Stanworthら（米国特許第5,601,821号）は、異種担体タンパク質とカップリングしたヒトIgEのC ϵ H4ドメインから誘導した

50

ペプチドをアレルギーワクチンとして利用する方法を記載している。しかし、このペプチドは、未変性の可溶性IgEと反応する抗体の産生を誘導しないことが示されている。さらに、Hellman（米国特許第5,653,980号）は、全長C ϵ H2-C ϵ H3ドメイン（ほぼ220アミノ酸長さ）の外來担体タンパク質との融合に基づく抗IgEワクチン組成物を提案している。しかし、Hellmanが提案した抗IgEワクチン組成物により誘導される抗体は、恐らく確実にアナフィラキシーを生じるであろう、というのは、IgE分子のC ϵ H2とC ϵ H3ドメインのいくつかの部分に対する抗体は、肥満細胞および好塩基球の表面上のIgE受容体と架橋し、アナフィラキシーのメディエーターを産生することが示されているからである（例えば、Stadlerら、1993, Int. Arch. Allergy and Immunology 102:121-126を参照）。従って、アナフィラキシー抗体を誘導しないIgEを介するアレルギー反応の治療法に対する必要性は残ったままである。

10

【0030】

アナフィラキシーの誘導に対する大きな関心から、I型アレルギー障害の治療に対する他の手法の開発が行われていて、この手法は、動物に投与されると抗IgEポリクローナル抗体の産生を誘導するミモトープから成る（例えば、Rudolf,ら、1998, Journal of Immunology 160:3315-3321を参照）。Kricekら（国際公開第W0 97/31948号）は、ファージディスプレイされたペプチドライブをモノクローナル抗体BSWI7を用いてスクリーニングし、IgE受容体結合のコンフォメーションを模倣するペプチドミモトープを同定した。これらのミモトープは恐らく遊離した未変性IgEと反応するが受容体に結合したIgEと反応しないととも、IgEをその受容体との結合からブロックするポリクローナル抗体を誘導するために使用する。Kricekらは、IgE分子のいずれの部分とも相同性がなく、従って本発明に開示したペプチドとは異なるペプチドミモトープを開示している。

20

【0031】

当技術分野を概観して証拠づけたように、癌、自己免疫疾患、炎症性障害、またはアレルギーなどの障害を治療または予防する現行方法の治療効力を増強する必要性は残ったままである。特に、癌の治療に利用される治療抗体のエフェクター機能、特に細胞傷害性効果を増強する必要性がある。当技術分野の現状はまた、アレルギー障害を治療または予防するには不足である（例えば、抗体治療またはワクチン治療により）。

【発明の開示】

【0032】

30

3. 発明の概要

Fc γ RIIAとFc γ RIIBの細胞外ドメインは95%同一であり、従ってこれらは多数のエピトープを共有する。しかし、Fc γ RIIAとFc γ RIIBは非常に異なる活性を示す。基本的な相違は、Fc γ RIIAが食作用および呼吸性バーストなどの細胞活性化をもたらす細胞内シグナル伝達を開始するのに対して、Fc γ RIIBは抑制するシグナル伝達を開始することにある。本発明以前において、本発明者らの知るところでは、ヒト細胞上に発現される未変性ヒトFc γ RIIAと未変性ヒトFc γ RIIBの相違を識別する抗体の存在は同定されていない；免疫応答をモジュレートする上でのその特有な活性と役割を考えると、未変性ヒトFc γ RIIBであつてかつ未変性ヒトFc γ RIIAでないことを認識する抗体が必要である。本発明は、部分的に、このような未変性ヒトFc γ RIIB特異的抗体の発見に基づくものである。

40

【0033】

本発明は、Fc γ RIIA、特にヒトFc γ RIIA、さらに特に未変性ヒトFc γ RIIAと結合するより大きい親和性で、Fc γ RIIB、特にヒトFc γ RIIB、さらに特に未変性ヒトFc γ RIIBと特異的に結合する単離された抗体またはそのフラグメントに関する。本明細書に使用される「未変性（native）」は、哺乳類動物細胞において内因的に細胞上に発現されたかまたは遺伝子組換えにより発現されたが、細菌細胞中に発現されたかまたは単離されたおよび変性されたのではないFc γ RIIBまたはFc γ RIIAを意味する。本発明のある特定の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、Fc γ RIIAと結合する親和性より少なくとも2倍大きい親和性でFc γ RIIBと結合する。本発明の他の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは、Fc γ RIIAと結合する親和性より少なくとも4倍、少なくとも6倍、少な

50

くとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも 10^4 倍、少なくとも 10^5 倍、少なくとも 10^6 倍、少なくとも 10^7 倍、または少なくとも 10^8 倍大きい親和性でFc γ RIIBと結合する。好ましい実施形態においては、上記抗体またはそのフラグメントは、Fc γ RIIAと結合する親和性より100倍、1000倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍、または 10^8 倍大きい親和性でFc γ RIIBと結合する。好ましくは、これらの結合親和性は、凝集IgGでなく単量体IgGにより決定され、結合は可変ドメインを経由する（例えば、Fabフラグメントは類似の結合特性を有する）。一実施形態においては、本発明の抗体は、Pulfordら、1986 Immunology 57:71-76に開示されたKB61と名付けられたモノクローナル抗体、またはWeinrichら、1996, Hybridoma 15:109-116に開示されたII8D2と名付けられたモノクローナル抗体ではない。他の特定の実施形態においては、本発明の抗体は、KD61またはII8D2と同じエピトープと結合しないおよび／または同じエピトープとの結合について競合しない。好ましくは、本発明の抗体は、Fc γ RIIB2アイソタイプの位置135～141に対応するアミノ配列SDPNFSIと結合しない。

10

【0034】

本発明は、当技術分野で公知の特異性を評価する標準的方法により決定して、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する単離された抗体またはそのフラグメントに関する。本発明は、例えば、ウェスタンブロットまたはラジオイムノアッセイにより決定して、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する単離された抗体またはそのフラグメントに関する。本発明は、例えば、Fc γ RIIB結合に対して直線範囲のELISAアッセイで決定して、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する単離された抗体またはそのフラグメントに関する。本発明の一実施形態において、本発明は、ELISAアッセイで決定してFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する単離された抗体またはそのフラグメントであって、細菌または哺乳類動物系で産生される上記抗体またはそのフラグメントに関する。

20

【0035】

特定の実施形態において、本発明は、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する単離された抗体またはそのフラグメントであって、上記抗体の定常ドメインはさらに少なくとも1以上のFc活性化受容体に対して増強された親和性を有する上記抗体またはそのフラグメントに関する。さらに他の特定の実施形態においては、上記Fc活性化受容体はFc γ RIIIである。

30

【0036】

本発明の一実施形態においては、上記抗体またはそのフラグメントはFc γ RIIBのIgG結合部位をブロックし、例えばブロッキングELISAアッセイにおいて、凝集した標識されたIgGのFc γ RIIBとの結合をブロックする。或る特定の実施形態においては、上記抗体またはそのフラグメントは、ELISAブロッキングアッセイにおいて、凝集した標識されたIgGの結合を、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または99.9%だけブロックする。さらに他の特定の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントは上記ELISAアッセイにおいて、上記凝集した標識されたIgGの結合を完全にブロックする。

【0037】

本発明の他の実施形態においては、上記抗体またはそのフラグメントは、Fc γ RIIBのIgG結合部位をブロックし、二重染色FACSアッセイで測定して、上記凝集した標識されたIgGのFc γ RIIBとの結合をブロックする。

40

【0038】

本発明は、Fc γ RIIBの活性をモジュレートする（すなわち、作動する（agonize）かまたは拮抗する（antagonize））抗体の使用を包含する。本発明の一実施形態においては、本発明の抗体はFc γ RIIBの少なくとも1つの活性を作動する、すなわちシグナル伝達を誘発する。作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の作動性抗体は、Fc γ Rライゲーションに対する活性化応答の鈍化および細胞応答の抑制をもたらすFc γ RIIBのクラスター形成を模倣してもよい。

【0039】

50

本発明の他の実施形態においては、本発明の抗体は少なくともFc γ RIIBの少なくとも1つの活性を拮抗し、すなわち、シグナル伝達をブロックする。例えば、本発明の抗体は凝集IgGのFc γ RIIBとの結合をブロックする。

【0040】

本発明は、Fc ϵ RIが誘導する肥満細胞活性化を抑制する抗体を提供する。本発明はさらに、単球細胞においてFc γ RIIAを介するマクロファージ活性化を抑制する抗Fc γ RIIB抗体を提供する。本発明はまた、B細胞受容体を介するシグナル伝達を抑制する抗Fc γ RIIB抗体も提供する。

【0041】

或る特定の実施形態においては、抗Fc γ RIIB抗体はFc γ RIIBのリガンド結合部位をブロックする。さらなる特定の実施形態においては、ブロッキング活性は免疫複合体がトリガーする活性化のネガティブ調節をブロックし、その結果、免疫応答を増強することができる。さらなる特定の実施形態においては、免疫応答の増強は抗体依存細胞応答を増加する。他の特定の実施形態においては、本発明の抗Fc γ RIIB抗体はFc γ RIIB受容体のB細胞および／またはFc受容体との架橋をブロックし、B細胞、肥満細胞、樹状細胞、またはマクロファージを活性化する。

【0042】

本発明は、Fc γ RIIAと比較してFc γ RIIBに対する特異性をもつ新規のモノクローナル抗体の産生を包含する。特に本発明は、Fc γ RIIA、特にヒトFc γ RIIAと結合するより大きい親和性で、Fc γ RIIB、特にヒトFc γ RIIBと特異的に結合する抗Fc γ RIIBモノクローナル抗体を産生する方法であって、(a) 1以上のFc γ RIIAトランスジェニックマウスを、精製したFc γ RIIBまたはその免疫原性フラグメントを用いて免疫感作するステップ；(b) 上記1以上のマウスの脾細胞からハイブリドーマ培養細胞株を作るステップ；(c) 上記ハイブリドーマ培養細胞株を、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体を産生する1以上のハイブリドーマ培養細胞株についてスクリーニングするステップを含む上記方法を提供する。本発明は上記方法により産生されるいずれの抗体も包含する。或る特定の実施形態において、本発明は、Fc γ RIIA、特にヒトFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIB、特にヒトFc γ RIIBと特異的に結合する抗Fc γ RIIBモノクローナル抗体を産生する方法であって、(a) 1以上のFc γ RIIAトランスジェニックマウスを、精製したFc γ RIIBまたはその免疫原性フラグメントを用いて免疫感作するステップ；(b) 上記マウスを、免疫応答を誘発するために十分な時間追加免疫感作するステップ；(c) 上記1以上のマウスの脾細胞からハイブリドーマ培養細胞株を作るステップ；(d) 上記ハイブリドーマ培養細胞株を、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体を産生する1以上のハイブリドーマ培養細胞株についてスクリーニングするステップを含む上記方法を提供する。好ましくは実施形態においては、上記マウスを少なくとも4ヶ月の期間にわたって4回追加免疫感作する。本発明の一実施形態においては、上記マウスの免疫応答を増強することが当技術分野で公知のアジュバントと混合しておいた精製したFc γ RIIBを用いて、上記マウスを免疫感作する。本発明の或る特定の実施形態においては、上記免疫原性フラグメントはFc γ RIIBの可溶性細胞外ドメインである。ハイブリドーマ培養細胞株は、当技術分野で公知の標準技術（例えば、ELISA）を用いてスクリーニングすることができる。

【0043】

好ましい実施形態において、本発明は、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるモノクローナル抗体を提供する。他の実施形態において、本発明は、クローン2B6または3H7により産生されるモノクローナル抗体と結合を競合しかつFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと結合するおよび／またはクローン2B6または3H7により産生されるモノクローナル抗体と同じFc γ RIIBのエピトープと結合しかつFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと結合する、単離された抗体またはそのフラグメントを提供する。さらに本発明はそれぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するハイブリドーマ培養細胞株2B6または3H7を提供する。

【0044】

本発明の方法はまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドも包含する。一実施形態において、本発明は、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの重鎖または軽鎖をコードする単離された核酸配列を提供する。本発明はまた、上記核酸を含むベクターにも関する。本発明はさらに重鎖をコードする第1の核酸分子および軽鎖をコードする第2の核酸分子を含むベクターであって、上記重鎖および軽鎖がFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの重鎖および軽鎖である上記ベクターを提供する。或る特定の実施形態においては上記ベクターは発現ベクターである。本発明はさらに、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドのベクターを含有する宿主細胞を提供する。好ましくは、本発明は、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有する寄託したハイブリドーマクローンにより産生される抗体の重鎖および軽鎖またはその部分、例えば、CDR、可変ドメインなどをコードするポリヌクレオチドを包含する。

10

【0045】

本発明はさらに、本発明の抗体またはそのフラグメントを産生する方法も提供する。本発明の抗体またはそのフラグメントは当技術分野で公知の抗体を産生する方法により、特に、培養ハイブリドーマ細胞からの分泌により、化学合成により、または当技術分野で公知の遺伝子組換え発現技術により産生することができる。或る特定の実施形態において、本発明は、Fc γ RIIB特異的抗体を遺伝子組換えにより産生する方法であって、(i)異種プロモーターと機能しうる形で連結された第1の核酸分子およびそれと同じかまたは異なる異種プロモーターと機能しうる形で連結された第2の核酸を含有する宿主細胞を培地中で上記抗体を発現するために好適な条件下で培養するステップであって、上記第1の核酸および第2の核酸がFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの重鎖および軽鎖をそれぞれコードする上記ステップ；および(ii)上記培地から上記抗体を回収するステップを含む上記方法に関する。

20

【0046】

好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体、そしてさらに好ましくは、ヒト化またはヒト抗体である。或る特定の実施形態においては、本発明の抗体はヒトFc γ RIIBの細胞外ドメインと結合する。他の特定の実施形態においては、本発明の抗体は特異的にまたは選択的にFc γ RIIBの1以上のエピトープを認識する。本発明の他の実施形態は、Fc γ RIIBに対する本発明の抗体の親和性を増加するためのファージディスプレイ技術の使用を包含する。当技術分野で公知のいずれのスクリーニング方法（例えば、ELISA）を利用して、増加したFc γ RIIBに対するアビディティを有する突然変異抗体を同定してもよい。他の特定の実施形態においては、本発明の抗体を、当技術分野で周知の抗体スクリーニングアッセイ（例えば、BIACOREアッセイ）を用いてスクリーニングし、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} 速度を有する抗体を同定する。

30

【0047】

本発明は、生物学的サンプル中のFc γ RIIBの存在を特異的に検出する（すなわち、Fc γ RIIBを検出するがFc γ RIIAを検出しない）ための本発明の抗体の使用を包含する。

【0048】

活性化および抑制Fc受容体、例えば、Fc γ RIIAおよびFc γ RIIBは、これらの受容体のバランスがとれた機能および好適な細胞免疫応答にとって極めて重要である。本発明は、Fc受容体シグナル伝達経路におけるこのようなバランスおよび調節制御の喪失に関連する疾患を治療するための本発明の抗体の使用を包含する。従って、本発明のFc γ RIIB抗体は免疫応答を調節する上での、例えば自己免疫性もしくは炎症性疾患またはアレルギー応答に関係する免疫応答を抑制する上での用途を有する。本発明のFc γ RIIB抗体はまた、例えば治療抗体を介する細胞傷害性を増強するある特定のエフェクター機能を改変するために使用することもできる。

40

【0049】

本発明の抗体は、例えば、一実施形態においては、単一薬物治療法として癌を予防また

50

は治療するために有用である。本発明の一実施形態においては、本発明の抗体はB細胞悪性腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫または慢性リンパ性白血病を予防または治療するために有用である。他の実施形態においては、本発明の抗体は、癌を予防または治療するために、特に細胞障害性をもつ癌抗原特異的治療抗体の細胞傷害性活性を強化して腫瘍細胞死滅を増強するおよび／または抗体依存性細胞傷害性細胞（「ADCC」）活性、補体依存性細胞傷害性（「CDC」）活性、または治療抗体の食作用を増強する上で有用である。本発明は、癌抗原により特徴付けられる癌を有する患者における癌を治療する方法であって、上記患者に治療上有効な量の、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する第1の抗体またはそのフラグメント、および上記癌抗原と特異的に結合し細胞傷害性である第2の抗体を投与することを含む上記方法を提供する。本発明はまた、癌抗原により特徴付けられる癌を有する患者における癌を治療する方法であって、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合しかつ、抗体が単量体であるときは、その定常ドメインがさらに1以上のFc活性化受容体、例えばFc γ RIIIAに対して増加した親和性を有する抗体またはそのフラグメント、および上記癌抗原と特異的に結合し細胞傷害性である抗体の治療上有効な量を、上記患者に投与することを含む、上記方法を提供する。ある特定の実施形態においては、上記Fc活性化受容体はFc γ RIIIAである。

10

【0050】

他の実施形態において、本発明は、細胞傷害性抗体を用いて治療する被験者において抗体を介する細胞傷害性効果を増強する方法であって、本発明の抗体またはそのフラグメントを上記細胞傷害性抗体の細胞傷害性効果を増強するのに十分な量だけ上記患者に投与することを含む、上記方法を提供する。さらに他の実施形態において、本発明は、細胞傷害性抗体を用いて治療する被験者において抗体を介する細胞傷害性効果を増強する方法であって、抗体が単量体であるときは、さらにFc活性化受容体に対して増強された親和性を有する本発明の抗体またはそのフラグメントを、上記細胞傷害性抗体の細胞傷害性効果を増強するのに十分な量だけ上記患者に投与することを含む、上記方法を提供する。さらに他の実施形態において、本発明は、さらに1以上のさらなる癌治療の実施を含む方法を提供する。

20

【0051】

本発明はさらに、(i)Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの治療上有効な量；および(ii)製薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、(i)Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの治療上有効な量；および(i)癌抗原と特異的に結合する細胞傷害性抗体；および(iii)製薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

30

【0052】

本発明は、本発明の抗体の使用であって、細胞を死滅させて抗体の治療活性を増強することを介してその治療効果を媒介するいずれかの治療抗体と組合わせての上記使用を包含する。ある特定の実施形態においては、本発明の抗体は、抗体を介するエフェクター機能を増強することにより抗体の治療活性を増強する。本発明の他の実施形態においては、本発明の抗体は、食作用および標的の腫瘍細胞のオプソニン作用を増強することにより細胞傷害性抗体の治療活性を強化する。本発明のさらに他の実施形態においては、本発明の抗体は、標的腫瘍細胞の破壊における抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（「ADCC」）を増強することにより抗体の治療活性を強化する。

40

【0053】

複数の実施形態において、本発明は、本発明の抗体の使用であって、細胞を死滅させて抗体の治療活性を増強することを介してその治療効果を媒介しない治療抗体と組合わせての上記使用を包含する。特定の実施形態において、本発明は、本発明の抗体の、作動活性をもつ治療用アポトーシス誘導抗体、例えば抗Fas抗体と組合わせての使用を包含する。治療用アポトーシス誘導抗体は、当技術分野で公知のアポトーシス経路をモジュレートするいずれかの死受容体、例えばTNFR受容体ファミリーメンバーに特異的であってもよい。

50

【0054】

本発明は、マクロファージを介する腫瘍細胞進行および転移をブロックするための本発明の抗体の利用を包含する。本発明の抗体は、マクロファージ浸潤が起こる固体腫瘍の治療に特に有用である。本発明の拮抗性抗体は、腫瘍部位に局在化するマクロファージの集団を低減または排除することにより、腫瘍細胞転移を制御、例えば低減または排除するのに特に有用である。本発明はさらに、マクロファージ以外のFc γ RIIBを発現する免疫エフェクター細胞、例えば樹状細胞を効果的に枯渇させるかまたは排除する抗体を包含する。本発明の抗体を用いる免疫エフェクター細胞の効果的枯渇または排除は、エフェクター細胞の集団の50%、60%、70%、80%、好ましくは90%、そして最も好ましくは99%だけの低減である。

10

【0055】

複数の実施形態において、本発明の作動性抗体は、黒色腫細胞の腫瘍を含む非造血性起源の腫瘍を治療するのに特に有用である。複数の実施形態において、本発明は、本発明の抗体の使用であって、腫瘍細胞それ自身の上に発現されないが腫瘍間質を含む周囲の反応性および腫瘍を支持する非悪性腫瘍細胞上に発現される腫瘍抗原と免疫特異的に結合する治療抗体と組合わせての上記使用を包含する。好ましい実施形態においては、本発明の抗体は、線維芽細胞上の腫瘍抗原、例えば線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）と免疫特異的に結合する抗体と組合わせて使用される。

【0056】

本発明は、それを必要とする患者の自己免疫障害を治療する方法であって、上記患者に1以上の本発明の抗体の治療上有効な量を投与することを含む上記方法を提供する。本発明はまたそれを必要とする患者の自己免疫障害を治療する方法であって、さらに上記患者に1以上の抗炎症薬、および／または1以上の免疫調節薬の治療上有効な量を投与することを含む上記方法も提供する。

20

【0057】

本発明はまた、それを必要とする患者の炎症性障害を治療する方法であって、上記患者に1以上の本発明の抗体の治療上有効な量を投与することを含む上記方法も提供する。本発明はまた、それを必要とする患者の炎症性障害を治療する方法であって、さらに上記患者に1以上の抗炎症薬、および／または1以上の免疫調節薬の治療上有効な量を投与することを含む上記方法も提供する。

30

【0058】

本発明は、被験者におけるワクチン組成物に対する免疫応答を増強する方法であって、上記被験者に、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントおよびワクチン組成物を、上記抗体またはそのフラグメントが上記被験者において上記ワクチン組成物に対する免疫応答を増強するために有効な量だけ投与されるように、投与することを含む上記方法を提供する。本発明の抗体を用いて、ワクチン組成物の抗原に対する体液性および／または細胞媒介応答を増強することができる。本発明の抗体は当技術分野で公知のいずれのワクチンと組合わせて使用してもよい。本発明は、特定の障害を予防または治療するための本発明の抗体の使用であって、特定の抗原または抗原に対する増強された免疫応答が疾患または障害を治療または予防するために有効である上記使用を包含する。

40

【0059】

本発明はまた、感染病原体に対する免疫治療を増強する方法であって、本発明の抗体を既に病原体、例えばHIVまたはHSVに感染している患者に投与して感染した細胞のオプソニン作用および食作用を増強する上記方法も提供する。

【0060】

本発明は、障害性アポトーシスを介するシグナル伝達を伴う疾患、例えば癌、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、欠乏Fasを介するアポトーシスを伴う疾患を治療する方法であって、本発明の抗体を抗Fas抗体と組合わせて投与することを含む上記方法を包含する。

50

【0061】

他の実施形態において、本発明は、被験者における自己免疫疾患を診断する方法であって、(i)上記被験者からの生物学的サンプルを有効量の本発明の抗体と接触させるステップ；および(ii)上記抗体またはそのフラグメントの結合を検出し、バックグラウンドまたは標準レベルを超える上記検出可能なマーカーの検出は上記被験者が自己免疫疾患を有することを示すとするステップを含む上記方法を提供する。

【0062】

本発明はさらに、その必要がある患者におけるIgE媒介アレルギー障害を治療または予防する方法であって、上記患者に本発明の作動性抗体の治療上有効な量を投与することを含む上記方法も提供する。本発明はまた、その必要がある患者におけるIgEを介するアレルギー障害を治療または予防する方法であって、上記患者に本発明の抗体を、IgEを介するアレルギー障害を治療または予防するために使用される他の治療抗体またはワクチン組成物と合わせて投与することを含む上記方法も提供する。

【0063】

3.1 定義

本明細書に使用される用語「Fc γ RIIBと特異的に結合する」および類似の用語は、Fc γ RIIBまたはそのフラグメントと特異的に結合しかつ他のFc受容体、特にFc γ RIIAと結合しない抗体またはそのフラグメントを意味する。さらに、当業者は、Fc γ RIIBと特異的に結合する抗体はその抗体の可変ドメインまたは定常ドメインを介して結合しうることを理解する。もしFc γ RIIBと特異的に結合する抗体がその可変ドメインを介して結合すれば、当業者は、それは凝集していない、すなわち単量体であることを理解する。Fc γ RIIBと特異的に結合する抗体は、例えばイムノアッセイ、BIAcore、または当技術分野で公知の他のアッセイにより測定して、他のペプチドまたはポリペプチドとより低い親和性で結合しうる。好ましくは、Fc γ RIIBまたはそのフラグメントと特異的に結合する抗体またはフラグメントは他の抗原と交差反応しない。Fc γ RIIBと特異的に結合する抗体またはフラグメントは、例えば、イムノアッセイ、BIAcore、または当技術分野で公知の他のアッセイにより同定することができる。抗体またはそのフラグメントは、実験技術、例えばウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ(RIA)および酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を用いて測定して、いずれの交差反応性抗原よりも高い親和性でFc γ RIIBと結合する場合、Fc γ RIIBと特異的に結合する。抗体特異性に関する考察は、例えば、Paul, 編, 1989, 「基礎免疫学、第2版(Fundamental Immunology Second Edition)」, Raven Press, New York p.332-336を参照。

【0064】

本明細書に使用される用語「抗体」は、モノクローナル、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化(camelized)抗体、1本鎖Fv(scFv)、1本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、細胞内発現抗体(intrabody)、および抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Idおよび抗-抗Id抗体を含む)、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを意味する。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性フラグメント、すなわち、抗原結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子はいずれのタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IGA₁およびIgA₂)またはサブクラスであってもよい。

【0065】

本明細書に使用される、ポリペプチドまたはタンパク質の文脈での用語「誘導体」は、アミノ酸残基置換、欠失または付加の導入により改変されているアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはタンパク質を意味する。本明細書に使用される用語「誘導体」はまた、改変されている、すなわち、いずれかのタイプの分子のポリペプチドまたはタンパク質との共有結合により改変されているポリペプチドまたはタンパク質を意味する。例えば、限定されるものではないが、抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガン

ドまたは他のタンパク質との結合などにより改変することができる。誘導体ポリペプチドまたはタンパク質は、限定されるものでないが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む当業者に公知の技術を用いる化学修飾により作ることができる。さらに、誘導体ポリペプチドまたはタンパク質誘導体は、それが誘導された元のポリペプチドまたはタンパク質と類似のまたは同一の機能を持つ。

【0066】

本明細書に使用される、非タンパク質誘導体の文脈での用語「誘導体」は、第1の有機または無機分子の構造に基づいて形成された第2の有機または無機分子を意味する。有機分子の誘導体は、限定されるものでないが、例えば、ヒドロキシル、メチル、エチル、カルボキシルまたはアミン基の付加または欠失により改変された分子を含む。有機分子はまたエステル化、アルキル化および／またはリン酸化されてもよい。

10

【0067】

本明細書に使用される用語「障害」および「疾患」は互換的に使用され、被験者の症状を意味する。特に、用語「自己免疫疾患」は「自己免疫障害」と互換的に使用され、被験者自身の細胞、組織および／または器官に対する被験者の免疫学的反応によって生じた細胞、組織および／または器官傷害により特徴付けられる被験者の症状を意味する。用語「炎症性疾患」は用語「炎症性障害」と互換的に使用され、炎症、好ましくは慢性炎症により特徴付けられる被験者の症状を意味する。自己免疫障害は炎症を随伴してもしなくてもよい。さらに、炎症は自己免疫障害により生じてもしなくてもよい。従って、ある特定の障害は自己免疫と炎症性障害の両方により特徴付けられてもよい。

20

【0068】

本明細書に使用される用語「癌」は、細胞の異常な無制御の増殖から生じる新生物または腫瘍を意味する。本明細書に使用される、癌は明確に白血病およびリンパ腫を含む。複数の実施形態において、癌は局在したまま残る良性腫瘍を意味する。他の実施形態において、癌は近隣の身体構造に侵入しかつ破壊しそして遠隔部位に広がる悪性腫瘍を意味する。複数の実施形態においては、癌は特定の癌抗原を随伴する。

【0069】

本明細書に使用される用語「免疫調節薬 (immunomodulatory agent)」と、限定されるものでないが、免疫調節薬 (immunomodulatory agents) を含むその変化は、宿主の免疫系をモジュレートする薬物を意味する。ある特定の実施形態においては、免疫調節薬は免疫抑制薬である。ある特定の実施形態においては、免疫調節薬は免疫刺激薬である。免疫調節薬は、限定されるものでないが、小分子、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、無機分子、模倣薬、および有機分子を含む。

30

【0070】

本明細書に使用される用語「エピトープ」は、動物、好ましくは哺乳類動物、そして最も好ましくはヒトにおいて、抗原性または免疫原性活性を有するポリペプチドまたはタンパク質の断片を意味する。免疫原性活性を有するエピトープは、動物における抗体応答を誘発するポリペプチドまたはタンパク質の断片である。抗原性活性を有するエピトープは、当業者に周知の方法、例えばイムノアッセイにより確認される、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチドまたはタンパク質の断片である。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。

40

【0071】

本明細書に使用される用語「断片」は、他のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5連続アミノ酸残基、少なくとも10連続アミノ酸残基、少なくとも15連続アミノ酸残基、少なくとも20連続アミノ酸残基、少なくとも25連続アミノ酸残基、少なくとも40連続アミノ酸残基、少なくとも50連続アミノ酸残基、少なくとも60連続アミノ酸残基、少なくとも70連続アミノ酸残基、少なくとも80連続アミノ酸残基、少なくとも90連続アミノ酸残基、少なくとも100連続アミノ酸残基、少なくとも125連続アミノ酸残基、少なくとも150連続アミノ酸残基、少なくとも175連続アミノ酸残基、少なくとも200連続アミノ酸残基、または少なくとも250連続アミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチド

50

を意味する。特定の実施形態においては、ポリペプチドの断片は、そのポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

【0072】

本明細書に使用される用語「核酸」および「ヌクレオチド配列」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、DNAおよびRNA分子の組合わせまたはハイブリッドDNA/RNA分子、およびDNAまたはRNA分子の類似体を含む。このような類似体は、例えば、限定されるものでないが、イノシンまたはトリチル化塩基を含むヌクレオチド類似体を用いて作製することができる。このような類似体はまた、分子に有益な属性、例えばヌクレアーゼ耐性または細胞膜を通過する能力の増加を与える改変された主鎖を有するDNAまたはRNA分子を含んでもよい。核酸またはヌクレオチド配列は1本鎖、2本鎖であって、1本鎖と2本鎖の両方の部分を含有してもよく、そして3本鎖部分を含有してもよい、しかし好ましくは2本鎖DNAである。

10

【0073】

本明細書に使用される「治療上有効な量」は、Fc γ RIIBに関連する疾患または障害およびFc受容体シグナル伝達経路の調節の喪失に関する疾患を治療または管理するためにまたは他の治療法、例えば、治療抗体、ワクチン治療法などの治療効力を増強するために十分な治療薬の量を意味する。治療上有効な量は、疾患の発症を遅延または最小限にする、例えば癌の拡大を遅延または最小限にするために十分な治療薬の量を意味してもよい。治療上有効な量は、疾患の治療または管理における治療上の利益を与える治療薬の量を意味してもよい。さらに、本発明の治療薬についての治療上有効な量は、疾患の治療または管理における治療上の利益を与える、例えば、疾患を治療または管理するのに十分な治療抗体の治療効力を増強するために十分な、治療薬単独の量、または他の治療法と組合わせての量を意味する。本発明のFc γ RIIB抗体の量に関係して用いる場合、この用語は、全体の治療を改善し、欲しない効果を軽減するかまたは回避し、または他の治療薬との相乗による治療効力を増強する量も包含しうる。

20

【0074】

本明細書に使用される用語「予防薬」は、障害の予防に、または障害の再発または拡大の予防に使用される薬物を意味する。予防上有効な量は、過剰増殖性疾患、特に癌の再発または拡大、または限定されるものでないが、過剰増殖性疾患の素因がある、例えば、遺伝的に癌の素因があるまたは先に発癌物質に曝された患者を含む、患者におけるそれらの発生を予防するために十分な予防薬の量を意味してもよい。予防上有効な量はまた、疾患の予防において予防上の利益を与える予防薬の量を意味してもよい。さらに、本発明の予防薬に関する予防上有効な量は、疾患の予防において予防上の利益を与える予防薬単独のまたは他の薬物と組合わせての量を意味する。本発明のFc γ RIIB抗体の量に関係して用いる場合、この用語は、全体の予防を改善しまたは予防効力または他の予防薬、例えば、限定されるものでないが、治療抗体との相乗を増強する量も包含しうる。

30

【0075】

本明細書に使用される用語「予防」は、予防薬または治療薬の投与から得られる、被験者における障害の1以上の症候群の再発または発症の予防を意味する。

【0076】

本明細書に使用される用語「組合わせて (in combination)」は、2種以上の予防および／または治療薬の使用を意味する。用語「組合わせて」は、予防および／または治療薬を、障害のある被験者に投与する順序を制限しない。第1の予防薬または治療薬を投与した後（例えば5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週、または12週後）に、第2の予防薬または治療薬を、障害のある被験者に投与してもよい。

40

【0077】

4. 図面の簡単な説明

図面の簡単な説明は下記参照。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【0078】

5. 好ましい実施形態の説明

5.1 Fc γ RIIB特異的抗体

本発明は、Fc γ RIIA、好ましくは、ヒトFc γ RIIA、さらに好ましくは未変性ヒトFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIB、好ましくはヒトFc γ RIIB、さらに好ましくはヒト未変性Fc γ RIIBと特異的に結合する抗体（好ましくはモノクローナル抗体）またはその断片を包含する。好ましくは本発明の抗体は、未変性ヒトFc γ RIIBの細胞外ドメインと結合する。ある特定の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントはFc γ RIIBと、Fc γ RIIAと結合するより2倍、4倍、6倍、10倍、20倍、50倍、100倍、1000倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍、または 10^8 倍大きい親和性で結合する。1つの特定の実施形態においては、抗体は、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるマウスモノクローナル抗体である。本発明の抗体を産生するハイブリドーマは、特許手続上の微生物寄託国際的承認に関するブダペスト条約（Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedures）の条項のもとで、American Type Culture Collection（10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110）に2002年8月13日に寄託し、それぞれ受託番号PTA-4591およびPTA-4592のもとで受託されていて、これは本明細書に参照により組み入れられる。特定の実施形態において、本発明は配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖を持つ抗体を包含する。好ましい実施形態においては、本発明の抗体はヒトであるかまたはヒト化されていて、好ましくはクローン3H7または2B6により産生される抗体のヒト化バージョンである。さらに好ましい他の実施形態においては、本発明の抗体はさらにFc活性化受容体、例えば、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIBなどと結合しない。

【0079】

特定の実施形態においては、本発明の抗体またはそのフラグメントはFc γ RIIBの少なくとも1つの活性を作動する。本発明の一実施形態においては、上記活性はB細胞受容体を介するシグナル伝達の抑制である。他の実施形態においては、本発明の作動性抗体はB細胞の活性化、B細胞増殖、抗体産生、B細胞の細胞内カルシウム流入、細胞周期進行、またはFc γ RIIBシグナル伝達経路中の1以上の下流シグナル伝達分子の活性を抑制する。さらに他の実施形態においては、本発明の作動性抗体は、Fc γ RIIBのリン酸化またはSHIP補充を増強する。本発明のさらなる実施形態においては、作動性抗体はB細胞受容体を介するシグナル伝達経路におけるMAPキナーゼ活性またはAkt補充を抑制する。他の実施形態においては、本発明の作動性抗体は、Fc γ RIIBを介するFc ϵ RIシグナル伝達の抑制を作動する。特定の実施形態においては、上記抗体はFc ϵ RIが誘導する肥満細胞活性化、カルシウム動員、脱顆粒、サイトカイン産生、またはセロトニン放出を抑制する。他の実施形態においては、本発明の作動性抗体は、Fc γ RIIBのリン酸化を刺激し、SHIPの補充を刺激し、SHIPリン酸化およびそのShcとの会合を刺激し、またはMAPキナーゼファミリーメンバー（例えば、Erk1、Erk2、JNK、p38など）の活性化を抑制する。さらに他の実施形態においては、本発明の作動性抗体はp62dokのチロシンリン酸化およびそのSHIPおよびrasGAPとの会合を増強する。他の実施形態においては、本発明の作動性抗体は単球またはマクロファージのFc γ Rを介する食作用を抑制する。

【0080】

他の実施形態においては、本発明の抗体、またはそのフラグメントは、Fc γ RIIBの少なくとも1つの活性を拮抗する。一実施形態においては、上記活性はB細胞受容体を介するシグナル伝達の活性化である。特定の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体は、B細胞活性、B細胞増殖、抗体産生、細胞内カルシウム流入、またはFc γ RIIBシグナル伝達経路における1以上の下流シグナル伝達分子の活性を増強する。さらに他の特定の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体はFc γ RIIBのリン酸化またはSHIP補充を減少する。本発明のさらなる実施形態においては、拮抗性抗体はB細胞受容体を介するシグナル伝達経路におけるMAPキナーゼ活性またはAkt補充を増強する。他の実施形態においては、本発明の

拮抗性抗体はFc γ RIIBを介するFc ϵ RIシグナル伝達の抑制を拮抗する。特定の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体はFc ϵ RIが誘導する肥満細胞活性化、カルシウム動員、脱顆粒、サイトカイン産生、またはセロトニン放出を増強する。他の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体はFc γ RIIBのリン酸化を抑制し、SHIPの補充を抑制し、SHIPリン酸化およびそのShcとの会合を抑制し、MAPキナーゼファミリーメンバー（例えば、Erk1、Erk2、JNK、p38など）の活性化を増強する。さらに他の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体はp62dokのチロシンリン酸化およびそのSHIPおよびrasGAPとの会合を抑制する。他の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体はFc γ Rを介する単球またはマクロファージの食作用を増強する。他の実施形態においては、本発明の拮抗性抗体は脾臓マクロファージによるオプソニン化粒子の食作用、クリアランスを防止する。

10

【0081】

本発明の抗体は、限定されるものでないが、モノクローナル抗体、合成抗体、遺伝子組換えで作られた抗体、多特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、1本鎖Fv (scFv)、1本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、細胞内発現抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含む。特に、本発明の方法に使用される抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち、上記免疫グロブリン分子がFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を含む。

【0082】

20

本発明の方法に使用される抗体は、鳥類および哺乳類動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリ）を含むいずれの動物起源由来であってもよい。好ましくは、抗体はヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である。本明細書に使用される「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーまたは合成ヒト免疫グロブリンコード配列のライブラリーからまたはヒト遺伝子からの抗体を発現するマウスから単離された抗体を含む。

【0083】

本発明の方法に使用される抗体は単特異的、二特異的、三特異的またはさらに多特異的であってもよい。多特異的抗体はFc γ RIIBの様々なエピトープと免疫特異的に結合してもまたはFc γ RIIBのエピトープだけでなく異種エピトープ、例えば異種ポリペプチドまたは固体支持材料の両方と免疫特異的に結合してもよい。例えば、国際公開WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360、およびWO 92/05793；Tuttら、1991、J. Immunol. 147:60-69；米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号、および第5,601,819号；およびKostelnyら、1992、J. Immunol. 148:1547-1553；Todorovskaら、2001、Journal of Immunological Methods、248:47-66を参照。

30

【0084】

特定の実施形態においては、本発明の抗体は多特異的であって、Fc γ RIIBに対して、および癌抗原もしくは他の細胞表面マーカー（例えば特定の疾患もしくは障害を治療もしくは予防する上で死滅させるように設計した細胞に特異的な）に対して、または他のFc受容体（例えば、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIBなど）に対する特異性を備える。

40

【0085】

特定の実施形態においては、本発明の方法に使用される抗体は、ATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を持つクローン2B6または3H7によりそれぞれ産生される抗体またはその抗原結合フラグメント（例えば、1個以上の相補性決定領域（CDR）、好ましくは6個のCDR全てを含む）（例えば、重鎖CDR3）である。他の実施形態においては、本発明の方法に使用される抗体は、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を持つクローン2B6または3H7から産生されるマウスモノクローナル抗体と同じエピトープに結合しおよび／または、ELISAアッセイまたは他の適当な競合イムノアッセイにより測定して、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を持つクローン2B6または3H7から産生されるマウスモノ

50

クローナル抗体と競合し、そしてまた、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと結合する。

【0086】

本発明の方法に使用される抗体は、いずれかの型の分子の抗体との共有結合により改変された誘導体を含む。例えば、限定されるものでないが、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク分解性切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合などにより改変されている抗体を含む。多数の化学的修飾のいずれかを公知技術により実施してもよく、それらの技術は、限定されるものでないが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む。さらに、誘導体は1以上の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

10

【0087】

ヒトにおける抗体のin vivo用途およびin vitro検出アッセイを含む複数の用途では、ヒト、キメラまたはヒト化抗体を使用することが好ましいであろう。完全なヒト抗体がヒト被験者の治療処置には特に所望される。ヒト抗体は当技術分野で知られる様々な方法により作ることができ、それらは、ヒト免疫グロブリン配列から誘導された抗体ライブラリーを用いる上記のファージディスプレイ方法を含む。また米国特許第4,444,887号および第4,716,111号；および国際公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741も参照；これらはそれぞれ本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

20

【0088】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現できないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを用いて産生することができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を無作為に、相同組換えによりマウス胚幹細胞中に導入することができる。あるいは、ヒト可変域、定常域、および多様域を、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、マウス胚幹細胞中に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同的組換えによりヒト免疫グロブリン遺伝子座を別々にまたは同時に導入することにより無機能化することができる。特にJ_H域のホモ接合性欠失は内因性抗体産生を阻止する。改変された胚幹細胞を拡大して胚盤胞中にマイクロインジェクションしてキメラマウスを作る。次いでキメラマウスを育種して、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を作る。トランスジェニックマウスを通常の手法を用いて選択した抗原、例えば本発明のポリペプチドの全てまたは一部を用いて、免疫感作する。該抗原に対するモノクローナル抗体は免疫化トランスジェニックマウスから通常のハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスが抱くヒト免疫グロブリントランスジーンはB細胞分化中に再配置し、次いでクラススイッチングおよび体細胞突然変異を受ける。従って、このような技術を用いると、治療上有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生することが可能である。このヒト抗体を産生する技術の総括については、Lonberg およびHuszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる)を参照すること。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生させる技術ならびにこのような抗体を産生させるプロトコルの詳細な考察については、例えば、国際公開WO 98/24893、WO 96/34096、およびWO 96/33735；および米国特許第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号、および第5,939,598号を参照、これらは参照により本明細書にその全文が組み入れられる。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) およびMedarex (Princeton, NJ) などの会社は以上に記載したのと類似の技術を用いて選択した抗原に対するヒト抗体の提供を契約することができる。

30

40

【0089】

キメラ抗体は、抗体の色々な部分が色々な免疫グロブリン分子、例えば非ヒト抗体から誘導された可変域およびヒト免疫グロブリン定常域を有する抗体から誘導された分子である。キメラ抗体を産生させる方法は当技術分野で公知である。例えば、Morrison, 1985,

50

Science 229:1202 ; Oiら, 1986, BioTechniques 4:214 ; Gilliesら, 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202 ; および米国特許第6,311,415号、第5,807,715号、第4,816,567号、および第4,816,397号を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。非ヒト種からの1以上のCDRおよびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を含むキメラ抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて産生することができ、それらの技術は、例えばCDR-グラフト化 (EP 239,400 ; 国際公開WO 91/09967 ; および米国特許第5,225,539号、第5,530,101号および第5,585,089号)、ベニアリング (veneering) または再表面形成 (EP 592,106 ; EP519,596 ; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 ; Studnickaら, 1994, Protein Engineering 7:805 ; およびRoguskaら, 1994, PNAS 91:969)、およびチェーンシャッフリング (chain shuffling) (米国特許第5,565,332号)を含む。以上確認した参考文献は、本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

10

【0090】

しばしば、フレームワーク領域中のフレームワーク残基を、CDRドナー抗体からの対応する残基により置換して抗原結合を改変、好ましくは改善しうる。これらのフレームワーク置換は当技術分野で周知の方法により、例えばCDRとフレームワーク残基の相互作用をモデル化して抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定し、かつ配列を比較して特定位置の異常なフレームワーク残基を同定することにより、同定される (例えば、米国特許第5,585,089号 ; およびRiechmannら, 1988, Nature 332:323を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる)。

20

【0091】

ヒト化抗体は、所定の抗原と結合することができ、かつ実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワークおよび実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するCDRを含む抗体、変異体またはそのフラグメントである。ヒト化抗体は、全てのまたは実質的に全てのCDR域が非ヒト免疫グロブリン (すなわち、ドナー抗体) のCDR域に対応する少なくとも1個、典型的には2個の可変ドメインの全てを実質的に含み、かつ全てのまたは実質的に全てのフレームワーク域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク域である。好ましくは、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常域 (Fc) の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常域の部分も含む。通常、抗体は軽鎖、ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有しうる。抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4域を含んでもよい。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含むいずれかのクラスの免疫グロブリン、およびIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄を含むいずれかのアイソタイプから選択することができる。通常、定常ドメインは補体結合定常ドメインであり、ヒト化抗体が細胞傷害性活性を示しかつクラスは典型的にはIgG₁であることが所望される。そのような細胞傷害性活性が所望でない場合は、定常ドメインはIgG₂クラスであってもよい。ヒト化抗体は1種以上のクラスまたはアイソタイプからの配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化する特定の定常ドメインの選択は当業界の技術に包含される。ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR域は親配列、例えばドナーCDRと正確に対応する必要はなく、あるいは、コンセンサスフレームワークを少なくとも1つの残基の置換、挿入または欠失により突然変異させて、その部位におけるCDRまたはフレームワーク残基がコンセンサスまたはインポート抗体に対応しないようにしてもよい。しかし、このような突然変異は大規模なものではないであろう。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、さらにしばしば90%、そして最も好ましくは95%超が親フレームワーク域 (FR) およびCDR配列の残基に対応するであろう。ヒト化抗体は当技術分野で公知の様々な技術を用いて産生させることができ、それらの方法としては、限定されるものでないが、CDRグラフト化 (欧州特許EP 239,400 ; 国際公開WO 91/09967 ; および米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、および第5,585,089号)、ベニアリング (veneering) または最表面形成 (欧州特許EP592,106およびEP519,596 ; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28 (4/5):489-498 ; Studnickaら, 1994, Protein Engineering 7 (6):805-814 ; およびRoguskaら, 1994, PNAS 91:969-973)、チェーンシャッフリング (米国特許第

30

40

50

5,565,332号)、および例えば、米国特許第6,407,213号、第5,766,886号、第5,585,089号、国際公開WO 9317105、Tanら、2002、J. Immunol. 169:1119-25、Caldasら、2000、タンパク質 Eng. 13:353-60、Moreaら、2000、Methods 20:267-79、Bacaら、1997、J. Biol. Chem. 272:10678-84、Roguskaら、1996、Protein Eng. 9:895-904、Coutoら、1995、Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s、Coutoら、1995、Cancer Res. 55:1717-22、Sandhu、1994、Gene 150:409-10、Pedersenら、1994、J. Mol. Biol. 235:959-73、Jonesら、1986、Nature 321:522-525、Riechmannら、1988、Nature 332:323、ならびにPresta、1992、Curr. OP. Struct. Biol. 2:593-596に開示された技術を含む。しばしば、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基により置換して抗原結合を改変、好ましくは改善しうる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法により、例えばCDRとフレームワーク残基の相互作用をモデル化して抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を同定すること、および配列を比較して特定位置の異なるフレームワーク残基を同定することにより、同定される（例えば、米国特許第5,585,089号；およびRiechmannら、1988、Nature 332:323を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。

10

【0092】

さらに、当業者に周知の技術を利用し、本発明の抗体を順に用いて抗イディオタイプ抗体を作製することができる（例えば、Greenspan & Bona、1989、FASEB J. 7: 437-444；およびNissinoff、1991、J. Immunol. 147:2429-2438を参照）。本発明は、本発明の抗体またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの使用を用いる方法を提供する。

20

【0093】

本発明は、ラクダ化単ドメイン抗体を包含する（例えば、Muyldermansら、2001、Trends Biochem. Sci. 26:230；Nuttallら、2000、Cur. Pharm. Biotech. 1:253；ReichmannおよびMuyldermans、1999、J. Immunol. Meth. 231:25；国際公開WO 94/04678およびWO 94/25591；米国特許第6,005,079号；を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。一実施形態において、本発明は、単ドメイン抗体を形成するように改変を施した2つのVHドメインを含む単ドメイン抗体を提供する。

【0094】

本発明の方法はまた、哺乳類動物、好ましくはヒトにおいて、15日より長い、好ましくは20日より長い、25日より長い、30日より長い、35日より長い、40日より長い、45日より長い、2ヶ月より長い、3ヶ月より長い、4ヶ月より長い、または5ヶ月より長い半減期（例えば、血清半減期）を有する抗体またはそのフラグメントの使用を包含する。哺乳類動物、好ましくはヒトにおける本発明の抗体またはそのフラグメントのより長い半減期は、哺乳類動物における上記抗体または抗体フラグメントのより高い血清力価をもたらし、従って、上記抗体または抗体フラグメントの投与頻度を低減し、および／または投与すべき上記抗体または抗体フラグメントの濃度を低減する。in vivo半減期の増加した抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術により作製することができる。例えば、in vivo半減期の増加した抗体またはそのフラグメントは、FcドメインとFcRn受容体の間の相互作用に関わることが同定されているアミノ酸残基を改変する（例えば、置換、欠失または付加することにより作製することができる。本発明の抗体は、Wardら（米国特許第6,277,375 B1号を参照）に記載された生物学的半減期を増加する方法により遺伝子操作することができる。例えば、本発明の抗体をFc-ヒンジドメインで遺伝子操作してin vivoまたは血清半減期を増加することができる。

30

40

【0095】

半減期の増加した抗体またはそのフラグメントは、上記抗体または抗体フラグメントにポリマー分子、例えば高分子量ポリエチレングリコール（PEG）を結合することにより作製することができる。PEGを上記抗体または抗体フラグメントに、多機能性リンカーを用いてまたは用いなくて、上記抗体または抗体フラグメントのN-またはC-末端にPEGの部位特異的複合を介して、またはリシン残基上のε-アミノ基を経由して結合することができ

50

る。生物学的活性の消失を最小限にする直鎖または分枝ポリマー誘導体化を利用する。複合の程度をSDS-PAGEおよび質量分析計によりによりきめ細かくモニターして、PEG分子と抗体の適当な複合を保証する。未反応PEGは抗体-PEG複合体から例えば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィにより分離することができる。

【0096】

本発明の抗体はまた、哺乳類動物循環系中に実質的に免疫原性応答無しに注入できる組成物を得るために、Davisら（米国特許第4,179,337号を参照）に記載の方法およびカップリング剤により改変してもよい。

【0097】

本発明はまた、フレームワークまたは可変域に突然変異（例えば、1以上のアミノ酸置換）をもつ本発明の抗体のいずれかのアミノ酸配列を含む抗体または抗体フラグメントの使用も包含する。好ましくは、これらの抗体の突然変異は、免疫特異的に結合する特定の抗原に対する抗体のアビディティおよび／または親和性を維持するかまたは増強する。当業者に公知の標準技術（例えば、イムノアッセイ）を用いて特定の抗原に対する抗体の親和性をアッセイすることができる。

【0098】

本発明は、好ましくは、Fc域に抗体の1以上のFc γ Rとの結合親和性を変化させる改変を含む抗体を包含する。1以上のFc γ Rと変化した結合親和性をもつ抗体を改変する方法は当技術分野で公知であり、例えば、PCT公開公報WO 99/58572、WO 99/51642、WO 8/23289、WO 89/07142、WO 88/07089、ならびに米国特許第5,843,597号および第5,642,821号を参照すること、これらはそれぞれ本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。本発明は、2003年1月9日出願の米国特許出願第60/439,498号、および2003年3月19日出願の米国特許出願第60/456,041号に開示された突然変異をいずれも包含し、これらはそれぞれ本明細書に参照により組み入れられる。いくつかの実施形態において、本発明は、Fc γ R、例えば、Fc γ RIIIAを活性化する親和性が変化した抗体を包含する。好ましくは、このような改変はまた、Fcを介するエフェクター機能の変化も有する。Fcを介するエフェクター機能に影響を与える改変は当技術分野では周知である（米国特許第6,194,551号を参照、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。本発明の方法に従って改変することができるアミノ酸は、限定されるものでないが、プロリン329、プロリン331、およびリシン322を含む。好ましくは、プロリン329、331およびリシン322をアラニンにより置換するが、いずれか他のアミノ酸による置換も意図される。国際公開WO 00/42072および米国特許第6,194,551号を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

【0099】

ある特定の実施形態においては、Fc域の改変はFc域の1以上の突然変異を含む。Fc域の1以上の突然変異は改変された抗体を介するエフェクター機能、他のFc受容体（例えば、Fc活性化受容体）との改変された結合、改変されたADCC活性、または改変されたC1q結合活性、または改変された補体依存細胞傷害活性、またはそれらのいずれかの組み合わせをもつ抗体をもたらす。

【0100】

本発明はまた、変化したオリゴ糖含量をもつ抗体も提供する。本明細書に使用されるオリゴ糖は、2以上の単純な糖類を含有する糖鎖を意味し、本明細書においてこれらの2つの用語は互換的に使用することができる。本発明の糖鎖部分は、当技術分野で一般的に使用される命名法を参照して記載される。糖鎖化学の総説については、例えば、Hubbardら、1981 Ann. Rev. Biochem., 50:555-583を参照、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。この命名法では、例えば、Manはマンノースを表し；GlcNacは2-N-アセチルグルコサミンを表し；Galはガラクトースを表し；Fucはフコースを表し、そしてGlcはグルコースを表す。シアル酸は短縮記号により記載され、NeuNacが5-N-アセチルノイラミン酸、そしてNeuNGcが5-グリコールノイラミン酸を表す。

【0101】

一般的に、抗体は糖鎖成分を重鎖定常域の保存された位置に含有し、ヒトIgGの30%まではグリコシル化Fab域を有する。IgGは単一のN結合したAsn297(CH2ドメインに存在する)において2本アンテナ(biantennary)の糖鎖構造を有する(Jefferisら, 1998, Immunol. Rev. 163:59-76; Wrightら, 1997, Trends Biotech 15:26-32)。ヒトIgGは典型的には次の構造の糖鎖を有する: GlcNAc(フコース)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)₂。しかし、IgG間で糖鎖含量に変動があり、これが機能の変化をもたらす、例えば、Jassalら, 2001 Bi chem. Biophys. Res. Commun. 288:243-9; Groeninkら, 1996 J. Immunol. 26:1404-7; Boydら, 1995 Mol. Immunol. 32:1311-8; Kumpelら, 1994, Human Antibody Hybridomas, 5: 143-51を参照。本発明は、Asn297に結合した糖鎖成分に変化のある抗体を包含する。一実施形態においては、糖鎖成分は末端GlcNAcの片方または両方および/または第3のGlcNAcアーム(2等分するGlcNAc)にガラクトースおよび/またはガラクトース-シアル酸を有する。

【0102】

いくつかの実施形態においては、本発明の抗体は実質的に1以上の選択された糖基を含まず、例えば、1以上のシアル酸残基、1以上のガラクトース残基、1以上のフコース残基を含まない。実質的に1以上の選択された糖基を含まない抗体は、当業者に公知の通常の方法を用いて調製することができ、その方法は、選択された糖基を糖鎖成分に付加する能力を欠く宿主細胞中に例えば遺伝子組換えにより抗体の本発明の抗体を産生させ、組成物の抗体の約90~100%が糖鎖成分と結合した選択された糖基を欠くようにする方法を含む。このような抗体を調製するための代替の方法は、例えば、1以上の選択された糖基の付加を防止または低下する条件のもとでの細胞の培養、または1以上の選択された糖基の翻訳後の除去を含む。

【0103】

特定の実施形態において、本発明は組成中の抗体の約80-100%がその糖鎖成分上に、例えば、Asn297上に糖鎖結合フコースを欠くことを特徴とする、実質的に均一な抗体調製物を産生する方法を包含する。該抗体は、例えば、(a)フコース代謝に欠陥がありそこに発現されるタンパク質をフコシル化する能力の低下した、遺伝子操作で作った宿主細胞の使用; (b)フコシル化を防止または低減する条件のもとでの細胞の培養; (c)例えばフコシダーゼ酵素を用いるフコース翻訳後の除去; または(d)フコシル化されていない産物を選択する抗体の精製、により調製することができる。最も好ましくは、所望の抗体をコードする核酸を、そこに発現される抗体をフコシル化する能力の低下した宿主細胞において発現させることである。好ましい宿主細胞は、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細胞(CHO)、例えば、Lec13 CHO細胞(レクチン耐性CHO突然変異培養細胞株; Ribka & Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1):51-62; Ripkaら, 1986 Arch. Biochem. Biophys. 249(2):533-45)、CHO-K1、DUX-B11、CHO-DP12またはCHO-DG44であって、これらは抗体が実質的にフコシル化されないように改変されている。このように、細胞がフコシルトランスフェラーゼ酵素、または他の酵素、またはフコースをN結合オリゴ糖へ添加するのに関わる基質の改変された発現および/または活性を提示して、その結果、酵素が細胞中で低減した活性および/または低下した発現レベルを有するようにしてもよい。フコース含量の変化した抗体を産生する方法については、例えば、WO 03/035835およびShieldsら, 2002, J. Biol. Chem. 277 (30):26733-40を参照; 両方とも本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

【0104】

いくつかの実施形態においては、糖鎖修飾の変化は、次の1以上をモジュレートする: 抗体の可溶化、抗体のサブ細胞輸送および分泌の亢進、抗体アセンブリーの促進、コンフォメーション純度および抗体を介するエフェクター機能。特定の実施形態においては、糖鎖修飾の変化は、糖鎖修飾の無い抗体と比較して、抗体を介するエフェクター機能を増強する。抗体を介するエフェクター機能の変化をもたらす糖鎖修飾は当技術分野で周知である(例えば、Shields R. L.ら, 2001, J. Biol. Chem. 277(30):26733-40; Davies J.ら, 2001, Biotechnology & Bioengineering, 74(4):288-294を参照)。他の特定の実施形態

においては、糖鎖修飾の変化は本発明の抗体のFc γ RIIB受容体との結合を増強する。本発明の方法による糖鎖修飾の変化は、例えば、抗体の糖鎖含量増加または抗体の糖鎖含減少を含む。糖鎖含量を改変する方法は当業者に公知であり、例えば、Wallickら, 1988, Journal of Exp. Med. 168(3):1099-1109; Taoら, 1989 Journal of Immunology, 143(8):2595-2601; Routledgeら, 1995 Transplantation, 60(8):847-53; Elliottら 2003; Nature Biotechnology, 21:414-21; Shieldsら 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(30):26733-40を参照; これらは全て本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

【0105】

いくつかの実施形態において、本発明は、1以上のグリコシル化部位を含み、1以上の糖鎖成分が抗体と共有結合した抗体を包含する。他の実施形態において、本発明はFc域に1以上のグリコシル化部位および1以上の修飾を含む抗体を包含し、先に開示した抗体および当業者に公知の抗体のとおりである。好ましい実施形態においては、Fc域の1以上の修飾は、野生型Fc域を含む抗体と比較して、Fc γ R、例えば、Fc γ RIIIAを活性化する抗体の親和性を増強する。Fc域に1以上のグリコシル化部位および／または1以上の修飾をもつ本発明の抗体は増強された抗体を介するエフェクター機能、例えば、増強されたADCC活性を有する。いくつかの実施形態において、本発明はさらに抗体の糖鎖成分と直接的にまたは間接的に相互作用することがわかっているアミノ酸の1以上の修飾を含む抗体を含み、それらのアミノ酸は限定されるものでないが、位置241、243、244、245、245、249、256、258、260、262、264、265、296、299、および301のアミノ酸を含む。抗体の糖鎖成分と直接的にまたは間接的に相互作用するアミノ酸は当技術分野で公知であり、例えば、Jefferysら, 1995 Immunology Letters, 44:111-7を参照、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

【0106】

本発明は1以上のグリコシル化部位を抗体の1以上の部位中に導入することにより、好ましくは抗体の機能性、例えば、Fc γ RIIBとの結合活性を変化させることなく改変されている抗体を包含する。グリコシル化部位を本発明の抗体の可変域および／または定常域中に導入することができる。本明細書に使用される「グリコシル化部位」は、抗体中のオリゴ糖（すなわち、お互いに連結された2以上の単糖を含有する糖鎖）が特異的にかつ共有結合により結合している相手のいずれか特定のアミノ酸配列である。オリゴ糖側鎖は典型的には抗体主鎖とNまたはO結合のいずれかを經由して連結される。N結合グリコシル化はオリゴ糖成分のアスパラギン残基の側鎖との結合を意味する。O結合グリコシル化はオリゴ糖成分のヒドロキシアミノ酸、例えば、セリン、トレオニンとの結合を意味する。本発明の抗体は1以上のグリコシル化部位を含んでもよく、N結合およびO結合グリコシル化部位を含む。当技術分野で公知のN結合またはO結合グリコシル化のためのいずれのグリコシル化部位を本発明に従って利用してもよい。本発明の方法に従って有用であるN結合グリコシル化部位の例は、アミノ酸配列：Asn-X-Thr/Ser（式中、Xはいずれのアミノ酸であってもよくかつThr/Serはトレオニンまたはセリンを示す）である。このような部位は、本発明が関わる技術分野で周知の方法を用いて、本発明の抗体中に導入することができる。例えば、「in vitro突然変異誘発、組換えDNA：短期過程（"In Vitro Mutagenesis" Recombinant DNA: A Short Course）」, J. D. Watson,ら W. H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp.106-116を参照、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。本発明の抗体中にグリコシル化部位を導入する方法の例は、抗体のアミノ酸配列を修飾するか突然変異させて所望のAsn-X-Thr/Ser配列を得る方法であってもよい。

【0107】

いくつかの実施形態において、本発明はグリコシル化部位を加えるかまたは欠失することにより本発明の抗体の糖鎖含量を改変する方法を包含する。抗体の糖鎖含量を改変する方法は当技術分野で周知であり、例えば、米国特許第6,218,149号; EP 0 359 096 B1; 米国公開US 2002/0028486; WO 03/035835; 米国公開US 2003/0115614; 米国特許第6,218,149号; 米国特許第6,472,511号を参照; これらは全て本明細書に参照によりその全てが組み

入れられる。他の実施形態において、本発明は、本発明の抗体の糖鎖含量を抗体の1以上の内因性糖鎖成分を欠失することにより改変する方法を包含する。

【0108】

本発明はさらに、本発明の抗体のエフェクター機能を改変する方法であって、本明細書に開示したまたは当技術分野で公知の方法を用いて抗体の糖鎖含量を改変する上記方法を包含する。

【0109】

当業者に公知の標準技術を用いて抗体またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列に突然変異を導入することができ、例えば、アミノ酸置換をもたらす位置指定突然変異およびPCRを介する突然変異が挙げられる。好ましくは、誘導体は、元来の抗体またはそのフラグメントと比較して、15アミノ酸未満の置換、10アミノ酸未満の置換、5アミノ酸未満の置換、4アミノ酸未満の置換、3アミノ酸未満の置換、2アミノ酸未満の置換を含む。好ましい実施形態においては、誘導体は1以上の予定した非必須アミノ酸残基においてなされる保存アミノ酸置換を有する。

【0110】

本発明はまた、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるマウスモノクローナル抗体の可変重鎖および／または可変軽鎖のアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である可変重鎖および／または可変軽鎖のアミノ酸配列を含む抗体またはそのフラグメントを包含する。本発明はさらに、FcγRIIAと結合するより大きい親和性でFcγRIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントであって、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるマウスモノクローナル抗体の1以上のCDRのアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である1以上のCDRのアミノ酸配列を含む上記抗体または抗体フラグメントを包含する。2つのアミノ酸配列のパーセント同一性の決定は、BLASTタンパク質サーチを含む当業者に公知のいずれの方法により決定してもよい。

【0111】

本発明はまた、FcγRIIAと結合するより大きい親和性でFcγRIIBと特異的に結合する抗体または抗体フラグメントであって、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるマウスモノクローナル抗体のヌクレオチド配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる上記抗体または抗体フラグメントの使用を包含する。好ましい実施形態において、本発明は、FcγRIIAと結合するより大きい親和性でFcγRIIBと特異的に結合する抗体または抗体フラグメントであって、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるマウスモノクローナル抗体の可変軽鎖および／または可変重鎖のヌクレオチド配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる可変軽鎖および／または可変重鎖を含む上記抗体または抗体フラグメントを提供する。他の好ましい実施形態において、本発明は、FcγRIIAと結合するより大きい親和性でFcγRIIBと特異的に結合する抗体または抗体フラグメントであって、それぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を有するクローン2B6または3H7により産生されるマウスモノクローナル抗体の1以上のCDRのヌクレオチド配列とストリンジентな状態でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされる1以上のCDRを含む上記抗体またはそのフラグメントを提供する。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、限定されるものでないが、フィルターに結合したDNAとの6x塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中での約45℃におけるハイブリダイゼーション、続いて1回以上の0.2xSSC／0.1% SDS中での約50-65℃における洗浄、高ストリンジентな条件、例

えばフィルターに結合したDNAとの6xSSC中での約45℃におけるハイブリダイゼーション、続いて1回以上の0.1xSSC/0.2%SDS中での約60℃における洗浄、または当業者に公知のいずれか他のストリンジェントな条件を含む（例えば、Ausubel, F. M.ら, 編 1989 「分子生物学の現行プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」, vol.1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY, at pages.6.3.1~6.3.6および2.10.3を参照）、これらは本明細書に参照により組み入れられる。

【0112】

5.1.1 抗体複合体

本発明は、融合タンパク質を作製するために、異種ポリペプチド（すなわち、無関係なポリペプチド；またはその部分、好ましくは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド）と遺伝子組換えにより融合したまたは化学的に複合した（共有および非共有結合により複合した）抗体を包含する。融合は必ずしも直接である必要はなく、リンカー配列を介して起こってもよい。抗体を特定の細胞表面受容体に特異的な抗体に融合または複合することにより、抗体を用いて、例えば異種ポリペプチドを特定の細胞型に、*in vitro*または*in vivo*でターゲティングしてもよい。異種ポリペプチドと融合したまたは複合した抗体はまた、当技術分野で公知の方法を用いて、*in vitro*イムノアッセイにおよび精製法に使用することができる。例えば、PCT公開WO 93/2 1232；EP 439,095；Naramuraら, Immunol. Lett., 39:91-99, 1994；米国特許第5,474,981号；Gilliesら, PNAS, 89:1428-1432, 1992；およびFellら, J. Immunol., 146:2446-2452, 1991を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

【0113】

さらに抗体を治療薬または所与の生物学的応答を改変する薬物成分と複合させることができる。治療薬または薬物成分は古典的な化学治療薬に限定されると考えてはならない。例えば、薬物成分は所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、毒素例えばアブリン、リシンA、シェードモナス外毒素（すなわち、PE-40）、またはジフテリア毒素、リシン (ricin)、ゲロニン (gelonin)、およびヤマゴボウ (pokeweed) 抗ウイルスタンパク質、タンパク質、例えば腫瘍壊死因子、限定されるものでないが、 α -インターフェロン (IFN- α)、 β -インターフェロン (IFN- β) を含むインターフェロン、神経成長因子 (NGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA)、アポトーシス薬（例えば、TNF- α 、TNF- β 、PCT公開WO 97/33899に開示されたAIM I）、AIM II (PCT公開WO 97/34911)、Fasリガンド (Takahashiら, J. Immunol., 6:1567-1574, 1994)、およびVEGI (PCT公開WO 99/23105)、血栓薬または抗血管形成薬（例えば、アンギオスタチンまたはエンドスタチン）、または生物学的応答改変剤、例えば、リンホカイン（例えば、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」）、および顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、マクロファージコロニー刺激因子、（「M-CSF」）、または増殖因子（例えば、成長ホルモン（「GH」）；プロテアーゼ、またはリボヌクレアーゼが挙げられる。

【0114】

抗体をマーカー配列、例えばペプチドと融合して精製を容易にすることができる。好ましい実施形態においては、マーカーアミノ酸配列はヘキサ-ヒスチジンペプチド、例えばとりわけ、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) として提供されるタグであり、これらの多くは市販されている。Gentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, 1989に記載の通り、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは融合タンパク質の精製を好都合にする。精製に有用な他のペプチドとしては、限定されるものでないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質から誘導されるエプトープに対応するヘマグルチニン"HA"タグ (Wilsonら, Cell, 37: 767 1984) および「フラグ」タグ (Knappik

ら, Biotechniques, 17(4):754-761, 1994) が挙げられる。

【0115】

本発明はさらに抗体フラグメントと融合または複合した異種ポリペプチドを含有する組成物を含む。例えば、異種ポリペプチドをFabフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、F(ab)₂フラグメント、またはそれらの部分と融合または複合させることができる。ポリペプチドを抗体部分と融合または複合する方法は当技術分野で公知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号、および第5,112,946号；EP 307,434；EP 367,166；国際公開WO 96/04388およびWO 91/06570；Ashkenaziら, 1991, PNAS 88:10535-10539；Zhengら, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600；およびVilら, 1992, PNAS 89:11337-11341（上記参考文献は参照によりその全てが組み入れられる）を参照。

10

【0116】

さらなる融合タンパク質を、遺伝子-シャッフリング、モチーフ-シャッフリング、エキソン-シャッフリング、および／またはコドン-シャッフリング（まとめて「DNAシャッフリング」と呼ぶ）の技術を介して作製することができる。DNAシャッフリングを用いて本発明の抗体またはそのフラグメントの活性を改変することができる（例えば、さらに高い親和性およびさらに低い解離速度をもつ抗体またはそのフラグメント）。一般的には、米国特許第5,605,793；第5,811,238号；第5,830,721号；第5,834,252号；および第5,837,458号、ならびにPattenら, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33；Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76；Hanssonら, 1999, J. Mol. Biol. 287:265；ならびにLorenzenらおよびBlasco, 1998, BioTechniques 24:308を参照（これらの特許および開示は本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。抗体またはそのフラグメント、またはコードされた抗体またはそのフラグメントは、誤りがちなPCRによる無作為突然変異、無作為ヌクレオチド挿入または遺伝子組換え前の他の方法で処理することにより改変することができる。FcγRIIbと特異的に結合する抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドの1以上の部分を、1以上の異種分子のモチーフ、セクション、パーツ、ドメイン、フラグメントなどの1以上の成分と組換えることもできる。

20

【0117】

本発明はまた、診断もしくは治療薬または血清半減期の増加が所望されるいずれか他の分子と複合した抗体を包含する。抗体を診断に用いて、例えば、臨床試験操作の一部として疾患、障害または感染の発生または進行をモニターし、例えば所与の治療体制の効力を決定することができる。抗体を検出可能な物質とカップリングすることにより、検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、ポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属が挙げられる。検出可能な物質を、直接的に抗体とまたは間接的に中間体（例えば、当技術分野で公知のリンカー）を介して、当技術分野で公知の技術によりカップリングまたは複合することができる。例えば、本発明による診断薬として使用する抗体と複合することができる金属イオンに対する米国特許第4,741,900号を参照。かかる診断および検出は、抗体を様々な酵素を含む検出可能な物質とカップリングすることにより実施することができ、それらの酵素としては、限定されるものでないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、塩基性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ；補欠分子団複合体、例えば、限定されるものでないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチン；蛍光物質、例えば、限定されるものでないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリン；蛍光物質、例えば、限定されるものでないが、ルミノール；生物発光物質、例えば、限定されるものでないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン；放射性物質、例えば、限定されるものでないが、ビスマス (²¹³Bi)、炭素 (¹⁴C)、クロム (⁵¹Cr)、コバルト (⁵⁷Co)、フッ素 (¹⁸F)、ガドリニウム (¹⁵³Gd、¹⁵⁹Gd)、ガリウム (⁶⁸Ga、⁶⁷Ga)、ゲルマニウム (⁶⁸Ge)、ホルミウム (¹⁶⁶Ho)、インジウム (¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、ヨ

30

40

50

ウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタン (^{140}La)、ルテチウム (^{177}Lu)、マンガン (^{54}Mn)、モリブデン (^{99}Mo)、パラジウム (^{103}Pd)、リン (^{32}P)、プラセオジウム (^{142}Pr)、プロメチウム (^{149}Pm)、レニウム (^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム (^{105}Rh)、ルテニウム (^{97}Ru)、サマリウム (^{153}Sm)、スカンジウム (^{47}Sc)、セレン (^{75}Se)、ストロンチウム (^{85}Sr)、硫黄 (^{35}S)、テクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、スズ (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、トリチウム (^3H)、キセノン (^{133}Xe)、イッテルビウム (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、イットリウム (^{90}Y)、亜鉛 (^{65}Zn)；様々なポジトロン放出断層撮影に用いるポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。

【0118】

抗体を、治療成分、例えば細胞毒（例えば、細胞増殖抑制または殺細胞薬）、治療薬または放射性元素（例えば、 α 線-エミッター、 γ 線-エミッターなどと複合することができる。細胞毒または細胞傷害薬は、細胞に有害であるいずれかの薬剤である。例としては、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシルビシン、ダウノルビシン、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、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンならびにそれらの類似体または同族体が挙げられる。治療薬としては、限定されるものでないが、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、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロランブシル (thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロトスファミド (cyclothosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびcis-ジクロロジアミン白金(II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン（例えばダウノルビシン（旧名称ダウノマイシン）およびドキシルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧名称アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC)）、および抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられる。

【0119】

さらに、抗体を治療成分、例えば放射性物質または大環状キレート剤（放射性金属イオン（上記放射性物質の例を参照）を複合するために有用である）と複合することができる。ある特定の実施形態においては、大環状キレート剤は、抗体とリンカー分子を経由して結合することができる1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸 (DOTA) である。このようなリンカー分子は当技術分野では公知であり、Denardoら, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Petersonら, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; および Zimmermanら, 1999, Nucl. Med. Biol. 26: 943-50に記載されていて、それぞれ、参照によりその全てが組み入れられる。

【0120】

このような治療成分を抗体と複合する技術は周知であり、例えば、Amonら, 「癌治療における薬物の免疫ターゲティング用モノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」, in 「モノクローナル抗体と癌治療法 (Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)」, Reisfeldら (編), 1985, pp.243-56, Alan R. Liss, Inc.; Hellstromら, 「薬物送達用の抗体 (Antibody For Drug Delivery)」, in 「制御された薬物送達 (Controlled Drug Delivery)」 (第2版), Robinsonら (編), 1987, pp.623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, 「癌治療における細胞傷害薬の抗体担体: 総説 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」, in 「モノクローナル抗体'84: 生物学的および臨床応用 (Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications)」, Pincheraら (編), 1985, pp.475-506; 「癌治療における放射性標識抗体の治療用途の分析、結果、ならびに将来予測 (Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radi

10

20

30

40

50

olabeled Antibody In Cancer Therapy) 」, in 「癌検出および治療用のモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy) 」, Baldwinら (編), 1985, pp.303-16, Academic Press ; and Thorpeら, Immunol. Rev., 62:119-58, 1982 を参照。

【0121】

複合した治療成分を伴うかまたは伴わない、単独でまたは細胞傷害性因子と組合わせて投与される抗体またはそのフラグメントを治療薬として用いることができる。

【0122】

あるいは、抗体を第2の抗体と複合して、米国特許第号4,676,980にSegalが記載した抗体ヘテロ複合体を作ることができる、この特許は本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

【0123】

抗体はまた固体支持体と結合してもよく、これはイムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。このような固体支持体としては、限定されるものでないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

【0124】

5.2 本発明のモノクローナル抗体の免疫感作、スクリーニング、抗体の同定および特徴付け

モノクローナル抗体は当技術分野で公知の様々な技術を用いて調製することができ、それらは、ハイブリドーマ、組換え体およびファージディスプレイ技術、またはそれらを組合わせた利用を含む。例えば、モノクローナル抗体は当技術分野で公知であり、例えば、Harlowら, 「抗体：研究室マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual) 」, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988) ; Hammerling, ら, in: 「モノクローナル抗体およびT細胞ハイブリドーマ (Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas) 」, pp.563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (これらは共に、参照によりその全てが組み入れられる) に教示の技術を含むハイブリドーマハイブリドーマ技術を用いて産生することができる。本明細書に使用される用語「モノクローナル抗体」はハイブリドーマ技術を介して産生される抗体に限定されるものでない。用語「モノクローナル抗体」は、いずれかの真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一クローンから誘導される抗体を意味するものであり、上記抗体が産生される方法を意味するものでない。

【0125】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生させかつスクリーニングする方法は日常的に行われかつ当技術分野で周知されている。限定されるものでない例においては、マウスを目的の抗原またはかかる抗原を発現する細胞を用いて免疫感作することができる。免疫応答が検出されれば、例えば、抗原に対して特異的な抗体がマウス血清中に検出されれば、マウス脾を採集して脾細胞を単離する。次いで脾細胞を周知の技術によりいずれかの適当な骨髓腫細胞と融合する。ハイブリドーマを選択しかつ限界希釈によりクローニングする。次いでハイブリドーマクローンを、抗原と結合できる抗体を分泌する細胞について、当技術分野で公知の方法によりアッセイする。一般的に高レベルの抗体を含有する腹水は、マウス腹腔内に陽性ハイブリドーマクローンを接種して作製することができる。

【0126】

或る特定の実施形態において、本発明は、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する方法であって、1以上のFc γ RIIAトランスジェニックマウス (米国特許第5,877,396号および米国特許第5,824,487号を参照) をヒトFc γ RIIBの精製細胞外ドメイン、アミノ酸1-180を用いて免疫感作するステップ、上記マウスの脾細胞からハイブリドーマ培養細胞株を産生させるステップ、および上記ハイブリドーマ培養細胞株を、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体を産生する1以上のハイブリドーマ培養細胞株について、スクリーニングするステップを含む上記方法を提供する。他の特定の実施形態において、本発明は、Fc γ

RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIB、特にヒトFc γ RIIBと特異的に結合するFc γ RIIBモノクローナル抗体を産生する方法であって、さらに、精製したFc γ RIIBまたはその免疫原性フラグメントを用いて1以上のFc γ RIIAトランスジェニックマウスを免疫感作するステップ、上記マウスを免疫応答を誘発するのに十分な回数だけ追加免疫感作するステップ、上記1以上のマウスの脾細胞からハイブリドーマ細胞を産生させるステップ、およびFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体を産生する1以上のハイブリドーマ培養細胞株について上記ハイブリドーマ培養細胞株をスクリーニングするステップを含む上記方法を提供する。本発明の一実施形態においては、上記マウスを、当技術分野で公知の免疫応答を増強するいずれかのアジュバントと混合されている精製Fc γ RIIBを用いて免疫感作する。本発明の方法で使用しうるアジュバントとしては、限定されるものでないが、タンパク質アジュバント；細菌アジュバント、例えば、全細菌（BCG、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*） parvum種、サルモネラ（*Salmonella*） minnesota種）および細胞壁骨格を含む細菌成分、トレハロースジミコレート（trehalose dimycolate）、モノホスホリル脂質A、結核菌のメタノール抽出性残基（MER）、完全または不完全フロイントアジュバント；ウイルスアジュバント；化学アジュバント、例えば、水酸化アルミニウム、ヨード酢酸塩およびコレステリルヘミコハク酸塩；裸のDNAアジュバントが挙げられる。本発明の方法で使用しうる他のアジュバントとしては、コレラ毒素、パラボックス（parapox）タンパク質、MF-59（Chiron Corporation；Biegら，1999，Autoimmunity，31(1):15-24も参照、これは本明細書に参照により組み入れられる）、MPL（登録商標）（Corixa Corporation；また、Lodmell D. I.ら，2000 Vaccine，18:1059-1066；Ulrichら，2000，Methods in Molecular Medicine，273-282；Johnsonら，1999，Journal of Medicinal Chemistry，42:4640-4649；Baldridgeら，1999 Methods，19:103-107も参照、これらは全て本明細書に参照により組み入れられる）、RC-529アジュバント（Corixa Corporation；Corixa社のアミノアルキルグルコサミニド-4-リン酸（AGP）化学ライブラリーからのリード化合物、www.corixa.comも参照）、およびDETOXTMアジュバント（Corixa Corporation；DETOXTMアジュバントはMPL（登録商標）アジュバント（モノホスホリル脂質A）および放線菌細胞壁骨格を含む；Etonら，1998，Clin. Cancer Res，4(3):619-27；およびGubta R.ら，1995，Vaccine，13(14):1263-76も参照、これらは両方とも本明細書に参照により組み入れられる）が挙げられる。

【0127】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは公知の技術により作製することができる。例えば、FabおよびF(ab')₂フラグメントは、免疫グロブリン分子のタンパク分解切断により、パパイン（Fabフラグメントを作るため）またはペプシン（F(ab')₂フラグメントを作るため）などの酵素を用いて産生することができる。F(ab')₂フラグメントは完全な軽鎖、ならびに重鎖の可変域、CH1域およびヒンジ域を含有する。

【0128】

例えば、抗体は当技術分野で公知の様々なファージディスプレイを用いて作製することができる。ファージディスプレイ法において、機能性抗体ドメインは、それをコードするポリヌクレオチド配列を運ぶファージ粒子の表面にディスプレイされる。特定の実施形態においてはこのようなファージを利用して、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメイン、例えばFabおよびFvまたはジスルフィド結合安定化Fvをディスプレイすることができる。目的の抗原と結合する抗原結合ドメインを発現するファージを、標識した抗原または固体表面もしくはビーズと結合したまたは捕獲された抗原を用いて、選択または同定することができる。この方法に使用されるファージは典型的にはfdおよびM13を含む繊維状ファージである。抗原結合ドメインはファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIタンパク質のいずれかと遺伝子組換えにより融合したタンパク質として発現される。本発明の免疫グロブリン、またはそのフラグメントを作るために利用しうるファージディスプレイ法の例としては、Brinkmanら，J. Immunol. Methods，182:41-50，1995；Amesら，J. Immunol. Methods，184:177-186，1995；Kettleboroughら，Eur. J. Immunol.，24:952-958，1994；Persicら，Gene，1

87:9-18, 1997; Burtonら, *Advances in Immunology*, 57:191-280, 1994 ; PCT出願PCT/G B 91/01134 ; PCT公開WO 90/02809 ; WO 91/10737 ; WO 92/01047 ; WO 92/18619 ; WO 93/1 1236 ; WO 95/15982 ; WO 95/20401 ; および米国特許第5,698,426号 ; 第5,223,409号 ; 第5, 403,484号 ; 第5,580,717号 ; 第5,427,908号 ; 第5,750,753号 ; 第5,821,047号 ; 第5,571,6 98号 ; 第5,427,908号 ; 第5,516,637号 ; 第5,780,225号 ; 第5,658,727号 ; 第5,733,743号 および第5,969,108号に記載された方法が挙げられ ; これらはそれぞれ本明細書に参照に よりその全てが組み入れられる。

【0129】

以上の参考文献に記載されるように、ファージ選択の後、ファージからの抗体コード領 域を単離し、これを用いてヒト抗体、またはいずれか他の所望のフラグメントを含む全抗 10 体を作製し、そして所望の宿主、例えば、以下に詳しく記載した哺乳類動物細胞、昆虫細 胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む所望の宿主に発現させることができる。例えば、 Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを遺伝子組換えにより産生する技術も、当技術分野 で公知の方法、例えば、PCT公開WO92/22324 ; Mullinaxら, *BioTechniques*, 12 (6):864-8 69, 1992 ; およびSawaiら, *AJRI*, 34:26-34, 1995 ; およびBetterら, *Science*, 240:1041 -1043, 1988 (これらはそれぞれ参照によりその全てが組み入れられる) に開示の方法を 用いて利用することもできる。1本鎖Fvおよび抗体を産生させるために利用しうる技術の 例は、米国特許第4,946,778および5,258,498 ; Hustonら, *Methods in Enzymology*, 203 :46-88, 1991 ; Shuら, *PNAS*, 90:7995-7999, 1993 ; およびSkerraら, *Science*, 240:1038 -1040, 1988に記載の技術を含む。 20

【0130】

ファージディスプレイ技術を用いてFcγRIIBに対する本発明の抗体の親和性を増加す ることができる。この技術は、本発明のコンビナトリアル方法に利用しうる高親和性抗体を 得るのに有用でありうる。親和性成熟 (affinity maturation) と呼ばれる技術は、FcγR IIBまたはその抗原性フラグメントを用いる突然変異誘発またはCDRウォーキングおよび再 選択を使って、最初のまたは親抗体と比較したとき、より高い親和性で抗原と結合する抗 体を同定する (例えば、Glaserら, 1992, *J. Immunology* 149:3903を参照)。単一ヌクレ オチドよりむしろ全コドンで突然変異誘発すると、アミノ酸突然変異の半無作為レパート リーが得られる。それぞれが単一CDR中の単一アミノ酸変更だけ異なりかつそれぞれのCDR 残基に対して可能なアミノ酸置換をそれぞれ示す変異体を含有する、変異体クローンのプ ールから成るライブラリーを構築することができる。固定した突然変異体を標識した抗原 と接触させることにより、抗原と結合親和性が増加した突然変異体をスクリーニングする ことができる。当技術分野で公知のいずれのスクリーニング方法を用いて、抗原に対する アビディティの増加した突然変異抗体を同定することができる (例えば、ELISA) (Wuら, 1998, *Proc Natl. Acad Sci. USA* 95:6037 ; Yeltonら, 1995, *J. Immunology* 155:1994 を参照)。軽鎖を無作為化するCDRウォーキングも可能である (Schierら, 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551を参照)。

【0131】

本発明の抗体を、エピトープマッピングによりさらに特徴付けて、FcγRIIAと比較して FcγRIIBに対する最大の特異性を有する抗体を選択することができる。抗体のエピトープ マッピング法は当技術分野で周知であり、本発明の方法の範囲に包含される。ある特定の 実施形態においては、FcγRIIBの1以上の領域を含む融合タンパク質を本発明の抗体のエ 20 ピトープのマッピングに用いることができる。特定の実施形態においては、融合タンパク 質は、ヒトIgG2のFc部分と融合したFcγRIIBのある領域のアミノ酸配列を含有する。それ ぞれの融合タンパク質は、アミノ酸置換および/または受容体のある特定領域の同族受容 体由来の対応領域との置換え、例えば、以下の表2に示すようなFcγRIIAをさらに含ん でよい。pMGX125およびpMGX132はFcγRIIB受容体のIgG結合部位を含有し、前者はFcγRII BのC末端と結合しかつ後者はFcγRIIAのC末端と結合するのでC末端結合を区別するた めに用いることができる。その他のものはIgG結合部位にFcγRIIA置換およびFcγIIAまた はFcγIIBのN末端に置換を有する。これらの分子は、抗体が結合する受容体分子の部分 30 40 50

を決定するのを助けることができる。

【表 2】

プラスミド	受容体	N末端	172-180	C末端
pMGX125	RIIb	I Ib	KKFSRSDPN	APS-----SS (I Ib)
pMGX126	RIIa/b	I Ia	QKFSRLDPN	APS-----SS (I Ib)
pMGX127		I Ia	QKFSRLDPT	APS-----SS (I Ib)
pMGX128		I Ib	KKFSRLDPT	APS-----SS (I Ib)
pMGX129		I Ia	QKFSHLDPT	APS-----SS (I Ib)
pMGX130		I Ib	KKFSHLDPT	APS-----SS (I Ib)
pMGX131		I Ia	QKFSRLDPN	VPSMGSSSS (I Ia)
pMGX132		I Ib	KKFSRSDPN	VPSMGSSSS (I Ia)
pMGX133	RIIa-131R	I Ia	QKFSRLDPT	VPSMGSSSS (I Ia)
pMGX134	RIIa-131H	I Ia	QKFSHLDPT	VPSMGSSSS (I Ia)
pMGX135		I Ib	KKFSRLDPT	VPSMGSSSS (I Ia)
pMGX136		I Ib	KKFSHLDPT	VPSMGSSSS (I Ia)

モノクローナル抗Fc γ RIIB抗体のエピトープを研究するために利用しうる融合タンパク質のリスト 残基172~180はFc γ RIIAおよびBのIgG結合部位に属する。Fc γ RIIA配列由来の特異的アミノ酸を太字で記した。

【0132】

融合タンパク質を、本発明の抗Fc γ RIIB抗体との結合を確認する生物学的アッセイ、例えばELISAに用いることができる。他の実施形態においては、エピトープ特異性のさらなる確認を、Fc γ RIIA配列由来の残基と置換えられた特定の残基をもつペプチドを用いて行うことができる。

【0133】

本発明は、本発明の抗体の機能、特にFc γ RIIBシグナル伝達をモジュレートする活性を同定するためのある特定の特徴付けアッセイを利用する本発明の方法により産生した抗体の特徴付けを包含する。例えば、本発明の特徴付けアッセイは、Fc γ RIIBのITIMモチーフ中のチロシン残基のリン酸化を測定するかまたはB細胞受容体が行うカルシウム動員の抑制を測定することができる。本発明の特徴付けアッセイは細胞に基づくアッセイであってもまたは無細胞のアッセイであってもよい。

【0134】

当技術分野では、肥満細胞中のFc γ RIIBの高親和性IgE受容体、Fc ϵ RIとの共凝集は抗原が誘導する脱顆粒、カルシウム動員、およびサイトカイン産生の抑制をもたらすことが十分確立されている (Metcalfe D. D.ら 1997, Physiol. Rev. 77:1033; Long E. O. 1999 Annu Rev. Immunol 17:875)。このシグナル伝達経路の分子の詳細は最近解明されている (Ott V. L., 2002, J Immunol. 162(9):4430-9)。Fc ϵ RIと共凝集すると、Fc γ RIIBはそのITIMモチーフ中のチロシン上で速やかにリン酸化され、次いでSrc相同性-2含有イノシトール-5-ホスファターゼ (SHIP)、SH2ドメイン-含有イノシトールポリリン酸5-ホスファターゼを補充し、これが順にリン酸化されてShcおよびp62^{dok}と結合する (p62^{dok}は、アダプター分子のファミリーのプロトタイプであって、シグナル伝達ドメイン、例えばアミノ末端プレクストリン相同性ドメイン (PHドメイン)、PTBドメイン、およびPXXPモチーフおよび多数のリン酸化部位を含有するカルボキシ末端領域を含む) (Carpinoら, 1997, Cell, 88:197; Yamanshiら, 1997, Cell, 88:205)。

【0135】

本発明は、1以上のIgEを介する応答をモジュレートする本発明の抗Fc γ RIIB抗体を特

徴付けることを包含する。好ましくは、IgEに対する高親和性受容体およびFc γ RIIBに対する低親和性受容体を同時発現する培養細胞株を、IgEを介する応答をモジュレートする上での本発明の抗Fc γ RIIB抗体を特徴付けるのに使用しうる。特定の実施形態においては、ラット好塩基球性白血病培養細胞株（RBL-2H3；Barsumian E. L.ら 1981 Eur. J. Immunol. 11:317、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）由来の細胞を全長ヒトFc γ RIIBによりトランスフェクトして、本発明に使用しうる。RBL-2H3はよく特徴づけられたラット培養細胞株であって、IgEを介する細胞活性化後のシグナル伝達機構を研究するために広く使われている。Fc γ RIIBは、RBL-2H3細胞に発現されかつFc ϵ RIと共凝集すると、Fc ϵ RIが誘導するカルシウム動員、脱顆粒、およびサイトカイン産生を抑制する（Malbecら、1998, J. Immunol. 160:1647；Daeronら、1995 J. Clin. Invest. 95:577；Ottら、2002 J. of Immunol. 168:4430-4439）。

10

【0136】

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の抗Fc γ RIIB抗体を、Fc ϵ RIが誘導する肥満細胞活性化の抑制について特徴づけることを包含する。例えば、Fc γ RIIBによりトランスフェクトされているラット好塩基球性白血病培養細胞株（RBL-H23；Barsumian E. L.ら 1981 Eur. J. Immunol. 11:317）由来の細胞をIgEを用いて感作し、ウサギ抗マウスIgGのF(ab')₂フラグメントにより刺激してFc ϵ RIを単独で凝集させるか、または全ウサギ抗IgGにより刺激してFc γ RIIBおよびFc ϵ RIを凝集させる。この系において、下流シグナル伝達分子の間接モジュレーションを、感作および刺激した細胞に対する本発明の抗体の付加によりアッセイすることができる。例えば、Fc γ RIIBのチロシンリン酸化およびSHIPの補充とリン酸化、限定されるものでないが、ERK1、Erk2、JNK、またはp38を含むMAPキナーゼファミリーメンバーの活性化；ならびにP62^{dok}のチロシンリン酸化およびSHIPおよびRasGAPとのその会合をアッセイすることができる。

20

【0137】

Fc ϵ RIが誘導する肥満細胞活性化の本発明の抗体による抑制を決定するアッセイの1つ例は、：RBL-H23細胞をヒトFc γ RIIBを用いてトランスフェクトするステップ；RBL-H23細胞をIgEにより感作するステップ；ならびにRBL-H23細胞をウサギ抗マウスIgGのF(ab')₂を用いて（対照として、Fc ϵ RIを単独で凝集させてFc ϵ RIを介するシグナル伝達を誘発する）、またはRBL-H23細胞を全長ウサギ抗マウスIgGを用いて（Fc γ RIIBとFc ϵ RIを共凝集させてFc ϵ RIを介するシグナル伝達の抑制をもたらす）刺激するステップを含んでもよい。全ウサギ抗マウスIgG抗体により刺激されている細胞を、本発明の抗体とともにさらにインキュベートしてもよい。本発明の抗体とともにプレインキュベートされている細胞および本発明の抗体とともにプレインキュベートされていない細胞のFc ϵ RIに依存する活性を測定し、そしてこれらの細胞におけるFc ϵ RIに依存する活性のレベルを比較すると、本発明の抗体によるFc ϵ RIに依存する活性のモジュレーションを示しうる。

30

【0138】

上記のアッセイの例を利用して、例えば、Fc γ RIIB受容体とのリガンド（IgG）結合をブロックするおよびFc γ RIIBとFc ϵ RIの共凝集を防止することによりFc γ RIIBを介するFc ϵ RIシグナル伝達の抑制を拮抗する抗体を同定することができる。このアッセイは同様に、Fc γ RIIBとFc ϵ RIの共凝集を増強するおよびFc γ RIIBとFc ϵ RIの共凝集を促進することによりFc γ RIIBが介在するFc ϵ RIシグナル伝達の抑制を作動する抗体を同定する。

40

【0139】

好ましい実施形態においては、Fc ϵ RIに依存する活性は、少なくとも1以上の次の活性である：下流シグナル伝達分子のモジュレーション（例えば、Fc γ RIIBのリン酸化状態のモジュレーション、SHIP補充のモジュレーション、MAPキナーゼ活性のモジュレーション、SHIPのリン酸化状態のモジュレーション、SHIPとShc会合のモジュレーション、P62^{dok}のリン酸化状態のモジュレーション、P62AKとSHIP会合のモジュレーション、P62^{dok}とRasGAP会合のモジュレーション、カルシウム動員のモジュレーション、脱顆粒、およびサイトカイン産生のモジュレーション、さらに他の好ましい実施形態においては、Fc ϵ RIに依存する活性はセロトニン放出および／または細胞外Ca⁺⁺流入および／またはIgEに依存す

50

る肥満細胞活性化である。当業者にとって、Fc γ RIIBとFc ϵ RIの共凝集はFc γ RIIBチロシンリン酸化を刺激し、SHIPの補充を刺激し、SHIPチロシンリン酸化およびSHCとの会合を刺激し、そして、限定されるものでないが、Erk1、Erk2、JNK、p38を含むMAPキナーゼファミリーメンバーの活性化を刺激することは公知である。当業者にとって、Fc γ RIIBとFc ϵ RIの共凝集はP62^{ok}のチロシンリン酸化増強、およびそのSHIPおよびRasGAPとの会合を刺激することも公知である。

【0140】

いくつかの実施形態において、本発明の抗Fc γ RIIB抗体はIgEを介する応答をモジュレートするその能力について肥満細胞または好塩基球の脱顆粒を、好ましくは細胞に基づくアッセイでモニタリングおよび／または測定することにより特徴付けられる。好ましくは、このようなアッセイで用いる肥満細胞または好塩基球はヒトFc γ RIIBを含有するように、当業者に公知の標準遺伝子組換え法で遺伝子操作により作製されている。特定の実施形態においては、本発明の抗Fc γ RIIB抗体はIgEを介する応答をモジュレートするその能力について、細胞に基づく β -ヘキソサミニダーゼ（顆粒に含有された酵素）放出アッセイにおいて特徴付けられる。肥満細胞と好塩基球からの β -ヘキソサミニダーゼ放出は急性アレルギーおよび炎症症状における原発性の出来事である（Aketaniら，2001 Immunol. Lett. 75:185-9；Aketaniら，2000 Anal. Chem. 72:2653-8）。限定されるものでないが、セロトニンおよびヒスタミンを含む他の炎症性メディエーターの放出をアッセイして、本発明の方法に従ってIgEを介する応答を測定してもよい。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、例えば肥満細胞および好塩基球からの β -ヘキソサミニダーゼを含有する顆粒の放出は細胞内カルシウム濃度に依存するプロセスであり、Fc ϵ RIの多価抗原との架橋により開始される。

【0141】

IgEを介する応答を媒介する本発明の抗Fc γ RIIB抗体を特徴付けるためのアッセイの一例は、 β -ヘキソサミニダーゼ放出アッセイであって、次のステップ：ヒトFc γ RIIBによりRBL-H23細胞をトランスフェクトするステップ；マウスIgE単独によるまたはマウスIgEおよび本発明の抗Fc γ RIIB抗体による細胞を感作するステップ；細胞を様々な濃度のヤギ抗マウスF(ab)₂、好ましくは0.03 μ g/mL～30 μ g/mLにより約1時間刺激するステップ；上清を採集するステップ；細胞を溶解するステップ；および上清中に放出された β -ヘキソサミニダーゼ活性を比色アッセイにより、例えばp-ニトロフェニル N-アセチル- β -D-グルコサミニドを用いて測定するステップを含む上記アッセイである。放出された β -ヘキソサミニダーゼ活性は全活性に対する放出された活性のパーセントとして表現される。放出された β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定して抗原単独；IgE単独；IgEと本発明の抗Fc γ RIIB抗体で処置した細胞と比較する。特定の作用機構により束縛されることを意図するのでないが、細胞をマウスIgE単独で感作してポリクローナルヤギ抗マウスIgGのF(ab)₂フラグメントによりチャレンジすると、ポリクローナル抗体がFc ϵ RIと結合したマウスIgEの軽鎖を認識するので、Fc ϵ RIの凝集と架橋が起こり；これが順に肥満細胞活性化および脱顆粒をもたらす。他方、細胞をマウスIgEと本発明の抗Fc γ RIIB抗体で感作してポリクローナルヤギ抗マウスIgGのF(ab)₂フラグメントによりチャレンジすると、Fc ϵ RIとFc γ RIIBの架橋が起こり、Fc ϵ RIが誘導する脱顆粒の抑制をもたらす。いずれの場合にも、ヤギ抗マウスF(ab)₂は用量に依存する β -ヘキソサミニダーゼ放出を誘導する。いくつかの実施形態においては、Fc γ RIIB受容体と結合しかつFc ϵ RIと架橋した抗Fc γ RIIB抗体は抑制経路の活性化に影響を与えない、すなわち、抗Fc γ RIIB抗体の存在のもとで脱顆粒のレベルの変化はない。他の実施形態においては、抗Fc γ RIIB抗体は、抗Fc γ RIIB抗体が結合すると、抑制受容体、Fc γ RIIBのさらに強い活性化を媒介し、Fc ϵ RIとの効果的架橋およびホモ凝集したFc γ RIIBの抑制経路の活性化を可能にする。

【0142】

本発明はまた、本発明の抗Fc γ RIIB抗体のIgEを介する細胞応答に対する効果の、当業者に公知の手法を使うカルシウム動員アッセイを用いる特徴付けを包含する。カルシウム動員アッセイの例は、次のステップ：好塩基球または肥満細胞をIgEにより感作するステ

ップ；細胞をカルシウム指示薬、例えばFura2とともにインキュベートするステップ；上記のように細胞を刺激するステップ；ならびに、細胞内カルシウム濃度を例えばフローサイトメトリーを用いてモニタリングおよび／または数値化するステップを含んでもよい。本発明は、細胞内カルシウム濃度を当業者に公知の方法によりモニタリングおよび／または数値化するステップを包含する

好ましい実施形態においては、本発明の抗Fc γ RIIB抗体はIgEを介する細胞活性化を抑制する。他の実施形態においては、本発明の抗Fc γ RIIB抗体は、Fc γ RIIBにより調節される抑制経路をブロックするかまたはFc γ RIIBに対するリガンド結合部位をブロックし、そして免疫応答を増強する。

【0143】

ヒト肥満細胞を研究する能力は好適な長期ヒト肥満細胞培養が存在しないことによって限定されている。最近、2種の新規の幹細胞因子依存性ヒトマスト培養細胞株（LAD1およびLAD2と呼ばれる）が肥満細胞肉腫患者由来の骨髓アスピレートから確立された（Kirschenbaumら, Leukemia research, 印刷中）。両方の培養細胞株はFc ϵ RIと複数のヒト肥満細胞マーカーを発現することが記載されている。本発明は、IgEを介する応答に対する本発明の抗体の効果を評価するための本発明の方法におけるLAD1およびLAD2細胞の使用を包含する。特定の実施形態においては、細胞に基づく β -ヘキソサミニダーゼ放出アッセイ、例えば上記のようなアッセイをLAD細胞に用いて、本発明の抗Fc γ RIIB抗体によるIgE-を介する応答のモジュレーションを決定することができる。アッセイの例においては、ヒト肥満細胞、例えば、LAD1をキメラヒトIgE抗ニトロフェノール（NP）を用いて初回刺激し、そしてBSA-NP、多価抗原、および細胞脱顆粒によりチャレンジし、上清中に放出された β -ヘキソサミニダーゼを測定することによりモニターする（Kirshenbaumら, 2002, Leukemia research, 印刷中）。

【0144】

いくつかの実施形態において、もしヒト肥満細胞が、当技術分野で公知の標準方法例えば、FACS染色を用いて測定して、内在性Fc γ RIIBの低い発現を有すれば、本発明の抗Fc γ RIIB抗体を介する抑制経路の活性化の差異をモニターおよび／または検出することが困難でありうる。従って、本発明はFc γ RIIB発現がサイトカインおよび特定の増殖条件を用いてアップレギュレートされうる代わりの方法を包含する。Fc γ RIIBはヒト単球培養細胞株、例えば、THP1およびU937において（Tridandapaniら, 2002, J. Biol. Chem., 277(7):5082-5089）および一次ヒト単球（Pricopら, 2001, J. of Immunol., 166:531-537）においてIL4により高度にアップレギュレートされることが記載されている。U937細胞のジブチリル環状AMPによる分化（differentiation）はFc γ RIIの発現を増加することが記載されている（Cameronら, 2002 Immunology Letters 83,171-179）。従って、検出の感度を上げるために、本発明の方法に利用するヒト肥満細胞における内在性Fc γ RIIB発現を、サイトカイン、例えば、IL-4、IL-13を用いてアップレギュレーションしてもよい。

【0145】

本発明はまた、本発明の抗Fc γ RIIB抗体をB細胞受容体（BCR）を介するシグナル伝達の抑制に対する特徴付けも包含する。BCRを介するシグナル伝達は、B細胞の活性化および増殖、抗体産生などの少なくとも1以上の下流の生物学的応答を含む。Fc γ RIIBとBCRの共凝集は、細胞周期進行および細胞生存率の抑制をもたらす。さらに、Fc γ RIIBとBCRの共凝集はBCRを介するシグナル伝達の抑制をもたらす。

【0146】

具体的に、BCRを介するシグナル伝達は、次の少なくとも1以上を含む：下流シグナル伝達分子のモジュレーション、例えば、Fc γ RIIBのリン酸化状態、SHIP補充、Btkおよび／またはPLC ζ の局在化、MAPキナーゼ活性、（抗アポトーシスシグナル）の補充、カルシウム動員、細胞周期進行、および細胞増殖。

【0147】

Fc γ RIIBを介するBCRシグナル伝達の抑制の多数のエフェクター機能はSHIPを介して媒介されるが、最近、リポ多糖により活性化されたSHIP欠失マウス由来のB細胞はカルシウ

10

20

30

40

50

ム動員、Ins(1,4,5)P₃産生、およびErkおよびAktリン酸化の、有意なFcγRIIBを介する抑制を表すことが実証されている (Brauweiler A.ら, 2001, Journal of Immunology, 167(1):204-211)。従って、ex vivoでSHIP欠失マウス由来のB細胞を用いて本発明の抗体を特徴付けることができる。本発明の抗体によるBCRシグナル伝達のFcγRIIBを介する抑制を確認するアッセイの1つの例は、次のステップ：SHIP欠失マウスから脾B細胞を単離するステップ、上記細胞をリボ多糖を用いて活性化するステップ、および上記細胞をF(ab')₂抗IgMにより刺激してBCRを凝集させるかまたは抗IgMにより刺激してBCRをFcγRIIBと共凝集させるステップを含む。無傷の抗IgMにより刺激してBCRがFcγRIIBと共凝集させた細胞を、さらに本発明の抗体とともにプレインキュベートすることができる。細胞のFcγRIIBに依存する活性を当技術分野で公知の標準技術により測定することができる。本発明の抗体とともにプレインキュベートしておいた細胞のFcγRIIBに依存する活性のレベルを、プレインキュベートしていない細胞と比較すると、レベルの比較はFcγRIIBに依存する活性の本発明の抗体によるモジュレーションを示しうる。

10

【0148】

FcγRIIBに依存する活性の測定は、例えば、フローサイトメトリーによる細胞内カルシウム動員を測定するステップ、Aktおよび／またはErkのリン酸化を測定するステップ、BCRを介するPI(3,4,5)P₃の蓄積を測定するステップ、またはFcγRIIBを介する増殖B細胞を測定するステップを含んでもよい。

【0149】

アッセイを用いて、例えば、FcγRIIB受容体に対するリガンド(IgG)結合部位をブロックすることにより、BCRシグナル伝達のFcγRIIBを介する抑制をモジュレートする、およびFcγRIIBとBCRの共凝集を防止することにより、BCRシグナル伝達のFcγRIIBを介する抑制を拮抗する抗体を同定することができる。アッセイを用いてまた、FcγRIIBとBCRの共凝集を増強する、およびBCRシグナル伝達のFcγRIIBが介在する抑制を作動する抗体を同定することもできる。

20

【0150】

本発明は、ヒト単球/マクロファージにおけるFcγRIIを介するシグナル伝達に対する本発明の抗FcγRIIB抗体を特徴付けることに関する。FcγRIIBの、免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフ(ITAM)を抱く受容体との共凝集は、SHIPをそのエフェクターとして用いるFcγRを介する食作用をダウンレギュレートするように作用する (Tridandapaniら 2002, J. Biol. Chem. 277(7):5082-9)。FcγRIIAのFcγRIIBとの共凝集は、FcγRIIBのITIMモチーフ上のチロシン残基の速やかなリン酸化をもたらし、SHIPのリン酸化、SHIPのShcとの会合、および120および60~65kDaの分子量を有するタンパク質のリン酸化を促進する。さらに、FcγRIIAのFcγRIIBとの共凝集は、細胞制御に関わりアポトーシスを抑制するセリン-トレオニンキナーゼであるAktのリン酸化のダウンレギュレーションをもたらす。

30

【0151】

本発明はさらに、本発明の抗FcγRIIB抗体を、ヒト単球/マクロファージにおけるそれらのFcγRが介在する食作用の抑制について特徴付けることを包含する。例えば、ヒト単球培養細胞株由来の細胞であるTHP-1を、FcγRIIBに対するマウスモノクローナル抗体IV.3のFabフラグメントおよびヤギ抗マウス抗体を用いて (FcγRIIA単独で凝集させるために)、または全IV.3マウスモノクローナル抗体およびヤギ抗マウス抗体を用いて (FcγRIIAとFcγRIIBを共凝集させるために) を用いて刺激してもよい。この系において、本発明の抗体を刺激された細胞に加えて、下流シグナル伝達分子のモジュレーション、例えば、FcγRIIBのチロシンリン酸化、SHIPのリン酸化、SHIPのShcとの会合、Aktのリン酸化、および120および60~65kDaの分子量を有するタンパク質のリン酸化をアッセイしてもよい。さらに、単球培養細胞株のFcγRIIBに依存する食作用効率を本発明の抗体の存在および不在において直接測定してもよい。

40

【0152】

ヒト単球/マクロファージにおけるFcγRを介する食作用の本発明の抗体による抑制を確

50

認するための他のアッセイの例は、次の操作：THP-1細胞を、IV.3マウス抗Fc γ RII抗体のFabおよびヤギ抗マウス抗体を用いて（Fc γ RIIA単独で凝集させてFc γ RIIAを介するシグナル伝達を誘発するために）、またはマウス抗Fc γ RII抗体およびヤギ抗マウス抗体を用いて（Fc γ RIIAとFc γ RIIBを共凝集させてFc γ RIIAを介するシグナル伝達を抑制するために）を用いて刺激する操作を含んでもよい。マウス抗Fc γ RII抗体およびヤギ抗マウス抗体を用いて刺激されている細胞を、本発明の抗体とともにさらにプレインキュベートしてもよい。本発明の抗体とともにプレインキュベートされている刺激された細胞と本発明の抗体を用いてプレインキュベートされていない細胞のFc γ RIIAに依存する活性を測定し、そしてこれらのFc γ RIIAに依存する活性のレベルを比較すると、本発明の抗体によるFc γ RIIAに依存する活性のモジュレーションが示されうる。

10

【0153】

上記のアッセイの例を利用して、例えば、Fc γ RIIB受容体とのリガンド結合をブロックするおよびFc γ RIIBとFc γ RIIAの共凝集を防止することによりFc γ RIIBを介するFc γ RIIAシグナル伝達の抑制を拮抗する抗体を同定することができる。このアッセイは同様に、Fc γ RIIBとFc ϵ RIの共凝集を増強するおよびFc γ RIIBとFc γ RIIAの共凝集を促進することによりFc γ RIIBが介在するFc γ RIIAシグナル伝達の抑制を作動する抗体を同定する。

【0154】

本発明の他の実施形態において、本発明は、先に記載の方法（Tridandapaniら，2000，J. Biol. CHEM. 275: 20480-7）による、THP-1細胞のフルオレセイン化IgG-オプソニン化されたヒツジ赤血球（SRBC）を貪食する能力を測定することによる、本発明の抗体の機能の特徴付けに関する。例えば、食作用を測定する例示のアッセイは：THP-1細胞を本発明の抗体を用いてまたはFc γ RIIと結合しない対照抗体を用いて処理するステップ、上記細胞の活性レベルを比較し、細胞の活性の差（例えば、ロゼット形成（rosetting）活性（IgGコートされたSRBCを結合するTHP-1細胞の数）、接着活性（THP-1細胞と結合したSRBCの総数）、および食作用速度）が本発明の抗体によるFc γ RIIAに依存する活性のモジュレーションを示すものであるステップから成る。このアッセイを用いて、例えば、Fc γ RIIB受容体のリガンド結合をブロックするおよび食作用のFc γ RIIBを介する抑制を拮抗する抗体を同定することができる。このアッセイはまた、Fc γ RIIAシグナル伝達のFc γ RIIBを介する抑制を増強する抗体も同定することができる。

20

【0155】

好ましい実施形態においては、本発明の抗体はヒト単球/マクロファージにおけるFc γ RIIBに依存する活性を、少なくとも1以上の次の方法でモジュレートする：下流シグナル伝達分子のモジュレーション（例えば、Fc γ RIIBのリン酸化状態のモジュレーション、SHIPリン酸化のモジュレーション、SHIPおよびShc会合のモジュレーション、Aktのリン酸化のモジュレーション、さらなる120および60～65kDa付近のタンパク質のリン酸化のモジュレーション）および食作用のモジュレーション。

30

【0156】

本発明は、治療抗体のエフェクター細胞機能に対する抗体の効果、例えば、治療抗体の腫瘍特異的ADCC活性を増強するそれらの能力を同定するための当業者に公知のアッセイを用いる、本発明の抗体の特徴付けを包含する。本発明の方法に従って使用しうる治療抗体としては、限定されるものでないが、抗腫瘍抗体、抗ウイルス抗体、抗微生物抗体（例えば、細菌および単細胞寄生生物）が挙げられ、その例を本明細書（第5.4.6節）に開示する。特に、本発明は、本発明の抗体を、治療抗体、例えば腫瘍特異的モノクローナル抗体の、Fc γ Rを介するエフェクター細胞機能に対するそれらの効果について特徴付けることを包含する。本発明に従ってアッセイすることができるエフェクター細胞機能の例としては、限定されるものでないが、抗体に依存する細胞を介する細胞傷害性、食作用、オプソニン化、オプソニン食作用、Clq結合、および補体依存性細胞を介する細胞傷害性が挙げられる。当業者に公知のエフェクター細胞機能活性を決定するためのいずれの細胞に基づくまたは無細胞アッセイを用いてもよい（エフェクター細胞アッセイについては、Perussiaら，2000，Methods Mol. Biol. 121:179-92；Baggioliniら，1998 Experientia, 44(10

40

50

):841-8; Lehmannら, 2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2):229-42; Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45:147-64; Munnら, 1990 J. Exp. Med., 172:231-237、Abdul-Majidら, 2002 Scand. J. Immunol. 55:70-81; Dingら, 1998, Immunity 8:403-411を参照、これらはそれぞれ本明細書に参照によりその全てが組み入れられる)。

【0157】

本発明の抗体を、エフェクター細胞、例えばナチュラルキラー細胞において、治療抗体のFc γ Rを介するADCC活性に対するそれらの効果について、当業者に公知の標準方法のいずれかを用いてアッセイすることができる(例えば、Perussiaら, 2000, Methods Mol. Biol. 121:179-92を参照)。本明細書に使用される用語「抗体に依存する細胞を介する細胞傷害性 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)」および「ADCC」は、当技術分野で通常および慣用の意味を持ち、Fc γ Rを発現する非特異的な細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞およびマクロファージなどの単球細胞)が標的細胞上の結合した抗体を認識して次いで標的細胞の溶解を起こす、in vitroの細胞を介する反応を意味する。原則として、いずれの活性化Fc γ Rを持つエフェクター細胞もトリガーされるとADCCを媒介することができる。ADCCを媒介する初代細胞 (primary cells) のNK細胞はFc γ RIIIを単独に発現するであるが、単球は、活性化の状態、局在化、または分化の状態に依ってFc γ RI、Fc γ RII、およびFc γ RIIIを発現することができる。造血性細胞に対するFc γ R発現の総括については、例えば、Ravetchら, 1991, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92を参照すること、これは参照により本明細書にその全てが組み入れられる。

【0158】

エフェクター細胞の白血球は1以上のFc γ Rを発現してエフェクター機能を果たす。好ましくは、該細胞は少なくともFc γ RIIIを発現してADCCエフェクター機能を果たす。本発明の方法に使用しうるエフェクター細胞は、限定されるものでないが、末梢血単核球(PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球を含み; PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞はその未変性供給源から、例えば本明細書に記載の血液またはPBMCから単離することができる。好ましくは、本発明のADCCアッセイに使用されるエフェクター細胞は、好ましくは正常なヒト血液から当業者に公知の標準方法を用いて、例えば、フィコール-パーク (Ficoll-Paque) 密度勾配遠心分離法を用いて精製した末梢血単核球 (PBMC) である。例えば、PBMCを全血液をフィコール-ハイパーク (Ficoll-Hypaque) 上に層形成させることにより単離し、細胞を500gで室温にて30分間遠心沈降する。白血球層をエフェクター細胞として採集することができる。本発明のADCCアッセイに使用される他のエフェクター細胞は、限定されるものでないが、単球から誘導されるマクロファージ (MDM) を含む。本発明の方法でエフェクター細胞として使用されるMDMは、好ましくは凍結されたストックとして得るかまたは新鮮なものとして利用する(例えば、Advanced Biotechnologies, MDから)。最も好ましい実施形態においては、洗い分けられた (elutriated) ヒト単球を本発明のエフェクター細胞として使用する。洗い分けられたヒト単球は活性化受容体であるFc γ RIIIAおよびFc γ RIIAならびに抑制受容体であるFc γ RIIBを発現する。ヒト単球は市販されていて、凍結されたストックとして得て、10% ヒトAB血清を含有する基本培地中でまたはヒト血清および25~50ng/mL GM-CSFを伴う基本培地中で解凍してもよい。細胞中のFc γ Rの発現レベルは、例えば、FACS分析を用いて直接決定することができる。あるいは、Fc γ RIIBの発現レベルはマクロファージで増加するので、細胞をマクロファージに成熟させた後に染色する。Fc γ Rの発現レベルを決定するのに使用しうる抗体は、限定されるものでないが、抗ヒトFc γ RIIA抗体、例えばIV.3-FITC; 抗Fc γ RI抗体、例えば32.2 FITC; および抗Fc γ RIIIA抗体、例えばCD16-PE、3G8を含む。最も好ましくは、MDMをIFN γ を用いて刺激し、さらに培養中の単球の生存率を増強すると報じられるサイトカイン、例えばGM-CSFおよび/またはM-CSFの200単位/mLを用いて処理する。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、IFN γ はFc γ R、特にFc γ RIおよびFc γ RIIIAの発現をアップレギュレートする。本発明の方法に使用するエフェクター細胞中の様々なFc γ Rの発現は、当業者に公知の方法を用いてFACS分析により決定することができる。

【0159】

本発明のADCCアッセイで使用される標的細胞は、限定されるものでないが、乳癌培養細胞株、例えば、ATCC受託番号HTB-30をもつSK-BR-3（例えば、Tremplら、1976, Cancer Res. 33:41を参照）；Bリンパ球；Burkittsリンパ腫から誘導される細胞、例えば、ATCC受託番号CCL-86をもつRaji細胞（例えば、Epsteinら、1965, J. Natl. Cancer Inst. 34:231-240を参照）、ATCC受託番号CCL-213をもつDaudi細胞（例えば、Kleinら、1968, Cancer Res. 28: 1300-10を参照）；卵巣癌培養細胞株、例えば、OVCAR-3（例えば、Hamilton, Youngら、1983を参照）、SK-OV-3、PA-1、CAOV3、OV-90、およびIGROV-1（NCIレポジトリから入手しうる；Benardら、1985, Cancer Research, 45:4970-9；これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）が挙げられる。標的細胞はアッセイする抗体の抗原結合部位により認識されなければならない。本発明の方法に使用する標的細胞は、癌抗原の低度、中度、または高度の発現レベルを有してもよい。癌抗原の発現レベルは、通常の当業者に公知の方法、例えば、FACS分析を用いて決定することができる。例えば、本発明は、Her2/neuが色々なレベルで発現される卵巣癌細胞、例えばIGROV-1（Her2/neuの低度の発現を特徴とする）またはOVCAR-3（Her2/neuの高度の発現を特徴とする）の使用を包含する。本発明の方法に標的細胞として使用しうる他の卵巣癌培養細胞株は、OVCAR-8（Hamiltonら、1983, Cancer Res. 43:5379-89、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）；BT-549、MCF7、およびHS578Tを含み、これらは全てNCIレポジトリから入手しうる。

10

【0160】

本発明の抗体の治療抗体のADCC活性に対する効果を決定するアッセイの例は、 ^{51}Cr 放出アッセイに基づくものであり：標的細胞を $[\text{}^{51}\text{Cr}]\text{Na}_2\text{CrO}_4$ （この細胞膜浸透性分子は細胞質タンパク質と結合して自発的に細胞から遅い速度で放出されるが、標的細胞壊死後には大量に放出されるので通常標識付けに用いられる）を用いて標識するステップ；好ましくは、標的細胞が1以上の腫瘍抗原を発現して、標的細胞の細胞表面上に発現された腫瘍抗原と免疫特異的に結合する1以上の抗体により標的細胞をオプソニン化するステップ；本発明の抗体、例えば、2B6、3H7の存在または不在のもとで、オプソニン化され放射標識された標的細胞を、マイクロタイタープレートにおいて標的細胞対エフェクター細胞の好適な比でエフェクター細胞と組み合わせるステップ；細胞の混合物を好ましくは16～18時間、好ましくは37℃でインキュベートするステップ；上清を採集するステップ；および上清サンプル中の放射活性を分析するステップを含むものである。次いで本発明の抗体の存在または不在のもとでの治療抗体の細胞傷害性を、例えば、次式： $\% \text{溶解} = (\text{実験cpm} - \text{標的漏れcpm}) / (\text{界面活性剤溶解cpm} - \text{標的漏れcpm}) \times 100\%$ 、あるいは、 $\% \text{溶解} = (\text{ADCC-AIC}) / (\text{最大放出} - \text{自発性放出})$ を用いて決定することができる。特異的溶解は式：特異的溶解＝本発明の分子を用いる $\% \text{溶解}$ －本発明の分子の不在での $\% \text{溶解}$ 、を用いて計算することができる。グラフを、標的：エフェクター細胞比または抗体濃度を変えることによって作ることができる。

20

30

【0161】

さらに他の実施形態においては、本発明の抗体は、抗体に依存する細胞の細胞傷害性（ADCC）に対して、先に記載された方法（例えば、Dingら、Immunity, 1998, 8:403-11を参照；これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）に従い特徴付けられる。

40

【0162】

いくつかの実施形態において、本発明はin vitroに基づくアッセイおよび／または動物モデルで治療抗体のADCC活性を増強する本発明の抗体の機能の特徴付けることを包含する。

【0163】

特定の実施形態において、本発明は卵巣癌モデルおよび／または乳癌モデルを用いて特定の腫瘍特異的ADCCを増強する本発明の抗体の機能を決定することを包含する。

【0164】

好ましくは、本発明のADCCアッセイは、使用される癌培養細胞株の間で癌抗原の発現レ

50

ベルが様々である少なくとも1つの癌抗原の発現により特徴付けられる、2以上の癌培養細胞株を用いて実施する。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、癌抗原の発現レベルが様々である2以上の培養細胞株におけるADCCアッセイの実施は、本発明の抗体の腫瘍クリアランスのストリンジエンシーの決定を可能にしうる。一実施形態においては、本発明のADCCアッセイは第1の癌培養細胞株と第2の癌培養細胞株を含む2つの癌培養細胞株を用いて実施し、ここで第1の癌培養細胞株は癌抗原の高度の発現レベルにより特徴付けられ、そして第2の癌培養細胞株は癌抗原の低度の発現レベルにより特徴付けられる。

【0165】

例示のアッセイにおいては、OVCAR3、卵巢癌培養細胞株が腫瘍抗原、Her2/neuおよびTAG-72を発現する腫瘍標的として役立ちうる；活性化FcγRIIAおよび抑制FcγRIIBを発現するヒト単球をエフェクターとして使用しうる；そして腫瘍特異マウス抗体、4D5およびCC49を腫瘍特異的抗体として使用しうる。OVCAR-3細胞はATCCから入手しうるしかつ複合化学治療の後に卵巢の進行性乳頭状腺癌を患う患者の悪性腹水から誘導することができる。Hamilton, Young, ら, 1983。好ましくは、OVCAR-3細胞を0.01mg/ml ウシインスリンを補充した培地中で拡大する。2x10⁶生OVCAR-3細胞を、年齢と体重に整合したNOD-SCIDかつヌード胸腺欠損マウス中にMatrigel (Becton Dickinson) を用いて皮下 (s.c) に注入してもよい。腫瘍の推定重量は式：長さx (幅)²/2により計算することができて、好ましくは3グラムを超えない。足場に依存する腫瘍を6~8週後に単離し、腫瘍1グラム当たり1μgのコラゲナーゼ (Sigma) を加えることにより、細胞を一夜インキュベーション後に解離させることができる。次いで細胞を腹腔内注射して異種移植モデルを確立し、そして、本明細書に記載のとおり、本発明の抗FcγRIIB抗体による腫瘍特異的抗体、例えば、CC49と4D5のADCCの増強を試験するためのADCCアッセイの標的として試験することができる。

【0166】

CC49と4D5抗体を分泌するハイブリドーマは、ATCCから入手しうるしかつ重鎖の軽鎖ヌクレオチド配列は公知である (Ricon, Gourlie ら, 1993; Carter, Preser ら, 1992)。好ましくは、4D5とCC49抗体を当業者に公知の標準方法を用いてキメラ化し、ヒトFc配列、例えば、IgG1のヒト定常域をマウス抗体の可変域にグラフトしてエフェクター機能を与える。キメラ4D5およびCC49抗体はそれらの可変域を経由して標的培養細胞株とおよびFc域を経由してヒトエフェクター細胞上に発現されるFcγRと結合する。CC49はTAG-72；腺癌細胞および卵巢癌上に高度に発現される多数の高分子量ムチンを指向する (Lastroria ら, 1998; Szpak ら, 1989; Sheer ら, 1988)。4D5はHer2/neu、上皮増殖因子受容体を指向する (Carter ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-9)。次いで本発明の抗体を利用して、抑制FcγRIIBのブロッキングによる腫瘍特異的抗体のADCC活性の増強を研究することができる。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、少なくとも1つの活性化FcγR、例えば、FcγRIIAを発現するエフェクター細胞が活性化すると抑制受容体 (FcγRIIB) の発現が増強され、FcγRIIAのADCC活性が抑制されるのでこれが腫瘍のクリアランスを制限する。しかし、本発明の抗体はブロッキング抗体、すなわち、抗体として役立って抑制シグナルが活性化されるのを防止し得るので、従って活性化シグナル、例えば、ADCC活性が長期間持続されてさらに強力な腫瘍のクリアランスをもたらしうる。

【0167】

好ましくは、ADCCアッセイに使用する本発明の抗体を改変して少なくとも1つのアミノ酸改変を含ませて、そのエフェクター機能を減少し、最も好ましくは廃止する。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体を改変してADCCアッセイに使用する本発明の抗体を改変して少なくとも1つのアミノ酸改変を含ませて、活性化FcγR、例えば、FcγRIIA、FcγRIIAとの結合を低減する一方、本発明の野生型抗体と比較して最大限のFcγRIIBブロッキング活性を保持する。本発明の抗体を当業者に公知のまたは本明細書に開示したいずれの方法によって改変してもよい。エフェクター機能を破壊することが公知のいずれのアミノ酸改変を本発明の方法に従って用いてもよい。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体を、位置265が改変される、例えば、位置265がアラニンと置換されるように改変

する。好ましい実施形態においては、本発明の抗体のマウス定常域を位置265のアミノ酸のアラニンとの置換を含む対応するヒト定常域と交換して、エフェクター機能を廃止する一方、Fc γ RIIBブロッキング活性を維持する。ELISAアッセイに基づいて、IgG1重鎖の位置265の単一アミノ酸変化はFc γ Rとの結合を有意に低減し、腫瘍質量の低減をもたらすことが示されている（Shieldsら、2002およびClynesら、2000）。他の実施形態においては、本発明の抗体を改変して位置297を改変する、例えば、位置297をグルタミンと置換して、N結合グリコシル化部位を消失させる（Sheildsら、2001；Sondermannら、2000；Jefferrisら、1995を参照、これらは全て本明細書に参照によりその全てが組み入れられる）。この部位における改変はFc γ Rとの全ての相互作用を廃止すると報じられている。好ましい実施形態においては、本発明の抗体のマウス定常域を、位置265および／または297のアミノ酸の置換を含む対応するヒト定常域と交換し、エフェクター機能を廃止する一方、Fc γ RIIBブロッキング活性を維持する。

10

【0168】

本発明の抗体の存在または不在のもとで腫瘍特異的抗体のADCC活性を決定するアッセイの例は、非放射性ユウロピウムに基づく蛍光アッセイ（BATDA、Perkin Elmer）であり、次のステップ：標的細胞を、エステルの加水分解により細胞膜と親水性リガンドを形成するアセトキシルメチルエステルの蛍光増強エステル（TDA）を用いて標識するステップ；この複合体は細胞を離れられず、エフェクターによる細胞が溶解するときだけ放出されるステップ；エフェクター細胞に対する標識した標的を、抗腫瘍抗体と本発明の抗体の存在のもとで加えるステップ；標的とエフェクター細胞の混合物を6～16時間、好ましくは37℃にてインキュベートするステップを含むものであってもよい。ADCC活性の程度は、放出されてユウロピウム（DELFLIA試薬；PerkinElmer）と相互作用するリガンドの量を測定することによってアッセイすることができる。リガンドとユウロピウムは、非常に安定な高度に蛍光性のキレート（EuTDA）を生成し、測定される蛍光は溶解される細胞数に正比例する。パーセント比溶解を式：（実験溶解－自発性溶解／全溶解－自発性溶解）x100%により計算することができる。ADCCアッセイにおいて、NK活性はウサギ抗アシアロG_{M1}抗体（WAKO Pure chemical, Richmond, VA）のF(ab)₂を用いて排除しうる。このin vitroアッセイを対照に用いて、本明細書に記載のin vivo腫瘍クリアランスモデルに対する条件を確立することができる。

20

【0169】

いくつかの実施形態においては、もし蛍光に基づくADCCアッセイの感度が治療抗体のADCC活性を検出するのに低すぎれば、本発明は放射性に基づくADCCアッセイ、例えば⁵¹Cr放出アッセイを包含する。放射性に基づくアッセイを、蛍光に基づくADCCアッセイの代わりにまたは組合わせて実施してもよい。

30

【0170】

本発明の抗体を特徴付けるための⁵¹Cr放出アッセイの例は、次のステップ：2x10⁶OVCA8-3細胞を50 μ Ci ⁵¹Crを用いて12時間標識するステップ；細胞をトリプシン処理するステップ；5x10³細胞を96ウェルプレートに加えるステップ；標的細胞を抗体4D5とCC49を用いて本発明の抗体の存在および不在のもとで特定の濃度で（好ましくは4D5とCC49は1～15 μ g/mLの様々な濃度である）オプソニン化するステップ；オプソニン化された標的細胞を単球由来のマクロファージ（MDM）（エフェクター細胞）に、好ましくは10:1～100:1の様々な比で加えるステップ；細胞の混合物を16-18時間37℃にてインキュベートするステップ；上清を回収するステップ；および上清の放射活性を分析するステップを含むものであってもよい。次いで、本発明の抗体の存在および不在のもとでの4D5とCC49の細胞傷害性を、例えば、次式：%溶解＝（実験cpm－標的漏れcpm）／（界面活性剤溶解cpm－標的漏れcpm）x100%、あるいは、%溶解＝（ADCC-AICC）／（最大放出－自発性放出）を用いて決定することができる。特異的溶解は式：特異的溶解＝本発明の分子を用いる%溶解－本発明の分子の不在での%溶解、を用いて計算することができる。グラフを、標的：エフェクター細胞比または抗体濃度を変えることによって作ることができる。

40

【0171】

50

いくつかの実施形態において、蛍光に基づくADCCアッセイおよび／または放射性に基づくADCCアッセイが本発明の抗体の存在のもとで治療抗体のADCC活性を検出するのに十分な感度がないときは、本発明は、先に記載された単球を介する細胞傷害性アッセイを包含する（Kleinerman、Gano,ら、1995）。IFN- γ はin vitroで単球を初回免疫すると殺腫瘍性になることが示されている（Adams & Marino 1981）。いくつかの実施形態においては、もしユウロピウムに基づくアッセイと ^{51}Cr 放出アッセイの両方でADCC活性の検出ができれば、OVCAR-3細胞と活性化単球を用いる単球を介する細胞傷害性アッセイの改変法を使用しうる。単球を介する細胞傷害性アッセイの例は次のステップ：指数増殖期の腫瘍細胞を一夜 $0.5\mu\text{Ci}^3[\text{H}]$ チミジンとともにインキュベートするステップ；細胞を洗浄して未結合標識を除去するステップ；細胞をトリプシン処理するステップ；標識した標的細胞を接着性IFN γ -活性化単球（エフェクター細胞）に100:1～10:1の様々なエフェクター：標的比で24時間、好ましくは 37°C にて加えるステップ；非接着性細胞を除去するステップ；細胞に新鮮培地を再供給するステップ；および細胞をさらに2日間培養するステップを含むものであってもよい。好ましくはアッセイを、抗体の不在で、 $1\sim 15\mu\text{g/mL}$ 抗腫瘍抗体の存在で、および活性化単球とともに、抗Fc γ RIIB抗体（ $1\sim 15\mu\text{g/mL}$ ）とプレインキュベートしてまたは抗Fc γ RIIB抗体および腫瘍細胞と共にインキュベートして実施する。好ましくはアッセイを、無処理単球を用いて平行して実施する。溶解物の放射活性は、式：[単球および抗体とともに培養した標的細胞の放射活性（cpm）-IFN γ と抗体の存在で単球とともに培養した標的細胞の放射活性]／単球および抗体とともに培養した標的細胞の放射活性 $\times 100$ により決定することができる。

【0172】

いくつかの実施形態においては、本発明のFc γ RIIB抗体のin vivo活性は異種移植ヒト腫瘍モデルで決定する。腫瘍は前記の癌培養細胞株のいずれかを用いて確立することができる。いくつかの実施形態においては、腫瘍を、癌抗原の低度の発現を特徴とする第1の癌培養細胞株と同じ癌抗原の高度の発現を特徴とする2つの癌培養細胞株を用いて確立しうる。次いで、腫瘍クリアランスを当業者に公知の方法を用いて、第1および第2の癌培養細胞株上の癌抗原と免疫特異的に結合する抗腫瘍抗体、および適当なマウスモデル、例えば、Balb/cヌードマウスモデル（例えば、Jackson Laboratories, Taconic）を用いて、養子性で伝達したヒト単球およびMDMをエフェクター細胞として用いて決定することができる。次いで前記の抗体のいずれかをこの動物モデルで試験して腫瘍クリアランスにおける本発明の抗Fc γ RIIB抗体のツール（tole）を評価することができる。

【0173】

本発明の抗体のin vivo活性を試験する方法の例は、次のステップ：癌抗原の発現を特徴とする癌培養細胞株を用いる異種移植マウスモデルを確立するステップ、および、腫瘍クリアランスを媒介する上で、癌培養細胞株に発現される癌抗原に特異的な抗体に対する本発明の抗体の効果を決定するステップを含んでもよい。好ましくは、そのin vivo活性を、第1の癌培養細胞株は低レベルで発現される第1の癌抗原で特徴付けられかつ第2の癌培養細胞株は第1の癌培養細胞株と比較して高いレベルで発現される同じ癌抗原により特徴付けられる2つの癌培養細胞株を用いて平行して試験する。従って、これらの実験は腫瘍クリアランスにおける本発明の抗体の役割の評価の厳格性を増加しうる。例えば、腫瘍をIGROV-1培養細胞株を用いて確立し、そしてHer2/neu特異的抗体の腫瘍クリアランスにおける本発明の抗Fc γ RIIB抗体の効果を評価してもよい。マウスを4のグループに配置して毎週3回モニターしてもよい。異種移植腫瘍モデルを確立するために、 5×10^6 の生細胞、例えば、IGROV-1、SKBR3を、例えばマウス、例えば、3つの年齢および体重の整合した雌性ヌード胸腺欠損マウスに、例えばMatrigel（Becton Dickinson）を用いて皮下注射してもよい。腫瘍の推定重量は式：長さ $\times$ （幅） $^2/2$ により計算することができて、好ましくは3グラムを超えない。拡大のための細胞のin vivo継代については、足場に依存する腫瘍を単離し、その細胞を、コラゲナーゼを好ましくは腫瘍1グラム当たり $1\mu\text{g}$ 加えることにより、 37°C で解離させることができる。皮下経路によるIGROV-1細胞の注射が好ましい。IGROV-1細胞の皮下注射は速く増殖する腫瘍を生じる一方、腹腔内経路は腹膜癌腫症を

誘導してマウスが2ヶ月で死亡する（Benardら，1985，Cancer Res. 45: 4970-9）。IGROV-1細胞は5週以内に腫瘍を形成するので、腫瘍細胞注射後の第1日にエフェクターとしての単球を、Her2/neuに特異的な治療抗体、例えばCh4D5および本発明の抗体；例えば前記キメラ2B6または3H7とともに、腹腔内に同時注射する。好ましくは、抗体は、マウス体重（mbw）1グラム当たりそれぞれ4 μ gを注射する。最初の注射の後、抗体の注射は毎週、その後は4～6週間行う。ヒトエフェクター細胞を2週に1回補充する。マウスの1グループは治療抗体を受給しないが、それぞれ抗腫瘍および抗Fc γ RIIB抗体に対するアイソタイプ対照抗体としてN297A突然変異体を含むキメラ4D5およびヒトIgG1を注射するであろう。

【0174】

以下の表3は、本発明による腫瘍クリアランス研究のセットアップの例である。表3に示すように、6グループで全48マウスそれぞれが本発明の抗体の腫瘍クリアランスにおける役割を、1つの標的とエフェクター細胞組み合わせを用いておよび2つの異なる組み合わせの抗体濃度を用いて試験するために必要であろう。グループAでは腫瘍細胞だけを注射し；グループBでは腫瘍細胞と単球を注射し；グループCでは腫瘍細胞、単球、抗腫瘍抗体（ch4D5）を注射し；グループDでは腫瘍細胞、単球、抗腫瘍抗体、および抗Fc γ RIIを注射し；グループEでは腫瘍細胞、単球および抗Fc γ RIIB抗体を注射し；グループFでは腫瘍細胞、単球、Ch4D5（N297A）、およびヒトIgG1を注射する。当業者は様々な抗体組み合わせの様々な抗体濃度を、記載した腫瘍モデルで試験できることを理解するであろう。好ましくは、乳癌培養細胞株、例えばSKBR3を用いる研究を上記実験と平行して実施する。

【表3】

8マウス/ グループ	腫瘍細胞 s. c 0日	単球 i. p 第1日	ch4D5 4 μ g/g 体重 第1日 i. p	ch4D5 N297A 4 μ g/g 体重 第1日 i. p	ch2B6 N297A 4 μ g/g 体重 第1日 i. p	ヒト IgG1 4 μ g/g 体重 第1日 i. p
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

【0175】

異種移植腫瘍モデルの終点は、腫瘍のサイズ、マウスの体重、生存時間および癌の組織化学的および組織病理学的試験に基づいて、当業者に公知の方法を用いて決定する。表3のマウスのグループをそれぞれ評価するであろう。好ましくはマウスを週3回モニターする。腫瘍増殖の判定基準は、腹部膨張、腹腔の明白なマス（mass）の存在であってもよい。好ましくは腫瘍重量対接種後日数の推定を計算するであろう。他のグループと比較したグループDのマウスの上記判定基準の比較が、腫瘍クリアランスの増強における本発明の抗体の役割を規定するであろう。好ましくは、抗体で処置した動物は、対照グループ後さらに2ヶ月観察下に置かれるであろう。

【0176】

代替の実施形態においては、養子性で移すエフェクター細胞よりむしろ、マウスエフェクター細胞上にヒトFc γ RIIBを発現するヒトFc γ RIIB「ノックイン」マウスを本発明の抗体のin vivo活性を確立するために用いることができる。ヒトFc γ RIIBを発現する創作者マウスはヒトFc γ RIIBのマウスFc γ RIIB遺伝子座への「ノックイン」により作製するこ

とができる。次いで創立者をヌードバックグラウンド上に戻し交配することができ、ヒトFcγRIIB受容体を発現しうる。得られるマウスエフェクター細胞は内因性の活性化FcγRIIAおよびGcγRIIAならびに抑制ヒトFcγRIIB受容体を発現しうる。

【0177】

本発明の抗体のin vivo活性をさらに、異種移植マウスモデルでヒト一次腫瘍由来の細胞、例えば、ヒト一次卵巣および乳癌由来の細胞を用いて試験してもよい。癌患者からの腹水および胸膜の浸出液サンプルをHer2/neuの発現について当業者に公知の方法を用いて試験してもよい。卵巣癌患者からのサンプルを6370gで20分間4℃にて腹水を遠心沈降することにより処理し、赤血球を溶解し、そして細胞をPBSにより洗浄してもよい。腫瘍細胞においてHer2/neuの発現が確認されると、異種移植腫瘍モデルを確立するための皮下接種用に2つのサンプル、メジアンおよび高い発現細胞を選択してもよい。次いで単離された腹水をマウス中に腹腔内注射して細胞を拡大する。ほぼ10マウスに腹腔内注射し、それぞれのマウス腹水をさらに2マウスに継代して全20マウスから腹水を取得し、それを用いて80マウスのグループを注射することができる。胸膜浸出液サンプルを腹水と類似の方法を用いて処理してもよい。胸膜浸出液サンプルからのHer2/neu+腫瘍細胞をマウスの右および左の乳パッド中に注射してもよい。

10

【0178】

いくつかの実施形態においては、もし腹水または胸膜浸出液サンプル中の新生物細胞のパーセントが他の細胞サブセットと比較して低ければ、新生物細胞をin vitroで拡大してもよい。他の実施形態においては、腫瘍細胞をCC49抗体（抗TAG-72）でコーティングした磁性ビーズを用いて先に記載の通り精製してもよく、例えば、Barkerら, 2001, Gynecol. Oncol. 82:57,63を参照、これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。簡単に説明すると、CC49抗体でコーティングした磁性ビーズを用いて卵巣腫瘍細胞を分離し、これをビーズから37℃にて一夜インキュベーションにより脱着することができる。いくつかの実施形態においては、もし腫瘍細胞がTAG-72抗原を欠くのであれば、抗体カクテル、例えば、Stem Cell Technologies, Inc.（カナダ）が提供する抗体カクテルを用いるネガティブ除去（negative depletion）を利用して腫瘍細胞を濃縮してもよい。

20

【0179】

他の実施形態においては、Her2/neuに加え、他の腫瘍マーカーを用いて非腫瘍細胞からの腹水および胸膜浸出液サンプルから得られる腫瘍細胞を分離することができる。胸膜浸出液または乳組織の場合、最近、CD44（接着分子）、B38.1（乳癌／卵巣癌特異マーカー）、CD24（接着分子）をマーカーとして利用しうるということが報じられている、例えば、Al Hajj,ら, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983,8を参照；これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。腫瘍細胞が精製されると、これをマウス中に皮下注射して拡大することができる。

30

【0180】

好ましくは、患者の腹水および胸膜浸出液に免疫組織化学および組織化学を実施し、異常増殖の構造的特徴を分析する。このような方法は当業者に公知であって、本発明に包含される。モニターしうるマーカーは、例えばサイトケラチン（炎症性および間葉細胞からの卵巣新生物および中皮細胞を同定するため）；カルレチニン（Her2neu陽性新生物細胞から中皮細胞を分離するため）；およびCD45（サンプル中の細胞集団の残りから炎症性細胞を分離するため）を含む。続いてのさらなるマーカーは、CD3（T細胞）、CD20（B細胞）、CD56（NK細胞）、およびCD14（単球）を含む。当業者は、上記の免疫組織化学および組織化学的方法が、本発明の方法に用いるいずれの腫瘍細胞に対しても同様に応用されることを理解するであろう。腫瘍細胞の皮下接種後に、マウスの臨床および解剖学的変化を行う。必要により、マウスを剖検して全腫瘍負荷を特定の器官局在化と関係づけてもよい。

40

【0181】

特定の実施形態においては、腫瘍をOVCAR-3細胞およびヒト卵巣癌腹水を用いて確立する。腹水は好ましくは試験する抗体に対するエフェクターと腫瘍標的の両方を含有する。

50

OVCAR-3培養細胞株は好ましくは単球をエフェクターとして移す。次いで両方のこれらの卵巣腫瘍の供給源を養子性でNOD/SCIDおよびヌードマウスに移し、そして腫瘍クリアランスを腫瘍特異的抗体と本発明の抗Fc γ RIIB抗体を用いて決定することができる。

【0182】

好ましくは、OVCAR-3細胞を、0.01mg/mlウシインスリンを補充した培地中で拡大する。

【0183】

2x10⁶生OVCAR-3細胞を、年齢および体重に整合したNOD-SCIDおよびヌード胸腺欠損マウス中にマトリゲル (Matrigel) (Becton Dickinson) とともに皮下注射してもよい。腫瘍の推定重量は式：長さx(幅)²/2により計算することができて、好ましくは3グラムを超えない。足場に依存する腫瘍を6〜8週後に単離し、腫瘍1グラム当たり1 μ gのコラゲナーゼ (Sigma) を加えることにより、細胞を一夜インキュベーション後に解離させることができる。次いで細胞を腹腔内注射して異種移植モデルを確立し、そして、本明細書に記載のとおり、本発明の抗Fc γ RIIB抗体によるADCCの増強を試験するためのADCCアッセイの標的として試験することができる。

【0184】

上記の腫瘍細胞調製物の腹腔内注射は腹水形成による腹部膨張を発生しうるので、これを採集して腹腔を洗浄して腫瘍細胞を収集する。10x10⁶のin vivo継代したOVCAR-3細胞を第0日に1グループ当たり8マウスに表4に示すように腹腔内注射することができる。11.5x10⁶細胞の注射は可視的な腹部膨張を40〜50日に生じることが報じられている (Hamilton, Youngら, 1983)。腫瘍細胞注射後28および42日に、治療抗体、例えばch4D5およびchCC 49 (先に記載のとおり調製しておいた) ならびに本発明の抗体、例えば2B6を、マウス体重1グラム当たり2 μ gおよび5 μ gにて、それぞれの時点に同時注射しう。腫瘍の確立前の2時点における抗腫瘍抗体の注射は、腫瘍マーカーの最適発現が変わりうるので腫瘍クリアランスを様々な増殖段階において評価することを可能にしう。抗体を受けないマウスのグループには無菌リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) を用いて偽注射しう。

【表4】

マウス腫瘍モデルの確立

1グループ当たり8マウス	腫瘍細胞 腹腔内 第0日	単球 腹腔内 第26日	Ch CC49抗体 2 μ g/gマウス体重 第28日	抗CD32B抗体 2 μ g/gマウス体重 第28日
A	+	-	-	-
B	+	+	-	-
C	+	+	+	-
D	+	+	+	+
E	+	+	-	+

【表 5】

	抗体	D	D1	D2	D3	C	C1	E	E1
第28日	CC49	表 2	2	5	5	表 2	5	表 2	0
	2B6	表 2	5	2	5	表 2	0	表 2	5
第42日	CC49	2	2	5	5	2	5	0	0
	2B6	2	5	2	5	0	0	2	5

10

【0185】

表 4 および 5 に示すとおり、腫瘍のクリアランスを増強する上での抗Fc γ RIIB抗体の役割を評価するために 8 マウスの 10 グループがそれぞれ必要であろう。グループ A では腫瘍細胞だけが注射され；グループ B では腫瘍細胞と単球が注射され；グループ C では腫瘍細胞、単球および抗腫瘍抗体が注射され；グループ D では腫瘍細胞、抗腫瘍抗体、抗Fc γ RIIB抗体、および単球が注射され；グループ E では腫瘍細胞、抗Fc γ RIIB抗体、および単球が注射される。マウスのグループ D - 対 - 他グループから得られる結果の比較は、腫瘍クリアランス速度を増強する上での抗Fc γ RIIB抗体の役割を規定するであろう。

20

【0186】

いくつかの実施形態においては、患者からの卵巢癌腹水を、本発明の抗体の *in vivo* 活性を決定するための腫瘍細胞の供給源として用いてもよい。卵巢癌腹水の約 18~20 サンプルを患者から得てもよい。次いで 3 卵巢癌腹水サンプルに対する異種移植腫瘍モデルを確立してもよい。これらのサンプルをスピンドルして処理し、腹水を 2500g にて 20 分間 4℃ で遠心沈降し；赤血球を溶解した後、細胞を PBS を用いて洗浄することができる。細胞を次の通り処理してもよい：スライドを組織病理学的かつ免疫化学的分析のために、異種移植腫瘍モデルを確立する前に、当業者に公知の方法を用いて染色し、新生物細胞のパーセント対エフェクター細胞集団および腫瘍モデルの確立に影響を与える他の細胞サブセットを分析する。免疫組織化学的方法により決定したサンプル中の新生物細胞および十分なエフェクター細胞を評価した後、腹水を NOD-SCID およびヌードマウス中に直接、腹腔内注射して腫瘍を確立してもよい。腫瘍クリアランスおよび抗Fc γ RIIB抗体の役割を次いで先に記載のように試験してもよい。

30

【0187】

5.2.1 抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明の抗体（例えば、それぞれ ATCC 受託番号 PTA-4591 および PTA-4592 をもつクローン 2B6 または 3H7 から産生したマウスモノクローナル抗体）、または本発明の免疫感作法により産生した他のモノクローナル抗体、およびそれらのヒト化バージョンをコードするポリヌクレオチド、ならびに上記ポリヌクレオチドを産生する方法も含む。

【0188】

本発明は、ATCC 受託番号 PTA-4591 をもつ、配列番号 1 に開示された 2B6 抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチドを包含する。本発明はまた、ATCC 受託番号 PTA-4591 をもつ、配列番号 3 に開示された 2B6 抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを包含する。

40

【0189】

本発明の方法はまた、様々なストリンジェンシー、例えば、高度のストリンジェンシー、中度のまたは低度のストリンジェンシー条件のもとで、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。ハイブリダイゼーションは様々なストリンジェンシーの条件下で実施することができる。例示であって限定するものでないが、低度のストリンジェンシーの条件を用いる操作は次の通りである（Shilo および Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792 も参照）。DNA を

50

含有するフィルターを、6時間40℃で、35%ホルムアミド、5X SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA、および500 µg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中で処理する。ハイブリダイゼーションを、次の改変：0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 µg/mlサケ精子DNA、10% (wt/vol) 硫酸デキストラン、および5~20 X 10⁶cpm ³²P-標識したプローブの使用、を施した同じ溶液中で実施する。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で18-20時間40℃にてインキュベートし、次いで1.5時間55℃にて2X SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA、および0.1% SDSを含有する溶液中で洗浄する。洗浄液を、新鮮な溶液により置換え、さらに1.5時間60℃にてインキュベートする。フィルターをプロットし乾燥し、そしてオートラジオグラフィーに曝露する。必要であれば、フィルターを3回65~65℃で洗浄してフィルムに再曝露する。使用する低度のストリンジェンシーの他の条件は当技術分野で周知である（例えば、交差種ハイブリダイゼーションに使用される）。例示であって限定するものでないが、高度のストリンジェンシーの条件を用いる操作は次の通りである。DNAを含有するフィルターのプレハイブリダイゼーションを8時間から一夜、65℃で、6X SSC、50mM TRIS-HCL (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500 µg/ml変性サケ精子DNAから成るバッファー中で実施する。フィルターを48時間、65℃で、100 µg/ml変性サケ精子DNAおよび5~20 X 10⁶cpmの³²P標識したプローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合物中でハイブリダイゼーションする。フィルターの洗浄を37℃で1時間、2X SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll、および0.01% BSAを含有する溶液中で実施する。次いで、50℃で45分間、0.1X SSC中で洗浄した後、オートラジオグラフィにかける。使用する高度のストリンジェンシーの他の条件は当技術分野で周知である。このようなストリンジェンシーの適当な条件の選択は当技術分野で周知である（例えば、Sambrookら、1989、「分子クローニング、研究室マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照；またAusubelら編, in 「研究室技術マニュアルの分子生物学シリーズにおける現行プロトコル (the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals)」, (著作権) 1987-1997, 「現行プロトコル (Current Protocols)」, (著作権) 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.も参照；特に、Dyson, 1991, 「核酸の固定とハイブリダイゼーション分析 (Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis)」 In 「必須の分子生物学：実践的手法 (Essential Molecular Biology : A Practical Approach)」, Vol. 2, T. A. Brown, 編, pp.111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UKを参照)。

【0190】

ポリヌクレオチドを得ることはできるし、そしてポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を当技術分野で公知のいずれかの方法により決定することができる。

【0191】

抗体をコードするポリヌクレオチドは、好適な供給源（例えば、抗体を発現するいずれかの組織または細胞、例えば、本発明の抗体、例えば2B6または3H7を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞から単離された核酸、好ましくはポリA+RNAから作製されたcDNAライブラリー）からの核酸から、Ig特異的プローブとのハイブリダイゼーションおよび／または配列の3'および5'末端とハイブリダイズしうる合成プライマーを用いるPCR増幅により、または同定する特定の遺伝子配列、例えば抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いるクローニングにより作製することができる。次いでPCRにより作製される増幅された核酸を、複製可能なクローニングベクター中に当技術分野で周知のいずれかの方法を用いてクローニングすることができる。

【0192】

抗体のヌクレオチド配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列を、ヌクレオチド配列を遺伝子操作する当技術分野で周知の方法、例えば組換えDNA技術、位置指定突然変異誘発、PCRなどを用いて遺伝子操作して（例えば、Sambrookら、1990, 「分子クローニン

10

20

30

40

50

グ、研究室マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) 」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、およびAusubelら編, 1998, 「分子生物学の現行プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) 」, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照、これらは両方とも本明細書に参照によりその全てが組み入れられる)、色々なアミノ酸配列を有する抗体を作製することが、例えばアミノ酸置換、欠失、および／または挿入を創出することができる。

【0193】

特定の実施形態においては、1以上のCDRを、日常の組換えDNA技術を用いてフレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は未変性またはコンセンサスフレームワーク領域であってもよく、そして好ましくはヒトフレームワーク領域である (ヒトフレームワーク領域のリストは、例えば、Chothiaら, 1998, J. Mol. Biol. 278:457-479を参照)。好ましくは、フレームワーク領域とCDRの組み合わせにより作製されるポリヌクレオチドは、上記抗体がFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、先に考察したように、1以上のアミノ酸置換がフレームワーク領域内になされ、そして好ましくは、そのアミノ酸置換が本発明の抗体のFc γ RIIBとの結合を改善する。

10

【0194】

他の実施形態においては、当技術分野で利用しうるヒトライブラリーまたはいずれかの他のライブラリーを、当技術分野で公知の標準技術によりスクリーニングして本発明の抗体をコードする核酸をクローニングしてもよい。

20

【0195】

5.2.2 抗体の組換え発現

本発明の抗体をコードする核酸配列が得られると、抗体を産生するためのベクターを、組換えDNA技術により当技術分野で周知の技術を用いて作ることができる。当業者に周知の方法を利用して、抗体をコードする配列および適当な転写および翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、in vitro 組換えDNA技術、合成技術、およびin vivo遺伝的組換えが挙げられる (例えば、Sambrookら, 1990, 「分子クローニング、研究室マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) 」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編, 1998, 「分子生物学の現行プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) 」, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照)。

30

【0196】

抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、通常の技術 (例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、およびリン酸カルシウム沈降) により宿主細胞に導入し、トランスフェクトした細胞を次いで通常の技術により培養して本発明の抗体を産生することができる。特定の実施形態においては、抗体の発現を構成的、誘導性、または組織特異的プロモーターにより制御する。

【0197】

本発明の組換え抗体を発現するために利用する宿主細胞は、細菌細胞、例えば大腸菌 (Escherichia coli)、または好ましくは、特に全組換え免疫グロブリン分子を発現するためには、真核生物細胞であってもよい。特に、ヒトサイトメガロウイルスからの主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと連携した哺乳類動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) は免疫グロブリンに対して有効な発現系である (Foeckingら, 1998, Gene 45:101 ; Cockettら, 1990, Bio/Technology 8:2)。

40

【0198】

様々な宿主-発現ベクター系を利用して本発明の抗体を発現することができる。このような宿主-発現系は抗体のコード配列を産生し続いて精製することができるビヒクルを意味するが、また、適当なヌクレオチドコード配列を用いて形質転換またはトランスフェクトされると本発明の抗体をin situで発現することができる細胞も意味する。これらとしては、限定されるものでないが、微生物、例えば免疫グロブリンコード配列を含有する組

50

換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）および枯草菌（*B. subtilis*））；免疫グロブリンコード配列を含有する組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス属 *Saccharomyces Pichia*）；免疫グロブリンコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクターに感染させた昆虫細胞系（例えば、バキュロウイルス）；免疫グロブリンコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）およびタバコモザイクウイルス（TMV））に感染させたまたは組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ti プラスミド）を用いて形質転換した植物細胞系；または哺乳類動物細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）から誘導されたプロモーターを含有する組換え発現構築物を抱く哺乳類動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、293T、3T3細胞、リンパ球（lymphotic cells）（米国特許第5,807,715号を参照）、Per C.6細胞（Crucellが開発したラット網膜細胞））が挙げられる。

【0199】

細菌系においては、発現する抗体に対して意図される用途に依って多くの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体の医薬組成物を作製するために大量のこのようなタンパク質を産生させる場合、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指令するベクターが所望される。このようなベクターとしては、限定されるものではないが、抗体コード配列を個々にベクター中にlacZコード領域のフレーム内でライゲートして融合タンパク質が産生されるようにする大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpUR278（Rutherfordら, 1983, EMBO J. 2: 1791）；pINベクター（Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109；Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509）；などが挙げられる。pGEXベクターはまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために利用することもできる。一般的に、このような融合タンパク質は可溶性であり、溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズとの吸収および結合、続いて遊離グルタチオンの存在のもとでの溶出により容易に精製することができる。pGEXベクターはトロニンまたは因子Xaプロテアーゼ切断部位を含んで、クローニングされた標的遺伝子産物がGST成分から放出されるように設計する。

【0200】

昆虫系においてはオートグラファ・カリフォルニア核多角体病ウイルス（*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*）（ACNPV）を外来遺伝子を発現するためのベクターとして利用される。ウイルスはガ科 *Spondoptera frugiperda* 細胞中で増殖する。抗体コード配列を個々にウイルスの非必須領域（例えば、多角体遺伝子）中にクローニングしてACNPVプロモーター（例えば、多角体プロモーター）の制御下に配置する。

【0201】

哺乳類動物宿主細胞においては、多くのウイルスに基づく発現系を利用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合、目的の抗体コード配列をアデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3部（tripartite）リーダー配列とライゲートしてもよい。このキメラ遺伝子を次いでアデノウイルスゲノムにin vitroまたはin vivo組換えにより挿入してもよい。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、域E1またはE3）での挿入により、感染した宿主中に生存しかつ免疫グロブリン分子を発現することができる組換えウイルスが得られる（例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照）。特定の開始シグナルも、挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳のために必要でありうる。これらのシグナルは、開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、開始コドンは全体のインサートの翻訳を保証する所望のコード配列のフレームと同じフェーズになければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、様々な起源、天然および合成のものであってよい。発現の効率は、適当なエンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどにより増強することができる（Bitt

nerら, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544を参照)

さらに、宿主細胞株を選択して、挿入配列の発現をモジュレートするかまたは遺伝子産物を所望の特定の様式で改変しかつ処理することができる。このようなタンパク質産物の改変（例えばグリコシル化）および処理（例えば切断）はタンパク質の機能にとって重要でありうる。色々な宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび改変に対する特徴的かつ特定の機構を有する。適当な培養細胞株または宿主系を選んで、発現される外来タンパク質の正しい改変とプロセッシングを保証することができる。この目的で、一次転写物の適当なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化に対して細胞機構を持つ真核生物宿主細胞を用いてもよい。このような哺乳類動物宿主細胞としては、限定されるものでないが、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、293T、3T3、WI38、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、CRL7030およびHs578Bstが挙げられる。

10

【0202】

組換えタンパク質を長期間、高収率産生させるためには、安定な発現が好ましい。例えば、安定して本発明の抗体を発現する培養細胞株を遺伝子操作により作ることができる。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使うよりもむしろ、宿主細胞を適当な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位など）により制御したDNAを用いて形質転換してもよい。宿主細胞を適当なかつ選択可能なマーカーにより制御されるDNAにより形質転換してもよい。外来DNAを導入した後に、遺伝子操作した細胞を濃縮培地中で1～2日間増殖し、次いで選択培地に切替えてもよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を与えるので、細胞が安定してプラスミドをその染色体中に組込んで増殖して巣を形成し、順にクローニングされて培養細胞株に拡大されうる。この方法を有利に用いて本発明の抗体を発現する培養細胞株を遺伝子操作で作製することができる。このように遺伝子操作で作製した培養細胞株は、本発明の抗体と直接的にまたは間接的に相互作用する化合物をスクリーニングしかつ評価する上で特に有用である。

20

【0203】

多くの選択系を利用することができ、限定されるものでないが、ヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら, 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら, 1980, Cell 22:817) 遺伝子をそれぞれtk-、hgprr-またはaprr-細胞において使用することができる。また、抗代謝産物耐性を以下の遺伝子を選択の基本に用いることができる：メトトレキセート耐性を与えるdhfrR (Wiglerら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hareら, 1981, Proc. NATL. Acad. Sci. USA 78: 1527)；ミコフェノール酸耐性を与えるgpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. NATL. Acad. Sci. USA 78: 2072)；アミノグリコシドG-418耐性を与えるneo (Clinical Pharmacy 12:488-505; WuおよびWu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; およびMorganおよびAnderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215)；ならびにハイグロマイシン耐性を与えるhygro (Santerreら, 1984, Gene 30: 147)。組換えDNA技術の技術分野で公知のかつ利用しうる方法は、Ausubelら編, 1993「分子生物学の現行プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley & Sons, NY; Krieger, 1990, 「遺伝子導入と発現、研究室マニュアル (Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual)」, Stockton Press, NY; およびin Chapters 12 and 13, Dracopoliら(編), 1994, 「ヒト遺伝学の現行プロトコル (Current Protocols in Human Genetics)」, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1、に記載されている。

30

40

【0204】

本発明の抗体の発現レベルはベクター増幅により増加することができる（総括は、Bebington and Hentschel, 「DNAクローニングにおける哺乳類動物細胞のクローニングした

50

遺伝子を発現するための遺伝子増幅に基づくベクターの利用 (The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning)」, Vol.3, Academic Press, New York, 1987を参照)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能であるとき、宿主細胞の培養中に存在する阻害剤のレベルが増加するとマーカー遺伝子のコピー数は増加しうる。増幅領域は抗体のヌクレオチド配列と関係しているなので、抗体の産生も増加しうる (Crouseら, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0205】

宿主細胞を、本発明の2つの発現ベクター、重鎖由来のポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第2のベクターと同時トランスフェクトしてもよい。2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドを等しく発現することができる同一の選択マーカーを含有してもよい。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一ベクターを用いてもよい。このような状況では、軽鎖は重鎖の前に配置して無毒の重鎖が過剰になるのを避ける (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197)。重鎖および軽鎖をコードする配列はcDNAまたはゲノムDNAを含んでもよい。

【0206】

本発明の抗体が組換えにより発現されると、これを当技術分野で公知の抗体を精製するためのいずれかの方法により、例えば、クロマトグラフィ (例えば、イオン交換、アフィニティ、特にタンパク質A後の特異的抗原に対するアフィニティにより、およびサイズカラムクロマトグラフィ)、遠心分離、示差溶解度、またはタンパク質を精製するためのいずれかの他の標準技術により精製することができる。

【0207】

5.3 予防および治療方法

本発明は抗体に基づく治療法であって、1以上の本発明の抗体を動物、好ましくは哺乳類動物、そして最も好ましくはヒトに投与することに関わり、疾患、障害、または感染に関連する、FcγRIIBの異常なレベルまたは活性に関連する、および／または、FcγRIIB活性に関連する免疫機能を改変するかまたは第2の治療抗体の細胞傷害性活性を増強するかまたはワクチン組成物の効力を増強することにより治療可能な、症候群を予防、治療、または改善するための上記治療法を包含する。いくつかの実施形態においては、1以上の本発明の抗体の投与による治療は、1以上の治療薬の投与、例えば、限定されるものでないが、化学治療、放射治療、ホルモン治療、および／または生物学的治療／免疫治療と組合わせて行われる。

【0208】

限定されるものでないが、本発明の予防および治療化合物は、限定されるものでないが、ペプチド、ポリペプチド、翻訳後改変されたタンパク質を含むタンパク質、抗体などを含むタンパク質性分子；小分子 (1000ダルトン未満)、無機または有機化合物；限定されるものでないが、2本鎖または1本鎖DNA、2本鎖または1本鎖RNA、ならびに3重らせん核酸分子を含む核酸分子を含む。予防および治療化合物は、いずれの公知の生物 (限定されるものでないが、動物、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルスを含む) 由来または合成分子のライブラリー由来のものであってもよい。

【0209】

抗体は、当技術分野で公知のまたは本明細書に記載した製薬上許容される組成物で提供することができる。以下に詳しく説明したように、本発明の抗体は、癌 (特に受動免疫治療または癌ワクチンの効力を増強するため)、自己免疫疾患、炎症性障害、またはアレルギー (例えば、アレルギーを治療するためにワクチンの効力を増強するため) を治療する方法に使用することができる。

【0210】

疾患、障害、または感染の予防およびまたは治療薬として機能する本発明の抗体を、疾患、障害、または感染に関連する1以上の症候群を治療、予防または改善するために、動

物、好ましくは哺乳類動物、そして最も好ましくはヒトに投与することができる。本発明の抗体を、Fc γ RIIBの異常レベルまたは活性に関連したおよび／またはFc γ RIIB活性に関連する免疫機能を改変することにより治療可能な疾患、障害、または感染を治療、予防または管理するのに有用な1以上の他の予防および／または治療薬と組合わせて投与することができる。ある特定の実施形態においては、本発明の1以上の抗体を哺乳類動物、好ましくはヒトに、癌治療に有用な他の1以上の治療薬とともに同時に投与する。用語「同時に」は、予防または治療薬を正確に同じ時点で投与することに限定されるのではなく、むしろ本発明の抗体と他の薬剤を被験者に続けてかつ本発明の抗体が他の薬物と一緒に作用するような時間間隔内に投与してそれらがそのように投与されなかった場合より増加した利益を与えることを意味する。例えば、それぞれの予防または治療薬を同じ時点で投与するかまたは異なる時点でいずれの順に続けて投与してもよい；しかし、もし同じ時点で投与しない場合、それらは十分近い時点で投与して所望の治療または予防効果を与えなければならない。それぞれの治療薬を別々に、いずれの適当な剤形で、そしていずれの好適な経路により投与してもよい。

10

【0211】

様々な実施形態においては、予防または治療薬を1時間未満離して、約1時間離して、約1時間～約2時間離して、約2時間～約3時間離して、約3時間～約4時間離して、約4時間～約5時間離して、約5時間～約6時間離して、約6時間～約7時間離して、約7時間～約8時間離して、約8時間～約9時間離して、約9時間～約10時間離して、約10時間～約11時間離して、約11時間～約12時間離して、24時間以下離してまたは48時間以下離して投与する。好ましい実施形態においては、2以上の成分を同じ患者訪問の際に投与する。

20

【0212】

本明細書に使用される投与量と投与頻度は、治療上有効かつ予防上有効な用語に包含される。投与量と投与頻度はさらに、典型的には、それぞれの患者に特有の因子によって、投与される特定の治療または予防薬、癌のタイプ、投与経路、ならびに患者の年齢、体重、応答、および過去の医療歴に依存して変化しうる。医師はこのような因子および次の事項、例えば文献に報じられるおよび「医師のデスクリファレンス (Physician's Desk Reference)」(第56版、2002)に推奨される投与量を考慮して好適な治療計画を選択することができる。

【0213】

本発明の抗体はまた、他のモノクローナルまたはキメラ抗体と一緒に、または例えば、抗体と相互作用しかつ免疫応答を増加するエフェクター細胞の数または活性を増加するのに役立つリンホカインまたは造血性増殖因子(例えば、IL-2、IL-3およびIL-7など)と一緒に有利に利用してもよい。本発明の抗体はまた、疾患、障害、または感染を治療するために用いる1以上の薬物、例えば抗癌薬、抗炎症性薬または抗ウイルス薬と一緒に有利に利用してもよく、これらは、例えば、以下の第5.4.6および5.4.5節に詳しく記載した通りである。

30

【0214】

5.3.1 癌

本発明の抗体を単独でまたは当技術分野で公知の癌性細胞の原発腫瘍の増殖または転移を抑制または低減する他の治療抗体と一緒に用いてもよい。一実施形態においては、本発明の抗体を癌免疫治療に用いられる抗体と一緒に用いてもよい。本発明は、このような免疫治療の効力を、治療抗体のエフェクター機能、例えば、ADCC、CDC、食作用、オプソニン作用などの効力を増加することにより増加するために、本発明の抗体の他の治療抗体との併用を包含する。特定の作用機構により束縛されることを意図しないが、本発明の抗体は、好ましくは単球およびマクロファージ上のFc γ RIIBをブロックして、例えば、Fc γ Rの活性化を介する腫瘍のクリアランスを増強することにより、治療上の利益である腫瘍特異的抗体の臨床効力を増強する。従って、本発明は、癌抗原と特異的に結合しかつ細胞傷害性である他の抗体と組合わせて投与するときに、癌抗原により特徴付けられる癌を予防または治療する方法を提供する。本発明の抗体は、特に細胞傷害性活性をもつ癌抗原特異

40

50

的治療抗体の細胞傷害性活性を増強して本発明の抗体による腫瘍細胞死滅を増強する上で、および／または例えば治療抗体のADCC活性またはCDC活性を増強する上で、癌の予防または治療に有用である。特定の実施形態において、本発明の抗体は、単独でまたは細胞傷害性治療抗体と組合わせて投与すると、癌性細胞（cancerous cell）の原発腫瘍の増殖または転移を、本発明の上記抗体の不在のもとでの原発腫瘍の増殖または転移と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%だけ抑制または低減する。好ましい実施形態においては、本発明の抗体は細胞傷害性治療抗体と組合わせて、癌（cancer）の原発腫瘍の増殖または転移を、上記抗体の不在のもとでのその増殖または転移と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%だけ抑制または低減する。

【0215】

正常から悪性状態への移行は、遺伝的および後成的変化に関わる多段階プロセスである。実際、この進行を容易にする多数の変化が細胞制御回路に起こって、腫瘍細胞は、通常、組織ホメオスタシスを制御する末端分化と静止状態の実施を行わなくなる。ある特定の遺伝子は癌細胞の侵襲性および転移性ポテンシャル、例えばCSF-1（コロニー刺激因子1またはマクロファージコロニー刺激因子）と関係付けられている。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、CSF-1は腫瘍部位へマクロファージを補給して腫瘍の進行を促進することにより、腫瘍進行および転移を媒介しうる。マクロファージは、恐らく血管形成因子、例えばチミジンホスホリラーゼ、血管内皮由来増殖因子の分泌；増殖因子、例えば腫瘍細胞上でパラ分泌因子として作用しうる上皮増殖因子の分泌により、腫瘍進行および転移を媒介する上で栄養性役割を有し、従って、血管中への腫瘍細胞遊走および侵襲を促進すると考えられる（例えば、Linら，2001，J. Exp. Med. 193(6):727-739；Linら，2002，Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 7(2):147-162；Schollら，1993，Molecular Carcinogenesis，7:207-11；Clynesら，2000，Nature Medicine，6(4):443-446；Fidlerら，1985，Cancer Research，45:4714-26を参照）。

【0216】

本発明は、本発明の抗体を用いてマクロファージを介する腫瘍細胞進行および転移をブロックすることを包含する。本発明の抗体は、マクロファージ浸潤が起こる固体腫瘍を治療する上で特に有用である。本発明の拮抗性抗体は、腫瘍部位に局在化するマクロファージの集団を低減または排除することにより、特に腫瘍細胞転移を制御、例えば低減または排除するのに有用である。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体は単独で腫瘍細胞転移を制御するために使用される。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の拮抗性抗体は、単独で投与されると、マクロファージ上の抑制FcγRIIBと結合し、効果的にマクロファージの集団を低減し、従って腫瘍細胞進行を制限する。本発明の拮抗性抗体は、腫瘍部位に局在化するマクロファージを低減するか、または好ましくは排除する。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体は、限定されるものでないが、乳癌、子宮癌および卵巣癌を含む、CSF-1の過剰発現により特徴付けられる癌の治療に使用される。

【0217】

本発明はさらに、FcγRIIBを発現するマクロファージ以外の免疫エフェクター細胞、例えば樹状細胞を効果的に除去または排除する抗体を包含する。本発明の抗体を用いる免疫エフェクター細胞の効果的な除去または排除は、エフェクター細胞の集団の50%、60%、70%、80%、好ましくは90%、そして最も好ましくは99%だけの低減でありうる。従って、本発明の抗体は、単独でまたは第2の抗体、例えば、抗腫瘍抗体、抗ウイルス抗体、および抗微生物抗体などの治療抗体と一緒に治療効力を増強する。いくつかの実施形

態においては、治療抗体は癌細胞または炎症性細胞に対して特異性を有する。他の実施形態においては、第2抗体は正常細胞と結合する。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の抗体をFc γ RIIBを発現するエフェクター細胞を除去するために単独で使用すると、Fc活性化受容体を介するシグナル伝達経路が効果的に増強される。第2抗体、例えば、治療抗体との組合わせで使用すると、抗体のFcを介するエフェクター機能を増加することにより、第2抗体の効力が増強される。

【0218】

本発明の方法および組成物により治療または予防することができる癌および関係する障害は、限定されるものでないが、次が挙げられる：白血病、例えば、限定されるものでないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、例えば骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病白血病（erytroleukemia leukemias）および脊髄形成異常症候、慢性白血病、例えば、限定されるものでないが、慢性骨髄球性（顆粒球）白血病、慢性リンパ性白血病、毛様細胞白血病；赤血球増加症（polycythemia vera）；リンパ腫、例えば、限定されるものでないがホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、例えば、限定されるものでないが、うつ積（smoldering）多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、プラズマ細胞白血病、単生プラズマ細胞腫および延髄外プラズマ細胞腫；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；意味未確定の単クローン性高ガンマグロブリン血症；良性モノクローナル免疫グロブリン血症；重鎖疾患；骨および結合組織肉腫、例えば限定されるものでないが、骨肉腫（bone sarcoma）、骨肉腫（osteosarcoma）、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫瘍、骨の線維肉腫、軟骨、骨膜肉腫、軟組織肉腫、血管肉腫（hemangiosarcoma）、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫；脳腫瘍、例えば限定されるものでないが、神経膠腫、星細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣細胞腫、乏突起膠腫、非神経膠腫、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体腫、松果体芽細胞腫、原発脳リンパ腫；乳癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、小葉（小細胞）癌、腺管内癌、髄様乳癌、粘液性乳癌、管状腺乳癌、乳頭状乳癌、パジェット病、および炎症性乳癌；副腎癌、例えば、限定されるものでないが、褐色細胞腫および副腎皮質性癌；甲状腺癌、例えば、限定されるものでないが乳頭または濾胞性甲状腺癌、髄様甲状腺癌および未分化甲状腺癌；膵臓癌、例えば、限定されるものでないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドまたは島細胞腫瘍；下垂体癌、例えば、限定されるものでないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症、および尿崩症；眼癌、例えば、限定されるものでないが、眼黒色腫、例えば虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、および毛様体黒色腫、および網膜芽細胞腫；膣癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、腺癌、および黒色腫；外陰部癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫、およびパジェット病；頸癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、および腺癌；子宮癌、例えば、限定されるものでないが、子宮内膜癌および子宮肉腫；卵巣癌、例えば、限定されるものでないが、卵巣上皮癌、境界型腫瘍、生殖細胞腫瘍、および間質腫瘍；食道癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘液性類表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、プラズマ細胞腫、いば状癌、および燕麦細胞（小細胞）癌；胃癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、肉芽腫性（ポリープ状）、潰瘍性、表在拡大型、広汎拡大型、悪性リンパ腫、リポ肉腫、線維肉腫、および癌肉腫；大腸癌；直腸癌；肝臓癌、例えば、限定されるものでないが、肝細胞性癌および肝芽腫、胆嚢癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌；胆管癌、例えば、限定されるものでないが、乳頭状癌、結節型および広汎型；肺癌、例えば、限定されるものでないが、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞癌（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌；精巣癌、例えば、限定されるものでないが、胚腫瘍、精上皮腫、未分化、古典的（典型的）、精母細胞、非精上皮腫、胚性癌、テラトーマ癌、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）、前立腺癌、例えば、限定されるものでないが、腺癌、平滑筋肉腫、および横紋筋肉腫；陰茎癌；口腔癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌；基底癌；唾液腺癌、例えば、限定されるものでないが、

10

20

30

40

50

腺癌、粘膜表皮性癌、およびアデノイド嚢胞癌；咽頭癌、例えば、限定されるものでないが、扁平上皮細胞癌、およびいぼ状；皮膚癌、例えば、限定されるものでないが、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌および黒色腫、表在拡大黒色腫、結節型黒色腫、黒子悪性黒色腫、末端部黒子黒色腫；腎臓癌、例えば、限定されるものでないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行細胞癌（腎盂および／または子宮）；ウィルムス腫瘍；膀胱癌、例えば、限定されるものでないが、移行細胞癌、扁平上皮細胞癌、腺癌、癌肉腫。さらに、癌としては、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、骨膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原生癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌が挙げられる（このような障害の総括については、Fishmanら、1985, Medicine, 第2版, J. B. Lippincott Co., Philadelphia、およびMurphyら、1997, 「十分な情報に基づく決定：癌診断、治療、および回復の全書（Informed Decisions : The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery）」, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of Americaを参照）。

10

【0219】

従って、本発明の方法と組成物はまた、様々な癌または他の異常増殖性疾患の治療または予防に有用であり、それらの疾患としては（限定されるものでないが）、次が挙げられる：癌、例えば、膀胱、乳房、大腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胃、子宮頸部、甲状腺および皮膚の癌；、例えば扁平上皮細胞癌；リンパ系統の造血性腫瘍、例えば、白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫；骨髓球性系統の造血性腫瘍、例えば、急性および慢性骨髓性白血病および前骨髓球性白血病；間葉起源の腫瘍、例えば、線維肉腫および横紋筋肉腫；他の腫瘍、例えば、黒色腫、精上皮腫、奇形癌、神経芽細胞腫および神経膠腫；中枢および末梢神経性系の腫瘍、例えば、星細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、および神経鞘腫；間葉起源の腫瘍、例えば、線維肉腫、横紋筋肉腫、および骨肉腫；および他の腫瘍、例えば、黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞性癌および奇形癌。アポトーシスにおける異常により生じる癌を本発明の方法と組成物により治療することも意図している。このような癌としては、限定されるものでないが、p53突然変異をもつ濾胞性癌、ホルモン依存性の乳房腫瘍、前立腺および卵巣、および前癌病変、例えば家族性腺腫様ポリープ症、および骨髓形成異常症候群が挙げられる。特定の実施形態においては、卵巣、膀胱、乳房、大腸、肺、皮膚、膵臓、または子宮における悪性腫瘍または異常増殖性変化（例えば、化生および異形成症）、または過剰増殖性障害を本発明の方法と組成物により治療または予防する。他の特定の実施形態においては、肉腫、黒色腫、または白血病を本発明の方法と組成物により治療または予防する。

20

30

【0220】

癌抗原と関係する癌は、癌抗原と結合しかつ細胞傷害性である抗体と組合わせて、本発明の抗体の投与により治療または予防することができる。或る特定の実施形態においては、本発明の抗体は、特定の癌抗原に対する抗体の、抗体を介する細胞傷害性効果を増強する。例えば、限定されるものでないが、次の癌抗原と関係する癌は、本発明の抗体により治療または予防することができる。KS 1/4汎癌抗原（PerezおよびWalker, 1990, J. Immunol. 142:32-37; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415）、卵巣癌抗原（CA125）（Yuら, 1991, Cancer Res. 51(2):48-475）、前立腺酸性リン酸（prostatic acid phosphate）（Tailorら, 1990, Nucl. Acids Res. 18 (1) : 4928）、前立腺特異的抗原（HenttuおよびVihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeliら, 1993, Cancer Res. 53:227-230）、黒色腫関係抗原p97（Estinら, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-44）、黒色腫抗原gp75（Vijayasardahlら., 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380）、高分子量黒色腫抗原（HMW-MAA）（Nataliら., 1987, Cancer 59:55-3; Mittelmanら, 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144）、前立腺特異的膜抗原、癌胎児抗原（CEA）（Foonら, 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294）、多形性上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪小球抗原、結腸直腸腫瘍関係抗原、例えば：CEA、TAG-72（Yokataら, 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408）、C017-1A（Ragnhammar, 1993, Int. J. Cancer 53:751-758

40

50

); GICA 19-9 (Herlynら, 1982, J Clin. Immunol. 2: 135)、CTA-1およびLEA、パーキ
ットリンパ腫抗原38.13、CD19 (Ghetieら, 1994, Blood 83: 1329-1336)、ヒトB-リンパ
腫抗原-CD20 (REFFら, 1994, Blood 83:435-445)、CD33 (Sgourosら, 1993, J. Nucl. Med.
34:422-430)、黒色腫特異的抗原、例えばガングリオシドGD2 (Salehら, 1993, J. Im
munol., 151,3390-3398)、ガングリオシドGD3 (Shitaraら, 1993, Cancer Immunol. Im
munother. 36:373-380)、ガングリオシドGM2 (Livingstonら, 1994, J. Clin. Oncol. 1
2: 1036-1044)、ガングリオシドGM3 (Hoonら, 1993, Cancer Res. 53: 5244- 5250)、
細胞表面抗原の腫瘍特異的移植型 (TSTA)、例えばウイルスにより誘導した腫瘍抗原、例
えばT-抗原DNA腫瘍ウイルスおよびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原、腫瘍胎児性抗原
- α -フェトプロテイン、例えば大腸、膀胱腫瘍癌胎児性抗原のCEA (Hellstromら, 1985,
Cancer. Res. 45:2210-2188)、分化抗原、例えばヒト肺癌抗原L6、L20 (Hellstromら, 1
986, Cancer Res. 46:3917-3923)、線維肉腫の抗原、ヒト白血病T細胞抗原-Gp37 (Bhat
tacharya-Chatterjeeら、1988, J. of Immun. 141:1398-1403)、ネオ糖タンパク質、ス
フィンゴ脂質、乳癌抗原、例えばEGFR (上皮増殖因子受容体)、HER2抗原 (p185^{HER2})、
多形性上皮ムチン (PEM) (Hilkensら, 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359)、悪
性ヒトリンパ球抗原-AP0-1 (Bernardら, 1989, Science 245:301-304)、分化抗原 (Feiz
i, 1985, Nature 314:53-57) 例えば、胎性赤血球および一次内胚葉に見出される I 抗原
、胃腺癌に見出される I (Ma)、乳上皮に見出されるM18およびM39、骨髓性細胞に見出さ
れるSSEA-1、結腸直腸癌に見出されるVEP8、VEP9、Myl、VIM-D5、およびD₁56-22、結腸腺
癌に見出されるTRA-1-85 (血液型群H)、C14、肺腺癌に見出されるF3、胃癌に見出される
AH6、胚性癌細胞に見出されるYハプテン、LeY、A431細胞に見出されるTL5 (血液型群A)
、EGF受容体、膵臓癌に見出されるE₁ シリーズ (血液型群B)、胚性癌細胞に見出されるFC
10.2、胃腺癌、腺癌に見出されるCO-514 (血液型群Le^a)、腺癌に見出されるNS-10、結腸
腺癌に見出されるCO-43 (血液型群Le^b)、G49、EGF受容体、(血液型群ALe^b/Le^y)、大腸
癌に見出される19.9、胃癌ムチン、骨髓細胞に見出されるTSA7、黒色腫に見出されるR24
、胚性癌細胞に見出される4.2、G_{D3}、D1.1、OFA-1、G_{M2}、OFA-2、G_{D2}、M1:22:25:8、なら
びに4-8細胞段階胚に見出されるSSEA-3、SSEA-4。他の実施形態においては、抗原は皮膚
T細胞リンパ腫から得たT細胞受容体誘導ペプチドである (Edelson, 1998, The Cancer
Journal 4:62を参照)。

【0221】

本発明の抗体を当技術分野で公知のいずれかの治療癌抗体と組合わせて用いて治療効
力を増強してもよい。例えば、本発明の抗体を、癌治療に治療上の効用を示している表3の
抗体とともに用いることができる。本発明の抗体は、上記治療癌抗体の少なくとも一つの
抗体を介するエフェクター機能を増強することにより治療癌抗体の治療効力を増強する。
或る特定の実施形態においては、抗体は、上記治療癌抗体の補体に依存するカスケードを
増強することによりその治療効力を増強する。本発明の他の実施形態においては、本発明
の抗体は、標的とした腫瘍細胞の食作用とオプソニン作用を増強することによりその治療
効力を増強する。本発明の他の実施形態においては、本発明の抗体は、標的とした腫瘍細
胞の破壊における抗体に依存する細胞を介する細胞傷害性 ("ADCC") を増強することによ
りその治療効力を増強する。

【0222】

本発明の抗体を、生得および獲得免疫応答のアクチベーターとして開発された (Coley
Pharmaceuticals) または現在開発中であるシトシン-グアニンジヌクレオチド (CpG) 系
産物と組合わせて用いることもできる。例えば、本発明は、癌を治療および/または予防
するための本発明の方法と組成物における、CpG 7909、CpG 8916、CpG 8954 (Coley Phar
maceuticals) の使用を包含する (Warrenら, 2002, Semin Oncol., 29 (1 Suppl 2):93-7
; Warrenら, 2000, Clin Lymphom, 1(1):57-61も参照、これは本明細書に参照により組み
入れられる)。

【0223】

本発明の抗体を、細胞死滅を介しない治療効果を有する治療抗体と組合わせて使用し、

抗体の治療活性を強化することができる。特定の実施形態において、本発明は、本発明の抗体の治療アポトーシスを誘導する作動活性をもつ抗体、例えば抗Fas抗体と組合わせた使用を包含する。抗Fas抗体は当技術分野で公知であり、例えば、Jo2 (Ogasawaraら, 1993, Nature 364:806) およびHFE7 (Ichikawaら, 2000, Int. Immunol. 12:555) を含む。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、Fc γ RIIBは、抗Fasを介するアポトーシスを促進することが示唆されていて、例えば、Xuら, 2003, Journal of Immunology, 171: 562-568を参照。実際、Fc γ RIIBの細胞外ドメインはFas受容体に対する架橋剤として役立ち、機能性複合体を形成させてFasに依存するアポトーシスを促進することができる。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体は抗Fas抗体とFc γ RIIBの相互作用をブロックし、Fasを介するアポトーシス活性の低減に導く。Fasを介するアポトーシス活性の低下をもたらす本発明の抗体は、望ましくない副作用、例えば肝毒性を有する抗Fas抗体と組合わせると特に有用である。他の実施形態においては、本発明の抗体は抗Fas抗体とFc γ RIIBの相互作用を増強し、Fasを介するアポトーシス活性の増強に導く。本発明の抗体の治療アポトーシスを誘導する作動活性をもつ抗体との組合わせは、治療効力を増強する。

10

【0224】

本発明の方法を用いる治療アポトーシスを誘導する抗体は、当技術分野で公知のアポトーシス経路のモジュレーション用のいずれかの死受容体、例えば、TNFR受容体ファミリーに特異的であってもよい。

【0225】

本発明は、障害性アポトーシスを介するシグナル伝達による疾患、例えば、癌、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、欠乏性Fasを介するアポトーシスによる疾患を治療する方法であって、本発明の抗体を抗Fas抗体と組合わせて投与することを含む上記方法を包含する。

20

【0226】

いくつかの実施形態においては、本発明の作動性抗体は、黒色腫細胞の腫瘍を含む非造血性由来の腫瘍を治療するのに特に有用である。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の作動性抗体の効力は、部分的に、黒色腫細胞の腫瘍を含む非造血性由来の腫瘍がFc γ RIIBを発現して、Fc γ RIIB抑制経路を活性化することにある。最近の実験は、実際、黒色腫細胞におけるFc γ RIIBの発現は抗腫瘍抗体との直接的相互作用により（例えば、抗腫瘍抗体のFc域と結合することにより）細胞質内に依存する方法で腫瘍増殖をモジュレートすることを示している (Cassardら, 2002, Journal of Clinical Investigation, 110(10):1549-1557)。

30

【0227】

いくつかの実施形態において、本発明は、腫瘍細胞それ自身に発現されないでむしろ腫瘍間質を含む周囲の反応性および腫瘍を支持する非悪性細胞に発現される腫瘍抗原と免疫特異的に結合する治療抗体と組合わせた本発明の抗体の使用を包含する。腫瘍間質は、新血管を形成する内皮細胞および腫瘍脈管構造を取り囲む間質繊維芽細胞を含む。特定の実施形態においては、本発明の抗体を、内皮細胞上の腫瘍抗原と免疫特異的に結合する抗体と組合わせて用いる。好ましい実施形態においては、本発明の抗体を、繊維芽細胞上の腫瘍抗原、例えば繊維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) と免疫特異的に結合する抗体と組合わせて用いる。FAPは、限定されるものでないが、肺、乳、および結腸直腸癌を含む多くの固体腫瘍の間質繊維芽細胞に高度に発現される95KDaのホモダイマーII型糖タンパク質である (例えば、Scanlanら, 1994, Proc. Natl. Acad. USA, 91:5657-61; Parkら, 1999, J. Biol. Chem., 274:36505-12; Rettigら, 1988, Proc. NATL. Acad. Sci. USA 85:3110-3114; Garin-Chesleaら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7235-7239を参照)。FAPと免疫特異的に結合する抗体は当技術分野で公知であり、本発明の範囲に包含され、例えば、Wuestら, 2001, Journal of Biotechnology, 159-168; Mersmannら, 2001, INT. J. CANCER, 92:240-248; 米国特許第6,455,677号を参照すること; これらの全ては本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。

40

50

【0228】

最近、IgEは腫瘍増殖のメディエーターであることが示唆されていて、実際、IgEを標的とした即効性の過敏性およびアレルギー炎症応答に関わる可能性のある自然の機構であることが報じられている（総括は、例えば、Millsら、1992, Am. Journal of Epidemiol. 122:66-74; Erikssonら、1995, Allergy 50:718-722を参照）。実際、最近の研究は、IgEを腫瘍細胞に搭載すると腫瘍増殖を低減し、複数の事例では腫瘍拒絶が起こることを示している。その研究によれば、IgEを搭載した腫瘍細胞は治療ポテンシャルを持つだけでなく、生得的免疫エフェクター機構およびT細胞を介する適応性免疫応答の活性化を含む長期の抗腫瘍免疫を得る、Realiら、2001, Cancer Res. 61:5516-22を参照；これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。本発明の拮抗性抗体は、IgEを介する癌治療法の効力を増強するために、IgEの投与と組合わせて、癌を治療および／または予防するために使用することができる。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の抗体は腫瘍のIgE治療の治療効力を、抑制経路をブロックすることにより増強する。本発明の拮抗性抗体は、(i)腫瘍増殖の遅延を増強すること；(ii)腫瘍進行の速度の低下を増強すること；(iii)腫瘍拒絶を増強すること；または(iv)IgE単独による癌の治療と比較して保護免疫を増強することにより、IgEを介する癌治療法の治療効力を増強することができる。

10

【0229】

癌治療法ならびにそれらの投与量、投与経路および推奨される用法は当技術分野で公知であって文献に記載されている、例えば、「医師のデスクリファレンス (Physician's Desk Reference)」(第56版、2002)を参照、これは本明細書に参照により組み入れられる。

20

【0230】

5.3.2 B細胞悪性腫瘍

本発明の作動性抗体は、B細胞悪性腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫および慢性リンパ性白血病を治療または予防するのに有用である。FcγRIIBは、悪性リンパ腫、特にB細胞非ホジキンリンパ腫の染色体転座による調節解除の標的である (Callanan M. B.ら、2000 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(1):309-314を参照)。従って、本発明の抗体は、いずれかのB細胞系統の慢性リンパ性白血病を治療または予防するのに有用である。B細胞系統の慢性リンパ性白血病は、Freedmanが総括している (Freedman, 1990, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4:405による総括を参照)。いずれの作用機構に束縛されることも意図しないが、本発明の作動性抗体は、B細胞増殖および／または活性化を抑制してB細胞悪性腫瘍を抑制または防止する。本発明はまた、B細胞悪性腫瘍を予防および／または治療するための当技術分野で公知の他の治療法 (例えば、化学治療および放射治療) と組合わせた本発明の作動性抗体の使用も包含する。本発明はまた、B細胞悪性腫瘍を予防および／または治療するための当技術分野で公知の他の抗体と組合わせた本発明の作動性抗体の使用も包含する。例えば、本発明の作動性抗体をGoldenbergら (米国特許第6,306,393号) が開示した抗C22または抗CD19抗体と組合わせて使用することができる。

30

【0231】

本発明の抗体はまた、Oncoscint (標的: CEA)、Verluma (標的: GP40)、Prostascint (標的: PSMA)、CEA-SCAN (標的: CEA)、Rituxin (標的: CD20)、Herceptin (標的: HER-2)、Campath (標的: CD52)、Mylotarge (標的: CD33)、およびZevalin (標的: CD20) と組合わせて使用してもよい。

40

【0232】

5.3.3 自己免疫疾患および炎症性疾患

本発明の作動性抗体を用いて自己免疫疾患または炎症性疾患を治療または予防することができる。本発明は、被験者における自己免疫性または炎症性障害に関連する1以上の症候群を予防、治療、または管理する方法であって、上記被験者に治療上有効な量の本発明の抗体またはそのフラグメントを投与することを含む上記方法を提供する。本発明はまた、被験者における炎症性障害に関連する1以上の症候群を予防、治療、または管理する方

50

法であって、さらに上記被験者に治療上有効な量の1以上の抗炎症薬を投与することを含む上記方法も提供する。本発明はまた、自己免疫疾患に関連する1以上の症候群を予防、治療、または管理する方法であって、さらに上記被験者に治療上有効な量の1以上の免疫調節薬を投与することを含む上記方法も提供する。第5.4.5節は抗炎症薬および免疫調節薬の限定されるものでない例を提供する。

【0233】

本発明の抗体はまた、自己免疫疾患または炎症性疾患を予防および／または治療するための当技術分野で公知のいずれかの抗体と組合わせて使用することもできる。炎症性障害を治療または予防するために使用される抗体の限定されるものでない例を表6Aに掲げ、自己免疫障害を治療または予防するために使用される抗体の限定されるものでない例を表6B 10
に掲げる。本発明の抗体は、例えば、表6Aおよび表6Bに掲げる治療抗体の治療効力を増強することができる。例えば、限定されるものでないが、本発明の抗体は表6Aおよび表6Bの抗体のいずれかにより処置される被験者の免疫応答を増強することができる。

【0234】

本発明の抗体はまた、Orthoclone OKT3、ReoPro、Zenapex、Simulec、Synagis、およびRemicadeと組合わせて使用することもできる。

【0235】

本発明の抗体を、生得および獲得免疫応答のアクチベーターとして開発された(Coley Pharmaceuticals)または現在開発中であるシトシン-グアニンジヌクレオチド(CpG)に基づく製品と組合わせて用いることもできる。例えば、本発明は、自己免疫性または炎症性障害を治療および／または予防するための本発明の方法と組成物における、CpG 7909、CpG 8916、CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals)の使用を包含する(Weeratnaら, 2001, F 20
EMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71、これは本明細書に参照により組み入れられる)。

【0236】

本発明の抗体を投与することにより治療できる自己免疫障害の例は、限定されるものでないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、自己免疫卵巣炎および睾丸炎、自己免疫血小板減少症、ベーチェット病、類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎(celiac sprue-dermatitis)、慢性疲労免疫機能障害症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャージ-スト劳斯症候群、癬痕類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、円板状狼瘡、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブズ病、ギヤン-バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、I型または免疫を介する糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発無ガンマグロブリン血症、原発胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レーノー現象、ライター症候群、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、 40
ブドウ膜炎、脈管炎、例えば疱疹状皮膚炎脈管炎、白斑、およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。炎症性障害の例は、限定されるものでないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー障害、敗血症ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性ウイルスまたは細菌感染から生じる慢性炎症が挙げられる。本明細書の第2.2.2節に記載の通り、いくつかの自己免疫障害は炎症性症状と関連している。このように、自己免疫障害と考えられる障害と炎症性障害の間には重複がある。従って、いくつかの自己免疫障害は炎症性障害としても特徴付けられる。本発明の方法によって予防、治療または管理することができる炎症性障害の例としては、限定されるものでないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー障害、敗血症ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関 50

節炎、炎症性骨溶解、および慢性ウイルスまたは細菌感染から生じる慢性炎症が挙げられる。

【0237】

本発明の抗体を用いて炎症性障害を患う動物、特に哺乳動物が罹る炎症を軽減することもできる。特定の実施形態において、抗体は動物の炎症を、上記抗体を投与されていない動物の炎症と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%だけ軽減することができる。他の実施形態においては、抗体の組合わせは動物の炎症を、上記抗体を投与されていない動物の炎症と比較して、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%だけ軽減することができる。

10

【0238】

本発明の抗体を用いて、移植の拒絶を予防することができる。

【表 6 A】

本発明の抗体と組合わせて用いることができる炎症性疾患および自己免疫疾患用の抗体

抗体名	標的抗原	産物型	アイソタイプ	スポンサー	適応症	
5G1.1	補体 (C5)	ヒト化	IgG	Alexion Pharm Inc	慢性関節リウマチ	
5G1.1	補体 (C5)	ヒト化	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE	
5G1.1	補体 (C5)	ヒト化	IgG	Alexion Pharm Inc	腎炎	
5G1.1-SC	補体 (C5)	ヒト化	ScFv	Alexion Pharm Inc	心肺バイパス	
5G1.1-SC	補体 (C5)	ヒト化	ScFv	Alexion Pharm Inc	心筋梗塞	10
5G1.1-SC	補体 (C5)	ヒト化	ScFv	Alexion Pharm Inc	血管形成術	
ABX-CBL	CBL	ヒト		Abgenix Inc	GvHD	
ABX-CBL	CD147	マウス	IgG	Abgenix Inc	同種移植拒絶	
ABX-IL8	IL-8	ヒト	IgG2	Abgenix Inc	乾癬	
アンテグレン	VLA-4	ヒト化	IgG	Athena/Elan	多発性硬化症	
抗-CD11a	CD11a	ヒト化	IgG1	Genentech Inc/Xoma	乾癬	
抗-CD18	CD18	ヒト化	Fab'2	Genentech Inc	心筋梗塞	
抗-LFA1	CD18	マウス	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	同種移植拒絶	
アントバ (Antova)	CD40L	ヒト化	IgG	Biogen	同種移植拒絶	20
アントバ (Antova)	CD40L	ヒト化	IgG	Biogen	SLE	
BTI-322	CD2	ラット	IgG	Medimmune Inc	GvHD、乾癬	
CDP571	TNF- α	ヒト化	IgG4	Celltech	クローン病	
CDP571	TNF- α	ヒト化	IgG4	Celltech	慢性関節リウマチ	
CDP850	E-セ렉チン	ヒト化		Celltech	乾癬	
Corsevin M	Fact VII	キメラ		Centocor	抗凝固薬	
D2E7	TNF- α	ヒト		CAT/BASF	慢性関節リウマチ	
Hu23F2G	CD11/18	ヒト化		ICOS Pharm Inc	多発性硬化症	
Hu23F2G	CD11/18	ヒト化	IgG	ICOS Pharm Inc	卒中	
IC14	CD14	?		ICOS Pharm Inc	中毒性ショック	30
ICM3	ICAM-3	ヒト化		ICOS Pharm Inc	乾癬	
IDEC-114	CD80	霊長類化		IDEC Pharm/Mitsubishi	乾癬	
IDEC-131	CD40L	ヒト化		IDEC Pharm/Eisai	SLE	
IDEC-131	CD40L	ヒト化		IDEC Pharm/Eisai	多発性硬化症	
IDEC-151	CD4	霊長類化	IgG1	IDEC Pharm/GlaxoSmithKline	慢性関節リウマチ	
IDEC-152	CD23	霊長類化		IDEC Pharm	喘息/アレルギー	
インフリキシマブ	TNF- α	キメラ	IgG1	Centocor	慢性関節リウマチ	
インフリキシマブ	TNF- α	キメラ	IgG1	Centocor	クローン病	40
LDP-01	β 2-インテグリン	ヒト化	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	卒中	
LDP-01	β 2-インテグリン	ヒト化	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	同種移植拒絶	
LDP-02	α 4 β 7	ヒト化		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	潰瘍性大腸炎	
MAK-195F	TNF α	マウス	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	中毒性ショック	
MDX-33	CD64 (FcR)	ヒト		Medarex/Centeon	自己免疫血管障害	
MDX-CD4	CD4	ヒト	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	慢性関節リウマチ	

抗体名	標的抗原	産物型	アイソタイプ	スポンサー	適応症	
MEDI-507	CD2	ヒト化		Medimmune Inc	乾癬	
MEDI-507	CD2	ヒト化		Medimmune Inc	GvHD	
OKT4A	CD4	ヒト化	IgG	Ortho Biotech	同種移植拒絶	
オルトクローン OKT4A	CD4	ヒト化	IgG	Ortho Biotech	自己免疫疾患	
オルトクローン/ 抗-CD3 OKT3	CD3	マウス	mIgG2a	Ortho Biotech	同種移植拒絶	
RepPro/ アブシキシマブ	gp11bIIla	キメラ	Fab	Centocor/Lilly	冠動脈造影の複合症	10
rhuMab-E25	IgE	ヒト化	IgG1	Genentech/Novartis/ Tanox Biosystems	喘息／アレルギー	
SB-240563	IL5	ヒト化		GlaxoSmithKline	喘息／アレルギー	
SB-240683	IL-4	ヒト化		GlaxoSmithKline	喘息／アレルギー	
SCH55700	IL-5	ヒト化		Celltech/Schering	喘息／アレルギー	
シムレクト	CD25	キメラ	IgG1	Novartis Pharm	同種移植拒絶	
SMART a-CD3	CD3	ヒト化		Protein Design Lab	自己免疫疾患	
SMART a-CD3	CD3	ヒト化		Protein Design Lab	同種移植拒絶	
SMART a-CD3	CD3	ヒト化	IgG	Protein Design Lab	乾癬	20
ゼナパックス	CD25	ヒト化	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman- La Roche	同種移植拒絶	

【表 6 B】

自己免疫障害に対する抗体

抗体	適応症	標的抗原
ABX-RB2		T細胞、B細胞およびNK細胞上のCBL抗原に対する抗体 異種マウスからの全ヒト抗体
IL1-ra	慢性関節リウマチ	組換え抗炎症性タンパク質
sTNF-RI	慢性炎症性疾患 慢性関節リウマチ	可溶性腫瘍壊死因子 α -受容体I型はTNF作用をブロックする
5C8 (抗CD-40リガンド抗体)	フェーズII試験を99年10月に中止した 「副作用」を試験	CD-40
IDEC131	全身エリテマトーデス (SLE)	抗CD40ヒト化
IDEC151	慢性関節リウマチ	霊長類化; 抗CD4
IDEC152	喘息	霊長類化; 抗CD23
IDEC114	乾癬	霊長類化抗CD80
MEDI-507	慢性関節リウマチ; 多発性硬化症 クローン病 乾癬	抗CD2
LDP-02 (抗b7mAb)	炎症性腸疾患クローン病潰瘍性大腸炎	白血球上のa4b7インテグリン受容体
SMART抗 γ インターフェロン抗体	自己免疫障害	抗 γ インターフェロン
Verteportin	慢性関節リウマチ	
Thalomid (サリドマイド)	ハンセン病-クローン病に市販する認可を得た 慢性関節リウマチ	腫瘍壊死因子 α (TNF α) の阻害剤
SEICIDS (選択的サイトカイン抑制薬)		ホスホジエステラーゼ4型酵素 (PDE-4) の高特異的な阻害剤はcAMP (環状アデノシンモノリン酸) のレベルを増加し、タンパク質キナーゼA (PKA) を活性化し、転写因子NK-KBをブロックし、TNF-A遺伝子の転写を防止し、TNF-aの産生を減少させる
IMiDs (免疫調節薬)	一般的自己免疫障害	サリドマイドの構造的類似体はTNF-aを抑制する
MDX-33	自己免疫反応により生じる血液障害	FcRI受容体に対するモノクローナル抗

10

20

30

40

	特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 自己免疫溶血性貧血	体
MDX-CD4	慢性関節リウマチおよび他の自己免疫を治療する	CD4受容体分子に対するモノクローナル抗体
VX-497	自己免疫障害 多発性硬化症 慢性関節リウマチ 炎症性腸疾患 狼瘡 乾癬	イノシンモノリン酸デヒドロゲナーゼの阻害剤 (リンパ球増殖に必要なヌクレオチドの産生に利用される新しいRNAおよびDNAを作るために必要な酵素)
VX-740	慢性関節リウマチ	ICEインターロイキン- 1β の阻害剤 (攻撃的免疫応答に導く酵素制御経路を転化してサイトカインを調節する)

抗体	適応症	標的抗原
VX-745	炎症に特異的 免疫応答の化学シグナル伝達に 関わる 炎症の開始と進行	P38MAPキナーゼ、マイトジェン活 性化プロテインキナーゼの阻害 剤
Enbrel (エタネルセプト) IL-8		TNF (腫瘍壊死因子) を標的とする IL-8 (インターロイキン8) に対す る全ヒトMAB (IL-8をブロックし炎症性応答を ブロックする)
5G1. 1	慢性関節リウマチ 類天疱瘡 (危険な皮膚発疹) 乾癬 狼蒼	aC5補体阻害剤
アポジェン (Apogen) MP4		組換え抗原 T細胞に関連する疾患を選択的 に破壊する アポトーシスを誘導する T細胞がプログラム細胞死によ り排除される 身体自身の細胞を攻撃しない 特定のアポジェンは特定のT細 胞を標的とする

Company Rankings	Product	Development Stage
Immunex	エンブレル	上市
Amgen	IL1-ra、sTNF-R1	フェーズII/III
Abgenix	AGX-RB2、IL-8	前臨床、フェーズI
Alexion	5G1. 1、ApogenMP4	フェーズII、前臨床
Biogen	5C8	フェーズII (中止)
IDEC	131. 151、152、114	フェーズIおよびII
MedImmune	MEDI507	フェーズI/II
Millennium	LDP-02、	フェーズII
タンパク質 Design Labs	抗γインターフェロン	前臨床
Medarex	MDX-33、MDX-CD4	フェーズII、フェーズI

QLT Photo Therapeutics	Verteportin	フェーズI
Celegene	サロミド、SelCIDs、IMiDs	上市、前臨床
Vertex	VX-497、VX-740、VX-745	フェーズII、フェーズII、フェーズII

5.3.4 アレルギー

本発明は、それを必要とする被験者におけるIgEを介するおよびまたはFcεRIを介するアレルギー障害を治療または予防する方法であって、上記被験者に治療上有効な量の本発明の作動性抗体またはそのフラグメントを投与することを含む上記方法を提供する。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の抗体は、急性かつ遅発性アレルギー応答に寄与するFcεRIが誘導する肥満細胞活性化を抑制するのに有用である (Metcalfe D.ら 1997, Physiol. Rev. 77:1033)。好ましくは、本発明の作動性抗体は、当技術分野で使用されているIgEを介するアレルギー障害を治療または予防する通常の方法と比較して、増加した治療効力および/または低下した副作用を有する。IgEを介するアレルギー障害を治療または予防する通常の方法は、限定されるものでないが、抗炎症性薬（例えば、経口および吸入による喘息用の副腎皮質ステロイド）、抗ヒスタミン薬（例えば、アレルギー鼻炎およびアトピー性皮膚炎用）、システイニルロイコトリエン（例えば、喘息治療用）；抗IgE抗体；および特定の免疫治療または除感作を含む。

【0239】

IgEを介するアレルギー応答の例としては、限定されるものでないが、喘息、アレルギー鼻炎、胃腸アレルギー、好酸球増加症、結膜炎、アトピー性皮膚炎、じんま疹、アナフィラキシー、または糸球体腎炎が挙げられる。

【0240】

本発明は、FcεRIおよびヒトFcγRIIBと複合体を形成する、すなわちFcεRIおよびヒトFcγRIIBと特異的に結合するように遺伝子操作で作製した分子、例えば免疫グロブリンを包含する。好ましくは、このような分子は、IgEおよびFcεRIに媒介される障害に治療効力を有する。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、これらの遺伝子操作した分子の治療効力は、部分的に、肥満細胞および好塩基球機能を抑制するその能力に因る。

【0241】

特定の実施形態においては、FcεRIおよびヒトFcγRIIBと特異的に結合する分子は、FcεRIに対する結合部位およびFcγRIIBに対する結合部位を含むキメラ融合タンパク質である。このような分子は、当業者に公知の標準組換えDNA手法に従って遺伝子操作で作製することができる。好ましい特定の実施形態において、本発明の方法に用いるキメラ融合タンパク質は、huFcεを抗FcγRIIBモノクローナル抗体のF(ab')単鎖のC-末端域と連結するためのブリッジとして使われる領域と融合した本発明の抗FcγRIIBモノクローナル抗体のF(ab')単鎖を含む。本発明の方法に用いるキメラ融合タンパク質の一例は次を含む： $V_L/C_H(Fc\gamma RIIB)$ -ヒンジ- $V_H/C_H(Fc\gamma RIIB)$ -リンカー- $C_H\epsilon 2$ - $C_H\epsilon 3$ - $C_H\epsilon 4$ 。キメラ分子用のリンカーは長さが5、10、好ましくは15アミノ酸であってもよい。リンカーの長さを変えて分子のFcγRIIBおよびFcεRIとの結合を最適化してもよい。特定の実施形態においては、リンカーは15アミノ酸リンカーであり、配列： $(Gly_4Ser)_3$ から成る。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、フレキシブルなペプチドリンカーは鎖対合を容易にしかつ可能なリフォールディングを最小化し、そしてこのリンカーはまた、キメラ分子が2つの受容体、すなわち、細胞上のFcγRIIBおよびFcεRIに到達してそれらと架橋することを可能にする。好ましくは、キメラ分子を、共存しうるプロモーター、例えばサイトメガロウイルスプロモーターとともに哺乳類動物発現ベクター、例えばpCI-neo中にクローニングする。本発明の方法に従って調製される融合タンパク質は、FcεRI ($CH\epsilon 2CH\epsilon 3$) に対するおよびFcγRIIB (VL/CL 、-ヒンジ- VH/CH) に対する結合部位を含有しうる。本発明の方法に従って調製される融合タンパク質をコードする核酸は、好ましくは、293細胞にトラ

ンスフェクトさせて、分泌されるタンパク質を当技術分野で公知の通常の方法を用いて精製する。

【0242】

キメラ分子のヒトFc ϵ RIおよびFc γ RIIBの両方との結合は、Fc γ Rとの結合を決定するための当業者に公知の通常の方法を用いて評価することができる。好ましくは、本発明のキメラ分子は、例えば抗原が駆動する脱顆粒および細胞活性化の抑制を、抑制することにより、IgEを介する障害を治療する上での治療効力を有する。IgEが駆動するFc ϵ RIを介する肥満細胞脱顆粒をブロックする上での本発明のキメラ分子の効力は、ヒトに用いる前に、ヒトFc ϵ R α およびヒトFc γ RIIBを発現するように遺伝子操作されているトランスジェニックマウスにおいて確認してもよい。

10

【0243】

本発明は、IgEに媒介されるおよび／またはFc ϵ RIに媒介されるアレルギー障害を治療および／または予防するための二特異的抗体の使用を提供する。二特異的抗体(BsAb)は、通常、別の抗原上の異なるエピトープと結合する。BsAbは潜在的な臨床効力を有し、ウイルス、ウイルス感染した細胞および細菌病原体を標的とするためにならびに血栓崩壊薬を血餅に送達するために使用されている(Cao Y., 1998 Bioconj. Chem 9:635-644; Koel emijら, 1999, J. Immunother., 22,514-524; Segalら, Curr. Opin. Immunol., 11,558-562)。BsIgGおよび他の関係する二特異的分子を作る技術は利用しうる(例えば、Carterら, 2001 J. of Immunol. Methods, 248,7-15; Segalら, 2001, J. of Immunol. Methods, 248,7-15を参照、これらは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる)。

20

【0244】

本発明は、抗Fc γ RIIB抗体の1つのF(ab')および利用しうるモノクローナル抗huIgE抗体の1つのF(ab')を含有し、同じ細胞の表面上の2つの受容体、Fc γ RIIBおよびFc ϵ RIと凝集する二特異的抗体を提供する。当技術分野で公知のおよび本明細書に開示したいずれの手法を用いて本発明の方法に使用する二特異的抗体を作製してもよい。特定の実施形態においては、BsAbを、先に記載のように、抗Fc γ RIIB抗体と抗huIgE抗体のF(ab')フラグメントを化学的に架橋することにより作製しうるのであって、例えば、Glennieら, 1995, 「腫瘍免疫生物学 (Tumor Immunobiology)」, Oxford University press, Oxford, p.225を参照; これは本明細書に参照によりその全てが組み入れられる。F(ab')フラグメントは、ペプシンによる限定されたタンパク分解とメルカプトエタノールアミンにより還元してフリーのヒンジ領域スルフヒドリル(SH)基をもつFab'フラグメントを得ることにより作製することができる。Fab'(SH)フラグメント上のSH基を過剰のO-フェニレンジマレイミド(O-PDM)を用いてアルキル化して遊離マレイミド基(mal)を得てもよい。2つの調製物Fab'(mal)およびFAB'(SH)を適当な比、好ましくは1:1で組合わせてヘテロダイマー構築物を作製してもよい。BsAbをサイズ排除クロマトグラフィにより精製し、当業者に公知の技術を用いてHPLCにより特徴付けることができる。

30

【0245】

特に、本発明は、Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと結合する第1の重鎖-軽鎖対およびIgE受容体と結合する第2の重鎖-軽鎖を含み、ここで上記第1の重鎖-軽鎖対が最初にFc γ RIIBと結合することを条件とする二特異的抗体を包含する。本発明の二特異的抗体は、当技術分野で公知の標準技術を用いて遺伝子操作で作製し、Fc γ RIIBとの結合がIgE受容体との結合に優先することを保証することができる。当業者であれば、二特異的抗体を、例えば、IgE受容体と結合する親和性より大きい親和性で上記二特異的抗体がFc γ RIIBと結合するように遺伝子操作することを理解しうる。さらに、二特異的抗体を、当技術分野で公知の技術により遺伝子操作して、抗体のヒンジサイズの長さを、例えばリンカーを付加することにより増加して、同じ細胞上のIgE受容体およびFc γ RIIB受容体との結合にフレキシビリティをもつ二特異的抗体を得ることができる。

40

本発明の抗体はまた、当技術分野で公知のIgE-を介するアレルギー障害を治療または予防するための他の治療抗体または薬物と組合わせて用いることもできる。例えば、本発明の抗体を次のいずれかと組合わせて用いることができる: アゼラスチン、アステリン(As

50

telin)、ジプロピオン酸ベクロメタゾン吸入薬、バンセル (Vanceril)、ジプロピオン酸ベクロメタゾン鼻吸入/スプレー薬、バンセナーゼ (Vancenase)、ベコナーゼ・ブデソニド鼻吸入/スプレー薬、リンコート・セチリジン、ジルテック・クロルフェニラミン、シュードエフェドリン、デコナミン (Deconamine)、スタフェド (Sudafed)、クロモリン、ネイサル crom (Nasalcrom)、インタル (Intal)、オブチクロム (Opticrom)、デスロラタジン、クラリネックス、フェキソフェナジンおよびシュードエフェドリン、アレグラD、フェキソフェナジン、アレグラ・フルニソリド鼻スプレー、ネイサリド (Nasalide)・プロピオン酸フルチカゾン鼻吸入/スプレー薬、フロナーゼ (Flonase)・プロピオン酸フルチカゾン経口吸入薬、フロベント、ヒドロキシジン、ビスタリル (Vistaril)、アタラックスロルタジン、シュードエフェドリン、クラリチンD、ロラタジン、クラリチン、プレドニゾロン (prednisolone)、プレドニゾロン (Prednisolone)、ペジアプレド (Pediapred) 経口液、メドロール・プレドニゾン、デルタゾン、プレドサロメテロール液 (Liquid Predsalmeterol)、セレベント・トリアムシノロンアセトニド吸入薬、アズマコート・トリアムシノロンアセトニド (Azmacort triamcinolone acetone) 鼻吸入/スプレー薬、ナサコート (Nasacort)、またはナサコートAQ (NasacortAQ)。本発明の抗体を、生得および獲得免疫応答のアクチベーターとして開発されている (Coley Pharmaceuticals) または現在開発中であるシトシン-グアニンジヌクレオチド (「CpG」) 系製品と組合わせて使用することができる。例えば、本発明は、IgEを介するアレルギー障害を治療および/または予防するための本発明の方法と組成物におけるCpG 7909、CpG 8916、CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) の使用を包含する (Weeratnaら, 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71も参照、これは本明細書に参照により組み入れられる)。

【0246】

本発明は、当技術分野で公知のアレルギー障害を治療するためのいずれかの治療抗体、例えば、XolairTM (オマリズマブ; Genentech); rhuMAB-E25 (BioWorld Today, Nov. 10, 1998, p.1; Genentech); CGP-51901 (ヒト化抗IgE抗体) などとの組合わせた本発明の抗体の使用を包含する。

【0247】

さらに、本発明は、当技術分野で公知のアレルギー障害を治療するための他の組成物と組合わせた本発明の抗体の使用を包含する。特に、Carsonら (米国特許第6,426,336号; 米国出願US 2002/0035109 A1; 米国出願US 2002/0010343は本明細書に参照によりその全てを組み入れられる)。

【0248】

5.3.5 免疫調節薬と抗炎症薬

本発明は自己免疫疾患および炎症性疾患を治療する方法であって、本発明の抗体の他の治療薬と併用した投与を含む上記方法を提供する。免疫応答調節薬の例は、限定されるものでないが、メトトレキサート、ENBREL、REMICADETM、レフルノミド、シクロホスファミド、シクロスポリンA、およびマクロライド抗生物質 (例えば、FK506 (タクロリムス))、メチルプレドニゾロン (MP)、副腎皮質ステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン (sirolimus)、ミゾリビン、デオキシスバグアリン (deoxyspergualin)、ブレキナール (brequinar)、マロノニトリルアミンド (malononitrioloamine) (例えば、leflunamide)、T細胞受容体モジュレーター、およびサイトカイン受容体モジュレーターが挙げられる。

【0249】

抗炎症薬は、炎症性および自己免疫障害の治療に成功をおさめており、現在、このような障害のための共通かつ標準の治療薬となっている。当業者に周知のいずれの抗炎症薬を本発明の方法に使用してもよい。抗炎症薬の限定されるものでない例は、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs)、ステロイド抗炎症薬、 β 作動薬、抗コリン作動薬、およびメチルキサンチンを含む。NSAIDの例は、限定されるものでないが、アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ (CELEBREXTM)、ジクロフェナク (VOLTARENTM)、エトドラク (LODINETM)

、フェノプロフェン (NALFON)、インドメタシン (INDOCINTM)、ケトララク (ketoralac) (TORADOLTM)、オキサプロジン (DAYPROTM)、ナブメントン (nabumentone) (RELAFENTM)、スリンダク (CLINORILTM)、トルメンチン (tolmentin) (TOLECTINTM)、ロフェコキシブ (VIOXXTM)、ナプロキセン (ALEVETM、NAPROSYNTM)、ケトプロテン (ACTRONTM) およびナブメントン (RELAFENTM) を含む。このようなNSAIDはシクロオキシゲナーゼ酵素 (例えば、COX-1および/またはCOX-2) を阻害することにより機能する。ステロイド抗炎症薬の例は、限定されるものでないが、グルココルチコイド、デキサメタゾン (DECADRONTM)、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン (DELTASONETM)、プレドニゾロン、トリアムシノロン、アズルフィジン (azulfidine)、およびエイコサノイド、例えばプロスタグランジン、トロンボキサン、およびロイコトリエンを含む。

10

【0250】

5.3.6 抗癌薬および治療抗体

特定の実施形態においては、本発明の方法は、1以上の血管新生阻害剤の投与、例えば、限定されるものでないが：アンギオスタチン (プラスミノゲン断片)；抗血管原性抗トロンビンIII；アンギオザイム (Angiozyme)；ABT-627；Bay12-9566；ベネフィン；ベバシズマブ；BMS-275291；軟骨から抽出された阻害剤 (CDI)；CAI；CD59補体フラグメント；CEP-7055；Col3；コンプレタスタチンA-4；エンドスタチン (コラーゲンXVIII断片)；フィブロネクチン断片；Gro-beta；ハロフジノン；ヘパリナーゼ；ヘパリン六糖断片；HMV833；ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)；IM-862；インターフェロン $\alpha/\beta/\gamma$ ；インターフェロン誘導性タンパク質 (IP-10)；インターロイキン-12；クリングル5 (プラスミノゲンフラグメント)；マリマスタット；メタロプロテイナーゼ阻害剤 (TIMPs)；2-メトキシエストラジオール；MMI270 (CGS 27023A)；MoAb IMC-1C11；ネオバスタット；NM-3；パンゼム；PI-88；胎盤リボスクレアーゼ阻害剤；プラスミノゲンアクチベーター阻害剤；血小板因子-4 (PF4)；プリノマスタット (Prinomastat)；プロラクチン16KD断片；プロリフェリン (Proliferin) 関連タンパク質 (PRP)；PTK787/ZK222594；レチノイド；ソリマスタット (Solimastat)；スクアラミン；SS3304；SU5416；SU6668；SU11248；テトラヒドロコルチゾール-S；テトラチオモリブデン酸塩；サリドマイド；トロンボスポンジン1 (TSP-1)；TNP-470；トランスホーミング増殖因子 β (TGF- β)；バスキュロスタチン (Vasculostatin)；バソスタチン (Vasostatin) (カルレチクリン断片)；ZD6126；ZD6474；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI)；およびビスホスホン酸塩の投与を包含する。

20

30

【0251】

本発明の抗体と組合わせて本発明の様々な実施形態において使用することができる本発明の医薬組成物および投与剤形およびキットを含む抗癌薬としては、限定されるものでないが、アシビシン (acivicin)；アクラルピシン (acralvicin)；アコダゾール塩酸塩 (acodazole hydrochloride)；アクロニン (acronine)；アドゼレシン (adozelesin)；アルデスロイキン (aldesleukin)；アルトレタミン (altretamine)；アンボマイシン (ambomycin)；アメタントロン酢酸塩 (ametantrone acetate)；アミノグルテチミド (aminogluthetimid)；アムサクリン (amsacrine)；アナストロゾール (anastrozole)；アントラマイシン (anthramycin)；アスパラギナーゼ (asparaginase)；アスペルリン (asperlin)；アザシチジン (azacitidine)；アゼテパ (azetepa)；アゾトマイシン (azotomycin)；バチマスタット (batimastat)；ベンゾデパ (benzodepa)；ビカルタミド (bicalutamide)；ビスアントレン塩酸塩 (bisantrene hydrochloride)；ビスナフィドジメシラート (bisnafide dimesylate)；ビゼレシン (bizelesin)；ブレオマイシン硫酸塩 (bleomycin sulfate)；ブレキナールナトリウム (brequinar sodium)；ブロピリミン (bropirimine)；ブスルフアン (busulfan)；カクチノマイシン (cactinomycin)；カルステロン (calusterone)；カラセミド (caracemide)；カルベチマー (carbetermer)；カルボプラチン (carboplatin)；カルムスチン (carmustine)；カルビシン塩酸塩 (carubicin hydrochloride)；カルゼルシン (carzelesin)；セデフィンゴール (cedefingol)；クロラムブシル (chlorambucil)；シロレマイシン (cirolemycin)；シスプ

40

50

ラチン (cisplatin) ; クラドリビン (cladribine) ; クリスナトールメシラート (crisn
 atol mesylate) ; シクロホスファミド (cyclophosphamide) ; シタラビン (cytarabine
) ; デカルバジン (dacarbazine) ; ダクチノマイシン (dactinomycin) ; ダウノルビシ
 ン塩酸塩 (daunorubicin hydrochloride) ; デシタビン (decitabine) ; デキソルマプラ
 チン (dexormaplatin) ; デザグアニン (dezaguanine) ; デザグアニンメシラート (deza
 guanine mesylate) ; ジアジコン (diaziquone) ; ドセタキセル (docetaxel) ; ドキソ
 ルビシン (doxorubicin) ; ドキソルビシン塩酸塩 (doxorubicin hydrochloride) ; ドロ
 キシフェン (droloxifene) ; ドロキシフェンクエン酸塩 (droloxifene citrate) ; ドロ
 モスタノロンプロピオン酸塩 (dromostanolone propionate) ; デュアゾマイシン (duazo
 mycin) ; エダトレキセート (edatrexate) ; エフロルニチン塩酸塩 (eflornithine hydr
 ochloride) ; エルサミトルシン (elsamitrucin) ; エンロプラチン (enloplatin) ; エ
 ンプロメート (enpromate) ; エピプロピジン (epipropidine) ; エピルビシン塩酸塩 (e
 pirubicin hydrochloride) ; エルプロゾール (erbulozole) ; エソルビシン塩酸塩 (eso
 rubicin hydrochloride) ; エストラムスチン (estramustine) ; エストラムスチン磷酸
 ナトリウム (estramustine phosphate sodium) ; エタニダゾール (etanidazole) ; エト
 ポシド (etoposide) ; エトポシド磷酸塩 (etoposide phosphate) ; エトプリン (etopri
 ne) ; ファドロゾール塩酸塩 (fadrozole hydrochloride) ; ファザラビン (fazarabine
) ; フェンレチニド (fenretinide) ; フロキシウリジン (floxuridine) ; フルダラビン
 磷酸塩 (fludarabine phosphate) ; フルオロウラシル (fluorouracil) ; フルロシタビ
 ン (flurocitabine) ; フォスキドン (fosquidone) ; フォストリエシンナトリウム (fos
 triecin sodium) ; ゲムシタビン (gemcitabine) ; ゲムシタビン塩酸塩 (gemcitabine h
 ydrochloride) ; ヒドロキシ尿素 (hydroxyurea) ; イダルビシン塩酸塩 (idarubicin hy
 drochloride) ; イフォスファミド (ifosfamide) ; イルモフォシン (ilmofosine) ;
 インターロイキンII (組換えインターロイキンII、またはrIL2を含む)、インターフェロ
 ン α -2a ; インターフェロン α -2b ; インターフェロン α -n1 ; インターフェロン α -n3 ; イン
 ターフェロン β -1a ; インターフェロン γ -1b ; イプロプラチン (iproplatin) ; イリノ
 テカン塩酸塩 (irinotecan hydrochloride) ; ランレオチド酢酸塩 (lanreotide acetate
) ; レトロゾール (letrozole) ; ロイプロリド酢酸塩 (leuprolide acetate) ; リアロ
 ゴール塩酸塩 (liarozole hydrochloride) ; ロメトレキソールナトリウム (lometrexol
 sodium) ; ロムスチン (lomustine) ; ロソキサントロン塩酸塩 (losoxantrone hydrochl
 oride) ; マソプロコール (masoprocil) ; メイタンシン (maytansine) ; メクロレタミ
 ン塩酸塩 (mechlorethamine hydrochloride) ; メゲストロール酢酸塩 (megestrol aceta
 te) ; メレンゲストロール酢酸塩 (melengestrol acetate) ; メルファラン (melphalan
) ; メノガリル (menogaril) ; メルカプトプリン (mercaptopurine) ; メトトレキセー
 ト (methotorexate) ; メトトレキセートナトリウム (methotorexate sodium) ; メトプ
 リン (metoprime) ; メツレデパ (meturedapa) ; ミチンドミド (mitindomide) ; ミトカ
 ルシン (mitocarcin) ; ミトクロミン (mitocromin) ; ミトギリル (mitogillin) ; ミト
 マルシン (mitomalcin) ; ミトマイシン (mitomycin) ; ミトスパー (mitosper) ; ミト
 タン (mitotane) ; ミトキサントロン塩酸塩 (mitoxantrone hydrochloride) ; ミコフェ
 ノール酸 (mycophenolic acid) ; ノコダゾール (nocodazole) ; ノガラマイシン (nogal
 amycin) ; オルマプラチン (ormaplatin) ; オキシスラン (oxisuran) ; パクリタキセル
 (paclitaxel) ; ペガスパルガーゼ (pegaspargase) ; ペリオマイシン (peliomycin) ;
 ペンタムスチン (pentamustine) ; ペプロマイシン硫酸塩 (peplomycin sulfate) ; ペ
 ルホスファミド (perfosfamide) ; ピポブロマン (pipobroman) ; ピプロスルファン (pip
 osulfan) ; ピロキサントロン塩酸塩 (piroxantrone hydrochloride) ; プリカマイシン
 (plicamycin) ; プロメスタン (plomestane) ; ポルフィマーナトリウム (porfimer sod
 ium) ; ポルフィルマイシン (porfiromycin) ; プレドニムスチン (prednimustine) ; プ
 ロカルバジン塩酸塩 (procarbazine hydrochloride) ; ピューロマイシン (puromycin)
 ; ピューロマイシン塩酸塩 (puromycin hydrochloride) ; ピラゾフリン (pyrazofurin)
 ; リボプリン (riboprime) ; ログレチミド (rogletimide) ; サフィンゴル (safingol)

; サフィンゴル塩酸塩 (safingol hydrochloride) ; セムスチン (semustine) ; シムタ
 ラゼン (simtrazene) ; スパルフォセートナトリウム (sparfosate sodium) ; スパルソ
 マイシン (sparsomycin) ; スピロゲルマニウム塩酸塩 (spirogermanium hydrochloride
) ; スピロムスチン (spiromustine) スピロプラチン ; (spiroplatin) ; ストレプトニ
 グリン (streptonigrin) ; ストレプトゾシン (streptozocin) ; スルフェヌル (sulofen
 ur) ; タリソマイシン (talismycin) ; テコガランナトリウム (tecogalan sodium) ;
 テガフル (tegafur) ; テロキサントロン塩酸塩 (teloxantrone hydrochloride) ; テ
 モポルフィン (temoporphin) ; テニポシド (teniposide) ; テロキシロン (teroxirone)
 ; テストラクトン (testolactone) ; チアミプリン (thiamiprine) ; チオグアニン (th
 ioguanine) ; チオテパ (thiotepa) ; チアゾフリン (tiazofurin) ; チラパザミン (tir
 apazamine) ; トレミフェンクエン酸塩 (toremifene citrate) ; トレストロン酢酸塩 (t
 restolone acetate) ; トリシリビンリン酸塩 (triciribine phosphate) ; トリメトレキ
 セート (trimetrexate) ; トリメトレキセートグルクロン酸塩 (trimetrexate glucurona
 te) ; トリプトレリン (triptorelin) ; ツブゾール塩酸塩 (tubulozole hydrochlorid
 e) ; ウラシルムスタード (uracil mustard) ; ウレデパ (uredepa) ; バプレオチド (va
 preotide) ; ベルテポルフィン (verteporfin) ; ビンブラスチン硫酸塩 (vinblastine s
 ulfate) ; ビンクラスチン硫酸塩 (vincristine sulfate) ; ビンデシン (vindesine)
 ; ビンデシン硫酸塩 (vindesine sulfate) ; ビネピジン硫酸塩 (vinepidine sulfate)
 ; ビングリシネート硫酸塩 (vinglycinate sulfate) ; ビンロイロシン硫酸塩 (vinleuro
 sine sulfate) ; ビノレルビン酒石酸塩 (vinorelbine tartrate) ; ビンロシジン硫酸塩
 (vinrosidine sulfate) ; ビンゾリジン硫酸塩 (vinzolidine sulfate) ; ボロゾール (v
 orozole) ; ゼニプラチン (zeniplatine) ; ジノスタチン (zinostatin) ; ゾルビシン塩
 酸塩 (zorubicin hydrochloride) が挙げられる。他の抗癌薬としては、限定されるもの
 でないが、20-epi-1,25ジヒドロキシビタミンD3 ; 5-エチニルウラシル ; アビラテロン (a
 biraterone) ; アクラルビシン (aclarbucicidin) ; アシルフルベン (acylfulvene) ; アデ
 シペノール (adecyphenol) ; アドゼレシン (adozelesin) ; アルデスロイキン (aldesleu
 kin) ; 全TK拮抗薬 ; アルトレタミン (altretamine) ; アンバムスチン (ambamustine)
 ; アミドックス (amidox) ; アミフォスチン (amifostine) ; アミノレブリン酸 (amino
 levulinic acid) ; アンルビシン (amrubicin) ; アンサクリン (amsacrine) ; アナグレ
 リド (anagrelide) ; アナストロゾール (anastrozole) ; アンドログラホリド (androgr
 apholide) ; 血管新生阻害剤 ; 拮抗薬D ; 拮抗薬G ; アントラレリックス (antarelix) ;
 抗背方化形態発生タンパク質-1 (anti-dorsalizing morphogenic protein-1) ; 抗男性ホル
 モン、前立腺癌薬 ; 抗女性ホルモン薬 ; 抗ネオプラストン薬 (antineoplaston) ; アン
 チセンスオリゴヌクレオチド ; アフィディコリングリシン酸塩 (aphidicolin glycinate)
 ; アポトーシス遺伝子モジュレーター ; アポトーシスレギュレーター ; アプリン酸 ; a
 ra-CDP-DL-PTBA ; アルギニンデアミナーゼ ; アスラクリン (asulacrine) ; アタメスタン
 (atamestane) ; アトリムスチン (atrimustine) ; アキシナスタチン1 (axinastatin 1
) ; アキシナスタチン2 (axinastatin 2) ; アキシナスタチン3 (axinastatin 3) ; アザ
 ステロン (azasetron) ; アザトキシン (azatoxin) ; アザチロシン (azatyrosine) ; バ
 ッカチン (baccatin) III誘導体 ; バラノール (balanol) ; バチマスタット (batimastat
) ; BCR/ABL拮抗薬 ; ベンゾクロリン (benzochlorins) ; ベンゾイルスタウロスポリン (b
 enzoylstauroporphine) ; β ラクタム誘導体 ; β アレチン (β -alethine) ; β アクラマ
 イシンB (betaclamycin B) ; ベツリン酸 ; bFGF阻害薬 ; ビカルタミド (bicalutamide)
 ; ビスアントレン (bisantrene) ; ビスアジリジニルスペルミン (bisaziridinylspermin
 e) ; ビスナフィド (bisnafide) ; ビストラテンA (bistratene A) ; ビゼルシン (bizelesin)
 ; ブレフラート (breflate) ; ブロピリミン (bropiramine) ; ブドチタン (budot
 itane) ; ブチオニンスルホキシミン (buthionine sulfoximine) ; カルシポトリオール
 (calcipotriol) ; カルホスチンC (calphostin C) ; カンプトテシン誘導体 ; カナリポ
 ックス (canarypox) IL-2 ; カペシタビン (capecitabine) ; カルボキサミド-アミノ-トリ
 アゾール ; カルボキシアミド-トリアゾール ; CaRest M3 ; CARN 700 ; 軟骨抽出阻害剤 ;

10

20

30

40

50

カルゼレシン (carzelesin) ; カゼインキナーゼ阻害剤 (ICOS) ; カスタノスペルミン (castanospermine) ; セクロピンB (cecropin B) ; セトロレリックス (cetorelix) ; chlornls ; クロロキノキサリンスルホンアミド ; シカプロスト (cicaprost) ; cis-ポルフィリン ; クラドリピン ; クロミフェン類似体 ; クロトリマゾール ; コリスマイシン (collismycin) A ; コリスマイシン (collismycin) B ; コンブレタスタチンA4 ; コンブレタスタチン類似体 ; コナゲニン ; クランベシジン (crambescidin) 816 ; クリスナトール (crisnatol) ; クリプトフィシン (cryptophycin) 8 ; クリプトフィシンA誘導体 ; キュラシンA ; シクロペントアントラキノン (cyclopentantraquinone) ; シクロプラタム (cycloplatan) ; シペマイシン (cypemycin) ; シタラビンオクホスファート (cytarabine ocfosfate) ; 細胞溶解性因子 ; サイトスタチン (cytostatin) ; ダクリキシマブ (dacliximab) 10 ; デシタビン (decitabine) ; デヒドロジデムニン (dehydrodidemnin) B ; デスロレリン (deslorelin) ; デキサメタゾン (dexamethasone) ; デキシホスファミド (dexifosfamide) ; デキスラゾキサナ (dexrazoxane) ; デキスベラパミル (dexverapamil) ; ジアジコン (diaziquone) ; ディデムニン (didemnin) B ; ジドックス (didox) ; ジエチルノルスペルミン ; ジヒドロ-5-アザシチジン ; ジヒドロタキソール、9- ; ジオキサマイシン (dioxamycin) ; ジフェニルスピロムスチン ; ドセタキセル ; ドコサノール ; ドラステロン (dolasetron) ; ドキシフルリジン ; (droloxifene) ; ドロナビノール (dronabinol) ; デュオカルマイシン (duocarmycin) SA ; エベスレン (ebeslen) ; エコムスチン (ecomustine) ; エデルホシン (edelfosine) ; エドレコロマブ (edrecolomab) ; エフロルニチン (eflornithine) ; エレメン (elemene) 20 ; エミテフル (emitefur) ; エピルビシン (epirubicin) ; エプリステリド (epristeride) ; エストラムスチン (estramustine) 類似体 ; エストロゲン作動薬 ; エストロゲン拮抗薬 ; エタニダゾール (etanidazole) ; エトポシド (etoposide) 燐酸塩 ; エキセメスタン (exemestane) ; ファドロゾール (fadrozole) ; ファザラビン (fazarabine) ; フェンレチニド (fenretinide) ; フィルグラスチン (filgrastim) ; フィナステリド (finasteride) ; フラボピリドール (flavopiridol) ; フレゼラスチン (flezelastine) ; フルアステロン (fluasterone) ; フルダラビン (fludarabine) ; フルオロダウノルニシン塩酸塩 (fluorodaunorubicin hydrochloride) ; ホルフェニメキス (forfenimex) ; ホルメスタン (formestane) ; ホストリエシン (fostriecin) ; ホテムスチン (fotemustine) ; ガドリニウムテキサヒドリル (gadolinium texaphyrin) ; 硝酸ガリウム (gallium nitrate) 30 ; ガロシタビン (galocitabine) ; ガニレリックス (ganirelix) ; ゼラチナーゼ阻害剤 ; ゲムシタビン (gemcitabine) ; グルタチオン阻害剤 ; ヘプスルファミン (hepsulfam) ; ヘルグリン (heregulin) ; ヘキサメチレンビスアセタミド ; ヒペリシン (hypericin) ; イバンドロン酸 (ibandronic acid) ; イダルビシン (idarubicin) ; イドキシフェン (idoxifene) ; イドラマントン (idramantone) ; イルモフェシン (ilmofosine) ; イロマスタット (ilomastat) ; イミダゾアクリドン (imidazoacridones) ; イミキモド (imiquimod) ; 免疫刺激性ペプチド ; インスリン様増殖因子-1受容体阻害剤 ; インターフェロン作動薬 ; インターフェロン ; インターロイキン ; イオベングアン (iobenguan) ; ヨードドキソルビシン (iododoxorubicin) ; イポメアノール (ipomeanol、4-) ; イロプラクト (iroplact) ; イルソグラジン (irosogladine) ; イソベンガゾール (isobengazole) 40 ; イソホモハリコンドリル (isohomohalicondrin) B ; イタセトロン (itasetron) ; ジャスプラキノリド (jasplakinolide) ; カハラリド (kahalalide F) ; ラメラリン-N-トリアセタート (lamellarin-N triacetate) ; ランレオチド (lanreotide) ; レイナマイシン (leinamycin) ; レノグラスチン (lenograstim) ; レンチナン硫酸塩 (lentinan sulfate) ; レプトールスタチン (leptolstatin) ; レトロゾール (letrozole ; 白血病抑制因子) ; (白血球αインターフェロン) ; ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン ; ロイプロレリン (leuprorelin) ; レバミソール (levamisole) ; リラロゾール (liarozole) ; 直鎖ポリアミン類似体 ; 親油性二糖ペプチド ; 親油性白金化合物 ; リソクリナミド (lissoclinamide) 7 ; ロバプラチン (lobaplatin) ; ロンブリシン (lombicine) ; ロメトレキソール (lometrexol) ; ロニダミン (lonidamine) ; ロソキサナ 50

トロン (losoxantrone) ; ロバスタチン (lovastatin) ; ロキシリビン (loxoribine) ;
 ルルトテカン (lurtotecan) ; ルテチウムテキサフィリン (lutetium texaphyrin) ; リ
 ソフィリン (lysofylline) ; 溶解性ペプチド ; マイタンシン (maitansine) ; マンノス
 タチン (mannostatin) A ; マリマスタット (marimastat) ; マソプロコル (masoprocol)
 ; マスピン (maspin) ; マトリリシン (matrilysin) 阻害剤 ; マトリックスメタロプロテ
 イナーゼ阻害剤 ; メノガリル (menogaril) ; メルバロン (merbarone) ; メテレリン (me
 terelin) ; メチオニナーゼ (methioninase) ; メトクロプラミド (metoclopramide) ; M
 IF阻害剤 ; ミフェプリストーン (mifepristone) ; (miltefosine) ; ミリモスチム (mi
 rimostim) ; ミスマッチ2本鎖RNA ; ミトグアゾーン (mitoguazone) ; ミトラクトール (mitolactol)
 ; マイトマイシン (mitomycin) 類似体 ; ミトナフィド (mitonafide) ; ミ
 トトキシシン繊維芽細胞増殖因子-サポリン (mitotoxin fibroblast growth 因子-saporin
) ; ミトキサントロン (mitoxantrone) ; モファロテン (mofarotene) ; モルグラモス
 チン (molgramostim) ; モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン ; モノホスホリ
 ル脂質A+マイコバクテリウム細胞壁 sk) ; モジダモル (modidamol) ; 多剤耐性遺伝子阻
 害剤 ; 多発性腫瘍サプレッサー1に基づく治療法 ; マスタード抗癌薬 ; マイカペルオキシ
 ド (mycaperoxide) B ; マイコバクテリア細胞壁抽出物 ; ミリアポロン (myriaporone) ;
 N-アセチルジナリン ; N-置換ベンズアミド ; ナファレリン (nafarelin) ; ナグレスチブ
 (nagrestip) ; ナロキソン+ペンタゾシン (naloxone+pentazocine) ; ナパビン (napav
 in) ; ナフテルピン (naphterpin) ; ナルトグラスチム (nartograstim) ; ネダプラチン
 (nedaplatin) ; ネモルビシン (nemorubicin) ; ネリドロロン酸 (neridronic acid) ; 中
 性エンドペプチダーゼ ; ニルタミド (nilutamide) ; ニサマイシン (nisamycin) ; 一酸
 化窒素モジュレーター ; 窒素酸化物抗酸化薬 ; ニトルリン (nitrullyn) ; 0-6-ベンジル
 グアニン (0-6-ベンジルguanine) ; オクトレチド (octreotide) ; オキセノン (okiceno
 ne) ; オリゴスクレオチド ; オナプリストン (onapristone) ; オンダセトロン (ondanse
 tron) ; オンダセトロン (ondansetron) ; オラシン (oracin) ; 経口サイトカインイン
 デューサー ; オルマプラチン (ormaplatin) ; オサテロン (osaterone) ; オキサリプラ
 チン (oxaliplatin) ; オキサウノマイシン (oxaunomycin) ; パクリタキセル (paclitax
 el) ; パクリタキセル類似体 ; パクリタキセル誘導体 ; パラウアミン (palauamine) ; パ
 ルミトイルリゾキシシン (palmitoylrhizoxin) ; パミドロロン酸 (pamidronic acid) ; パナ
 キシトリオール (panaxytriol) ; パノミフェン (panomifene) ; パラバクチン (paraba
 ctin) ; パゼリプチン (pazelliptine) ; ペガスパルガーゼ (pegaspargase) ; ペルデシ
 ン (peldesine) ; ペントサンポリ硫酸ナトリウム ; ペントスタチン (pentostatin) ; ペ
 ントロゾール (pentrozole) ; ペルフルブロン (perflubron) ; ペルホスファミド (perf
 osfamide) ; ペリリルアルコール ; フェナジノマイシン (phenazinomycin) ; フェニル
 酢酸塩 ; ホスファターゼ阻害剤 ; ピシバニル (picibanil) ; ピロカルピン塩酸塩 (piloc
 arpine hydrochloride) ; ピラルビシン (pirarubicin) ; ピリトレキシム (piritrexim
) ; プラセチン (placetin) A ; プラセチン (placetin) B ; プラスミノーゲンアクチベ
 ーター阻害剤 ; 白金錯体 ; 白金化合物 ; 白金-トリアミン錯体 ; ポルフィマーナトリウム (p
 orfimer sodium) ; ポルフィロマイシン (porfiromycin) ; プレドニゾン (prednisone)
 ; プロピルビスアクリドン (propyl bis-acridone) ; プロスタグランジンJ2 ; プロテア
 ソーム阻害剤 ; タンパク質Aに基づく免疫調節薬 ; タンパク質キナーゼC阻害剤 ; タンパク
 質キナーゼC阻害剤 (微細藻類の) ; タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤 ; プリン
 スクレオシドホスホリラーゼ阻害剤 ; プルプリン (purpurin) ; ピラゾロアクリジン ; ピ
 リドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン複合体 ; raf拮抗薬 ; ラルチトレキセド (r
 altitrexed) ; ラモセトロン (ramosetron) ; rasファルネシルタンパク質トランスフェ
 ラーゼ阻害剤 (ras farnesyl protein transferase inhibitors) ; ras阻害剤 ; ras-GAP
 阻害剤 ; 脱メチル化レテルリプチン (retelliptine demethylated) ; レニウムRe186エチ
 ドロン酸塩 (rhenium Re 186 etidronate) ; リゾキシシン (rhizoxin) ; リボザイム ; RII
 レチンアミド (RII retinamide) ; ログレチミド (rogletimide) ; ロヒツキン (rohituk
 ine) ; ロムルチド (romurtide) ; ロキニメキス (roquinimex) ; ルビギノンBL (rubigi

10

20

30

40

50

none BL) ; ルボキシル (ruboxyl) ; サフィンゴル (safingol) ; セントピン (saintopin) ; SarCNU ; サルコフィトール (sarcophytol) A ; サルグラモスチン (sargramostim) ; Sdi 1 模倣物 ; セムスチン (semustine) ; 老化誘導阻害剤 (senescence derived inhibitor) 1 ; センスオリゴヌクレオチド ; シグナル伝達阻害剤 ; シグナル伝達モジュレーター ; 1 本鎖抗原結合タンパク質 ; シゾフィラン (sizofiran) ; ソブゾキサナ (sobuzoxane) ; ナトリウムボロカプテート (sodium borocaptate) ; フェニル酢酸ナトリウム ; ソルベロール (solverol) ; ソマトメジン (somatomedin) 結合タンパク質 ; ソネルミン (sonermin) ; スパルフォシン酸 (sparfosic acid) ; スピカマイシン (spicamycin) D ; スピロムスチン (spiromustine) ; スプレノペンチン (splenopentin) ; スポンジスタチン (spongistatin) 1 ; スクアラミン (squalamine) ; 幹細胞阻害剤 ; 幹細胞分裂阻害剤 ; スチピアミド (stipiamide) ; ストロメライシン阻害剤 ; スルフィノシン (sulfinosine) ; 超活性血管作用性腸ペプチド拮抗薬 ; スラジスタ (suradista) ; スラミン (suramin) ; スワイソニン (swainsonine) ; 合成グリコサミノグリカン ; タリムスチン (tallimustine) ; タモキシフェンメチオジド (tamoxifen methiodide) ; タウロムスチン (tauromustine) ; タザロテン (tazarotene) ; テコガラナトリウム ; テガフル (tegafur) ; テルルラピリリウム (tellurapyrylium) ; テロメラゼ阻害剤 ; テモポルフィン (temoporfin) ; テモゾロミド (temozolomide) ; テニポシド (teniposide) ; テトラクロロデカオキシド (tetrachlorodecaoxide) ; テトラゾミン (tetrazomine) ; サリブラチン (thaliblastine) ; チオコラリン (thiocoraline) ; トロンボポエチン ; トロンボポエチン模倣物 ; チマルファシン (thymalfasin) ; サイモポエチン受容体作動薬 ; サイモトリナン (thymotrinan) ; 甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone) ; スズエチルエチオプルプリン (tin ethyl etiopurpurin) ; チラパザミン (tirapazamine) ; 二塩化チタノセン ; トプセンチン (topsentin) ; トレミフェン (toremifene) ; 全能性幹細胞因子 ; 翻訳阻害剤 ; トレチノイン (tretinoin) ; トリアセチルウルジン ; トリシリビン (triciribine) ; トリメトレキセート (trimetrexate) ; トリプトレリン (triptorelin) ; トロピセトロン (tropisetron) ; ツロステライド (turosteride) ; チロシンキナーゼ阻害剤 ; (tyrp 宿主ins) ; (UBC 阻害剤) ; ウベニメックス (ubenimex) ; 泌尿生殖器洞誘導増殖阻害剤因子 ; ウロキナーゼ受容体拮抗薬 ; バプレオチド (vapreotide) ; バリオリン (variolin) B ; ベクター系、赤血球遺伝子治療法 ; ベラレゾル (velaresol) ; ベルミン (vermine) ; ベルジン (verdins) ; ベルテポルフィン (verteporfin) ; ビノレルビン (vinorelbine) ; ビンキサルチン (vinxaltine) ; ビタキシン (vitaxin) ; ボロゾール (vorozole) ; ザノテロン (zanoterone) ; ゼニプラチン (zeniplatin) ; ジラスコルブ (zilascorb) ; およびジノスタチンステマラマー (zinostatin stimalamer) が挙げられる。好ましいさらなる抗癌薬は5-フルオロウラシルおよびロイコボリンである。

【0252】

本発明の方法に使用することができる治療抗体の例は、限定されるものでないが、HERCEPTIN (登録商標) (Trastuzumab) (Genentech, CA) (転移性乳癌の患者を治療するためのヒト化抗HER2モノクローナル抗体である) ; REOPRO (登録商標) (abciximab) (Centocor) (血餅形成の予防用の血小板上抗糖タンパク質IIb/IIIa受容体である) ; ZENAPAX (登録商標) (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Switzerland) (免疫応答抑制薬) (急性腎他移植片拒絶の予防用の免疫抑制、ヒト化抗CD25モノクローナル抗体である) ; PANOREXTM (マウス抗17-1A細胞表面抗原IgG2a抗体である) (Glaxo Wellcome/Centocor) ; BEC2 (マウス抗イディオタイプ (GD3エピトープ) IgG抗体である) (ImClone System) ; IMC-C225 (キメラ抗EGFR IgG抗体である) (ImClone System) ; VITAXINTM (ヒト化抗AVβ3インテグリン抗体である) (Applied Molecular Evolution/Medimmune) ; Campath 1H/LDP-03 (ヒト化抗CD52 IgG1抗体である) (Leukosite) ; Smart M195 (ヒト化抗CD33 IgG抗体である) (Protein Design Lab/Kanebo) ; RITUXANTM (キメラ抗CD20 IgG1抗体である) (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettayaku) ; LYMPHOCIDETM (ヒト化抗CD22 IgG抗体である) (Immunomedics) ; ICM3 (ヒト化抗ICAM3抗体である) (ICOS Pharm) ; IDE

10

20

30

40

50

C-114（霊長類化抗CD80抗体である）（IDEC Pharm/Mitsubishi）；ZEVALDSFM（放射標識したマウス抗CD20抗体である）（IDEC/Schering AG）；IDEC-131（ヒト化抗CD40L抗体である）（IDEC/Eisai）；

IDEC-151（霊長類化抗CD4抗体である）（IDEC）；IDEC-152（霊長類化抗CD23抗体である）（IDEC/Seikagaku）；SMART 抗CD3（ヒト化抗CD3 IgGである）（Protein Design Lab）；5G1.1（ヒト化抗補体因子5（C5）抗体である）（Alexion Pharm）；D2E7（ヒト化抗TNF- α 抗体である）（CAT/BASF）；CDP870（ヒト化抗TNF- α Fabフラグメント（Celltech）；IDEC-151（霊長類化抗CD4 IgG1抗体である）（IDEC Pharm/Smithkline Beecham）；MDX-CD4（ヒト抗CD4 IgG抗体である）（Medarex/Eisai/Genmab）；CDP571（ヒト化抗TNF- α IgG4抗体である）（Celltech）；LDP-02（ヒト化抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗体である）（LeukoSite/Genentech）；オルトクローンOKT4A（ヒト化抗CD4 IgG抗体である）（Ortho Biotech）；ANTOVATM（ヒト化抗CD40L IgG抗体である）（Biogen）；ANTEGRENTM（ヒト化抗VLA-4 IgG抗体である）（Elan）；およびCAT-152（ヒト抗TGF- $\beta 2$ 抗体である）（Cambridge Ab Tech）が挙げられる。

【0253】

本発明の抗体と組合わせて使用することができる治療抗体の他の例を表7に掲げる。

【表7】

本発明の抗体と組合わせて使用することができる癌治療用のモノクローナル抗体

会社	製品	疾患	標的
Abgenix	ABX-EGF	癌	EGF受容体
AltaRex	OvaRex	卵巣癌	腫瘍抗原CA125
	BravaRex	転移性癌	腫瘍抗原MUC1
Antisoma	Theragyn (pentumomab-ITRトリウム-90)	卵巣癌	PEM抗原
	Therex	乳癌	PEM抗原
Boehringer Ingelheim	blvatuzumab	頭および頸部癌	CD44
Centocor/J&J	Panorex	大腸直腸癌	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	急性MI	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	虚血性卒中	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAb、イディオタイプ105AD7	大腸直腸癌ワクチン	gp72
Crucell	抗EpCAM	癌	Ep-CAM
Cytoclonal	MAb、肺癌	非小細胞肺癌	NA
Genentech	Herceptin	転移性乳癌	HER-2
	Herceptin	初期乳癌	HER-2
	Rituxan	再発/抵抗性低度または濾胞性NHL	CD20
	Rituxan	中度及び高度NHL	CD20
	MAb-VEGF	NSCLC, 転移性	VEGF
	MAb-VEGF	大腸直腸癌、転移性	VEGF

【0254】

会社	製品	疾患	標的
	AMD Fab	加齢に伴う黄斑変性症	CD18
	E-26 (2 nd gen. IgE)	アレルギー喘息および 鼻炎	IgE
IDEC	Zevalin (リツキサン+イト トリウム-90)	低度の濾胞性、再発また は抵抗性、CD20-陽性、 B細胞NHLおよびリツキ シマブ抵抗性NHL	CD20
ImClone	セツキシマブ+インノテカ ン	抵抗性大腸直腸癌	EGF受容体
	セツキシマブ+シスプラチ ンおよび放射	新しく診断されたまた は 再発性頭及び頸部癌	EGF受容体
	セツキシマブ+ゲムシタピ ン	新しく診断された転移 性膵臓癌	EGF受容体
	セツキシマブ+シスプラチ ン+5FUまたはタキソール	再発性または転移性頭 及び頸部癌	EGF受容体
	セツキシマブ+カルボプラ チン+パクリタキセル	新しく診断された非小 細胞肺癌	EGF受容体
	セツキシマブ+シスプラチ ン	頭及び頸部癌 (広汎な不 治の局所領域疾患およ び遠くへの転移)	EGF受容体
	セツキシマブ+放射	局所進行性頭及び頸部 癌	EGF受容体
	BEC2+カルメット-ゲラン 杆菌	小細胞肺癌	ガングリオシドGD3を模 倣する
	BEC2+カルメット-ゲラン 杆菌	黒色腫	ガングリオシドGD3を模 倣する
	IMC-IC11	肝転移を伴う大腸直腸 癌	VEGF-受容体
ImmonoGEN	nuC242-DMI	大腸直腸、胃、および膵 臓癌	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	非ホジキンリンパ腫	CD22

会社	製品	疾患	標的
	LymphoCideY-90	非ホジキンリンパ腫	CD22
	CEA-Cide	転移性固体腫瘍	CEA
	CEA-CideY-90	転移性固体腫瘍	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-標識 arcitumomab)	大腸直腸癌 (放射イメー ジング)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-標識 arcitumomab)	乳癌 (放射イメージング)	CEA
	CEA-Scan (TC-99M-標識 arcitumomab)	肺癌 (放射イメージング)	CEA
	CEA-Scan (TC-99M-標識 arcitumomab)	intraoperative腫瘍 (radioimaging)	CEA
	LeukoScan (TC-99M-標識 sulesomab)	soft組織感染 (放射イメ ージング)	CEA
	LymphoScan (TC-99M-標識)	リンパ腫 (放射イメー ジング)	CD22
	AFP-Scan (Tc-99m-標識)	liver7gem-細胞癌 (放射 イメージング)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+イットリウム -90)	頭および頸部癌	NA
	HumaSPECT	大腸直腸イメージング	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	前立腺および他の癌	CTLA-4
	MDX-210 (her-2過剰発現)	前立腺癌	HER-2
	MDX-210/MAK	癌	HER-2
MedImmune	Vitaxin	癌	$\alpha v \beta_3$
Merck KGaA	MAB 425	様々な癌	EGF受容体
	IS-IL-2	様々な癌	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	慢性リンパ性白血病	CD52
NeoRx	CD20-ストレプトアビジン (+ ビオチン-イットリウム90)	非ホジキンリンパ腫	CD20
	Avidicin (アルブミン + NRLU13)	転移性癌	NA

10

20

30

40

会社	製品	疾患	標的
Peregrine	Oncolym (+ヨウ素-131)	非ホジキンリンパ腫	HLA-DR10BETA
	Cotara (+ヨウ素-131)	切除不能の悪性神経膠腫	DNA-関連タンパク質
Pharmacia Corporation	C215 (+ブドウ球菌性エンテロトキシン)	膵臓癌	NA
	Mab、肺/腎臓癌	肺および腎臓癌	NA
	naicolomab tafenatox (C242 +ブドウ球菌性エンテロトキシン)	大腸および膵臓癌	NA
Protein Design Labs	Nuvion	T細胞悪性腫瘍	CD3
	SMARTM195	AML	CD33
	SMART1D10	NHL	HLA-DR抗原
Titan	CEAVac	大腸直腸癌、進行した	CEA
	TriGem	転移性黒色腫&小細胞肺癌	GD2-ガングリオシド
	TriAb	転移性乳癌	MUC-1
Trilex	CEAVac	大腸直腸癌、進行した	CEA
	TriGem	転移性黒色腫&小細胞肺癌	GD2-ガングリオシド
	TriAb	転移性乳癌	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMab-G2放射標識	非ホジキンリンパ腫	NA
	Monopharm C	大腸直腸&膵臓癌	SK-1抗原
	GlioMab-H (+gelonin毒素)	神経膠腫、黒色腫&神経芽細胞腫	NA
Xoma	Rituxan	再発性/抵抗性低度または濾胞性NHL	CD20
	Rituxan	中および高度のNHL	CD20
	ING-1	腺腫癌	Ep-CAM

10

20

30

【0257】

5.3.7 ワクチン治療

40

本発明は、被験者のワクチン組成物に対する免疫応答を増強する方法であって、上記被験者にFcεRIIAと結合するより大きい親和性でFcγRIIBと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントおよびワクチン組成物を投与することを含み、ここで上記抗体またはそのフラグメントが上記ワクチン組成物に対する免疫応答を増強することを特徴とする上記方法を提供する。或る特定の実施形態においては、上記抗体またはそのフラグメントは、ワクチンが指向している抗原の抗原提示および/または抗原プロセッシングを増強することにより上記ワクチン組成物に対する免疫応答を増強する。当技術分野で公知のいずれのワクチン組成物も、本発明の抗体またはそのフラグメントと組合わせて有用である。

【0258】

一実施形態において、本発明は、本発明の抗体の、当技術分野で公知のいずれの癌ワク

50

チン、例えば、CanvaxinTM (Cancer Vax, Corporation、黒色腫および大腸癌) ; Oncophage (HSPPC-96; Antigenics; 転移性黒色腫) ; HER-2/neu癌ワクチンなどと組合わせての使用も包含する。本発明の方法と組成物に使用される癌ワクチンは、例えば、抗原特異的ワクチン、抗イディオタイプワクチン、樹状細胞ワクチン、またはDNAワクチンであってもよい。本発明は、本発明の抗体のSegalら (米国特許第6,403,080号、これは参照により本明細書にその全文が組み入れられる) が記載した細胞に基づくワクチンとの併用を包含する。本発明の抗体と一緒に用いる細胞に基づくワクチンは自家性または同種異系であってもよい。簡単に説明すると、Segalらが記載した癌に基づくワクチンはGenitrix, LLCのオプソノカイン (Opsonokine) (TM) 製品に基づく。オプソノカイン (Opsonokine) (TM) は遺伝子操作により作製したサイトカインであり、腫瘍細胞と混合すると自動的に細胞の表面に付着する。「飾られた (decorated)」細胞をワクチンとして投与すると、細胞上のサイトカインは受給者中の重要な抗原提示細胞を活性化する一方、その抗原提示細胞が腫瘍細胞を摂取することを可能にする。次いで抗原提示細胞は「キラー」T細胞に身体全体の類似腫瘍細胞を見付けて破壊するように指示する。このようにして、オプソノカイン (Opsonokine) (TM) 製品は腫瘍細胞を強力な抗腫瘍免疫治療薬に変換する。

【0259】

一実施形態において本発明は、本発明の抗体の当技術分野で公知のいずれのアレルギーワクチンと組合わせての使用も包含する。本発明の抗体は、例えば、Linhartら (2000, FASEB Journal, 16 (10): 1301-3、これは参照により組み入れられる) が記載した、花粉アレルギーに対するワクチン接種に利用される大オオアワガエリ (major timothy) 花粉アレルギーをコードする組換えハイブリッド分子と組合わせて使用することができる。さらに本発明の抗体は、Hornerら (2002, Allergy, 57 Suppl, 72:24-9、これは参照により組み入れられる) が記載した、DNAに基づくワクチン接種と組合わせて使用することができる。本発明の抗体は、Choiら (2002, Ann. アレルギーAsthma Immunology, 88 (6):584-91) およびBarlanら (2002, Journal Asthma, 39 (3):239-46) (両方とも、参照により本明細書にその全文が組み入れられる) が記載した、カルメット-ゲラン桿菌 (「BCG」) ワクチン接種と組合わせて、IgE分泌を下方調節するために使用することができる。本発明の抗体は食物アレルギーを治療する上で有用である。特に本発明の抗体は、ワクチンまたは当技術分野で公知の他の免疫治療 (Hourihaneら, 2002, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2 (3):227-31を参照) と組合わせて、ピーナッツアレルギーを治療するために使用することができる。

【0260】

本発明の方法および組成物は、抗原に対する免疫が所望される場合にワクチンと組合わせて使用することができる。このような抗原は当技術分野で公知のいずれの抗原であってもよい。本発明の抗体は、例えば感染病原体、罹患したまたは異常な細胞、例えば、限定されるものでないが、細菌 (例えば、グラム陽性菌、グラム陰性菌、好気性菌、スピロヘータ、ミコバクテリア、リケッチア属、クラミジア属など)、寄生虫、真菌 (例えば、カンジダアルビカンズ、アスペルギルス属など)、ウイルス (例えば、DNAウイルス、RNAウイルスなど)、または腫瘍に対する免疫応答を増強するために使用してもよい。ウイルス感染は、限定されるものでないが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ; A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、または他の肝炎ウイルス; サイトメガロウイルス、ヘルペスシンプレックスウイルス-1 (-2、-3、-4、-5、-6)、ヒトパピローマウイルス; 呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、パラインフルエンザウイルス (PIV)、エプスタイン・バーウイルス、またはいずれか他のウイルス感染を含む。

【0261】

本発明は、ワクチン組成物の抗原に対する体液性および/または細胞を介する応答を増強するための本発明の抗体の使用を包含する。本発明はさらに、特定の抗原または抗原に対する免疫応答の増強が疾患または障害を治療または予防するために有効である場合、特定の障害を予防または治療するための本発明の抗体の使用も包含する。このような疾患および障害は、限定されるものでないが、ウイルス感染、例えばHIV、CMV、肝炎、ヘルペス

ウイルス、麻疹など、細菌感染、真菌および寄生虫感染、癌、ならびに特定の抗原に対する免疫応答を増強することにより治療または予防するのに受入れられる他の疾患または障害を含む。

【0262】

5.4 組成物および投与の方法

本発明は、本発明の抗体を含む方法および医薬組成物を提供する。本発明はまた、疾患、障害または感染に関連する1以上の症候群を治療、予防、および改善する方法であって、被験者に有効な量の本発明の融合タンパク質もしくは複合分子、または本発明の融合タンパク質もしくは複合分子を含む医薬組成物を投与することによる上記方法も提供する。好ましい態様においては、抗体または融合タンパク質または複合分子は、実質的に精製されている(すなわち、実質的にその効果を限定するかまたは望ましくない副作用を生じる物質を含まない)。特定の実施形態においては、被験者は動物、好ましくは哺乳類動物、例えば非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および霊長類(例えば、サル、例えばカニクイザルおよびヒト)である。好ましい実施形態においては、被験者はヒトである。

【0263】

様々な送達系が公知であり、本発明の抗体を含む組成物を投与するために利用することができ、例えばリポソーム中の封入、微粒子、マイクロカプセル、抗体または融合タンパク質を発現することができる組換え細胞、受容体を介するエンドサイトーシス(例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照)、核酸のレトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などがある。

【0264】

いくつかの実施形態においては、本発明の抗体を本発明の抗体の標的を定めて送達するためのリポソームに入れて製剤する。リポソームは、同心に配置した水相を封入するリン脂質二重層から構成される小胞である。リポソームは典型的には様々なタイプの脂質、リン脂質、および/または界面活性剤を含む。リポソームの成分は生物膜の脂質配置と同様に二重層の立体配置に置かれる。リポソームは、部分的に、その生物共存性、低免疫原性、および低毒性の故に、特に好ましい送達小胞である。リポソームの調製方法は当技術分野で公知であり、本発明の範囲に含まれる、例えば、Epsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688; Hwangら, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4; 米国特許第4,485,045号および第4,544,545号を参照; これらは全て参照により本明細書にその全文が組み入れられる。

【0265】

本発明はまた、長い血清半減期、すなわち長い循環時間をもつリポソームを調製する方法、例えば米国特許第5,013,556号に開示された方法も包含する。本発明の方法に使用される好ましいリポソームは循環から速やかにクリアーされない、すなわち、単核の貪食細胞系(MPS)に取込まれることはない。本発明は、当業者に公知の方法を用いて調製される立体的に安定化されたリポソームを包含する。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、立体的に安定化したリポソームは嵩張ったかつ高度にフレキシブルな親水成分とともに脂質成分を含有し、これがリポソームの血清タンパク質との欲しない反応を低下し、血清成分によるオプソニン化を低下し、そしてMPSによる認識を低下する。立体的に安定化したリポソームは、好ましくはポリエチレングリコールを用いて調製される。リポソームおよび立体的に安定化したリポソームの調製については、例えば、Bendasら, 2001 Bio Drugs, 15(4):215-224; Allenら, 1987 FEBS Lett. 223:42-6; Klivanovら, 1990 FEBS Lett., 268:235-7; Blumら, 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029:91-7; Torchilinら, 1996, J. Liposome Res. 6:99-116; Litzingerら, 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190:99-107; Maruyamaら, 1991, Chem. Pharm. Bull., 39:1620-2; Klivanovら, 1991, Biochim Biophys Acta, 1062: 142-8; Allenら, 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13:285-309を参照; これらはすべて参照により本明細書にその全文が組み入れられる。本発明はまた、特定の器官を標的とするように工夫したリポソームも包含する。例えば、米国特許

第号4,544, 545を参照。本発明の組成物および方法に使用する特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法により作製することができる。リポソームを規定した孔サイズのフィルターを通して押出し、所望の直径を有するリポソームを得る。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体のフラグメント、例えば、F(ab')をリポソームと、先に記載された方法を用いて複合化してもよい（例えば、Martinら, 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288を参照、これは参照により本明細書にその全文が組み入れられる）。

【0266】

本発明の抗体はまた、免疫リポソームとして製剤してもよい。免疫リポソームは、本発明の抗体またはそのフラグメントが共有結合または非共有結合によりリポソーム表面と結合していることを特徴とするリポソーム組成物を意味する。抗体をリポソーム表面と結合する化学は当技術分野で公知であり、本発明の範囲に包含され、例えば、Allenら, 1995, Stealth Liposomes, Boca Roton: CRC Press, 233-44; Hansenら, 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1239:133-44を参照; これらは参照により本明細書にその全文が組み入れられる。最も好ましい実施形態においては、本発明の方法と組成物に使用する免疫リポソームはさらに立体的に安定化させる。好ましくは、本発明の抗体を共有結合または非共有結合により、リポソームの脂質二重層に安定して根付いた疎水性アンカーと結合する。疎水性アンカーの例としては、限定されるものでないが、リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジリンシトール（PI）が挙げられる。抗体と疎水性アンカーの間の共有結合を達成するために、当技術分野で公知の生化学手法のいずれを用いてもよく、例えば、J. Thomas August, ED., 1997, 「遺伝子治療：薬理学の進歩（Gene Therapy : Advances in Pharmacology）」, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA., p.399-435を参照、これは参照により本明細書にその全文が組み入れられる。例えば、抗体分子上の官能基を、疎水性アンカーと結合しているリポソーム上の活性基と反応させてもよい、例えば、抗体上のリシン側鎖のアミノ基を、水溶性カルボジイミドを用いて活性化したりリポソームと結合しているN-グルタリルホスファチジルエタノールアミンとカップリングさせてもよく; または還元した抗体のチオール基を、ピリジルチオプロピオニル-ホスファチジルエタノールアミンなどのチオール反応性アンカーを経由してリポソームとカップリングさせてもよい。例えば、Dietrichら, 1996, Biochemistry, 35:1100-1105; Loughreyら, 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901:157-160; Martinら, 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288; Martinら, 1981, Biochemistry, 20:4429-38を参照; これらはすべて参照により本明細書にその全文が組み入れられる。特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、本発明の抗体を含む免疫リポソーム製剤は、抗体を標的細胞、すなわち、抗体が結合するFcγRIIB受容体を含む細胞の細胞質へ送達するので、特に治療薬として有効である。免疫リポソームは、好ましくは、血液、特に標的細胞中で長い半減期を有し、標的細胞の細胞質内部に移行することができ、それにより治療薬の消失またはリソソーム内経路による分解を避ける。

【0267】

本発明は、本発明の抗体またはそのフラグメントを含む免疫リポソームを包含する。いくつかの実施形態においては、免疫リポソームはさらに1以上の本明細書に開示したさらなる治療薬を含む。

【0268】

本発明の免疫リポソーム組成物は、1以上の小胞を形成する脂質、本発明の抗体またはそのフラグメントまたは誘導体、および場合によっては親水性ポリマーを含む。小胞を形成する脂質は、好ましくは、2つの炭化水素鎖、例えばアシル鎖と極性ヘッド基を有する脂質である。小胞を形成する脂質の例としては、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジリンシトール、スフィンゴミエリン、および糖脂質、例えば、セレブロシド、ガングリオシドが挙げられる。さらなる本発明の製剤に有用な脂質が当業者に公知であり、本発明の範囲に包含される。いく

つかの実施形態において、免疫リポソーム組成物はさらに、リポソームの血清半減期を増大する親水性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコールおよびガングリオシドGM1を含む。親水性ポリマーをリポソームと複合化する方法は当技術分野で周知であり、本発明の範囲に包含される。免疫リポソームおよびそれらを調製する方法の総括については、例えば、PCT国際公開第WO 97/38731号、Vingerhoadsら、1994、Immunomethods、4:259-72；Maruyama、2000、Biol. Pharm. Bull. 23(7):791-799；Abraら、2002、Journal of liposome research、12(1&2):1-3；Park、2002、Bioscience Reports、22(2):267-281；Bendasら、2001 BioDrugs、14 (4):215-224；J. Thomas August、編、1997、「遺伝子治療：薬理学の進歩 (Gene Therapy : Advances in Pharmacology)」, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA., p.399-435を参照、これらは全て参照により本明細書にその全文が組み入れられる。

10

【0269】

本発明の抗体を投与する方法は、限定されるものでないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外、および粘膜（例えば、鼻腔内および口腔経路）を含む。特定の実施形態においては、本発明の抗体を筋肉内、静脈内、または皮下に投与する。組成物をいずれの普通の経路により、例えば、注入またはボラス注射により、上皮または粘膜皮膚ライニング（例えば、口腔粘膜、直腸および腸管粘膜など）を介する吸収により投与してもよく、かつ他の生物学的活性薬と一緒に投与してもよい。投与は全身に対してでもまたは局所に対してであってもよい。さらに、例えば、吸入器または噴霧器、およびエロゾル化剤を用いる製剤の使用により肺投与を利用することもできる。例えば、米国特許第号6,019,968；5,985,320；5,985,309；5,934,272；5,874,064；5,855,913；5,290,540；および4,880,078；ならびにPCT公開WO 92/19244；WO 97/32572；WO 97/44013；WO 98/31346；およびWO 99/66903を参照、これらはそれぞれ参照により本明細書にその全文が組み入れられる。

20

【0270】

本発明はまた、本発明の抗体を、ヘルメットによりシールした容器、例えば、アンプルまたは小袋（サッシュ）中にパッケージし、抗体の量を表示して提供する。一実施形態においては、本発明の抗体を、乾燥した無菌凍結乾燥粉末または無水濃縮物をヘルメットによりシールした容器に入れて供給し、そして例えば水または生理食塩水を用いて被験者に投与するために適当な濃度に再構築してもよい。好ましくは、本発明の抗体を、乾燥した無菌凍結乾燥粉末または無水濃縮物をヘルメットによりシールした容器に入れて少なくとも5mg、さらに好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位用量にて供給する。凍結乾燥した本発明の抗体はその元来の容器中で2～8℃の間で貯蔵しなければならない。かわりの実施形態においては、本発明の抗体を、液剤形で、ヘルメットによりシールした容器に入れて、抗体、融合タンパク質、または複合分子の量および濃度を表示して供給する。好ましくは、抗体の液剤形を、ヘルメットによりシールした容器に入れて、少なくとも1mg/ml、さらに好ましくは少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも100mg/ml、少なくとも150mg/ml、少なくとも200mg/mlの抗体を供給する。

30

40

【0271】

障害に関連するの1以上の症候群の治療、予防または改善するために有効でありうる本発明の組成物の量は、標準の臨床技術により決定することができる。製剤で用いるべき正確な用量はまた、投与経路、および病状の重篤度にも依存しうるので、医師の判断およびそれぞれの患者環境によって決定しなければならない。有効な用量をin vitroまたは動物モデル試験系から誘導した用量-応答曲線から外挿することもできる。

【0272】

本発明に包含される抗体について患者に投与される投与量は、典型的には、0.0001mg/k

50

g~100mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与される用量は、0.0001mg/kg~20mg/kg、0.0001mg/kg~10mg/kg、0.0001mg/kg~5mg/kg、0.0001~2mg/kg、0.0001~1mg/kg、0.0001mg/kg~0.75mg/kg、0.0001mg/kg~0.5mg/kg、0.0001mg/kg~0.25mg/kg、0.0001~0.15mg/kg、0.0001~0.10mg/kg、0.001~0.5mg/kg、0.01~0.25mg/kgまたは0.01~0.10mg/kg患者体重である。一般的に、外来ポリペプチドに対する免疫応答の故に、ヒト抗体はヒト体内において他種由来の抗体より長い半減期を有する。従って、ヒト抗体は投与量の低減および投与頻度の低減がしばしば可能である。さらに、例えば、脂質化などの修飾により抗体の取込みおよび組織貫入を増強することにより、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与の量と頻度を低減することができる。

【0273】

一実施形態において、患者に投与される本発明の抗体の投与量は、単一薬治療として用いるとき、0.01mg~1000mg/日である。他の実施形態においては、本発明の抗体を他の治療組成物と一緒に用い、患者に投与される投与量は上記抗体を単一薬治療法として用いるときより低い。

【0274】

特定の実施形態においては、本発明の医薬組成物を治療の必要な領域に局所投与することが所望されうる；この投与は、例えば、限定されるものでないが、局所注入により、注射により、またはシラスチック (sialastic) メンブランなどのメンブランまたは繊維を含む多孔質、非孔質、またはゼラチン状材料からなる移植片を用いて達成することができる。好ましくは、本発明の抗体を投与するとき、抗体または融合タンパク質を吸収しない材料を使うように注意しなければならない。

【0275】

他の実施形態においては、組成物を小胞、特にリポソームに入れて送達することができる (Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treatら, in 「感染症と癌の治療法におけるリポソーム (Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer)」, Lopez-Berestein and Fidler (編), Liss, New York, pp.353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp.3 17-327 を参照；一般的には前掲を参照)。

【0276】

さらに他の実施形態においては、組成物を制御放出または持続放出系で送達することができる。当業者に公知のいずれの技術を利用して、本発明の1以上の抗体を含む持続放出製剤を作ることができる。例えば、米国特許第4,526,938号；PCT公開WO 91/05548；PCT公開WO 96/20698；Ningら, 1996, 「ヒト大腸癌の腫瘍内放射免疫治療 持続放出ゲルを用いる異種移植片 (Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel)」 Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Songら, 1995, 「長循環エマルジョンの抗体を介する肺ターゲティング (Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions)」 PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleekら, 1997, 「心血管応用のためのbFGF抗体に対する生物分解性ポリマー担体 (Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application)」 Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854；およびLamら, 1997, 「局所送達のための、組換えヒト化モノクローナル抗体のマイクロカプセル化 (Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery)」 Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照、これらはそれぞれ参照により本明細書にその全文が組み入れられる。一実施形態においては、ポンプを制御放出系に用いる (Langer, 前掲；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20；Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507；およびSaudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照)。他の実施形態においては、ポリマー材料を用いて抗体の制御放出を達成することができる (例えば「制御放出の医療応用 (Medical Applications of Controlled Release)」, LangerおよびWise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)；「制御放出薬生物学的活性、医薬品設計と性能 (Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)」, Smolen およびBall (編),

10

20

30

40

50

Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, 1983, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; (またLevyら, 1985, *Science* 228:190; Duringら, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howardら, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105も参照); 米国特許第5,679,377号; 米国特許第5,916,597号; 米国特許第5,912,015号; 米国特許第5,989,463号; 米国特許第5,128,326号; PCT公開WO 99/15154; およびPCT公開WO 99/20253を参照)。持続放出製剤に使用されるポリマーの例としては、限定されるものでないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド (PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピリジン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリ乳酸 (PLA)、ポリ(乳酸-コ-グリコリド) (PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられる。さらに他の実施形態においては、制御放出系を治療標的 (例えば、肺) の近位に配置して、その結果、全身用量の一部分しか必要としないようにすることができる (例えば、Goodson, in 「制御放出の医療応用 (Medical Applications of Controlled Release)」, 前掲, vol. 2, pp.115-138 (1984)を参照)。他の実施形態においては、制御放出移植片として有用なDunnら (米国特許第5,945,155を参照) によるポリマー組成物を使用する。この特定の方法は、生物活性物質のポリマー系からのin situ制御放出に基づく。移植は一般的に、治療処置を必要とする患者体内のいずれの場所にあってもよい。他の実施形態においては非ポリマー持続送達系を使用し、この場合、被験者体内の非ポリマー移植片を薬物送達系として利用する。体内に移植すると、移植片の有機溶媒は周囲組織液中に散逸、分散または浸出して非ポリマー材料が徐々に凝集または沈降し、固体のミクロ多孔質マトリックスを形成する (米国特許第5,888,533号を参照)。

10

20

【0277】

制御放出系は、Langer (1990, *Science* 249:1527-1533) による総括に考察されている。当業者に公知のいずれの技術を用いて本発明の1以上の治療薬を含む持続放出製剤を作ってもよい。例えば、米国特許第4,526,938号; 国際公開WO 91/05548およびWO 96/20698; Ningら, 1996, *RadioTherapy & Oncology* 39:179-189; Songら, 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleekら, 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; およびLamら, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760を参照、これらはそれぞれ参照により本明細書にその全文が組み入れられる。

30

【0278】

特定の実施形態においては、本発明の組成物が抗体をコードする核酸である場合、核酸をin vivo投与してそのコードされた抗体の発現を促進することができる; それを適当な核酸発現ベクターの部分として構築しかつそれを細胞内に取込まれるように投与することにより、例えば、レトロウイルスベクターの使用により (米国特許第4,980,286号を参照)、または直接インジェクションにより、または微粒子ボンバードメントにより (例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤を用いてコーティングして、または核に進入することが知られるホメオボックス様ペプチドと連結して投与すること (例えば、Joliotら, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868を参照) などによる。あるいは、核酸を細胞内に導入して宿主細胞DNAに組込んで相長的組換えにより発現させてもよい。

40

【0279】

抗体について、被験者に投与される治療上または予防上有効な投与量は、典型的には、0.1mg/kg~200mg/kg被験者体重である。好ましくは、被験者に投与される投与量は、0.1mg/kg~20mg/kg被験者体重、そしてさらに好ましくは1mg/kg~10mg/kg被験者体重である。本発明の抗体の投与の用量と頻度はまた、例えば脂質化などの修飾による抗体または融合タンパク質の取込みおよび組織貫入 (例えば、肺中への) の増強によって低減することもできる。

【0280】

本発明の抗体の治療上または予防上有効な量を用いる被験者の治療は、単一治療または

50

、好ましくは、シリーズの治療を含んでもよい。好ましい例においては、被験者を約0.1～30mg/kg体重、毎週1回、約1～10週間、好ましくは約2～8週間、さらに好ましくは約3～7週間、そしてなおさらに好ましくは約4、5、または6週間の範囲で、本発明の抗体を用いて治療を行う。他の実施形態においては、本発明の医薬組成物を毎日1回、毎日2回、または毎日3回投与する。他の実施形態においては、医薬組成物を毎週1回、毎週2回、毎2週1回、毎月1回、毎6週1回、毎2月1回、毎年2回または毎年1回投与する。治療に使用する抗体の有効な投与量は、特定の治療のコースにわたって増加または減少することも理解されるであろう。

【0281】

5.4.1 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用であるバルク薬組成物（例えば、不純なまたは非殺菌の組成物）および単位投与剤形の調製に利用することができる医薬組成物（すなわち、被験者または患者に投与するのに好適である組成物）を含む。そのような組成物は、本明細書に開示した予防および／もしくは治療薬またはこれらの薬剤と製薬上許容される担体の組合わせの予防上または治療上有効な量を含む。好ましくは、本発明の組成物は本発明の抗体および製薬上許容される担体の予防上または治療上有効な量を含む。

【0282】

ある特定の実施形態において医薬組成物は、Fc γ RIIAが結合する親和性より大きい親和性でFc γ RIIBと結合する治療上有効な量の抗体またはそのフラグメント、特異的に癌抗原と結合する細胞傷害性抗体、および製薬上許容される担体を含む。他の実施形態においては、上記医薬組成物はさらに1以上の抗癌薬を含む。

【0283】

特定の実施形態において、用語「製薬上許容される」は、連邦または州政府の規制当局により認可されたまたは米国薬局方もしくは他の一般的に認められた動物そして特にヒトにおける使用に対する薬局方に掲げられたことを意味する。用語「担体」は、希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全および不完全）、賦形剤、または治療薬を投与するのに用いるビヒクルを意味する。このような製薬担体は、水および油などの無菌液であってもよく、石油、動物、植物または合成起源、例えばピーナッツオイル、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などの無菌液を含む。医薬組成物を静脈内投与するとき、水は好ましい担体である。生理食塩水およびブドウ糖およびグリセロール水溶液もまた、特に注射溶液として液状担体として利用することができる。好適な製薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。所望であれば、組成物はまた、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有してもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳化液、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、持続放出製剤などの剤形であってもよい。

【0284】

一般的に、本発明の組成物の成分は、別々にまたは一緒に混合して単位投与剤形で、例えば、乾燥した凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、ヘルメットによりシールした容器、例えばアンプルまたは小袋（サシエット）に入れ、活性薬の量を表示して供給される。組成物を注入により投与する場合、無菌製薬品質の水または生理食塩水を含有する注入ボトルを用いて調剤してもよい。組成物を注射により投与する場合、無菌の注射用水または生理食塩水のアンプルを提供して、その成分が投与前に混合されるようにすることができる。

【0285】

本発明の組成物を、中性または塩形態として製剤してもよい。製薬上許容される塩としては、限定されるものでないが、アニオン、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、蔞酸、酒石酸などから誘導されるアニオンと形成した塩、およびカチオン、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン

10

20

30

40

50

、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されたカチオンと形成した塩を含む。

【0286】

5.4.2 遺伝子治療

特定の実施形態においては、抗体または融合タンパク質をコードする配列を含む核酸を投与して、遺伝子治療法の方法により、疾患、障害、または感染に関連する1以上の症候群を治療、予防、または改善する。遺伝子治療法は、被験者への発現されたまたは発現されうる核酸の投与により実施する治療法を意味する。本発明のこの実施形態においては、核酸はそのコードした抗体または融合タンパク質を産生して治療または予防効果を媒介する。

10

【0287】

当技術分野で利用しうるいずれの遺伝子治療用の方法を本発明に従って使用することができる。方法の例を以下に記載する。

【0288】

遺伝子治療法の方法の一般的総括については、Goldspielら, 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; WuおよびWu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932 (1993); およびMorgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11 (5) : 155-215を参照。利用することができる組換えDNA技術の技術分野で公知の方法は、Ausubelら (編), 「分子生物学の現行プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」 John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, 「遺伝子導入および発現 研究室マニュアル (Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual)」, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。

20

【0289】

好ましい態様においては、本発明の組成物は抗体をコードする核酸を含み、上記核酸は好適な宿主中において抗体を発現する発現ベクターの一部分である。特に、このような核酸は、抗体コード領域と機能しうる形で連結されたプロモーター、好ましくは異種プロモーターを有し、上記プロモーターは、誘導可能な、構成的な、かつ場合によっては、組織特異的である。他の特定の実施形態においては、抗体コード配列およびいずれか他の所望の配列がゲノム内の所望の部位における相同的組換えを促進する領域にフランキングし、その結果、抗体をコードする核酸の染色体内発現を可能にする核酸分子が使用される (KollerおよびSmithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; ならびにZijlstraら, 1989, Nature 342:435-438)。

30

【0290】

他の好ましい態様においては、本発明の組成物は融合タンパク質をコードする核酸を含み、上記核酸は好適な宿主において融合タンパク質を発現する発現ベクターの一部分である。特に、このような核酸は、融合タンパク質のコード領域と機能しうる形で連結されたプロモーター、好ましくは異種プロモーターを有し、上記プロモーターは、誘導可能な、構成的な、かつ場合によっては、組織特異的である。他の特定の実施形態においては、融合タンパク質のコード配列およびいずれか他の所望の配列がゲノム内の所望の部位における相同的組換えを促進する領域にフランキングし、その結果、融合タンパク質をコードする核酸の染色体内発現を可能にする核酸分子が使用される。

40

【0291】

核酸の被験者中への送達は、直接的 (この場合には被験者を核酸または核酸を運ぶベクターに直接曝す) または間接的 (この場合には細胞を最初に核酸にin vitroで形質転換し、次いで被験者中に移植する) のいずれであってもよい。これらの2つの手法は、それぞれ、in vivoまたはex vivo遺伝子治療法として公知である。

【0292】

特定の実施形態においては、核酸配列を直接in vivoに投与し、そこで発現してコードされた産物を発現する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれかにより、実施

50

することができる；例えば、それを適当な核酸発現ベクターの部分として構築しかつそれを細胞内に取込まれるように投与することにより、例えば、欠陥または弱毒化レトロウイルスまたは他のベクターを使った感染により（米国特許第4,980,286号を参照）、または裸のDNAの直接インジェクションにより、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）により、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤を用いてコーティングし、リボソーム、ミクロ粒子、もしくはマイクロカプセル内に封入し、またはそれらを核に進入することが知られるペプチドと連結して投与することにより、受容体を介するエンドサイトーシスを受けるリガンドと連結して投与すること、（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）（これを用いて受容体を特異的に発現する細胞型を標的とする）などによる。他の実施形態においては、核酸-リガンド複合体（このリガンドはエンドソームを破壊する融合性ウイルスペプチドを含む）を形成させて、リソソーム分解を回避させることができる。さらに他の実施形態において、核酸は、特異的受容体をターゲティングすることにより、細胞特異的取込みと発現をin vivoで標的にすることができる（例えば、PCT公開WO 92/06180；WO 92/22635；WO92/20316；WO93/14188；WO 93/20221を参照）。あるいは、核酸を細胞内に導入し、そして発現のために宿主細胞DNA内に相同的組換えによって組込ませることができる（Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；およびZijlstraら, 1989, Nature 342:435-438）。

【0293】

特定の実施形態においては、抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列を含有するウイルスベクターを用いる。例えば、レトロウイルスベクターを利用することができる（Millerら, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599を参照）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージングおよび宿主細胞DNA中への組込みのために必要な成分を含有する。遺伝子治療法に利用する抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列を1以上のベクター中にクローニングして、ヌクレオチド配列の被験者中への送達を容易にする。レトロウイルスベクターについてのさらなる詳細は、Boesenら、（1994, Biotherapy 6:291-302）に見出すことができ、これは、化学治療にさらに耐性のある幹細胞を作る目的でmdr 1遺伝子を造血性幹細胞へ送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載する。遺伝子治療法におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献には：Clowesら, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651；Kleinら, 1994, Blood 83:1467-1473；SalmonsおよびGunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141；ならびにGrossmanおよびWilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114がある。

【0294】

アデノウイルスは、遺伝子治療に利用しうる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、遺伝子を呼吸器上皮に送達するビヒクルとして魅力がある。アデノウイルスは自然で呼吸器上皮に感染して軽度の疾患を引起す。アデノウイルスに基づく送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは非分裂細胞に感染することができるので有利である。KozarskyおよびWilson（Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993）はアデノウイルスに基づく遺伝子治療法の総括を報じている。Boutら（Human Gene Therapy, 5:3-10, 1994）は、遺伝子をアカゲザルの呼吸器上皮へ導入するためのアデノウイルスベクターの利用を実証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの利用の他の例は、Rosenfeldら, 1991, Science 252:431-434；Rosenfeldら, 1992, Cell 68 :143-155；Mastrangeliら, 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234；PCT公開WO 94/12649；ならびにWangら, 1995, Gene Therapy 2:775-783に見出すことができる。好ましい実施形態においては、アデノウイルスベクターを利用する。

【0295】

アデノ随伴ウイルス（AAV）も遺伝子治療における利用が報じられている（例えば、Walshら, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300および米国特許第5,436,146号を参照）。

【0296】

遺伝子治療に対する他の手法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介するトランスフェクション、またはウイルス感染などの方法により、遺伝子を組織培養物中の細胞に導入することに関わる。通常、導入の方法は、選択可能なマーカーの細胞への導入を含む。次いで細胞を選択のもとに置いて、取上げられかつ導入した遺伝子を発現する細胞を単離する。次いでこれらの細胞を被験者に送達する。

【0297】

この実施形態においては、核酸を細胞中に導入した後に、得られる組換え細胞をin vivo投与する。このような導入は、当技術分野で公知のいずれかの方法、例えば、限定されるものでないが、核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージベクターを用いるトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、感染、細胞融合、染色体融合遺伝子導入 (chromosome-mediated gene transfer)、微小核融合遺伝子導入 (microcell mediated gene transfer)、スフェロプラスト融合などにより実施することができる。外来遺伝子を細胞中に導入するための多数の技術は当技術分野で公知であり (例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohenら, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; およびClin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985を参照)、受給細胞の必要な発生および生理学的機能が破壊されないことを条件として本発明に従って利用することができる。その技術は核酸の細胞への安定な導入を提供して、核酸が細胞により発現され、そして好ましくはその細胞子孫に遺伝してかつ発現されるものでなければならない。

【0298】

得られる組換え細胞は、当技術分野で公知の様々な方法により被験者に送達することができる。組換え血液細胞 (例えば、造血性幹または祖先細胞) は、好ましくは、静脈内に投与される。細胞の使用予想量は、所望の効果、患者状態などに依存し、当業者が決定しうる。

【0299】

遺伝子治療の目的で核酸を導入する相手の細胞は、いずれの所望の、利用しうる細胞型を包含してもよく、限定されるものでないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞; 血液細胞、例えばTリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球; 様々な幹または祖先細胞、特に造血性幹または祖先細胞、例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝などから得られるものを含む。

【0300】

好ましい実施形態においては、遺伝子治療に使用される細胞は被験者自己のものである。

【0301】

組換え細胞を遺伝子治療に使用する一実施形態においては、抗体または融合タンパク質をコードする核酸配列を細胞中に導入して、その細胞またはその子孫により発現されうるようにし、次いでその組換え細胞をin vivoで投与して治療効果を与える。特定の実施形態においては、幹または祖先細胞を用いる。単離してin vivoで維持することができる。いずれの幹および/または祖先細胞も潜在的に、本発明のこの実施形態に従って利用することができる (例えば、PCT公開WO 94/08598; StempleおよびAnderson, 1992, 細胞7 1:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A :229; ならびにPittelkowおよびScott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771を参照)。

【0302】

特定の実施形態においては、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域と機能しうる形で連結されて、適当な転写誘導物質の存在または不在を制御することにより核酸の発現を制御しうる誘導プロモーターを含む。

【0303】

5.4.3 キット

本発明は、本発明の抗体を充填した1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供

10

20

30

40

50

する。さらに、疾患の治療に有用な1以上の他の予防または治療薬を、医薬パックまたはキット中に含んでもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含む医薬パックまたはキットも含む。場合によってはこのような容器に、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府当局が指示した形式であって、ヒト投与用の製造、使用または販売行政当局による認可を反映する注意書きを添付してもよい。

【0304】

本発明は、上記の方法で 사용할 ことができるキットを提供する。一実施形態においては、キットは1以上の本発明の抗体を含む。他の実施形態においては、キットはさらに、癌の治療用に有用な1以上の他の予防または治療薬を、1以上の容器中に含む。他の実施形態においては、キットはさらに、1以上の癌に関連する癌抗原と結合する1以上の細胞傷害性抗体を含む。ある特定の実施形態において、他の予防または治療薬は化学治療薬である。他の実施形態において、予防または治療薬は生物学的またはホルモン治療薬である。

10

【0305】

5.5 治療上の効用の特徴付けおよび実証

本発明の医薬組成物または予防または治療薬の複数の形態は、好ましくは、*in vitro*、例えば細胞培養系で、および次いで*in vivo*、例えば動物モデル生物で、例えばげっ歯類動物モデル系で所望の治療活性について試験した後に、ヒトに使用する。例えば、特定の医薬組成物の投与が示されるかどうかを確認するために用いることができるアッセイは、細胞培養アッセイであって、患者組織サンプルを培養で増殖し、医薬組成物と曝すかまたはそうでなければ接触させ、そしてこのような組成物の組織サンプルに対する効果、例えば、軟寒天中での増殖および／またはコロニー形成または3次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の抑制または減少を観察する上記アッセイを含む。組織サンプルは患者から生検により得ることができる。この試験により、治療上最も有効な予防または治療分子をそれぞれの個々の患者に対して同定することができる。あるいは、患者からの細胞を培養する代わりに、治療薬と方法を、腫瘍または悪性培養細胞株の細胞を用いてスクリーニングすることができる。様々な特定の実施形態においては、*in vitro* アッセイを、自己免疫性または炎症性障害（例えば、T細胞）に関わる細胞型の代表的細胞を用いて実施し、本発明の医薬組成物がこのような細胞型に対して所望の効果を有するかを確認することができる。当技術分野の多数のアッセイ標準を用いて、このような生存および／または増殖を評価することができる；例えば、細胞増殖は、³H-チミジン組込みを測定することにより、直接細胞計数より、プロトオンコジーン（例えば、*fos*、*myc*）または細胞周期マーカーなどの公知の遺伝子の転写活性の変化を検出することにより評価することができる；細胞生存率はトリパンブルー染色により評価することができる、分化は形態の変化、軟寒天中での増殖および／またはコロニー形成または3次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の減少などに基づいて視覚で評価することができる。

20

30

【0306】

予防および／または治療薬の組合わせは、ヒトで使用する前に、適当な動物モデル系で試験することができる。このような動物モデル系としては、限定されるものでないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどが挙げられる。当技術分野で周知のいずれの動物系を使用してもよい。本発明の特定の実施形態においては、予防および／または治療薬の組合わせはマウスモデル系で試験する。このようなモデル系は広く使用されていて、当業者に周知である。予防および／または治療薬は、反復して投与することができる。予防および／または治療薬を投与する時間的体制、およびこのような薬剤を別々にまたは混合物として投与するかどうかなどの操作のいくつかの態様は、様々である。

40

【0307】

本発明の方法に使用する好ましい動物モデルは、例えば、マウスエフェクター細胞上に

50

Fc γ Rを発現するトランスジェニックマウス、例えば、米国特許第5,877,396号（これは参照により本明細書にその全文が組み入れられる）に記載されたいずれかのマウスモデルである。本発明の方法に使用するトランスジェニックマウスとしては、限定されるものではないが、ヒトFc γ RIIIAを運ぶマウス、ヒトFc γ RIIAを運ぶマウス、ヒトFc γ RIIBとヒトFc γ RIIIAを運ぶマウス、ヒトFc γ RIIBとヒトFc γ RIIAを運ぶマウスが挙げられる。

【0308】

本発明の予防および／または治療薬が一度試験されていると、それらを臨床試験に試験してそれらの効力を確立することができる。臨床試験を確立することは、当業者に公知の普通の方法論に従って実施しうるのであって、本発明の組成物の最適の投与量と投与経路だけでなく毒性プロファイルも日常の実験を利用して確立することができる。

10

【0309】

本発明の組合わせ治療法の抗炎症性活性は、当技術分野で公知のかつCrofford L. J.およびWilder R. L.（「動物の関節炎と自己免疫（Arthritis and Autoimmunity in Animals）」 in 「関節炎と近縁症状：リウマチ学の教科書（Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology）」, McCartyら（編），第30章 Lee and Febiger, 1993）に記載の様々な炎症性関節炎の実験動物モデルを利用して決定することができる。炎症性関節炎および自己免疫リウマチ疾患の実験的かつ自発性動物モデルはまた、本発明の組合わせ治療法の抗炎症性活性を評価するために利用することもできる。以下は例として掲げたいくつかのアッセイであり、限定されるものではない。

【0310】

20

当技術分野で公知のかつ広く利用される関節炎または炎症性疾患用の主な動物モデルとしては、アジュバントが誘導する関節炎ラットモデル、コラーゲンが誘導する関節炎ラットおよびマウスモデル、ならびに、抗原が誘導する関節炎ラット、ウサギおよびハムスターモデルが挙げられ、これらは全て、Crofford L. J. and Wilder R. L.（「動物の関節炎と自己免疫（Arthritis and Autoimmunity in Animals）」 in 「関節炎と近縁症状：リウマチ学の教科書（Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology）」, McCartyら（編），第30章 Lee and Febiger, 1993、これは参照により本明細書にその全文が組み入れられる）に記載されている。

【0311】

本発明の組合わせ治療法の抗炎症性活性は、カラゲナンが誘導する関節炎ラットモデルを用いて評価することができる。カラゲナンが誘導する関節炎はまた、ウサギ、イヌおよびブタにおける慢性関節炎または炎症の研究にも利用されている。定量的な組織形態計測的評価を用いて治療効力を決定する。このようなカラゲナンが誘導する関節炎モデルを利用する方法は、Hansra P.ら、「ラットにおけるカラゲナンが誘導する関節炎（Carrageenan-induced Arthritis in the Rat）」, Inflammation, 24(2):141-155, (2000)に記載されている。また、ザイモサンが誘導する炎症動物モデルも普通に利用されてかつ当技術分野で公知である。

30

【0312】

本発明の組合わせ治療法の抗炎症性活性はまた、カラゲナンが誘導するラットの足浮腫（paw edema）の抑制を、Winter C. A.ら、「抗炎症薬用アッセイとしての、カラゲナンが誘導するラット後足浮腫（Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs）」Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547, (1962)に記載の方法の改変法を用いて測定することにより評価することもできる。このアッセイはほとんどのNSAIDの抗炎症性活性に対する一次in vivoスクリーニングとして使われていて、ヒト効力を予測すると考えられている。試験予防または治療薬の抗炎症性活性は、ビヒクルを投与した対照グループと比較した試験グループの後足重量増加の抑制として表現される。

40

【0313】

さらに、炎症性腸疾患の動物モデルを用いて、本発明の組合わせ治療法の効力を評価することもできる（Kimら, 1992, Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober, 1985,

50

Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl):3S-10S)。潰瘍性大腸炎およびクローン病は動物に誘導することができるヒト炎症性腸疾患である。硫酸化多糖体（限定されるものでないが、アミロペクチン、カラゲーン、アミロペクチン硫酸およびデキストラン硫酸を含む）または化学刺激剤（限定されるものでないが、トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）および酢酸を含む）を動物に経口投与して炎症性腸疾患を誘導することができる。

【0314】

喘息に対する動物モデルを利用して、本発明の組合わせ治療法の効力を評価することもできる。このようなモデルの一例は、マウス養子性導入モデルであり、このモデルでは、TH1またはTH2受給マウスのエーロアレルゲン吸入誘発により、気道へのTHエフェクター細胞の遊走が起こり、激しい好中球（TH1）および好酸球（TH2）肺粘膜炎症性応答を起こす（Cohnら，1997，J. Exp. Med. 186:1737-1747）。

10

【0315】

自己免疫障害用の動物モデルを利用して、本発明の組合わせ治療法の効力を評価することもできる。自己免疫障害、例えばI型糖尿病、甲状腺自己免疫、全身エリテマトーデス、および糸球体腎炎に対する動物モデルが開発されている（Flandersら，1999，Autoimmunity 29:235-246；Kroghら，1999，Biochimie 81:511-515；Foster，1999，Semin. Nephrol. 19:12-24）

さらに、当業者に公知のいずれのアッセイを利用して、本発明に開示した自己免疫および／または炎症性疾患に対する組合わせ治療法の予防および／または治療効用を評価してもよい。

20

【0316】

本発明の予防および／または治療プロトコルの毒性および効力は、標準の細胞培養または実験動物における、例えば、LD₅₀（集団の50％に対する致死用量）およびED₅₀（集団の50％における治療上有効な用量）を確認するための医薬操作により確認することができる。毒性と治療効果の間の用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表現される。大きい治療指数を示す予防および／または治療薬が好ましい。毒性副作用を表す予防および／または治療薬を使用することはできるが、このような薬物を罹患組織の部位を標的に定める送達系を設計して無感染細胞に対する潜在的な損傷を最小化し、それにより、副作用を軽減するように注意しなければならない。

【0317】

30

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトに使用する予防および／または治療薬の投与量の範囲を処方するのに利用することができる。このような薬物の投与量は、好ましくは、ED₅₀を含みかつ少しの毒性しかないか無毒の循環濃度の範囲内にある。投与量は、利用する投与剤形および投与経路に依存して変わりうる。本発明の方法に使用するいずれの薬物に対しても、治療上有効な用量は最初に細胞培養アッセイから推定することができる。用量を動物モデルで、細胞培養で決定したIC₅₀（すなわち、症候群の半最大抑制を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように処方してもよい。このような情報を利用して、ヒトにおいて有用な投与量をさらに正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィにより測定することができる。

40

【0318】

本発明に従って使用される治療法の抗癌活性はまた、当技術分野で公知でありかつ「抗癌剤開発用腫瘍モデルの関連性（Relevance of Tumor Models for Anticancer Development）」（1999，編 FiebigおよびBurger）；「腫瘍学に対する貢献（Contributions to Oncology）」（1999，Karger）；「腫瘍学研究におけるヌードマウス（The Nude Mouse in Oncology Research）」（1991，編 Boven and Winograd）；およびAnticancer Drug Development Guide（1997 編 Teicher）（これらは本明細書に参照により本明細書にその全文が組み入れられる）に記載されている、癌研究用の様々な実験動物モデル、例えばSCIDマウスモデルまたはトランスジェニックマウスまたはヒト異種移植片をもつヌードマウス、動物モデル、例えば、ハムスター、ウサギなどを用いることにより決定することもできる。

50

【0319】

本発明のプロトコルと組成物は、ヒトで使用する前に、好ましくは、in vitroで、次いでin vivoで、所望の治療または予防活性について試験する。治療薬と方法は、腫瘍または悪性培養細胞株の細胞を用いてスクリーニングすることができる。当技術分野の多くのアッセイ標準を利用してこのような生存および／または増殖を評価することができる；例えば、細胞増殖は³H-チミジン組込みを測定することにより、直接細胞計数より、プロトオンコジーン（例えば、fos、myc）または細胞周期マーカーなどの公知の遺伝子の転写活性の変化を検出することにより評価することができる；細胞生存率はトリパンブルー染色により評価することができ、分化は形態の変化、軟寒天中での増殖および／またはコロニー形成または3次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の減少などに基づいて視覚で評価することができる。

10

【0320】

治療に用いる化合物は、限定されるものでないが、ヒトで試験する前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなどを含む好適な動物モデル系で、例えば、上記の動物モデルで試験することができる。次いで、化合物を適当な臨床試験に使用することができる。

【0321】

さらに、当技術分野で公知のいずれかのアッセイを用いて、本明細書に開示した組合せ治療法の予防および／または治療効用を、癌、炎症性障害、または自己免疫疾患の治療または予防について評価することができる。

20

【0322】

5.6 診断方法

標識した本発明の抗体を診断目的に用いて、疾患、障害または感染を検出、診断、またはモニターすることができる。本発明は、疾患、障害または感染、特に自己免疫疾患を検出または診断する方法であって、(a)被験者の細胞または組織サンプル中のFcγRIIBの発現を、FcγRIIBと免疫特異的に結合する1以上の抗体を用いてアッセイするステップ；および(b)抗原のレベルを対照レベル、例えば正常組織サンプル中のレベルと比較して、抗原の対照レベルと比較したアッセイした抗原のレベルの増加は疾患、障害または感染を示すとするステップを含む上記方法を提供する。

【0323】

本発明の抗体を使用し、生物学的サンプル中のFcγRIIBレベルを本明細書に記載のまたは当業者に公知の古典的免疫組織学的方法を用いて評価することができる（例えば、Jalkanenら, 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985；Jalkanenら, 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096を参照）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体に基づく方法は、イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）を含む。好適な抗体アッセイ標識は当技術分野で公知であり、酵素標識、例えば塩基性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ；放射性同位体、例えばヨウ素（¹²⁵I, ¹³¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（³⁵S）、トリチウム（³H）、インジウム（¹²¹In）、およびテクニウム（^{99m}Tc）；発光標識、例えばルミノール；および蛍光標識、例えばフルオレセインおよびローダミンが挙げられる。

30

【0324】

本発明の一態様は、ヒトにおける疾患、障害、または感染の検出および診断である。一実施形態においては、診断は、a)被験者にFcγRIIBと免疫特異的に結合する標識した抗体の有効量を投与する（例えば、非経口、皮下、または腹腔内に）ステップ；b)投与後ある時間の間、標識した抗体が被験者の部位に選択的に濃縮してそこでFcγRIIBが発現される（そして無結合の標識した分子がバックグラウンドレベルまでクリアされる）のを待つステップ；c)バックグラウンドレベルを測定するステップ；およびd)被験者中の標識した抗体を検出して、標識した抗体のバックグラウンドレベルを超える検出は被験者が疾患、障害または感染を有することを示すとするステップを含む。この実施形態に従って、抗体を、当業者に公知のイメージングシステムを用いて検出可能であるイメージング成分により

40

50

標識する。バックグラウンドレベルは、検出された標識した分子の量を、特定の系に対して先に決定した標準値と比較することを含む様々な方法により決定することができる。

【0325】

被験者のサイズと使用するイメージングシステムが、診断イメージを作るために必要なイメージング成分の量を決定しうることは当技術分野で理解されるであろう。ヒト被験者に対する放射性同位体成分の場合、注射される放射能の量は通常約5~20ミリキュリーの ^{99m}Tc であろう。標識した抗体を次いで選択的に特定のタンパク質を含有する細胞の位置に蓄積させる。in vivo腫瘍イメージングは、S. W. Burchielら、「放射標識した抗体とそのフラグメントの免疫薬物動態学 (Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibody and Their Fragments)」 in 「腫瘍イメージング：癌の放射化学的検出、第13章 (Tumor Imaging :The Radiochemical Detection of Cancer, Chapt. 13)」, S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes, 編, Masson Publishing Inc. (1982)に記載されている。

10

【0326】

使用する標識のタイプおよび投与様式を含む複数の変数に依存して、標識した分子が被験者の部位に選択的に濃縮しうるためのかつ無結合の標識した分子がバックグラウンドレベルにクリアされるための投与後の時間間隔は、6~48時間または6~24時間または6~12時間である。他の実施形態においては、投与後の間隔は5~20日または5~10日である。

【0327】

一実施形態においては、疾患、障害または感染のモニタリングを、例えば最初の診断後1ヶ月、最初の診断後6ヶ月、最初の診断後1年などに疾患、障害または感染の診断を繰返すことによって実施する。

20

【0328】

被験者中の標識した分子の存在は、in vivo走査に対する当技術分野で公知の方法を用いて検出することができる。これらの方法は、使用する標識のタイプに依存する。当業者は特定標識を検出するための適当な方法を決定することができよう。本発明の診断に利用しうる方法とデバイスは、限定されるものでないが、コンピューター断層撮影 (CT)、位置放出断層撮影 (PET) などの全身走査、磁気共鳴イメージング (MRI)、およびソノグラフィを含む。

【0329】

特定の実施形態においては、分子を放射性同位体により標識し、患者において放射線応答外科機器 (Thurstonら、米国特許第5,441,050号) を用いて検出する。他の実施形態においては、分子を蛍光化合物により標識し、患者において蛍光応答走査機器を用いて検出する。他の実施形態においては、分子を位置放出性金属により標識し、患者においてポジトロン放出断層撮影を用いて検出する。さらに他の実施形態においては、分子を常磁性標識により標識し、患者において磁気共鳴イメージングを用いて検出する。

30

【0330】

6. 実施例

6.1 モノクローナル抗体の調製

マウスモノクローナル抗体を、クローン3H7または2B6からそれぞれATCC受託番号PTA-4591およびPTA-4592を用いて産生させた。Fc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合するマウスモノクローナル抗体を作製した。トランスジェニックFC8RIIAマウス (Dr. Ravetch Laboratory, Rockefeller Universityにおいて作製された) を、ヒトFc γ RIIB受容体の細胞外ドメイン、残基1~180をコードするcDNAによりトランスフェクトしておいた293細胞の上清から精製されたFc γ RIIBを用いて免疫感作した。これらのマウスの脾細胞からのハイブリドーマ培養細胞株を産生し、そしてFc γ RIIAと結合するより大きい親和性でFc γ RIIBと特異的に結合する抗体についてスクリーニングした。

40

【0331】

6.2 抗体スクリーニングおよび特徴付け

材料と方法

ハイブリドーマ培養からの上清を、Fc γ RIIAまたはFc γ RIIBに対する免疫活性について

50

ELISAアッセイを用いてスクリーニングする。それぞれの場合、プレートに100ng/wellのFcγRIIAまたはFcγRIIBを用いてコーティングする。抗体の特定の受容体との結合はヤギ抗マウスHRP複合抗体により650nmにおける吸収をモニターして検出する。

【0332】

ブロッキングELISA実験においては、ハイブリドーマ上清からの抗体の、凝集IgGのFcγRIIBとの結合をブロックする能力をモニターする。プレートを適当な「ブロッキング薬」を用いてブロックし、洗浄バッファ（PBS+0.1%Tween）を用いて3回洗浄する（200μl/ウェル）。プレートをハイブリドーマ上清を用いて1時間37℃でプレインキュベートする。ブロッキングに続いて、固定した量の凝集ビオチン化ヒトIgG（1μg/ウェル）をウェルに加え、凝集物をFcγRIIB受容体と結合させる。この反応は、2時間37℃にて実施する。次いで検出をモニターし、さらに洗浄の後、ストレプトアビジン西洋わさびペルオキシダーゼ複合体を用いて処理して結合した凝集IgGを検出する。650nmにおける吸収は結合した凝集IgGと比例する。

10

【0333】

β-ヘキソサミニダーゼ放出アッセイにおいては、ハイブリドーマ上清からの抗体の、Fcεが誘導するβ-ヘキソサミニダーゼの放出を抑制する能力をモニターする。RBL-2H3細胞をヒトFcγRIIBによりトランスフェクトし；細胞を、0.03μg/mL～30μg/mLの範囲の様々な濃度のヤギ抗マウスF(ab)₂フラグメントを用いて刺激し；マウスIgE単独（0.01μg/mLにて）を用いてまたは抗FcγRIIB抗体を用いて感作する。1時間インキュベーションした後、細胞を遠心沈降し；上清を採集し；そして細胞を溶解する。上清に放出されたβ-ヘキソサミニダーゼ活性を、比色アッセイでp-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-グルコサミニドを用いて測定する。放出β-ヘキソサミニダーゼ活性を、全活性と比較して放出された活性のパーセントとして表現する。

20

【0334】

FACS ANALYSIS

FcγRIIBを発現するCHO細胞を様々な抗体を用いて染色してFACSにより分析する。一シリーズの実験において、細胞を直接標識してモノクローナル抗体が受容体を認識するかを確認する。

【0335】

ブロッキングFACS実験においては、ハイブリドーマ上清からの抗体の、凝集IgGのFcγRIIBとの結合をブロックする能力をモニターする。各サンプルについて約100万個の細胞（FcγRIIBを発現するCHO細胞）を、氷上で30分間2μgのアイソタイプ対照（マウスIgG1）とともにまたは2B6または3H7抗体とともにインキュベートする。細胞をPBS+1%BSAを用いて1回洗浄し、そして1μgの凝集ビオチン化ヒトIgGとともに30分間氷上でインキュベートする。細胞を洗浄し、二次抗体、すなわち結合した抗体を検出するためのヤギ抗マウスFITC、および結合した凝集ビオチン化ヒトIgGを検出するためのストレプトアビジン-PE複合体を加えて、氷上で30分間インキュベートする。細胞を洗浄してFACSにより分析する。

30

【0336】

Bリンパ球を、FcγRIIBおよびCD20の存在を検出するために染色する。各サンプルに対する200μLの「バッフィコート（buffy coat）」を氷上で2ugのアイソタイプ対照またはモノクローナル抗体、2B6または3H7とともにインキュベートする。細胞を1回PBS+1%BSAを用いて洗浄して1μlのヤギ抗マウス-PE抗体とともに30分間氷上でインキュベートする。細胞を1回洗浄してCD20-FITC抗体（2μg）をサンプルに加え、氷上で30分間インキュベートする。全てのサンプルをPBS+1%BSAを用いて1回洗浄し、そしてFACSにより分析する。

40

【0337】

ADCCアッセイ

Her2/neu抗原を発現する4～5x10⁶個の標的細胞（IGROV-1またはSKBR-3細胞）を、ビス（アセトキイメチル）2,2':6',2"-テルピリジン-t-6"-ジカルボキシラート（DELTA BATDA試薬、Perkin Elmer/Wallac）を用いて標識する。BATDA試薬を細胞に加え、混合物を37℃に

50

て好ましくは5%CO₂のもとで、少なくとも30分間インキュベートする。次いで細胞を生理学的バッファー、例えば0.125mMスルフィンピラゾールを含むPBS、および0.125mMスルフィンピラゾールを含有する培地を用いて洗浄する。標識した標的細胞をエフェクター細胞、例えばPBMCに、ほぼ50:1、75:1、または100:1のエフェクター：標的比となるように加える。PBMCを、全血液をFicoll-Hypaque (Sigma) 上に重ね、室温で30分間500gにて遠心回転した。白血球層をユウロピウムに基づくADCCアッセイ用のエフェクターとして採集した。凍結したまたは新しく単離した洗い分けられた単球 (Advanced Biotechnologies, MD) をエフェクターとして腫瘍標的培養細胞株とともに100:1~10:1の様々なエフェクター：標的比で用いて、抗体の濃度を1~15 µg/mlで滴定する。凍結ストックとして得てサイトカインにより刺激した単球をADCCアッセイにおけるエフェクター細胞として用いる。もし凍結単球が最適な作用をすればそれを日常的に使用し、そうでなければ新しい細胞を使用する。MDMは、培養中の単球の生存と分化を増強することが知られるサイトカインGM-CSFまたはM-CSFを用いる処理により調製しうる。MDMをサイトカインを用いて刺激し、様々なFcγR (I、IIA、IIB、およびIIIA) の発現をFACS分析により確認しうる。

【0338】

エフェクターおよび標的細胞を、少なくとも2時間、16時間まで、37℃にて、5%CO₂下で、標的細胞、Her2/neu上に発現される抗原に特異的な抗腫瘍抗体の存在のもとで、かつ抗FcγRIIB抗体の存在または不在のもとでインキュベートする。N297A突然変異を含有するように遺伝子操作されているキメラ4D5抗体をネガティブ対照として用いる、それはこの抗体は腫瘍標的細胞と可変域を経由して結合するからである。この部位のグリコシル化が喪失すると、抗体のFc域のFcγRとの結合は無くなる。市販されるヒトIgG1/kは抗FcγRIIB抗体に対するアイソタイプ対照として役立つ。細胞上清を採集して酸性ユウロピウム溶液 (例えば、DELFLIAユウロピウム溶液、Perkin Elmer/Wallac) を加える。形成されるユウロピウム-TDAキレート蛍光、時間分割蛍光光度計 (例えば、Victor 1420、Perkin Elmer/Wallac) で定量する。最大放出 (MR) と自発性放出 (SR) とを、標的細胞の1%TX-100および培地単独とのインキュベーションによりそれぞれ確認する。抗体非依存性細胞傷害性 (AICC) を標的およびエフェクター細胞の抗体の不在のもとでのインキュベーションにより測定する。それぞれのアッセイは好ましくは3重で実施する。平均パーセント比溶解は、実験放出 (ADCC-AICC) / (MR-SR) x 100として計算する。

【0339】

3H7クローンから産生されるモノクローナル抗体の特徴付け

ハイブリドーマ培養の様々なバッチの直接結合

ハイブリドーマ培養の様々なバッチのFcγRIIAおよびFcγRIIBとの直接結合を、ELISAアッセイを用いて比較した (図1A)。上清番号1、4、7、9、および3を特異的結合について試験し、その結合を市販抗体、FL18.26と比較した。図1A (左パネル) に示すように、クローン7からの上清がFcγRIIBと最大の結合を有し、この結合は、飽和条件のもとで市販抗体のFcγRIIBとの結合より約4倍高い。しかし、クローン7からの上清は、FcγRIIAに対して右パネルに見られるようにほとんど親和性がないが、市販抗体はFcγRIIAと少なくとも4倍より高く結合する。

【0340】

3H7クローンから産生される抗体の、FcγRIIAおよびFcγRIIBとの直接結合

粗製3H7上清および精製3H7上清の結合を測定した (図1B)。それぞれの場合、上清を70 µg/mlの濃度で供給し、6倍まで希釈した。図1に示すように、飽和条件のもとで、3H7上清はFcγRIIAと結合するより4倍高くFcγRIIBと結合する。タンパク質Gカラムを用いて精製すると、3H7上清のそれぞれの免疫原との絶対的結合が改善される。

【0341】

3H7クローンから産生される抗体による、FcγRIIBに対する凝集ヒトIgG結合のブロッキング

もしハイブリドーマ上清中に存在する抗体がIgG結合部位においてFcγRIIBと結合してIgG結合をブロッキングすれば、凝集IgGは受容体と結合できず、従って650nmにおける吸収

10

20

30

40

50

を検出することはできない。抗体は事実上、Fc γ RIIB上のIgG結合部位をブロックする「ブロッキング剤」である。対照として、ブロッキングなし、対照上清、および3H7クローンからの上清を用いてELISAを実施した。図2に示すように、3H7上清は完全にIgG結合をブロックした、それは、650nmにおける吸収を欠くことから明らかのように、凝集IgGが受容体と結合することができないからである。しかし、対照上清はIgG結合をブロックせず；凝集IgGは650nmの読みにより明らかのように受容体と結合する。対照上清はブロッキングなしで行った状況に類似する。

【0342】

3H7クローンから産生される抗体の、細菌および哺乳類動物Fc γ RIIBに対する直接結合の比較

10

図3に示すように、3H7クローンからの上清は哺乳類動物および細菌Fc γ RIIBと比較的結合する。飽和条件のもとで、3H7上清は細菌および哺乳類動物Fc γ RIIBと、Fc γ RIIAと結合するより3倍高く結合する。このように、3H7クローンからのモノクローナル抗体は転写後改変（例えば、グリコシル化）されている哺乳類動物Fc γ RIIBと特異的に結合することができる。

【0343】

3H7クローンから産生される抗体の、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、およびFc γ RIIIAとの直接結合

20

3H7培養細胞株からのハイブリドーマ培養からの上清の、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIAおよびFc γ RIIBとの直接結合をELISAアッセイを用いて比較した(図4)。

【0344】

クローン3H7から産生した抗体はFc γ RIIIAに対する親和性がなく、かつFc γ RIIAと結合するより4倍大きい親和性でFc γ RIIBと結合する。

【0345】

2B6クローンから産生されるモノクローナル抗体の特徴付け

2B6クローンから産生される抗体の直接結合の、Fc γ RIIに対する他の3種の市販モノクローナル抗体との比較

30

クローン2B6から産生される抗体のFc γ RIIAおよびFc γ RIIBとの結合をFc γ RIIに対する3種の他の市販抗体、AT10、FL18.26、およびIV.3のそれと、ELISAアッセイで比較する。図5、パネルAに見られるように、クローン2B6から産生される抗体は、他の市販抗体より4.5倍高くFc γ RIIBと結合する。さらに、他の3種の市販抗体がFc γ RIIAと飽和しうる方法でクローン2B6からの抗体がFc γ RIIAと結合するより2倍大きい親和性で結合するにも関わらず、クローン2B6から産生される抗体は、Fc γ RIIAに対して最小の親和性しか有しない(図5、パネルB)。

【0346】

クローン2B6から産生される抗体による、Fc γ RIIBに対する凝集ヒトIgG結合のブロッキング

40

クローン2B6から産生される抗体の、Fc γ RIIBに対する凝集ヒトIgGの結合をブロックする能力を、ブロッキングELISAアッセイにより研究し、クローン3H7から産生される抗体のそれと比較した。図6Aに示すように、対照上清はIgG結合部位上のFc γ RIIBと結合せず、凝集IgGが受容体と結合できるので、従って650nmにおける吸収は最大である。しかし、クローン3H7はIgG結合を75%までブロックする。クローン2B6はIgG結合部位を完全にブロックし、凝集IgGは受容体と結合できないので、非常に高い希釈率ですら、650nmにおける吸収が検出されない。図6Bはバーチャートのデータを示す。

【0347】

二重染色FACSアッセイを用いる、2B6抗体と凝集IgGのFc γ RIIBとの結合における競合

二重染色FACSアッセイを用いて、クローン2B6から産生される抗体を、全長哺乳類動物Fc γ RIIBによりトランスフェクトしたCHO細胞において特徴付けた。

【0348】

図7、パネルCに示すように、CHO細胞において、細胞をモノクローナル抗体とともに

50

プレインキュベートした後に、ビオチン化凝集IgGに染色が観察されないので、クローン2B6から産生される抗体は、凝集IgGのFc γ RIIB受容体との結合を効果的にブロックする。細胞は下側右パネルでのみ染色され、ほとんどの細胞が2B6クローンからのモノクローナル抗体と結合したことを示す。IgG1をアイソタイプ対照として使う対照実験、パネルAにおいて、すなわち細胞を細胞アイソタイプ標識したIgGによって染色すると、モノマーIgGはFc γ RIIBと検出可能な親和性で結合しないので染色は観察されないが、パネルBにおいて、Fc γ RIIBと結合することができる凝集IgGによって、細胞の約60%は染色される。

【0349】

モノクローナル抗Fc γ RIIB抗体およびCD20共染色 (co-stain) ヒトBリンパ球

二重染色FACSアッセイを利用してヒトBリンパ球においてクローン2B6および3H7から産生される抗体を特徴付けした。細胞をBリンパ球集団を選択するためにFITCと複合した抗CD20抗体を用いて染色するだけでなく、さらにクローン3H7および2B6から産生される抗体をヤギ抗マウスペルオキシダーゼを用いて標識した。水平軸は抗CD20抗体蛍光の強度を表し、垂直軸はモノクローナル抗体蛍光の強度を表す。図8、パネルBおよびCに示すように、細胞を抗CD20抗体ならびにクローン3H7および2B6から産生された抗体について二重染色したが、クローン2B6から産生される抗体はクローン3H7から産生される抗体より強い染色を示した。パネルAはアイソタイプ対照、マウスIgG1の染色を示す。

【0350】

Fc γ RIIBを発現するCHO細胞の染色

安定してFc γ RIIBを発現するCHO細胞を、IgG1アイソタイプ対照 (図9A; 左パネル) を用いてまたは3H7ハイブリドーマ (図9B; 右パネル) からの上清を用いて染色した。ヤギ抗マウスペルオキシダーゼ複合抗体を二次抗体として利用した。次いで細胞をFACSにより分析した; 3H7ハイブリドーマからの上清を用いて染色した細胞は、強い蛍光シグナルおよび右へのピークシフトが見られ、3H7ハイブリドーマから産生された上清によるCHO細胞中のFc γ RIIBの検出を示す。2B6ハイブリドーマから産生された上清を用いて染色した細胞もまた、IgG1を用いて染色した細胞と比較して、有意な蛍光および右へのピークシフトが見られ、2B6ハイブリドーマから産生された上清によるCHO細胞中のFc γ RIIBの検出を示す。

【0351】

2B6による β -ヘキソサミニダーゼ放出の抑制

ヒトFc γ RIIBを発現するトランスフェクタントをマウスIgEを用いて感作し、ポリクローナルヤギ抗マウスIgGのF(ab')₂フラグメントを用いてチャレンジしてFc ϵ RIを凝集させた。ポリクローナル抗体はFc ϵ RIと結合したマウスIgE抗体の軽鎖を認識するので架橋が起こる。この実験を図10Aに図解する。マウスIgEを用いて感作しかつ2B6抗体を用いてプレインキュベートしたトランスフェクタントもポリクローナルヤギ抗マウスIgGのF(ab')₂フラグメントを用いてチャレンジしてFc ϵ RIをFc γ RIIBと架橋させた。図10Bに示すように、2B6抗体およびIgEを用いてプレインキュベートした細胞を、ヤギ抗マウスF(ab')₂を用いてチャレンジすると、低い量の β -ヘキソサミニダーゼ放出が観察された。図10Bに見られるように、2B6抗体は抑制受容体活性をブロックしない。むしろFc ϵ RIとの架橋は抑制経路を活性化し、 β -ヘキソサミニダーゼ放出の有意な減少をもたらす。これらのデータはまた、ヒトFc γ RIIB抑制受容体はラット好塩基球において効果的にシグナル伝達しうること示す。

【0352】

in vitro ADCCアッセイ

IGROV-1、OVCAR-8、およびSKBR-3細胞がHer2neu抗原を発現するかどうかを確認するために、細胞を、精製4D5またはch4D5抗体を用いて氷上で染色し; 無結合の抗体をナトリウムアジドを含有するPBS/BSAバッファーを用いて洗浄除去し、そして4D5またはch4D5の結合を、PEと複合したヤギ抗マウスまたはヤギ抗ヒト抗体 (Jackson Laboratories) によりそれぞれ検出した。無関係なIgG1抗体 (Becton Dickinson) を非特異的結合に対する対照として使った。図11に示すように、卵巣腫瘍培養細胞株は乳癌培養細胞株より低いHer2/n

10

20

30

40

50

eu抗原を発現し、これらの培養細胞株を平行して評価することにより、本発明の抗体、Fc γ RIIB抗体による腫瘍クリアランスのストリンジェンシーを決定しうる。

【0353】

ヒト単球は活性化と抑制受容体の両方を発現するADCCに関わるエフェクター集団である。Fc γ Rの発現を、FACS分析により複数ロットの凍結単球を用いて試験した（これらの細胞は腫瘍クリアランスにおけるch2B6の役割を研究するためのエフェクターとして養子移入しうる）。市販の洗い分けられ凍結された単球を10%ヒトAB血清を含有する基本培地中、およびヒト血清および25~50ng/ml GM-CSFを含む基本培地中で解凍した。細胞を、IV.3-FITC（抗huFc γ RIIA）、32.2-FITC（抗Fc γ RI）、CD16-PE（Pharmingen）または3G8（抗Fc γ RIII）-ヤギ抗マウスPE、3H7（抗Fc γ RIIB）、および単球用のCD14マーカー（PHARMINGEN）を用いて、関係するアイソタイプ対照とともに、直接染色するか、またはマクロファージに7~8日間成熟させ（MDM）、プラスチックへ移しとった後に染色した。新しく解凍した単球と培養単球を表す2人のドナーからのMDMの代表的なFACSプロファイルを、図12に示す。これらの結果は、Fc γ RIIBが単球（ドナーに依って5~30%）中に軽度

10

に発現されることを示す。しかし、この発現は、マクロファージに成熟するにつれて増加する。予備的データは、ヒト腫瘍標本中の腫瘍浸潤マクロファージはFc γ RIIBに対して陽性に染色されることを示す。Fc γ Rのパターンおよび形態学的にマクロファージに分化する能力は、凍結単球の複数ロットで再現性のあることが見出された。これらのデータは、この細胞供給源が養子移入実験用に十分であることを示す。

【0354】

20

ch4D5はPBMCを用いて卵巣および乳癌培養細胞株に有効なADCCを媒介する

抗Her2/neu抗体のADCC活性をユウロピウムに基づくアッセイで試験した。卵巣培養細胞株、IGROV-1、および乳癌培養細胞株、SKBR-3を、ヒトPBLをエフェクター細胞とする4時間アッセイにおける標識した標的として用いた。図13は、ch4D5がHer2neuを発現する標的の溶解を媒介する機能的活性を有することを示す。本発明の抗体の、抗Her2/neu抗体のADCC活性に対する効果を続いて測定する。

【0355】

ヒト腫瘍培養細胞株を用いる異種移植マウスモデルにおけるFc γ RIIB抗体のin vivo活性

6~8週齢雌性Balb/cヌードマウス（Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME; Taconic）を用いて異種移植卵巣および乳癌モデルを確立した。マウスはBIOCON, Inc. Rockville, Maryland（添付プロトコルを参照）で維持する。マウスを異種移植モデル用のバイオセーフティレベル-2施設で、腹水-由来卵巣細胞および胸膜浸出液由来乳癌細胞を腫瘍供給源として用いて飼育する。マウスをこれらの実験のために4グループに配置し、毎週3回モニターする。マウスの重量と生存時間を記録し、そして腫瘍を増殖するための判定基準は腹部膨張および明白な腫瘍とする。明らかな不快または腫瘍が5グラムに達する徴候を示すマウスを二酸化炭素を用いて安楽死させ剖検に付した。抗体で処理した動物は、対照グループの後、さらに2ヶ月間観察下に置く。

30

【0356】

腫瘍培養細胞株による異種移植腫瘍モデルの確立

異種移植腫瘍モデルを確立するため、 5×10^6 個の生IGROV-1またはSKBR-3細胞を3年齢かつ相応の体重をもつ雌性ヌード胸腺欠損マウスにマトリゲル（Matrigel）（Becton Dickinson）とともに皮下注射する。腫瘍の推定重量を、式：長さx（巾）²/2により計算して3グラムを超えないようにする。拡大のための細胞のin vivo継代については、足場に依存する腫瘍を単離し、その細胞を、コラゲナーゼ（Sigma）を好ましくは腫瘍1グラム当たり1 μ g加えることにより、37℃にて一夜で解離させる。

40

【0357】

IGROV-1細胞の皮下注射は増殖の速い腫瘍を生じる一方、腹腔内経路はマウスを2ヶ月で死亡させる腹膜癌腫症を誘導する。IGROV-1細胞は5週以内に腫瘍を形成するので、腫瘍細胞注射後の第1日にエフェクターとしての単球を、治療抗体ch4D5および2B6とともに、腹腔内にマウス体重（mbw）1グラム当たりそれぞれ4 μ gにて同時注射する（表8）。最初

50

の注射の後、抗体の注射を毎週、その後は4～6週間行う。ヒトエフェクター細胞を2週に1回補充する。マウスの1グループは治療抗体を受給しないが、それぞれ抗腫瘍およびch2B6抗体に対するアイソタイプ対照抗体としてch4D5 N297AおよびヒトIgG1を注射しうる。

【表 8】

ADCCエフェクターとして養子移入されたヒト単球をもつヌードマウスの異種移植腫瘍モデルにおける、抗Her2neu抗体、ch4D5およびch2B6、抗Fc γ RIIB抗体による腫瘍クリアランス研究の概要。MWB（マウス体重）。

8マウス/グループ	腫瘍細胞 皮下第0日	単球 腹腔内第1日	ch4D5 4 μ g/g体重 第1日腹腔内	ch4D5 N297A 4 μ g/g体重 第1日腹腔内	ch2B6 N297A 4 μ g/g体重 第1日腹腔内	ヒト IgG1 4 μ g/g体重 第1日腹腔内
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

【0358】

表8に示されるように、1標的とエフェクター組み合わせ、2つの異なる組み合わせの抗体濃度による腫瘍クリアランスにおける抗Fc γ RIIB抗体の役割を試験するために、6グループの48マウスをそれぞれ必要とする。これらのグループは、A) 腫瘍細胞、B) 腫瘍細胞および単球、C) 腫瘍細胞、単球、抗腫瘍抗体、ch4D5、D) 腫瘍細胞、単球、抗腫瘍抗体ch4D5、および抗Fc γ RIIB抗体、例えば、ch2B6、E) 腫瘍細胞、単球、および抗Fc γ RIIB抗体、例えば、ch2B6、およびF) 腫瘍細胞、単球、ch4D5 N297A、およびヒトIgG1である。様々な抗体濃度の組み合わせを類似のスキームで試験することができる。

【0359】

乳癌培養細胞株、SKBR-3を用いる研究を、SKBR-3細胞過剰発現Her2neuとしてのIGROV-1モデルと平行して実施する。これは腫瘍クリアランスにおける抗Fc γ RIIB抗体の役割の評価のストリンジェンシーを増加しうる。IGROV-1細胞を用いる腫瘍クリアランス研究の成果に基づいて、他の標的による将来の実験の実験設計に改変を加える。

【0360】

異種移植腫瘍モデルの終点は、表xxにおける各グループに対する腫瘍のサイズ（マウス体重）、生存時間、および組織学報告に基づいて決定する。マウスを週3回モニターし；増殖腫瘍の判定基準は腹部膨張、腹腔の明白なマスの存在である。腫瘍重量-対-接種後日数の推定を計算する表8のグループDマウス-対-他のグループのマウスからの3つの判定基準に基づいて、腫瘍クリアランスの増強における抗Fc γ RIIB抗体の役割を規定しうる。明らかな痛みのまたは5グラムの腫瘍重量に達する徴候を示すマウスを二酸化炭素を用いて安楽死させ、剖検に付する。抗体で処理した動物はこの時点の後、2ヶ月間観察する。

【0361】

ヒト一次卵巣および乳癌由来の細胞による異種移植マウスモデルにおけるFc γ RIIB抗体のin vivo活性

癌腫症の患者由来の浸出液から単離した腫瘍細胞を移入することにより、一次卵巣および乳癌から一次腫瘍を確立する。これらの研究を臨床に翻訳するために、異種移植モデル

を2人の卵巣患者および2人の乳癌患者からの腹水-および胸膜浸出液由来の腫瘍細胞を用いてそれぞれ評価する。乳癌細胞の供給源としての胸膜浸出液、および悪性乳組織の移植を用いて異種移植マウスモデルが成功裏に確立されている；例えば、Sakakibaraら, 1996, Cancer J. SCI. AM. 2:291を参照、これは参照により本明細書にその全文が組み入れられる。これらの研究は初代細胞の腫瘍クリアランスにおける抗FcγRIIB抗体の広範囲の応用を確認しうる。腫瘍クリアランスを、抗腫瘍抗体ch4D5および抗FcγRIIB抗体、例えばch2B6を用いて、ヒト単球を養子移入されたBalb/cヌードマウスモデルにおいて試験する。

【0362】

ヒト腹水および胸膜浸出液由来の一次腫瘍細胞

10

卵巣癌の患者からの腹水および乳癌患者から胸膜浸出液は、St. Agnes Cancer Center, Baltimore, Marylandにより供給される。患者からの腹水および胸膜浸出液は40-50%腫瘍細胞を含有して、高発現のHer2neu+腫瘍細胞をもつサンプルを用いて異種移植モデルを確立しうる。

【0363】

異種移植腫瘍モデルを確立する前に、腹水および胸膜浸出液サンプルを新生物細胞上のHer2/neuの発現について試験する。腫瘍モデルの確立に影響を与えうる新生物細胞-対-他細胞サブセットのパーセントを確認しうる。卵巣および乳癌の患者からの腹水および胸膜浸出液をそれぞれ日常的に分析して新生物細胞上のHer2/neu+の発現レベルを確認する。FACS分析を用いて臨床サンプル中のHer2/neu+新生物細胞のパーセントを確認する。高パーセントのHer2/neu+新生物細胞をもつサンプルを選択してBalb/cマウスにおける腫瘍の惹起に使う。

20

【0364】

組織化学と免疫化学

組織化学と免疫組織化学を卵巣癌の患者の腹水および胸膜浸出液について実施し、新生物の構造的特性を分析する。モニターするマーカーは、サイトケラチン（炎症性および間葉細胞からの卵巣新生物および中皮細胞を同定するため）；カルレチニン（Her2/neu陽性新生物細胞からの中皮を分離するため）；およびCD45（サンプル中の細胞集団の残部から炎症性細胞を分離するため）である。以下のさらなるマーカーはCD3（T細胞）、CD20（B細胞）、CD56（NK細胞）、およびCD14（単球）を含みうる。

30

【0365】

免疫組織化学染色用に、凍結セクションおよびパラフィン固定組織を標準技術により調製する。凍結ならびに脱パラフィンしたセクションを同様の染色プロトコルで染色する。スライドを3%過酸化水素中に漬けて組織の内在性ペルオキシダーゼをクエンチし、PBSによって5分間洗浄する。セクションをブロックし、一次抗体ch4D5を加えて血清を30分間ブロックした後にサンプルをPBSにより3回洗浄する。ビオチンと複合した二次抗ヒト抗体を加えて30分後にスライドをPBS中で5分間洗浄する。アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体（Vector Labs）を加えて30分後に洗浄する。スライドを新鮮な基質DAB溶液中でインキュベートすることにより発色し、その反応を水道水で洗浄することにより停止する。H&E染色のために、スライドを脱パラフィンし、次いで色々なアルコール濃度で水和する。スライドを水道水で洗浄し、ヘマトキシリン中に5分間置く。過剰の染色を酸-アルコール、続いてアンモニア、および水を用いて除去する。スライドをエオシン中に置き、続いて90~100%アルコールより洗浄して脱水する。最後に、スライドをキシレン中に置き、固定液を用いてマウントして長期保存する。全ての場合に、腫瘍細胞のパーセントをパパニコラ（Papanicolaou）染色により決定する。

40

【0366】

組織化学染色

2人の異なる卵巣癌患者からの腹水をヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）およびギムザにより染色して、腫瘍細胞および他の細胞型の存在を分析した。組織化学染色の結果を図14に示す。

50

【0367】

マウスモデル

卵巣癌患者からのサンプルを、腹水を6370gにて、20分間、4℃で遠心沈降により処理し、赤血球を溶解した後、細胞をPBSにより洗浄した。各サンプル中のHer2neu+腫瘍細胞のパーセントに基づいて中度および高度に発現する2サンプルを選択し、皮下接種して異種移植モデルを確立し、腫瘍のクリアランスにおける抗FcγRIIB抗体の役割を評価した。

【0368】

腫瘍細胞は無処理の腹水の細胞サブセットの40~50%を構成し、精製後にほぼ $10\sim 50\times 10^6$ の腫瘍細胞が腹水2リットルから得られたと報じられている（Barkerら, 2001, Gynecol. Oncol. 82:57-63）。単離された腹水細胞をマウス中に腹腔内注射して細胞を拡大する。10
ほぼ10マウスを腹腔内注射し、そしてそれぞれのマウス腹水をさらに2マウス中にそれぞれ継代して全20マウスから腹水を得て、これを用いて80マウスのグループを注射する。胸膜浸出液を腹水と同様な方法で扱い、Her2neu+腫瘍細胞を上部右および左乳パッドのマトリゲル（matrigel）に注射する。腫瘍細胞の皮下注射後、マウスを臨床および解剖学的変化を試験する。必要であれば、マウスを剖検して全腫瘍負荷と特定器官局在化との相関を調べる。

【図面の簡単な説明】

【0369】

【図1A】3H7クローンから産生した抗体のFcγRIIBおよびFcγRIIAとの直接結合を示す。いくつかのハイブリドーマ培養から得た抗体のFcγRIIとの直接結合を、市販抗FcγRII抗体のそれと、プレートに該受容体によりコーティングしたELISAアッセイで比較した。20
色々な希釈（1:10）の上清をプレート上でインキュベートした。結合した抗体は、ヤギ抗マウスHRP複合抗体を用いて検出し、その吸収を650nmでモニターした。

【図1B】3H7クローンから産生した抗体のFcγRIIBおよびFcγRIIAとの直接結合を示す。3H7ハイブリドーマ培養から得た抗体（図1Aの上清n.7）のFcγRIIAおよびFcγRIIBとの直接結合を、粗製型（左パネル）および精製型（右パネル）で、図1Aと同じELISAアッセイを用いて比較した。

【図2】3H7ハイブリドーマから産生した抗体と凝集ビオチン化ヒトIgGのFcγRIIBに対する結合の競合を示す。FcγRIIBとの結合に対して、3H7抗体の凝集ビオチン化ヒトIgGと競合する能力をブロッキングELISA実験を用いて測定した。FcγRIIBによりコーティングしたELISAプレートを3H70抗体を含有する上清および同じハイブリドーマ細胞由来であるが抗体を含有しない上清（ネガティブ対照）とともにインキュベートした。200ng/wellから開始して、次いで色々な希釈（1:3）の凝集ビオチン化ヒトIgGをプレートに加え、そして結合した凝集物を複合したストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼを用いて検出し、反応物をTMBにより現像して吸収を650nmでモニターした。30

【図3】3H7抗体の、細菌系または哺乳類動物系で産生したFcγRIIBとの直接結合の比較を示す。3H7抗体のFcγRIIBとの直接結合はELISAアッセイを用いて測定した。細菌または哺乳類動物が産生したFcγRIIBとの結合を比較した。抗体滴定は直接の上清から開始して、その後1:10で希釈を続けた。結合した抗体をヤギ抗マウスHRP複合抗体を用いて検出し、反応物をTMBにより現像し、そしてその吸収を650nmでモニターした。40

【図4】3H7抗体のFcγRIIA、FcγRIIBおよびFcγRIIIAとの直接結合を示す。精製3H7抗体の、哺乳類動物系に発現されたFcγRIIA、FcγRIIBおよびFcγRIIIAとの直接結合を、ELISAアッセイを用いて比較した。ELISAプレートを3種の受容体（100ng/ウエル）を用いてコーティングした。精製3H7抗体の色々な希釈液をコーティングしたプレート上でインキュベートした。ヤギ抗マウスHRP複合抗体を、結合した特異的抗体の検出に使用し、反応物をTMBにより現像して吸収を650nmにてモニターした。

【図5】クローン2B6由来の精製した抗体のFcγRIIAおよびFcγRIIBとの直接結合能力の比較を、3種のFcγRIIに対する市販モノクローナル抗体と比較して示す。2B6抗体のFcγRIIA（上右パネル）およびFcγRIIB（上左パネル）との結合を、3種のFcγRIIに対する他の市販抗体と比較した。使用したELISAフォーマットは図4に記載したものと同一であ 50

る。

【図6】クローン2B6から産生した抗体と凝集ビオチン化ヒトIgGのFc γ RIIBに対する結合の競合を示す。パネルA：Fc γ RIIBとの結合について、クローン2B6由来の上清中に存在する抗体の凝集ビオチン化ヒトIgGと競合する能力を、ブロッキングELISA実験を用いて測定した。2B6抗体競合能力を、ハイブリドーマからのネガティブ上清のそれとおよび3H7抗体のそれと比較した。Fc γ RIIBを用いてコーティングしたELISAプレートを経験希釈（1:10）の上清とともにインキュベートした。洗浄後、プレートを固定した量の凝集ビオチン化ヒトIgG（1mg/ウェル）とともにインキュベートし、結合した凝集物を複合したstreptavidin-HRPを用いて検出した。反応物をTMBにより現像して吸収を650nmでモニターした。パネルB：パネルAに記載したのと同じブロッキングELISAを、精製2B6抗体を用いて実施し、使用したブロッキング抗体の或る濃度（4mg/ウェル）から得たデータをバーチャートで表現した。Fc γ RIIBに対する凝集ヒトIgG結合をブロックする2B6能力をマウスIgG1アイソタイプ対照と比較した。

10

【図7】二重染色FACSアッセイを用いて確認した、Fc γ RIIBに対する結合における2B6抗体と凝集ビオチン化ヒトIgGの競合。二重染色FACSアッセイを実施し、全長哺乳類動物Fc γ RIIBにより安定してトランスフェクトしておいたCHO-K1細胞を用いて2B6抗体を特徴付けた。パネルA：トランスフェクタント細胞をマウスIgG1アイソタイプ対照を用いて染色し、次いでヤギ抗マウスFITC複合抗体およびstreptavidin-PEを用いて処理した。パネルB：トランスフェクタント細胞をマウスIgG1アイソタイプ対照を用いて染色した後に凝集ビオチン化ヒトIgGを用いて染色し、そしてヤギ抗マウスFITC複合抗体を用いて標識して結合したモノクローナル抗体を検出しかつ複合したstreptavidin-PEを用いて標識して結合した凝集物を検出した。パネルC：細胞を2B6抗体を用いて染色し、抗体を洗浄により除去し、そして細胞を凝集ビオチン化ヒトIgGとともにインキュベートした。細胞を洗浄し、そしてヤギ抗マウスFITC複合抗体を用いて標識して結合したモノクローナル抗体を検出しかつ複合したstreptavidin-PEを用いて標識して結合した凝集物を検出した。

20

【図8】ヒトBリンパ球のモノクローナル抗Fc γ RIIB抗体およびCD20同時染色を示す。ヒト血液から得た細胞（バツフィーコート）を抗CD20-FITC複合抗体（Bリンパ球集団を選択するために）ならびに3H7および2B6を用いて染色した。結合した抗Fc γ RIIB抗体をヤギ抗マウスPE複合抗体により検出した。A：細胞を抗CD20-FITC抗体およびマウスIgG1アイソタイプ対照を用いて同時染色した。B：細胞を抗CD20-FITC抗体および3H7抗体を用いて同時染色した。C：細胞を抗CD20-FITC抗体および2B6抗体を用いて同時染色した。

30

【図9A】Fc γ RIIBを発現するCHO細胞の染色を示す。CHO/II B細胞をマウスIgG1アイソタイプ対照（左パネル）および3H7抗体（右パネル）を用いて染色した。細胞に結合した抗体をヤギ抗マウスPE複合抗体を用いて標識した。

【図9B】Fc γ RIIBを発現するCHO細胞の染色を示す。CHO/II B細胞をマウスIgG1アイソタイプ対照（左パネル）および2B6抗体（右パネル）を用いて染色した。細胞に結合した抗体をヤギ抗マウスPE複合抗体を用いて標識した。

【図10】 β -ヘキソサミニダーゼ放出アッセイを示す。A： β -ヘキソサミニダーゼ放出アッセイの図解。ヒトFc γ RIIBを発現するトランスフェクタントをマウスIgEを用いて感作し、ポリクローナルヤギ抗マウスIgGのF(ab')₂フラグメントによりチャレンジしてFc ϵ RIと凝集させた。ポリクローナル抗体はFc ϵ RIと結合したマウスIgE抗体の軽鎖を認識する能力があるので架橋が起こる。マウスIgEを用いて感作しかつ2B6抗体とともにプレインキュベートしたトランスフェクタントもポリクローナルヤギ抗マウスIgGのF(ab')₂フラグメントによりチャレンジしてFc ϵ RIをFc γ RIIBと架橋させた。B：ヒトFc γ RIIBを発現するRBL-2H3細胞においてヤギ抗マウスF(ab)₂により誘導される β -ヘキソアミニダーゼ放出。放出 β -ヘキソサミニダーゼ活性は全活性と比較した放出活性パーセントとして表現した。

40

【図11】卵巣および乳癌培養細胞株はHer2/neuを様々なレベルで発現することを示す。A)精製ch4D5による卵巣IGROV-1の染色、B)精製4D5抗体による卵巣OVCAR-8の染色、および

50

C)精製ch4D5による乳癌SKBR-3細胞の染色後に、フィコエリトリン (PE) と複合したヤギ抗ヒト抗体を用いて処理した。関連アイソタイプ対照IgG1を抗Her2neu抗体による染色の左に示される。

【図1 2】溶出した単球は全てのFc γ Rを発現することを示す。A. ドナー1から得たMDM。B. ドナー2から得たMDM、ヒト血清またはヒト血清およびGM-CSF中で拡大した。C. 解凍して直ぐ染色した単球。単球から誘導されたマクロファージをヒトFc γ R受容体に特異的な抗体を用いて染色した。それぞれのプロットにおける黒色のヒストグラムはバックグラウンド染色を示す。各パネル中の白色のヒストグラムは特異的抗ヒトFc γ R抗体を用いた染色を示す。

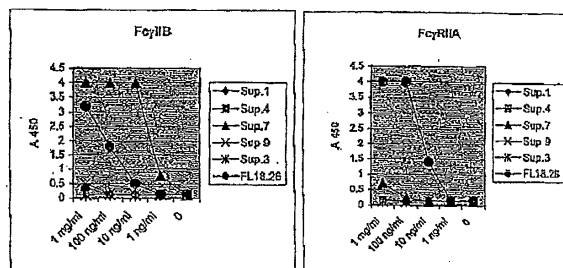
【図1 3】ch4D5は、PBMCを用いて卵巣および乳癌培養細胞株に有効なADCCを媒介する。抗体依存性溶解から差引いた特異的溶解を、A)卵巣腫瘍培養細胞株、IGROV-1 (エフェクター：標的比75:1にて) およびB)乳腫瘍培養細胞株、SKBR-3 (エフェクター：標的比50:1にて) について、表示した色々な濃度のch4D5を用いて示した。

【図1 4】ヒト卵巣腹水の組織化学的染色は腫瘍細胞および他の炎症性細胞を示す。A)卵巣腫瘍を患う患者の腹水のH&E染色。3つの新生物細胞を、不規則なサイズと形状、分散した細胞質、および不規則な濃度の核により同定することができる。B)卵巣の重症腫瘍を患う患者からの無処理腹水のギムザ染色は、短い矢印により示した2つの背中合わせに位置した中皮細胞を示す。また、長い矢印で示した5つの悪性上皮細胞のクラスターも示されている。赤血球がバックグラウンドに見られる。C)卵巣重症腫瘍の他の患者のギムザ染色は中皮細胞、リンパ球、および上皮新生物細胞 (矢印) から成る細胞のクラスターを示す。

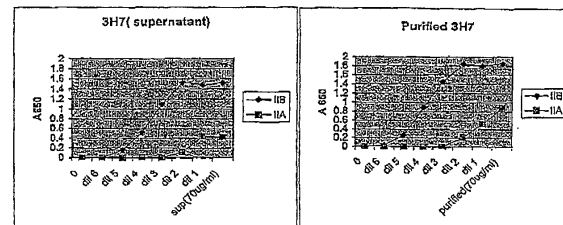
【図1 5】Ch4D5は、PBMCを用いる卵巣および乳癌培養細胞株による効果的なADCCを媒介する。

【図1 6】ヒト卵巣腹水の組織化学的染色は腫瘍細胞と他の炎症性細胞を示す。

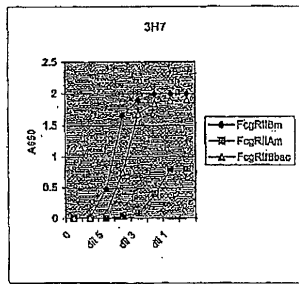
【図1 A】



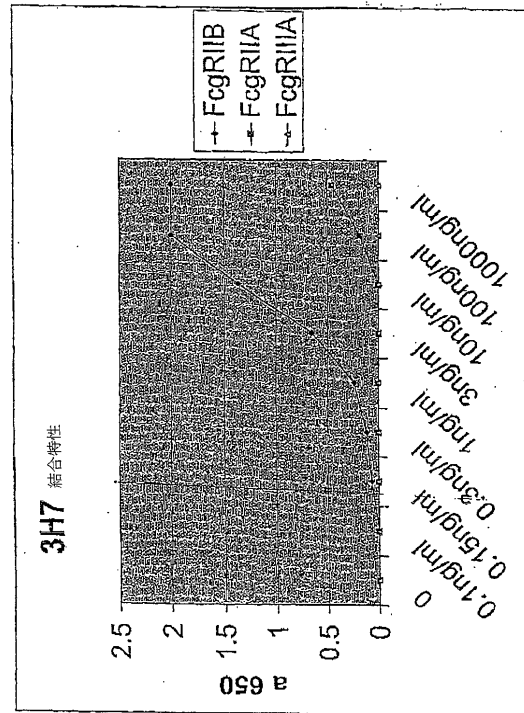
【図1 B】



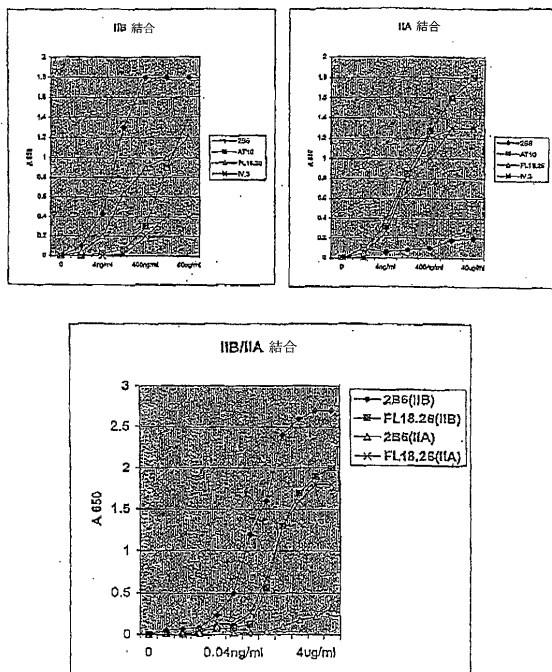
【図 3】



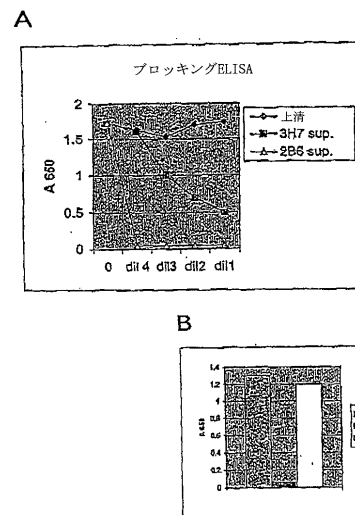
【図 4】



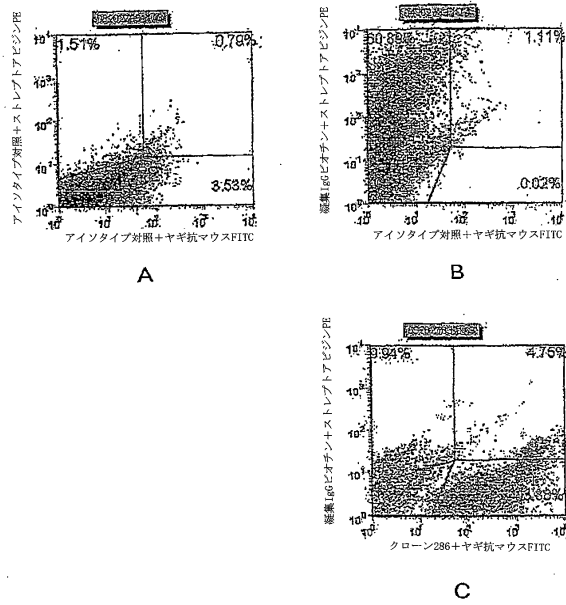
【図 5】



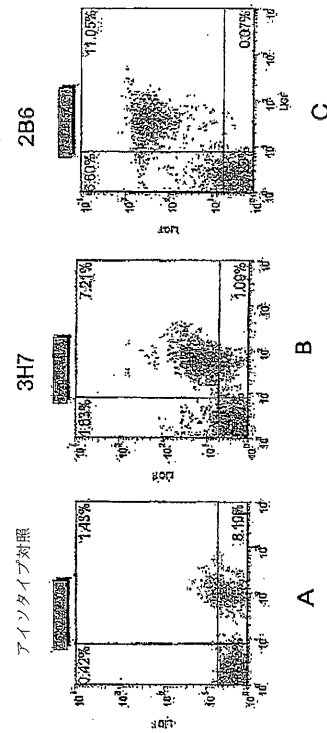
【図 6】



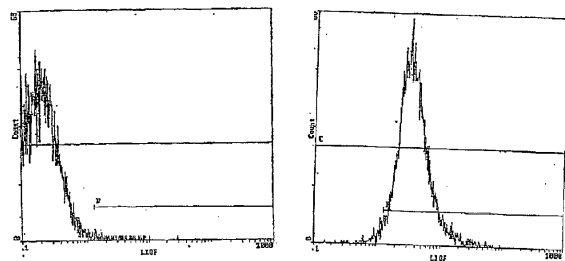
【図 7】



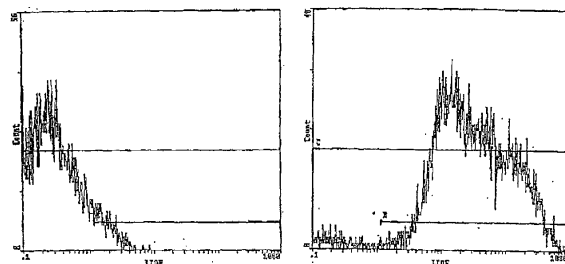
【図 8】



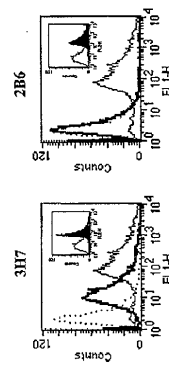
【図 9 A】



【図 9 B】

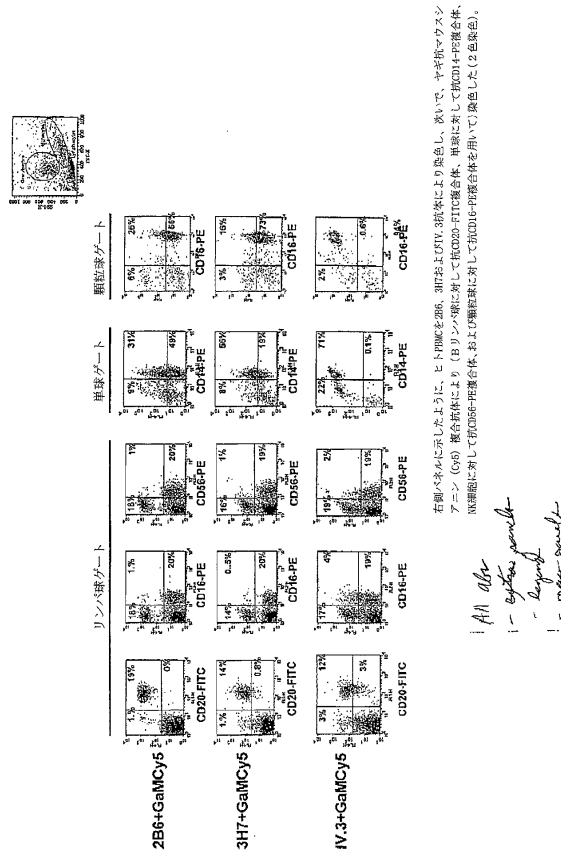


【図 10】

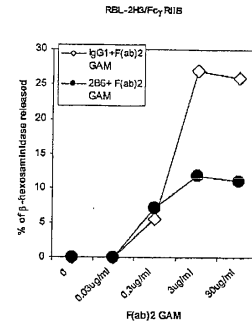


hufcy RITBを形成するCHS細胞を、抗CD28抗体、2B6または3H7とともにインキュベートした。細胞を洗浄し、9 μ g/mlのヒトIgGを細胞に水上で加えた。ヒト細胞IgGをヤギ抗マウスFITC複合体を用いて検出した。サンプルをFACSにより分析した。点線：アイソタイプ対照+ヤギ抗hufcyRITC、細い実線：アイソタイプ対照+ヒトIgG+ヤギ抗hufcyRITC、太い実線：抗CD28抗体+ヒトIgG+ヤギ抗hufcyRITC。細胞上の受容体と結合したそれぞれの抗体の最も、サンプルの別のセット上で、ヤギ抗マウス抗複合体を用いて検出した (挿入図)。

【図 1 1】



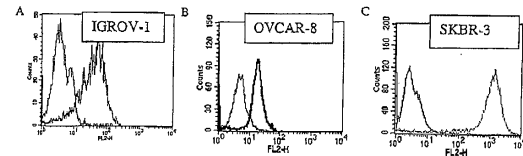
【図 1 2】



huFcγRIIBを発現するRBL-2H3細胞において、ヤギ抗マウスF(ab)₂フラグメント (GAM F(ab)₂) により誘導されるβ-ヘキソサミニダーゼ放出。細胞を、マウスIgE (0.01 μg/ml) およびIgG1を用いてまたは精製2B6抗体 (3 μg/ml) パネルを用いて感作した後に、様々な濃度 (0.03 μg/ml ~ 30 μg/ml) のGAM F(ab)₂により刺激した。37℃で1時間後、上清を回収し、細胞を溶解した。上清中における細胞内に放出されたβ-ヘキソサミニダーゼ活性をp-アセチル-β-D-グルコサミドを用いる比色アッセイにより測定した。放出されたβ-ヘキソサミニダーゼ活性を、全活性と比較して放出された活性のパーセントとして表現した。

【図 1 3】

卵巣および乳癌培養細胞株の細胞表面上のHer2neuの発現



図#4 卵巣および乳癌培養細胞株はHer2neuを様々なレベルで発現する。染色は、A) 卵巣IGROV-1は精製ch4D5により、B) 卵巣OVCAR-8は精製4D5抗体により、そしてC) 乳癌SKBR-3細胞は精製ch4D5により、次いでフィコトリリン (PE) と複合したヤギ抗ヒトによる。関連アインタイプ対照IgG1を、抗Her2neu抗体についての染色の左に示す。

【図 1 4】

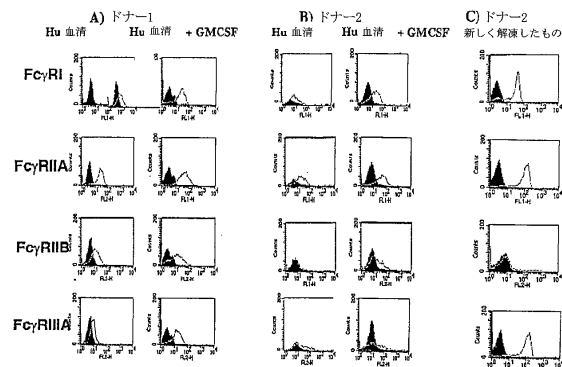
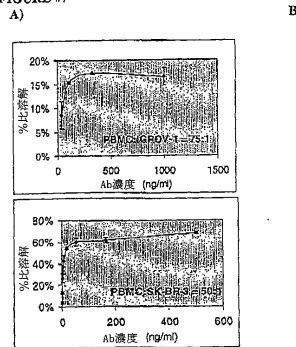


図 6 : 洗い分けられた単球は全てのFcγRを発現する。A) ドナー 1 から取得したMEM, B) ドナー 2 をヒト血清またはヒト血清およびGM-CSF中で拡大した。C) 単球を解凍して直接染色した。単球誘導マクロファージをヒトFcγR受容体に特異的な抗体を用いて染色した (セクションC.4)。それぞれのプロットの黒塗りヒストグラムはバックグラウンド染色を表す。それぞれのパネル内の白抜きヒストグラムは特異的抗ヒトFcγR抗体についての染色を表す。

【図 1 5】

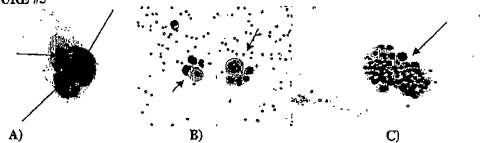
FIGURE #7



図#7 Ch4D5は、PMMCを用いる卵巣および乳癌培養細胞株による効果的なADCCを媒介する抗体依存性溶解から差引いた比溶解を示す。A) 卵巣腫瘍培養細胞株、IGROV-1 (エフェクター: 標的比=75; 1) B) 乳癌培養細胞株SKBR-3 (エフェクター: 標的比=50:1)、図に示した色々の濃度のch4D5を用いた。

【図 1 6】

FIGURE #5



図#5 ヒト卵巣腫瘍の組織化学的染色は腫瘍細胞と他の炎症性細胞を示す。A) 卵巣癌の患者の腫瘍のH&E染色。3つの新生物細胞を、不規則なサイズと形状、散在した細胞質、および不規則な高密度核により同定することができる。B) 重篤な卵巣癌の患者から得た無処理腫瘍のギムザ染色は、短い矢印により示した背を向かい合わせた2つの上皮細胞を示す。また長い矢印により示した5つの悪性上皮細胞のクラスターが示されている。赤血球がバックグラウンドに見られる。C) 重篤な卵巣癌の他の患者のギムザ染色は、上皮細胞、リンパ球、および上皮新生物細胞 (矢印) から成る細胞クラスターを示す。

【配列表】

0004459810000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 0 7 K 16/46	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
		C 1 2 P 21/08	
		G 0 1 N 33/53	D

- (72)発明者 ケーニツヒ, スコット
 アメリカ合衆国 2 0 8 5 2 メリーランド州, ロックヴィル, ラルストン ロード 1 0 9 0 1
- (72)発明者 ヴェリ, マリアーコンセッタ
 アメリカ合衆国 2 0 8 5 5 メリーランド州, ダーウッド, グッドフェロー ウェイ 7 7 1 5

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 Hybridoma,1996,15(2),p.109-16
 J.Immunol.,1990,144(6),p.2295-303

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C07K 16/28
 BIOSIS/MEDLINE/CapIus(STN)
 PubMed
 WPI

专利名称(译)	FcγRIIB特异性抗体及其应用		
公开(公告)号	JP4459810B2	公开(公告)日	2010-04-28
申请号	JP2004529382	申请日	2003-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	宏观基因有限公司		
申请(专利权)人(译)	宏杰弗里·尼克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	宏杰弗里·尼克斯公司		
[标]发明人	ケーニツヒスコット ヴェリマリアコンセッタ		
发明人	ケーニツヒ,スコット ヴェリ,マリア-コンセッタ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P1/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 C07K16/32 C07K16/42		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 C07K16/283 C07K16/2896 C07K16/32 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/732		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.N A61K39/395.T A61P1/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/00.C C12P21/08 G01N33/53.D		
优先权	60/403266 2002-08-14 US		
其他公开文献	JP2006506977A JP2006506977A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及特异性结合FcγRIIB，特别是人Fc13RIB的抗体或其片段，其亲和力大于所述抗体或其片段与Fc3RIIA，特别是人FcγRIIA的结合。本发明提供了通过施用本发明的抗体来增强治疗性抗体的效应功能来增强治疗性抗体的治疗效果的方法。本发明还提供了通过施用本发明的抗体来增强疫苗组合物功效的方法。

受容体	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
結合	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2x10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2x10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2x10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 5x10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 10 ¹⁰ M ⁻¹	IgG1, IgA2 10 ⁹ M ⁻¹
細胞型	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞	マクロファージ 好中球 好酸球 樹状細胞 血小板 ランゲルハンス細胞	マクロファージ 好中球 好酸球	B細胞 肥満細胞	NK細胞 好酸球 マクロファージ 好中球 肥満細胞	肥満細胞 好酸球 好塩基球	マクロファージ 好中球 好酸球
ライゲーションの効果	取込み 刺激 死滅の呼吸バースト誘導の活性化	取込み 顆粒放出	取込み 刺激の抑制	取込みなし 刺激の抑制	死滅の誘導	顆粒の分泌	取込み 死滅の誘導