

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5054385号  
(P5054385)

(45) 発行日 平成24年10月24日(2012.10.24)

(24) 登録日 平成24年8月3日(2012.8.3)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/28 Z N A
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 V
<b>A61P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 Y
<b>A61P 17/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00

請求項の数 19 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-554260 (P2006-554260)	(73) 特許権者	502352519 ダイアックス、コープ DYAX CORP. アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、テクノロジー、スクエア、300
(86) (22) 出願日	平成17年2月22日(2005.2.22)		
(65) 公表番号	特表2008-506631 (P2008-506631A)	(73) 特許権者	503404073 ザ シービーアール インスティテュート フォー バイオメディカル リサーチ、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02115、ボストン、ハンチントン アベニュー 800
(43) 公表日	平成20年3月6日(2008.3.6)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/005361	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02005/079515		
(87) 国際公開日	平成17年9月1日(2005.9.1)		
審査請求日	平成20年1月24日(2008.1.24)		
(31) 優先権主張番号	60/546,354		
(32) 優先日	平成16年2月19日(2004.2.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 立体配座特異的抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫グロブリン重鎖(HC)可変ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖(LC)可変ドメインを含む抗体であって、HC可変ドメインとLC可変ドメインは、活性型立体配座のLFA-1と結合する抗原結合部位を形成しており、活性型LFA-1と結合するための次の性質の1以上を有することを特徴とする上記抗体：

(i) 重鎖可変ドメインが、

(a) RYVMW (配列番号1)からなるアミノ酸配列を含むCDR1；

(b) YIWPSGGNTYYADSVKG (配列番号2)からなるアミノ酸配列を含むCDR2；および

(c) SYDFWSNAFDI (配列番号3)からなるアミノ酸配列を含むCDR3

を含み、かつ

軽鎖可変ドメインが、

(d) RASQSIGSYLN (配列番号7)からなるアミノ酸配列を含むCDR1；

(e) AASSLQS (配列番号8)からなるアミノ酸配列を含むCDR2；および

(f) QQSYSTPS (配列番号9)からなるアミノ酸配列を含むCDR3

を含むものである；あるいは

(ii) 重鎖可変ドメインが配列番号23で示されるアミノ酸配列を含み、かつ

軽鎖可変ドメインが配列番号22で示されるアミノ酸配列を含むものである；あるいは

(iii) 重鎖可変ドメインが、配列番号42で示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含み、かつ

10

20

軽鎖可変ドメインが、配列番号39で示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むものである；あるいは

(iv) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列が配列番号33で示されるアミノ酸配列(軽鎖)を含み、かつ免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列が配列番号36で示されるアミノ酸配列(重鎖)を含むもの、

からなる群より選択される配列を含む抗体であって、活性型立体配座のLFA-1と結合する該抗体。

【請求項 2】

少なくとも(i)のCDR領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、それぞれ、少なくとも配列番号23で示されるアミノ酸配列および配列番号22で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

少なくとも抗体フレームワーク領域が、配列番号33で示されるアミノ酸配列(軽鎖)における 1 ~ 2 4 位 (FR1-L)、3 6 ~ 5 0 位 (FR2-L)、5 8 ~ 8 9 位 (FR-3L) および 1 0 4 ~ 1 1 5 位 (FR4-L)、ならびに配列番号36で示されるアミノ酸配列(重鎖)における 1 ~ 3 0 位 (FR1-H)、3 6 ~ 4 9 位 (FR2-H)、6 7 ~ 9 8 位 (FR3-H)、および 1 1 0 ~ 1 2 0 位 (FR4-H) における抗体フレームワーク領域と同一である、請求項 1 に記載の抗体

【請求項 5】

ヒトにおいて免疫原性ではない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

全長IgG抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

抗原結合フラグメントであり、かつFcドメインを含まない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体および製薬上許容される塩を含有する医薬組成物。

【請求項 9】

軽鎖および重鎖の可変ドメイン配列および定常ドメイン配列が、それぞれ、配列番号60で示されるアミノ酸配列および配列番号61で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

炎症もしくは炎症性疾患を治療または予防する方法であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体を、炎症もしくは炎症性疾患を治療または予防するのに有効な量で被験者に投与することを含んでなる方法に用いるための医薬の製造における、該抗体の使用。

【請求項 11】

炎症もしくは炎症性疾患を治療または予防する方法が、前記抗体を1mg/kg/週より少ない用量で少なくとも2週間投与することを含んでなる、請求項10に記載の使用。

【請求項 12】

被験者が乾癬に罹患しているか、またはその素因がある、請求項10に記載の使用。

【請求項 13】

被験者が安定した斑状乾癬を有する、請求項12に記載の使用。

【請求項 14】

被験者が、少なくとも部分的にはT細胞炎症反応が原因となる疾患に罹患しているか、またはその素因がある、請求項10に記載の使用。

【請求項 15】

被験者が慢性関節リウマチに罹患しているか、またはその素因がある、請求項10に記載の使用。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

被験者に請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体を、該被験者の免疫応答を抑制するのに有効な量で投与することを含んでなる、免疫応答の抑制方法に用いるための医薬の製造における、該抗体の使用。

【請求項 17】

被験者が移植を受けているか、または受けようとしている、請求項16に記載の使用。

【請求項 18】

免疫応答の抑制方法が、T細胞機能を調節する第2の薬剤を投与することをさらに含む、請求項17に記載の使用。

【請求項 19】

T細胞機能を調節する第2の薬剤がCD154に対する抗体またはCD45RBに対する抗体である、請求項18に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インテグリン、特にインテグリンの特定の立体配座、と相互作用する結合タンパク質（「インテグリン結合タンパク質」）に関する。代表的なインテグリン結合タンパク質は抗体である。

【背景技術】

【0002】

インテグリンは細胞間の、また細胞と細胞外環境の間の、重要な相互作用を媒介する細胞表面分子である。インテグリンは細胞表面上で少なくとも2つの異なる立体配座（conformation）をとることができる。すなわち、インテグリンリガンドと結合しない非活性型立体配座と、インテグリンリガンドと結合できる活性型立体配座である。細胞性シグナル伝達によって、インテグリンはその立体配座を非活性型から活性型へと変えることが可能である。活性化されると、インテグリンは他の細胞の表面上の、細胞外マトリックス中の、または血液凝固もしくは補体カスケードにおいて集合する、そのコグネイトリガンドと特異的な様式で結合する。

【0003】

それぞれのインテグリンにはサブユニットとサブユニットが含まれる。20種類を上回るインテグリンヘテロ二量体が知られている。多くのインテグリンは体内の特定の細胞上に選択的に発現されており、例えば、あるサブセットのインテグリンが白血球上に選択的に発現している。

【0004】

白血球上のインテグリンは、白血球の遊出において、また炎症や免疫反応において中心的な重要性を担っている。白血球上にある2つの代表的なインテグリンはLFA-1とMac-1である。LFA-1（L2）は、炎症に関連した細胞表面分子（ICAM）、例えばICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、ICAM-4、およびICAM-5を含めて、いくつかのコグネイトリガンドと結合する。Mac-1（M2）は、ICAM-1、補体成分iC3b、および血液凝固成分フィブリノーゲンと結合する。

【発明の開示】

【0005】

インテグリン、特にインテグリンの特定の立体配座、と相互作用する結合タンパク質（「インテグリン結合タンパク質」）を開示する。代表的なインテグリン結合タンパク質は抗体である。インテグリン結合タンパク質は、例えば非活性型の立体配座（不活性のまたは休止している立体配座など）と比べて、インテグリンの活性型立体配座と優先的に相互作用することができる。インテグリン結合タンパク質は、例えば非活性型の立体配座（不活性のまたは休止している立体配座など）またはその模擬体と比べて、インテグリンの活性型立体配座の模擬体（例えば、改変型インテグリンであって、その立体配座がコグネイトリガンドと結合する能力がある状態で拘束されているもの）と優先的に相互作用することができる。インテグリン結合タンパク質は、不利な立体配座と比べて、少なくとも1.5

10

20

30

40

50

、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、1000、または $10^5$ 倍高い親和性をもって、好適な立体配座と結合することができる。

【0006】

一実施形態においては、インテグリン結合タンパク質を用いて、インテグリン活性を調節する（例えば、活性型インテグリンの活性を中和する）ことができる。例えば、インテグリン結合タンパク質を用いて、活性型インテグリンが表面にある細胞と、その活性型インテグリンのコグネイトリガンドとの、相互作用を阻害することが可能である。

【0007】

一実施形態においては、インテグリン結合タンパク質は白血球インテグリン、例えばLFA-1、例えば活性型LFA-1（「aLFA-1」）、例えばヒトaLFA-1と相互作用する。

10

【0008】

一実施形態においては、インテグリン結合タンパク質が抗体である。抗体は1以上のヒト領域、例えば1以上のヒトCDR、1以上のヒトフレームワーク（例えば、生殖系列もしくは体細胞変異したヒトFR）、または1以上のヒト定常領域、あるいはその有効ヒト領域を含むことができる。

【0009】

一実施形態においては、インテグリン結合タンパク質はaLFA-1活性を阻害する。例えば、インテグリン結合タンパク質は、aLFA-1が結合パートナー（例えば、LFA-1のコグネイトリガンド）と相互作用するのを防止する。特定の場合には、該抗体はaLFA-1がICAM（例えば、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、ICAM-4、またはICAM-5）と相互作用するのを防止することができる。

20

【0010】

インテグリン結合タンパク質は炎症を調節（例えば、軽減）することができ、それゆえ、インテグリン結合タンパク質を用いて炎症性疾患（例えば、慢性関節リウマチまたは乾癬）を治療することができる。したがって、インテグリン結合タンパク質は、かかる疾患を治療または予防するのに有効な量で被験者に投与することが可能である。

【0011】

一形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖（HC）可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖（LC）可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とする。HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、例えばカチオン依存性をもって、LFA-1の活性型立体配座（「aLFA-1」）と結合する（例えば、 $10 \mu\text{g/ml}$ のタンパク質濃度で検出可能に結合する）抗原結合部位を形成する。例えば、最大結合にはカチオンの存在が必要である。このタンパク質はLFA-1との結合のためにマグネシウムまたはマンガンが必要としうる。代表的なカチオン濃度は $0.01 \sim 11 \text{mM}$ 、例えば $0.1 \sim 5 \text{mM}$ 、または $0.1 \sim 3 \text{mM}$ である。一実施形態では、このタンパク質はマグネシウム、EGTAおよびCBRLFA-1/2抗体の存在下でLFA-1と結合するが、マグネシウム、カルシウムおよびCBRLFA-1/2抗体の存在下では結合しない。

30

【0012】

ある実施形態においては、このタンパク質はMHM24よりも良好な親和性でaLFA-1と結合する。例えば、該タンパク質はMHM24の $K_D$ より低い（例えば、MHM24の $K_D$ より少なくとも0.1、0.5、または1nM低い） $K_D$ で結合する。

40

【0013】

ある実施形態においては、このタンパク質は LのK287C/K294C I-ドメインと結合することができる。例えば、該タンパク質は、 LのL161C/F299C I-ドメインまたは野生型 Lと比べて、優先的に LのK287C/K294C I-ドメインと結合する。

【0014】

ある実施形態においては、このタンパク質はaLFA-1と $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、または $10^{-12} \text{M}$ より低い $K_D$ で結合する。いくつかの場合には、該タンパク質はヒトaLFA-1と10、5、1、0.5、0.2、0.1、または $0.05 \text{s}^{-1}$ より低い $k_{off}$ で結合する。一実施形態では、該タンパク質はLFA-1とLFA-1のコグネイトリガンド（例えば、ICAM-1などのICAM）との相互作用を低減させることができる。一実施形態では、該タンパク質は白血球とICAM発現細

50

胞（例えば、内皮細胞）との相互作用を低減させることができる。

【0015】

ある実施形態においては、HC可変ドメイン配列のH1およびH2超可変ループは、本明細書に記載する抗体と同じカノニカル構造（canonical structure）を有する。例えば、重鎖可変ドメイン配列は、H1およびH2超可変ループに対して1-3 Chothiaカノニカル構造を有する可変ドメインを形成する。

【0016】

ある実施形態においては、LC可変ドメイン配列のL1およびL2超可変ループは、本明細書に記載する抗体と同じカノニカル構造を有する。例えば、軽鎖可変ドメイン配列は、L1およびL2超可変ループに対して2-1 Chothiaカノニカル構造を有する可変ドメインを形成する。

10

【0017】

別の形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖（HC）可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖（LC）可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とし、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座と結合する抗原結合部位を形成し、その際、重鎖可変ドメイン配列が、(a) RYVMW（配列番号1）由来の（5個のうち）少なくとも3、4または5個のアミノ酸を含むCDR1、(b) YIWPSGGNTYYADSVKG（配列番号2）由来の（17個のうち）少なくとも13、14、15、16または17個のアミノ酸を含むCDR2、および/または(c) SYDFWSNAFDI（配列番号3）由来の（11個のうち）少なくとも5、6、7、8、9、10または11個のアミノ酸を含むCDR3、または本明細書に記載する別のCDR3（例えば、D2-57の親和性成熟変異体に由来するもの）を含む。このタンパク質は本明細書に記載するその他の特徴を含んでいてもよい。

20

【0018】

重鎖可変ドメイン配列のCDR3の領域の代表的な配列としては、Xa-S-X2-D-X4-X5-S-X7-A-X8-X9-X10-X11（配列番号4）が挙げられる。Xは、任意のアミノ酸、好ましくはシステイン以外の任意のアミノ酸である。この配列は1つ以上の下記の性質をもつことができる：

- (i) Xaは、親水性、例えばSまたはNなどの非荷電親水性残基である；
- (ii) X2は、芳香族、例えばYまたはFである；
- (iii) X4は、疎水性、例えばLまたは芳香族（例：YまたはF）である；
- (iv) X5は、疎水性、例えば大きな疎水性側鎖、例えばWまたはRである；
- (v) X7は、NまたはY、または側鎖にヒドロキシルを含む別のアミノ酸である；
- (vi) X9は、芳香族、例えばYまたはFである；
- (vii) X10は、小さい残基、例えばDやEなどの極性残基、またはAである；および
- (viii) X11は、任意のアミノ酸、例えばK、I、S、M、N、VまたはLである。

30

【0019】

この配列には以下の配列が含まれる：S-(Y/F)-D-(L/Y/F)-(W/R/K)-S-(N/Q/Y)-A-(Y/F)-(D/E/A)-(K/I/S/M/N/V/L)（配列番号5）、

S-(Y/F)-D-(L/Y/F)-(W/R)-S-(N/Y)-A-(Y/F)-(D/E/A)-(K/I/S/M/N/V/L)（配列番号6）。さらに別の配列として次の配列が含まれる：

40

Xa-(S/T)-X2-(D/E)-X4-X5-(S/T)-X7-(G/A/S)-X8-X9-X10-X11

【0020】

ある実施形態においては、前記タンパク質はD2-57またはDX-2001の特徴、例えばD2-57抗体のCDR領域を含む。一実施形態では、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、D2-57またはDX-2001抗体の対応する可変ドメイン配列に対して少なくとも70、80、85、90、92、93、94、95、97、98、99、または100%の同一性を有する。

【0021】

別の形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖（HC）可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖（LC）可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とし、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座と結合する抗原結合部位を

50

形成し、その際、軽鎖可変ドメイン配列が、(a) RASQSIGSYLN (配列番号7) 由来の(11個のうち)少なくとも7、8、9、10、または11個のアミノ酸を含むCDR1、(b) AASSLQS (配列番号8) 由来の(7個のうち)少なくとも4、5、6または7個のアミノ酸を含むCDR2、および/または(c) QQSYSTPS (配列番号9) 由来の(8個のうち)少なくとも5、6、7、または8個のアミノ酸を含むCDR3を含む。このタンパク質は本明細書に記載するその他の特徴を含んでいてもよい。一実施形態では、このタンパク質はD2-57またはDX-2001の特徴、例えばD2-57またはDX-2001抗体のCDR領域を含む。一実施形態では、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、D2-57またはDX-2001抗体の対応する可変ドメイン配列に対して少なくとも70、80、85、90、92、93、94、95、97、98、99、または100%の同一性を有する。

【0022】

別の形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖(HC)可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖(LC)可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とし、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座と結合する抗原結合部位を形成し、その際、重鎖可変ドメイン配列が、(a) HYGMS (配列番号10) 由来の(5個のうち)少なくとも3、4、または5個のアミノ酸を含むCDR1、(b) VISPSGGRTLYADSVKG (配列番号11) 由来の(17個のうち)少なくとも13、14、15、16または17個のアミノ酸を含むCDR2、および/または(c) HYSYAMDV (配列番号12) 由来の(8個のうち)少なくとも5、6、7、または8個のアミノ酸を含むCDR3を含む。一実施形態では、このタンパク質はC1-54の特徴、例えばC1-54抗体のCDR領域を含む。一実施形態では、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、C1-54抗体の対応する可変ドメイン配列に対して少なくとも70、80、85、90、92、93、94、95、97、98、99、または100%の同一性を有する。

【0023】

別の形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖(HC)可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖(LC)可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とし、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座と結合する抗原結合部位を形成し、その際、軽鎖可変ドメイン配列が、(a) TASQSVDSNLA (配列番号13) 由来の(11個のうち)少なくとも7、8、9、10、または11個のアミノ酸を含むCDR1、(b) GASTRAT (配列番号14) 由来の(7個のうち)少なくとも4、5、6または7個のアミノ酸を含むCDR2、および/または(c) QQYNKWPPYS (配列番号15) 由来の(10個のうち)少なくとも6、7、8、9または10個のアミノ酸を含むCDR3を含む。一実施形態では、このタンパク質はC1-54の特徴、例えばC1-54抗体のCDR領域を含む。一実施形態では、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、C1-54抗体の対応する可変ドメイン配列に対して少なくとも70、80、85、90、92、93、94、95、97、98、99、または100%の同一性を有する。

【0024】

別の形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖(HC)可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖(LC)可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とし、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座と結合する抗原結合部位を形成する。重鎖可変ドメイン配列は、(a) HYSMQ (配列番号16) 由来の(5個のうち)少なくとも3、4または5個のアミノ酸を含むCDR1、(b) YIGSSGNTYYADSVKG (配列番号17) 由来の(17個のうち)少なくとも13、14、15、16または17個のアミノ酸を含むCDR2、および/または(c) GTYNTSPFDY (配列番号18) 由来の(10個のうち)少なくとも7、8、9または10個のアミノ酸を含むCDR3を含む。一実施形態では、このタンパク質はP1-G10の特徴、例えばP1-G10抗体のCDR領域を含む。一実施形態では、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、P1-G10抗体の対応する可変ドメイン配列に対して少なくとも70、80、85、90、92、93、94、95、97、98、99、または100%の同一性を有する。

【0025】

別の形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖(HC)可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖(LC)可変ドメイン配列を含むタンパク質を特徴とし、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座と結合する抗原結合部位を形成する。軽鎖可変ドメイン配列は、(a) SGDALGQKYAS (配列番号19) 由来の(11個のう

10

20

30

40

50

ち)少なくとも7、8、9、10または11個のアミノ酸を含むCDR1、(b) QDSKRPS (配列番号20)由来の(7個のうち)少なくとも4、5、6または7個のアミノ酸を含むCDR2、および/または(c) QAWDTTAYV (配列番号21)由来の(9個のうち)少なくとも5、6、7、8または9個のアミノ酸を含むCDR3を含む。一実施形態では、このタンパク質はP1-G10の特徴、例えばP1-G10抗体のCDR領域を含む。一実施形態では、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列が、P1-G10抗体の対応する可変ドメイン配列に対して少なくとも70、80、85、90、92、93、94、95、97、98、99、または100%の同一性を有する。

**【0026】**

本明細書に記載するタンパク質は、そのCDRアミノ酸残基の少なくとも30、50、60、70、80、90または100%が基準CDR配列中の残基(ヒト生殖系列配列中の対応する位置の残基と同一)と同一でなくてよい。このタンパク質は、FR領域の少なくとも30、50、60、70、80、90または100%がヒト生殖系列配列由来のFR配列またはD2-57、DX-2001、C1-54もしくはP1-G10のFR配列と同一であってよい。代表的なヒト生殖系列配列としては、VKI-02、VL2-1、VKIII-L2::JK2、vg3-23、V3-23::JH4、およびV3-23::JK6の配列、ならびに本明細書で提供する他の配列が含まれる。

**【0027】**

別の形態において、本発明は、不活性型LFA-1と比べて、活性型LFA-1と優先的に結合し、かつ活性型LFA-1との結合について抗体D2-57、DX-2001、C1-54、またはP1-G10と競合する、抗体または非天然タンパク質を特徴とする。

**【0028】**

別の形態において、本発明は、LFA-1(例えば、活性型LFA-1)上の、抗体D2-57、DX-2001、C1-54、またはP1-G10によって認識されるエピトープと共通する部分があるエピトープに結合するか、あるいは抗体D2-57、DX-2001、C1-54、またはP1-G10と同じエピトープに結合する、抗体または非天然タンパク質を特徴とする。

**【0029】**

別の形態において、本発明は、本明細書に記載するタンパク質および製薬上許容される塩を含む医薬組成物を特徴とする。本発明はまた、本明細書に記載するタンパク質および治療上または診断上の使用説明書を含むキットを提供する。

**【0030】**

別の形態において、本発明は、炎症または炎症性疾患を治療または予防するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載するタンパク質を、炎症または炎症性疾患を治療または予防する(例えば、炎症または炎症性疾患の少なくとも1つの症状を緩和するか、あるいはそのような症状の発現を遅らせる)のに有効な量で被験者に投与することを含んでなる。

**【0031】**

ある実施形態では、タンパク質を1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量で、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間にわたり投与する。例えば、平均的な患者には、1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量を、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間、投与することが推奨される。

**【0032】**

ある実施形態では、タンパク質を、検出可能な血清濃度(その平均トラフ濃度が9、8、7、6、5、4、3、2、1µg/mlより低い)を生じるのに有効な用量で投与する。一実施形態では、タンパク質を2期に分けて投与する。第1期では第1用量を投与し、第2期では第1用量と異なる第2用量を投与する。第1用量は第2用量より少なくとも多くてもよく、例えば少なくとも20、30、または40%相違する。

**【0033】**

例えば、第1用量は初期量であって、例えば0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくする。第2用量は1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくすることができる。

10

20

30

40

50

## 【0034】

ある実施形態において、被験者は乾癬に罹患しているか、または乾癬に罹患する素因がある。例えば、被験者は安定した斑状乾癬 (plaque psoriasis) を有する。一実施形態では、被験者は、その体表面の少なくとも2、5、10、15、20、または25%が乾癬にかかっている。

## 【0035】

ある実施形態では、該タンパク質は、例えば30、60、90、または180日前に、別の全身療法または光線療法を施されていない被験者に、投与する。

## 【0036】

前記タンパク質は、白血球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。また、該タンパク質は、好酸球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。

10

## 【0037】

別の形態において、本発明は、炎症または炎症性疾患を治療または予防するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載するタンパク質を、炎症または炎症性疾患を軽減するのに有効な量で被験者に投与することを含んでなり、その際、該タンパク質は被験者の非活性型LFA-1分子とは実質的に相互作用しない。

## 【0038】

ある実施形態では、タンパク質を1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量で、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間にわたり投与する。例えば、平均的な患者には、1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量を、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間、投与することが推奨される。

20

## 【0039】

ある実施形態では、タンパク質を、検出可能な血清濃度 (その平均トラフ濃度が9、8、7、6、5、4、3、2、1 µg/mlより低い) を生じるのに有効な用量で投与する。一実施形態では、タンパク質を2期に分けて投与する。第1期では第1用量を投与し、第2期では第1用量と異なる第2用量を投与する。第1用量は第2用量より少なくとも多くてもよく、例えば少なくとも20、30、または40%相違する。

30

## 【0040】

例えば、第1用量は初期量であって、例えば0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくする。第2用量は1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくすることができる。

## 【0041】

ある実施形態において、被験者は乾癬に罹患しているか、または乾癬に罹患する素因がある。例えば、被験者は安定した斑状乾癬を有する。一実施形態では、被験者は、その体表面の少なくとも2、5、10、15、20、または25%が乾癬にかかっている。

## 【0042】

ある実施形態では、タンパク質を、例えば30、60、90、または180日前に、別の全身療法または光線療法を施されていない被験者に、投与する。

40

## 【0043】

前記タンパク質は、白血球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。また、該タンパク質は、好酸球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。

## 【0044】

別の形態において、本発明は、炎症または炎症性疾患を治療または予防するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載するタンパク質を、活性型LFA-1と優先的に結合しない抗体 (例えば、活性型LFA-1と不活性型LFA-1のいずれにもほぼ同じ親和性で結

50

合する抗体、例えばRAPTIVA（登録商標）を用いて炎症または炎症性疾患を治療または予防するのに必要とされる量より少ない量で、被験者に投与することを含んでなり、その際、該タンパク質は被験者の白血球上に露出された非活性型LFA-1分子とは実質的に相互作用しない。

【0045】

ある実施形態では、タンパク質を1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量で、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間にわたり投与する。例えば、平均的な患者には、1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量を、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間、投与することが推奨される。例えば、タンパク質は、実質的に同じ結果を達成するために、RAPTIVA（登録商標）より少ない用量で投与される。

10

【0046】

ある実施形態では、タンパク質を、検出可能な血清濃度（その平均トラフ濃度が9、8、7、6、5、4、3、2、1µg/mlより低い）を生じるのに有効な用量で投与する。一実施形態では、タンパク質を2期に分けて投与する。第1期では第1用量を投与し、第2期では第1用量と異なる第2用量を投与する。第1用量は第2用量より少なくとも多くてもよく、例えば少なくとも20、30、または40%相違する。

【0047】

例えば、第1用量は初期量であって、例えば0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくする。第2用量は1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくすることができる。

20

【0048】

ある実施形態において、被験者は乾癬に罹患しているか、または乾癬に罹患する素因がある。例えば、被験者は安定した斑状乾癬を有する。一実施形態では、被験者は、その体表面の少なくとも2、5、10、15、20、または25%が乾癬にかかっている。

【0049】

ある実施形態では、タンパク質を、例えば30、60、90、または180日前に、別の全身療法または光線療法を施されていない被験者に、投与する。

【0050】

前記タンパク質は、白血球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。また、該タンパク質は、好酸球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。

30

【0051】

別の形態において、本発明は、炎症または炎症性疾患を治療または予防するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載するタンパク質を、炎症または炎症性疾患の少なくとも1つの症状を軽減するかまたはその症状の発現を遅らせるのに有効な量で被験者に投与することを含んでなり、その際、活性型LFA-1タンパク質を表面に提示しない被験者の細胞は該タンパク質の標的とならない。

【0052】

ある実施形態では、タンパク質を1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量で、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間にわたり投与する。例えば、平均的な患者には、1週につき1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少ない用量を、例えば少なくとも2、3、5、10または52週間、投与することが推奨される。

40

【0053】

ある実施形態では、タンパク質を、検出可能な血清濃度（その平均トラフ濃度が9、8、7、6、5、4、3、2、1µg/mlより低い）を生じるのに有効な用量で投与する。一実施形態では、タンパク質を2期に分けて投与する。第1期では第1用量を投与し、第2期では第1用量と異なる第2用量を投与する。第1用量は第2用量より少なくとも多くてもよく、

50

例えば少なくとも20、30、または40%相違する。

【0054】

例えば、第1用量は初期量であって、例えば0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくする。第2用量は1、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、または0.02mg/kgより少なくすることができる。

【0055】

ある実施形態において、被験者は乾癬に罹患しているか、または乾癬に罹患する素因がある。例えば、被験者は安定した斑状乾癬を有する。一実施形態では、被験者は、その体表面の少なくとも2、5、10、15、20、または25%が乾癬にかかっている。

【0056】

ある実施形態では、例えば30、60、90、または180日前に、別の全身療法または光線療法を施されていない被験者に、タンパク質を投与する。

【0057】

前記タンパク質は、白血球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。また、該タンパク質は、好酸球数を少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、または45%増加させるのに有効な用量で投与することができる。

【0058】

例えば、被験者は、少なくとも部分的にはT細胞炎症反応によって引き起こされる疾患にかかっているか、またはその素因をもっている。好ましい実施形態では、その疾患が慢性関節リウマチまたは乾癬である。

【0059】

例えば、被験者は下記の群から選択される炎症性疾患にかかっているか、またはその素因をもっている：湿疹や喘息などのアレルギー症状、ライター症候群、HIV、サイトカイン誘発毒性、一過性低ガンマグロブリン血症、悪性疾患（例えば、慢性リンパ球性白血病やヘアリーセル白血病などのB細胞悪性疾患）、白血球漏出を伴う疾患、急性糸球体腎炎、喘息、免疫不全障害、腫瘍細胞の二次臓器などへの浸潤、インスリン炎、アテローム硬化症、T細胞の浸潤および慢性炎症反応を伴う症状、選択的IgA不全、髄膜炎、慢性皮膚粘膜、急性炎症性成分を伴う皮膚病、サルコイドーシス、皮膚過敏性反応（ウルシ皮膚炎（poison ivyおよびpoison oak）を含む）、蕁麻疹、ネフローゼ症候群、急性虫垂炎、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎など）、脳炎、損傷治癒、慢性閉塞性肺疾患、重症筋無力症、先天性X連鎖低ガンマグロブリン血症、狼瘡、成人呼吸促進症候群、眼窩炎症性疾患、炎症性胸疾患、ブドウ膜炎、乾癬、HIVおよびリノウイルス感染、CNS炎症性疾患、抗原-抗体複合体媒介疾患、壊死性腸炎、アミロイドーシス、熱による損傷、気管支炎、白血球接着不全II症候群、自己免疫溶血性貧血、腹膜炎、肺線維症、敗血症性ショック、敗血症または外傷に二次的な多臓器損傷症候群、白血球搬出、悪性貧血、腎炎、慢性気管支炎、分類不能型免疫不全、強皮症、糸球体腎炎、多発性筋炎、骨盤炎症性疾患、鼻炎、顆粒球輸血関連症候群、ウイルス感染、血液透析、自己免疫疾患（例えば、肉芽腫症および脈管炎）、肺炎症、反応性関節炎、皮膚炎、および白血球接着不全。自己免疫疾患の例としては次のものが含まれる：慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、真性糖尿病、多発性硬化症、レーノー症候群、自己免疫性甲状腺炎、実験的自己免疫脳脊髄炎、シェーグレン症候群、若年性糖尿病、ならびに結核、サルコイドーシスおよび多発性筋炎で一般に見られるサイトカインとTリンパ球により媒介される遅延型過敏症と関連した免疫反応。

【0060】

ある実施形態においては、タンパク質を、以下のリスクを実質的に高めない用量で投与する：重大な感染のリスク（例えば、患者の0.4%以下）、血小板減少のリスク（例えば、患者の0.3%以下）、乾癬悪化のリスク（例えば、患者の0.7%以下）、または頭痛、寒気、発熱、悪心、筋肉痛、疼痛、関節炎、もしくは関節痛のリスク（例えば、それぞれ患者の32、13、7、11、8、10、0.4、および0.3%以下）。一実施形態では、タンパク質はRA

10

20

30

40

50

PTIVA（登録商標）と同じかまたはそれより少ない副作用頻度でありうる。

【0061】

別の形態において、本発明は、免疫応答を抑制するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載するタンパク質を、被験者の免疫応答を抑制するのに有効な量で被験者に投与することを含んでなる。一実施形態では、被験者が移植をうけているか、または移植をうけようとしている。

【0062】

別の形態において、本発明は、被験者における疾患を治療または予防するための方法の特徴とする。この方法は、活性型LFA-1および非活性型LFA-1と実質的に同じ親和性で結合する抗LFA-1抗体には応答しないかまたは該抗体を許容しない被験者であって、活性型のLFA-1と優先的に結合する抗LFA-1抗体を必要とする被験者を同定し、活性型のLFA-1と優先的に結合する抗LFA-1抗体を該被験者に投与することを含んでなる。

【0063】

別の形態において、本発明は、aLFA-1活性を調節する方法の特徴とする。この方法は、請求項1に記載のaLFA-1結合タンパク質を用意し、該タンパク質をaLFA-1に、aLFA-1活性を調節するのに十分な量で接触させることを含んでなる。例えば、前記接触はin vitroでもin vivoでもよい。

【0064】

ある実施形態では、該タンパク質を腫瘍細胞（例えば、喉頭癌、表皮癌、肺癌、乳癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、もしくは肝癌、および/または転移癌に見られる細胞）の近くにあるaLFA-1と接触させる。一実施形態では、該タンパク質を内皮細胞の近くにあるaLFA-1と接触させる。

【0065】

別の形態において、本発明は、サンプル中のaLFA-1タンパク質の存在を、例えばin vitroで、検出する方法の特徴とする。この方法は、(i)サンプル（および場合により、対照サンプルのような基準サンプル）を、本明細書に記載するaLFA-1結合タンパク質に、aLFA-1結合タンパク質とaLFA-1タンパク質との相互作用を起こさせる条件下で接触させ、(ii) aLFA-1結合タンパク質と該サンプル（および場合により、対照サンプルのような基準サンプル）との相互作用を検出することを含んでなる。

【0066】

aLFA-1結合タンパク質またはaLFA-1の少なくとも一方が固定化される。

【0067】

別の形態において、本発明は、aLFA-1（例えば、活性型aLFA-1）の存在を、例えばin vivoで、検出する方法の特徴とする。この方法は、(i)被験者（および場合により、対照被験者）にaLFA-1結合タンパク質を、aLFA-1結合タンパク質とaLFA-1タンパク質との相互作用を起こさせる条件下で投与し、(ii)被験者におけるaLFA-1結合タンパク質の位置または被験者におけるaLFA-1結合タンパク質とaLFA-1との複合体の形成を検出することを含んでなる。例えば、被験者はヒトである。前記検出は被験者をイメージングすることを含みうる。例えば、aLFA-1結合タンパク質をMRIで検出可能なように標識する。

【0068】

本発明はまた、免疫グロブリン重鎖（HC）可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖（LC）可変ドメイン配列を含むタンパク質を包含する。HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、活性型立体配座のインテグリンI-ドメインと非活性型立体配座のインテグリンI-ドメインのいずれにも検出可能に結合するが、非活性型立体配座のインテグリンとの結合に比べて、活性型立体配座のインテグリンと優先的に結合する抗原結合部位を形成する。

【0069】

例えば、前記タンパク質は、不活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、または1000倍優先的に結合する。

【0070】

前記タンパク質は、不活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と少なくとも1.5、2、3、4、5、または10倍優先的に結合するが、その優先性は15、20、50、70、80、100、500、または1000倍以下である。

【0071】

本発明はまた、免疫グロブリン重鎖（HC）可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖（LC）可変ドメイン配列を含むタンパク質を包含する。HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、開放立体配座のインテグリンI-ドメインと閉鎖立体配座のインテグリンI-ドメインのいずれにも検出可能に結合するが、閉鎖立体配座のインテグリンI-ドメインに比べて、開放立体配座のインテグリンI-ドメインと優先的に結合する抗原結合部位を形成する。

10

【0072】

例えば、前記タンパク質は、不活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、または1000倍優先的に結合する。

【0073】

前記タンパク質は、不活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と少なくとも1.5、2、3、4、5、または10倍優先的に結合するが、その優先性は15、20、50、70、80、100、500、または1000倍以下である。一実施形態では、該タンパク質はジスルフィドでロックされたK287C/K294C I-ドメインと結合することができる。

【0074】

本発明はまた、免疫グロブリン重鎖（HC）可変ドメイン配列および免疫グロブリン軽鎖（LC）可変ドメイン配列を含むタンパク質を包含し、ここで、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列は、LFA-1の活性型立体配座のインテグリンI-ドメインと非活性型立体配座のインテグリンI-ドメインのいずれにも検出可能に結合するが、非活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と優先的に結合する抗原結合部位を形成する。例えば、前記タンパク質は、不活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、または1000倍優先的に結合する。前記タンパク質は、不活性型LFA-1に比べて、活性型LFA-1と少なくとも1.5、2、3、4、5、または10倍優先的に結合するが、その優先性は15、20、50、70、80、100、500、または1000倍以下である。一実施形態では、前記開放立体配座のI-ドメインがジスルフィドでロックされたK287C/K294C I-ドメインである。

20

30

【0075】

代表的な抗体は以下の配列またはそのセグメントを含むことができる：

## 【表 1】

表 1: 代表的な可変ドメイン

名称	アミノ酸配列	
D2-57 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIGSYLN	
配列番号 22	WYQQKTGKAPKALIIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQLEDFATYYC QQSYSTPS FGQGTKVEIKRT	10
D2-57 HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS RYVMW	
配列番号 23	WVRQAPGKGLEWVS YIWPSGGNTYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS SYDFWSNAFDI WGQGMVTVSS	
DX-2001 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSIGSYLN	20
配列番号 24	WYQQKPGKAPKALIIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPSFGQGTKVEIKRT	
DX-2001 HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS RYVMW	
配列番号 25	WVRQAPGKGLEWVS YIWPSGGNTYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS SYDFWSNAFDI WGQGMVTVSS	30
C1-54 LC	DIQMTQSPATLSVSPGERVTLSC TASQSVDSNLA	
配列番号 26	WYQQKPGQAPRLLVY GASTRAT GVPARFSGSGSGTAFTLTI DSIQSEDFAVYYC QQYNKWPPYS FGQGTKLEIKRT	

名称	アミノ酸配列	
C1-54 HC	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFS HYGMS	
配列番号 27	WVRQAPGKGLEWVS VISPSGGRTLYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK HYSYAMDV WGQGTTVTVSS	10
P1-G10 LC	SVLTQPPSVSVSPGQTASVTC SGDALGQKYAS	
配列番号 28	WYQQKPGQSPVLVIF QDSKRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYC QAWDTTAYV FGTGTKVTVL	
P1-G10 HC	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAASGFTFS HYSMQ	
配列番号 29	WVRQAPGKGLEWVS YIGSSGGNTYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR GTYNTSPFDY WGQGTTLVTVSS	20

重鎖可変ドメインの変形は、例えばN-末端グルタミン酸を、省くことができる。

【0076】

インテグリン結合抗体は一般的に単一特異性の、例えばモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントである。aLFA-1結合抗体は全長（例えば、IgG（例：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA（例：IgA1、IgA2）、IgD、およびIgE）であってもよいし、抗原結合フラグメント（例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub> またはscFvフラグメント）のみを含んでいてもよい。前記抗体またはその抗原結合フラグメントは2本の重鎖免疫グロブリンと2本の軽鎖免疫グロブリンを含むか、または一本鎖抗体でありうる。抗体は、場合により、  
、  
、  
、  
、  
、またはμ定常領域遺伝子から選択される定常領域を含んでいてもよい。aLFA-1結合抗体は実質的にヒト抗体（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の定常領域またはその一部）由来の重鎖および軽鎖定常領域を含むことができる。定常領域はAまたは非Aアロタイプの配列をもつことができる。

【0077】

一実施形態において、抗体は組換えまたは改変抗体であり、例えば、キメラ、ヒト化、脱免疫化、またはin vitro作製抗体である。本明細書中で用いる「組換え」または「改変」抗体とは、組換え手段により作製、発現、創出または単離されたあらゆる抗体を含めるものであり、例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体、または他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含むその他のいずれかの手段により作製、発現、創出または単離された抗体が含まれる。そのような組換え抗体には、ヒト、ヒト化、CDRグラフト化、キメラ、脱免疫化、in vitro作製抗体が含まれ、場合により、ヒト生殖系列免疫グロブリンをコードする核酸配列に由来するフレームワークおよび/または定常領域を含んでいてもよい。

【0078】

一実施形態において、前記抗体は、LFA-1と結合する公知の抗体が結合するエピトープ

50

とは異なったエピトープに結合する。例えば、前記抗体は、下記の抗体が結合するエピトープの1つ以上とは異なったエピトープに結合する：MHM23 (Hildrethら, Eur. J. Immunol. 13:202-208 (1983)); MHM24; RAPTIVA (登録商標); M18/2 (IgG.sub.2a; Sanches-Madridら, J. Exp. Med. 158:586 (1983)); mAb25 (Dranfieldら, J Cell Biol. 1992 Jan; 116(1):219-26.); H52 (American Type Culture Collection (ATCC) 受託番号 HB 10160); NK1-L16 (Landisら, J Cell Biol. 1993 Mar;120(6):1519-27); MEM-83 (Landisら, 前掲); 7E3; Mas191cおよびIOT18 (Vermot Desrochesら, Scand. J. Immunol. 33:277-286 (1991)); ならびにNA-8 (WO 94/12214)。他の実施形態では、前記抗体は、LFA-1との結合について、そのような抗体とは競合しない。さらに他の実施形態では、前記抗体は本明細書に記載する抗体と競合しない。

10

## 【0079】

ある実施形態において、前記抗体は、本明細書に記載する抗体(例えば、D2-57、DX-2001、C1-54、またはP1-G10)の一部共通したエピトープと結合するか、または本明細書に記載する抗体のaLFA-1への結合を競合的に阻害する。一実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載する抗体(例えば、D2-57、DX-2001、C1-54、またはP1-G10)が結合するエピトープの少なくとも12、10、8、6、5、または3アミノ酸内にあるアミノ酸を含むエピトープと結合する。一実施形態では、前記抗体は、本明細書に記載する抗体(例えば、D2-57、DX-2001、C1-54、またはP1-G10)の12、10、8、6、または4 内に位置する1以上の側鎖を認識する抗原結合部位構造を含む。このエピトープは および/または サブユニット上に1以上のアミノ酸側鎖を含むことができる。一実施形態では、エピトープが LのI -ドメイン上に1以上のアミノ酸側鎖を含む。

20

## 【0080】

さらに、aLFA-1結合抗体の任意の組合せ、例えばaLFA-1の異なる領域に結合する2種以上の抗体、例えばaLFA-1の細胞外ドメイン上の2つの異なるエピトープに結合する抗体(例えば、二重特異性抗体)も本発明の範囲内である。

## 【0081】

ある実施形態において、aLFA-1結合抗体は少なくとも1つの軽鎖もしくは重鎖免疫グロブリン(または2つの軽鎖免疫グロブリンと2つの重鎖免疫グロブリン)を含む。好ましくは、各免疫グロブリンは、本明細書に記載する抗体の軽鎖もしくは重鎖可変領域由来の相補性決定領域(CDR)と実質的に同一のCDRを少なくとも1つ、2つ、好ましくは3つ有する軽鎖もしくは重鎖可変領域をそれぞれ含む。

30

## 【0082】

本明細書に記載するインテグリン結合タンパク質は単独で使用することができ、例えば、誘導体化またはコンジュゲート化されていない形態で被験者に投与したり、in vitroで使用したりすることができる。他の実施形態では、インテグリン結合タンパク質を誘導体化したり、修飾したり、または他の機能性分子、例えば別のポリペプチド、タンパク質、アイソトープ、細胞、もしくは不溶性支持体に連結することができる。例えば、インテグリン結合タンパク質を1以上の他の分子種と(例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合などにより)機能的に連結させることができ、かかる分子種としては、例えば抗体(例えば、その結合タンパク質が抗体であれば、二重特異性または多重特異性抗体を作るため)、毒素、標識、血清滞留を長引かせる成分(例えば、PEG)、治療薬(例えば、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤)などがある。また、抗体は、それが補体依存性細胞傷害(CDC)または抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を媒介できるように、あるいは、それがCDCまたはADCCを媒介しないように、設計することもできる。例えば、抗体はCDC-もしくはADCC-応答能のあるFcドメイン、またはCDC-もしくはADCC-応答能のないFcドメインをもつことができる。

40

## 【0083】

別の形態において、本発明は、aLFA-1と結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列(例えば、本明細書に記載する免疫グロブリン重鎖可変ドメイン)を含むポリペプチドをコードするコード配列を含んでなる核酸を特徴とする。例えば、免疫グロブリン重鎖可変

50

ドメイン配列には、CDRモチーフまたは本明細書に記載のCDRが含まれる。免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列は本明細書に記載のフレームワーク領域を含みうる。一例として、重鎖可変ドメインの可変ドメイン配列は、本明細書に記載するアミノ酸配列またはその可変ドメイン配列に対して少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、または99%同一である。

【0084】

別の形態では、本発明は、aLFA-1と結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列（例えば、本明細書に記載する免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン）を含むポリペプチドをコードするコード配列を含んでなる核酸を特徴とする。例えば、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列には、CDRモチーフまたは本明細書に記載のCDRが含まれる。免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列は本明細書に記載するフレームワーク領域を含みうる。一例として、軽鎖可変ドメインの可変ドメイン配列は、本明細書に記載するアミノ酸配列またはその可変ドメイン配列に対して少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、または99%同一である。

10

【0085】

本明細書に記載する核酸は、コード配列と機能的に連結されたプロモーターをさらに含むことができる。核酸は第1および第2のコード配列を含んでいてもよく、例えば、第1のコード配列は免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含むポリペプチドをコードし、第2のコード配列は免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むポリペプチドをコードする。

【0086】

別の形態において、本発明は、重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする第1の核酸および軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする第2の核酸を含有する宿主細胞を特徴とする。重鎖可変領域と軽鎖可変領域は会合してaLFA-1結合タンパク質を形成することができる。これらの可変領域は本明細書に記載する1以上の性質をもつことができ、例えば、本明細書に記載する配列（例えば、本明細書に記載する単離抗体由来の可変ドメインの配列または本明細書に記載するヒト生殖系列の配列）に対して少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、または99%の同一性を有する。本発明はまた、aLFA-1結合抗体を提供する方法を包含する。この方法は、本明細書に記載する宿主細胞を用意し、該宿主細胞において第1および第2の核酸を、軽鎖および重鎖可変領域が集合してaLFA-1と相互作用する抗原結合タンパク質を形成する条件下で、発現させることを含みうる。

20

30

【0087】

別の形態において、本発明は、ヒトまたは有効ヒト重鎖免疫グロブリン可変ドメインおよびヒトまたは有効ヒト軽鎖免疫グロブリン可変ドメインを含む結合タンパク質を特徴とし、該結合タンパク質はヒトaLFA-1と結合する。前記タンパク質は $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、または $10^{-10}$ Mより低い $K_d$ でaLFA-1と結合することができる。前記タンパク質は本明細書に記載する1以上のさらなる特徴を含んでいてもよい。

【0088】

さらに別の形態では、本発明は、aLFA-1結合抗体またはその抗原結合フラグメントの作製方法を特徴とする。この方法は、重鎖可変領域（例えば、本明細書に記載する重鎖可変領域）を含むポリペプチドをコードする第1の核酸配列を含有する宿主細胞を用意し、軽鎖可変領域（例えば、本明細書に記載する軽鎖可変領域）を含むポリペプチドをコードする第2の核酸配列を用意し、該宿主細胞内で第1および第2の核酸配列を、軽鎖および重鎖可変領域が集合してaLFA-1と相互作用する抗原結合タンパク質を形成する条件下で、発現させることを含んでなる。第1および第2の核酸配列は連結されても、連結されなくてもよく、例えば、同一のベクター上でまたはそれぞれ別個のベクター上で発現させることができる。第1および第2の核酸配列は、同一分子の成分であってもよいし、異なる分子（例えば、異なる染色体もしくはプラスミド）上であってもよい。

40

【0089】

宿主細胞は真核細胞（例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞）または原核細胞（例えば、大腸菌）でありうる。例えば、哺乳動物細胞は培養細胞または細胞系であってよ

50

い。代表的な哺乳動物細胞としては、リンパ球細胞系（例えば、NSO）、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO）、COS細胞、酵母細胞、およびトランスジェニック動物由来の細胞（例えば、乳房上皮細胞）が挙げられる。本明細書に記載する抗体をコードする核酸は、例えば、トランスジェニック動物において発現させることができる。一実施形態では、核酸を組織特異的プロモーター（例えば、乳房特異的プロモーター）の制御下に置き、抗体をトランスジェニック動物において産生させる。例えば、抗体分子をトランスジェニック動物（例えば、トランスジェニック・ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、またはげっ歯類）のミルク中に分泌させる。

#### 【0090】

別の形態において、本発明は、被験者における炎症性疾患を治療または予防する方法を特徴とする。この方法は、aLFA-1結合タンパク質（例えば、本明細書に記載するタンパク質）を用意し、該被験者に、炎症性疾患を調節または予防するのに十分な量の該タンパク質を接触させることを含んでなる。この方法は、炎症性疾患にかかっているかまたはそのリスクがあるとして被験者を識別することを含みうる。

10

#### 【0091】

被験者は哺乳類、例えば霊長類、好ましくは高等霊長類、例えばヒト（本明細書に記載する疾患にかかっているか、またはそのリスクがある患者）でありうる。

#### 【0092】

aLFA-1結合タンパク質は被験者に全身的に（例えば、経口的、非経口的、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、経皮的、もしくは吸入により）、局所的に、または粘膜（鼻、喉、気管支など）への適用により投与することができる。

20

#### 【0093】

この方法は、炎症の少なくとも1つの指標をモニターすることをさらに含み、かかる指標としては、例えば、局部体温、腫脹（例えば、測定されるもの）、発赤、局所もしくは全身の白血球数、好中球の有無、サイトカインレベル、エラスターゼ活性などが挙げられる。被験者は1以上の下記期間中にモニターされる：治療開始前、治療中、または治療の1以上の要素を施した後。同じaLFA-1結合タンパク質または他の薬剤による更なる治療の必要性を評価するためにモニターしてもよい。上記のパラメーターの1つ以上が希望通りに変化したら、それは被験者の状態が改善されたことを示している。モニターについての情報は、例えば電子またはデジタル方式で、記録することができる。

30

#### 【0094】

別の形態において、本発明は、サンプル（例えば、生物学的サンプルまたは組織生検材料）中のaLFA-1タンパク質の存在をin vitroで検出する方法を特徴とする。この方法を用いて、本明細書に記載する疾患を評価（例えば、診断または病期判定）することができる。この方法は、(i)サンプル（および場合により、基準（例えば、対照）サンプル）に、本明細書に記載するaLFA-1結合タンパク質を、aLFA-1結合タンパク質とLFA-1タンパク質との相互作用を起こさせる条件下で接触させ、(ii)サンプル（および場合により、基準（例えば、対照）サンプル）において、例えば、LFA-1結合タンパク質とLFA-1との複合体の形成を検出することにより、またはaLFA-1結合タンパク質とLFA-1との相互作用を検出することにより、aLFA-1を検出することを含んでなる。前記複合体の形成はaLFA-1タンパク質（例えば、活性型aLFA-1タンパク質）の存在を示しており、本明細書に記載する処置の適合性または必要性を示すものである。例えば、基準サンプル（例えば、対照サンプル）と比較して、サンプル中の複合体の形成に統計的有意差があれば、該サンプル中に活性型aLFA-1が存在することとなる。

40

#### 【0095】

さらに別の形態において、本発明は、LFA-1（例えば、活性型aLFA-1）の存在をin vivo（例えば、被験者におけるin vivoイメージング）で検出する方法を提供する。この方法を用いて、本明細書に記載する疾患（例えば、炎症、炎症性疾患、過剰のLFA-1活性を特徴とする疾患、またはLFA-1媒介疾患）を評価（例えば、診断、局在化、または病期判定）することができる。この方法は、(i)被験者（および場合により、対照の被験者）に、a

50

LFA-1結合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント）を、aLFA-1結合タンパク質とaLFA-1タンパク質との相互作用を起こさせる条件下で投与し、(ii)該結合タンパク質とaLFA-1との複合体の形成を検出することを含んでなり、その際、基準（例えば、対照の被験者またはそのベースライン）と比較して、被験者における複合体の形成に統計的有意差があれば、aLFA-1が存在することとなる。被験者の体内の特定の場所に活性型aLFA-1が存在することは、炎症または炎症性疾患の指標となりうる。

【0096】

他の実施形態では、本明細書に記載する疾患（例えば、炎症性疾患、過剰のLFA-1活性を特徴とする疾患、またはLFA-1媒介疾患）を診断または病期判定する方法が提供される。この方法は、(i)該疾患にかかっているかまたはそのリスクがある被験者を識別し、(ii)該疾患により影響される組織または細胞のサンプルを取得し、(iii)該サンプルまたは対照サンプルにaLFA-1結合タンパク質を、該結合タンパク質とaLFA-1タンパク質との相互作用を起こさせる条件下で接触させ、(iv)複合体の形成を検出することを含んでなる。基準サンプル（例えば、対照サンプル）と比較して、サンプルにおける該結合タンパク質とLFA-1との複合体の形成が統計的に有意に増加していれば、該疾患または該疾患の病期を示すこととなる。一実施形態では、該サンプルは非外科的手段により、例えば血液、唾液、または尿サンプルとして得られる。他の実施形態では、外科手術が用いられる。

【0097】

好ましくは、in vivoおよびin vitro診断法で用いるaLFA-1結合タンパク質は、結合したまたは結合してない該結合タンパク質の検出を容易にするために、検出可能な物質で直接または間接的に標識する。

【0098】

本発明の多くの実施形態は、活性型LFA-1（「aLFA-1」）と優先的に結合する結合タンパク質に関して記載されているが、別の標的タンパク質（例えば別のインテグリン、例えば別の白血球インテグリンサブファミリーのメンバー）の配座異性体（conformer）または異なるLFA-1配座異性体と優先的に結合するタンパク質を作製して使用することも可能である。

【0099】

定義

「結合タンパク質」とは、標的分子と相互作用することができるタンパク質をさす。「インテグリン結合タンパク質」とは、インテグリンと相互作用することができるタンパク質をさし、特に活性型インテグリン（例えば、aLFA-1）またはその模擬体と優先的に相互作用するタンパク質を含む。

【0100】

本明細書中で用いる「抗体」とは、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を意味する。例えば、抗体は重(H)鎖可変領域（本明細書ではVHと略す）と軽(L)鎖可変領域（本明細書ではVLと略す）を含みうる。別の例では、抗体は2つの重(H)鎖可変領域と2つの軽(L)鎖可変領域を含む。「抗体」なる用語は、完全な抗体だけでなく、抗体の抗原結合フラグメント（例えば、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>、Fdフラグメント、Fvフラグメント、およびdAbフラグメント）も包含する。

【0101】

VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」（FR）と呼ばれる比較的保存された領域が間隔をおいて配置された、「相補性決定領域」（「CDR」）と呼ばれる超可変性の領域にさらに再分割することができる。フレームワーク領域とCDRの程度は正確に定義されている（Kabatら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C.ら（1987）J. Mol. Biol. 196:901-917を参照のこと）。本明細書ではKabatの定義を用いる。各VHおよびVLは典型的には3つのCDRと4つのFRからなり、これらはアミノ末端からカルボキシ末端の方向に次の順序で配置されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、C

10

20

30

40

50

DR3、FR4。

【0102】

「免疫グロブリンドメイン」とは、免疫グロブリン分子の可変ドメインまたは定常ドメインに由来するドメインをさす。免疫グロブリンドメインは典型的には、約7本の鎖から形成された2つのシートと、保存されたジスルフィド結合を含む（例えば、A.F. WilliamsおよびA.N. Barclay 1988 Ann. Rev Immunol. 6:381-405を参照のこと）。免疫グロブリン可変ドメインの超可変ループのカノニカル構造は、例えば、Chothiaら（1992）J. Mol. Biol. 227:799-817; Tomlinsonら（1992）J. Mol. Biol. 227:776-798; およびTomlinsonら（1995）EMBO J. 14(18):4628-38に記載されるように、その配列から推測することができる。

10

【0103】

本明細書中で用いる「免疫グロブリン可変ドメイン配列」とは、免疫グロブリン可変ドメインの構造を形成することができるアミノ酸配列をさす。例えば、この配列は天然の可変ドメインのアミノ酸配列の全部または一部を含みうる。例えば、この配列は1個、2個またはそれ以上のN-もしくはC-末端アミノ酸、内部アミノ酸を欠失していてもよく、1個以上の挿入または追加の末端アミノ酸を含んでいてもよく、その他の改変を含んでいてもよい。一実施形態では、免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むポリペプチドを別の免疫グロブリン可変ドメイン配列と結合させて、標的結合構造（つまり「抗原結合部位」）、例えば、非活性型構造に対して優先的に活性型インテグリン構造または活性型インテグリン構造の模擬体と相互作用する構造、を形成させることができる。

20

【0104】

抗体のVH鎖およびVL鎖は重鎖もしくは軽鎖定常領域の全部または一部をさらに含むことができ、それにより、それぞれ重免疫グロブリン鎖または軽免疫グロブリン鎖が形成される。一実施形態では、抗体は2本の重免疫グロブリン鎖と2本の軽免疫グロブリン鎖からなる四量体であり、その場合に、重免疫グロブリン鎖と軽免疫グロブリン鎖は、例えばジスルフィド結合によって、相互に連結される。重鎖定常領域は3つのドメインCH1、CH2およびCH3を含む。軽鎖定常領域は1つのCLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は一般に、抗体が宿主の組織または因子（免疫系の各種細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）を含む）に結合するのを仲介する。「抗体」なる用語は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM

30

【0105】

抗体の1以上の領域はヒトまたは有効ヒトでありうる。例えば、可変領域の1以上がヒトまたは有効ヒトでありうる。例えば、CDR（例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3）の1以上がヒトでありうる。軽鎖CDRのそれぞれがヒトでありうる。HC CDR3がヒトでありうる。フレームワーク領域（例えば、HCまたはLCのFR1、FR2、FR3、およびFR4）の1以上がヒトでありうる。一実施形態では、全てのフレームワーク領域がヒトであり、例えばヒト体細胞（例えば、免疫グロブリンを生産する造血細胞または非造血細胞）由来である。一実施形態において、ヒト配列は生殖系列配列であり、例えば生殖系列核酸によりコードされるものである。定常領域の1以上はヒトまたは有効ヒトでありうる。別の実施形態では、全抗体の少なくとも70、75、80、85、90、92、95、または98%がヒトまたは有効ヒトでありうる。

40

【0106】

抗体の全部または一部は免疫グロブリン遺伝子またはそのセグメントによりコードされる。代表的なヒト免疫グロブリン遺伝子には、（IgA1およびIgA2）、（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、、およびμ定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約25Kdまたは214アミノ酸

50

)は、NH<sub>2</sub>-末端の可変領域遺伝子(約110アミノ酸)とカルボキシ末端の または 定常領域遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」(約50Kdまたは446アミノ酸)は、同様に、可変領域遺伝子(約116アミノ酸)と他の前記定常領域遺伝子の1つ、例えば(約330アミノ酸をコードする)によってコードされる。

#### 【0107】

全長抗体の「抗原結合フラグメント」(または単純に「抗体部分」もしくは「フラグメント」とは、本明細書中で用いるとき、対象の標的と特異的に結合する能力を保持する、全長抗体の1以上のフラグメントをさす。全長抗体の「抗原結合フラグメント」という用語に包含される結合フラグメントの例としては、(i) Fabフラグメント、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価フラグメント; (ii) F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント; (iii) Fdフラグメント、VHおよびCH1ドメインからなる; (iv) Fvフラグメント、抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなる; (v) dAbフラグメント (Wardら, (1989) Nature 341:544-546)、VHドメインからなる; および(vi) 官能価を保持する単離された相補性決定領域(CDR)。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインであるVLとVHは別個の遺伝子によってコードされるが、組換え法を用いて、合成リンカーによってそれらを結合させることができる。かかる合成リンカーは、両ドメインを単一のタンパク質(VLおよびVH領域が対合して、一本鎖Fv(scFv)として知られる一価分子を形成する)として作製することを可能にする。例えば、Birdら(1988) Science 242:423-426; およびHustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照のこと。

#### 【0108】

抗体フラグメントは当業者に知られた従来の方法を含む適切な方法を使って取得することができる。「単一特異的抗体」なる用語は、特定の標的(例えば、エピトープ)に対して単一の結合特異性および親和性を示す抗体を意味する。この用語は「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含み、本明細書中で用いるとき、単一分子組成の抗体またはそのフラグメントの調製物をさす。本明細書中で用いる「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス(例えば、IgMまたはIgG1)をさす。

#### 【0109】

「有効ヒト」免疫グロブリン可変領域は、その免疫グロブリン可変領域が正常なヒトにおいて免疫原反応を誘発しないように、十分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含む免疫グロブリン可変領域のことである。「有効ヒト」抗体は、その抗体が正常なヒトにおいて免疫原反応を誘発しないように、十分な数のヒトアミノ酸位置を含む抗体のことである。

#### 【0110】

「ヒト化」免疫グロブリン可変領域は、その免疫グロブリン可変領域が正常なヒトにおいて免疫原反応を誘発しないように、十分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含むよう改変されている免疫グロブリン可変領域のことである。「ヒト化」免疫グロブリンの記述は、例えば米国特許第6,407,213号および同第5,693,762号に見出せる。

#### 【0111】

本明細書中で用いる「結合親和性」とは、見かけの結合定数つまりK<sub>a</sub>を意味する。K<sub>a</sub>は解離定数(K<sub>d</sub>)の逆数である。結合タンパク質は、例えば、特定の標的分子に対して少なくとも10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>または10<sup>-8</sup> Mの結合親和性を有する。第2標的に比して第1標的への結合リガンドのより高い親和性結合は、第2標的に結合するためのK<sub>a</sub>(または数値K<sub>d</sub>)より、第1標的に結合するためのK<sub>a</sub>が高い(または数値K<sub>d</sub>が小さい)ことにより示される。そのような場合に、結合タンパク質は第2標的(例えば、第2立体配座のタンパク質またはその模擬体)よりも第1標的(例えば、第1立体配座の同タンパク質またはその模擬体)に対して特異性を有する。結合親和性(例えば、特異性または他の匹敵するものに対する)の差は少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、1000、または10<sup>5</sup>倍でありうる。

## 【0112】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、または分光法（例えば、蛍光検定を使用する）を含めて、様々な方法で測定することができる。結合親和性を評価するための一般的条件は、pH7.2のPBS（リン酸緩衝食塩水）中30 である。こうした方法を用いて、結合したおよび遊離の結合タンパク質の濃度を、結合タンパク質（または標的）濃度の関数として測定することができる。結合した結合タンパク質の濃度（「結合型」）は、以下の式により、遊離の結合タンパク質の濃度（「遊離」）と標的上の結合タンパク質の結合部位の濃度に関係している（式中、Nは標的分子あたりの結合部位の数である）：

$$[\text{結合型}] = N \cdot [\text{遊離}] / ((1/Ka) + [\text{遊離}])$$

10

## 【0113】

しかし、Kaの正確な測定を行うことがいつも必要とは限らない。なぜなら、往々にして、それは、親和性の定量的測定（例えば、ELISAまたはFACS分析のような方法を用いて測定される）を得るのに十分であり、Kaに比例しており、それゆえに、より高い親和性が例えば2倍高いかどうかを確認するといった比較のために使用して、親和性の定性的測定を得たり、あるいは、例えば機能アッセイ（例えば、in vitroもしくはin vivoアッセイ）での活性により、親和性の推測を得たりすることができるからである。

## 【0114】

「単離された組成物」とは、該組成物を得ることができる天然サンプルの少なくとも1つの成分の少なくとも90%から分離されている組成物を意味する。人工的または天然に得られる組成物は、対象の種または種の集団が重量-重量基準で少なくとも5、10、25、50、75、80、90、92、95、98、または99%純粋であるならば、少なくともある純度の組成物でありうる。

20

## 【0115】

「エピトープ」とは、結合タンパク質（例えば、Fabもしくは全長抗体などの抗体）が結合する標的化合物上の部位をさす。標的化合物がタンパク質である場合には、その部位は完全にアミノ酸成分から構成されるか、完全に該タンパク質のアミノ酸の化学的修飾物（例えば、グリコシル部分）で構成されるか、またはそれらの組合せにより構成される。重複するエピトープには少なくとも1個の共通のアミノ酸残基が含まれる。

## 【0116】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」（これらの用語は本明細書では相互交換可能に用いられる）の計算は次のように行われる。最適な比較を目的として配列をアライメントする（例えば、最適な比較のために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、また、比較のために非相同配列を無視することができる）。GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを用いて、ギャップペナルティ-12、ギャップ伸張ペナルティ-4、およびフレームシフトギャップペナルティ-5を含むBlossum 62スコアリングマトリックスにより最良のスコアとして最適なアライメントを決定する。その後、対応するアミノ酸位置のアミノ酸残基または対応するヌクレオチド位置のヌクレオチドを比較する。第1配列のある位置に、第2配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが存在する場合には、これらの分子はその位置で同一となる（本明細書中で用いるアミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」に等しい）。2つの配列間の同一性パーセントは、両配列により共有される同一位置の数の関数である。

30

40

## 【0117】

好ましい実施形態において、比較のためにアライメントされる参照配列の長さは、該参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より一層好ましくは少なくとも60%、より一層好ましくは少なくとも70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%、または100%である。例えば、参照配列は免疫グロブリン可変ドメイン配列の長さであってよい。

## 【0118】

50

本明細書中で用いる「実質的に同一」（または「実質的に相同」）とは、第1のアミノ酸または核酸配列が第2のアミノ酸または核酸配列と同一のもしくは同等の（例えば類似の側鎖をもつ、例えば保存されたアミノ酸置換）アミノ酸残基またはヌクレオチドを十分な数で含み、その結果、第1および第2のアミノ酸または核酸配列が同様の活性、例えば結合活性、結合優先性、もしくは生物学的活性を示す（または、かかる活性を示すタンパク質をコードする）ことを意味する。抗体の場合には、第2の抗体が同様の特異性を有しかつ同一の抗原に対して少なくとも50%の親和性を有する。

#### 【0119】

本明細書に開示する配列に類似のまたは相同の配列（例えば、少なくとも約85%の配列同一性を有する配列）もまた本出願の一部である。ある実施形態では、配列同一性が約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上でありうる。さらに、実質的な同一性は、例えば、核酸セグメントが該核酸鎖の相補体を選択的ハイブリダイゼーション条件（例えば、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）下でハイブリダイズする場合にも、存在する。核酸は細胞内に、細胞溶解液中に、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在しうる。

#### 【0120】

本明細書中で用いる「低度のストリンジェンシー、中度のストリンジェンシー、高度のストリンジェンシー、または非常に高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションと洗浄の条件を説明している。ハイブリダイゼーションを行うためのガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができ、前記文献を引用により本明細書に組み込むものとする。この文献には水性方法と非水性方法が記載されており、どちらも使用することができる。本明細書で言うところの具体的なハイブリダイゼーション条件は次のとおりである：(1) 低度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、6X 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45℃、続いて0.2X SSC、0.1% SDS中少なくとも50℃で2回洗浄（低ストリンジェンシー条件の場合は、洗浄温度を55℃に上げてよい）；(2) 中度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、6X SSC中で約45℃、続いて0.2X SSC、0.1% SDS中60℃で1回以上の洗浄；(3) 高度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、6X SSC中で約45℃、続いて0.2X SSC、0.1% SDS中65℃で1回以上の洗浄；および(4) 非常に高度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、0.5M リン酸ナトリウム、7% SDS中で65℃、続いて0.2X SSC、1% SDS中65℃

で1回以上の洗浄。非常に高度のストリンジェンシー条件(4)が好適な条件であり、ほかに特定しない限りこれを使用すべきである。本発明は、本明細書に記載する核酸またはその相補体（例えば、本明細書に記載する結合タンパク質をコードする核酸）に低度、中度、高度または非常に高度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を包含する。これらの核酸は同じ長さであっても、基準となる核酸の長さの30、20、または10%以内であってもよい。その核酸は免疫グロブリン可変ドメイン配列をコードする領域に相当しうる。

#### 【0121】

インテグリン結合タンパク質は、本明細書に記載する結合タンパク質に対して、該タンパク質の機能に重大な影響を及ぼさない突然変異（例えば、保存的アミノ酸置換または非必須アミノ酸置換）を含んでいてもよい。特定の置換が許容されるかどうか、すなわち、生物学的特性（例えば、結合活性）に有害な作用を与えないかは、例えば、Bowieら (1990) Science 247:1306-1310に記載の方法を用いて、予測することができる。

#### 【0122】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基を、類似の側鎖をもつアミノ酸残基で置換することである。類似の側鎖をもつアミノ酸残基のグループは当技術分野で定義されている。これらのグループには以下のものが含まれる：塩基性側鎖をもつアミノ酸（例：リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖をもつアミノ酸（例：アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖をもつアミノ酸（例：グリシン、アスパラギン、グルタミン、セ

10

20

30

40

50

リン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖をもつアミノ酸(例:アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 $\gamma$ -分枝側鎖をもつアミノ酸(例:トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖をもつアミノ酸(例:チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)。多くのフレームワークおよびCDRアミノ酸残基には1以上の保存的置換を含めることが可能である。

#### 【0123】

生体高分子のコンセンサス配列は、各種アミノ酸間で変化させることのできる位置を含んでいてもよい。例えば、そのような場合に記号「X」は、一般に、任意のアミノ酸(例えば、20種類の天然アミノ酸のいずれか、またはシステイン以外の19種類のアミノ酸のいずれか)を意味する。許容される他のアミノ酸はまた、例えば、丸括弧とスラッシュを使って、示すこともできる。例えば、「(A/W/F/N/Q)」は、アラニン、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギン、およびグルタミンがその特定の位置に許容される、ことを意味する。

10

#### 【0124】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を完全に消失させることなく、より好ましくは、生物学的活性を実質的に改変させることなく、結合物質(例えば、抗体)の野生型配列から改変させることのできる残基であり、一方「必須」アミノ酸残基はそのような変化をもたらすものである。

#### 【0125】

「ポリペプチド」または「ペプチド」(これらは相互交換可能に用いられる)とは、3個以上のアミノ酸がペプチド結合で連結されて、例えば3~30アミノ酸、12~60アミノ酸、もしくは30~300アミノ酸、または300アミノ酸を上回る長さの高分子を意味する。ポリペプチドは1個以上の非天然アミノ酸を含んでいてもよい。典型的には、ポリペプチドは天然アミノ酸のみを含む。「タンパク質」は1本以上のポリペプチド鎖を含みうる。したがって、「タンパク質」なる用語はポリペプチドを包含する。タンパク質またはポリペプチドは1以上の修飾、例えばグリコシル化、アミド化、リン酸化などを含んでいてもよい。「小ペプチド」という用語は、長さが3~30アミノ酸(例えば、8~24アミノ酸)のポリペプチドを表すために用いられる。

20

#### 【0126】

「コグネイトリガンド」とは、インテグリンの天然に存在するリガンドをさし、その天然に存在する変異体(例えば、スプライス変異体、天然の突然変異体、およびイソ型)も含まれる。

30

#### 【0127】

「模擬体」とは、インテグリンまたはその一部の立体配座の模擬体の場合に、天然に存在するインテグリンまたはその一部と比べて、少なくとも1つの特定の立体配座をとる傾向がある改変型インテグリンをさす。

#### 【0128】

統計的有意差は、当技術分野で公知の方法により求めることができる。代表的な統計学的検定には、スチューデントのT検定、マン・ホイットニー(Mann Whitney)のUノンパラメトリック検定、およびウィルコクスン(Wilcoxon)のノンパラメトリック統計検定が含まれる。いくつかの統計的に有意な関係は、0.05または0.02未満のP値を有する。特定の結合タンパク質は、統計的に有意(例えば、P値<0.05または0.02)な差(例えば、特異性または結合の差)を示しうる。「誘発する」、「阻害する」、「増強する」、「高める」、「増加する」、「低下する」などの用語は、2つの状態間の識別可能な量的または質的な相違を表し、これら2つの状態間の差(例えば、統計的有意差)をさすことができる。

40

#### 【0129】

本発明の他の構成および効果は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。本発明の実施形態は本明細書に記載する構成の任意の組合せを含んでいる。いかなる場合も、「実施形態」なる用語は、例えば別の実施形態において、本明細書に

50

開示する 1 以上の他の構成を締め出すものではない。本出願の全体を通して引用された全ての文献、特許出願（公開および未公開）、ならびに公開された特許の内容は、引用により本明細書に明示的に組み込むものとする。本出願にはまた、2003年米国食品医薬品局（FAD）により承認された製品ラベルRAPTIVA（登録商標）が引用により組み込まれる。

【 0 1 3 0 】

#### 詳細な説明

本発明は、とりわけ、活性型立体配座のインテグリンと結合する、例えばLFA-1の非活性型立体配座と比べて活性型LFA-1（「aLFA-1」）と結合する、結合タンパク質（例えば、抗体）を提供する。一実施形態において、前記結合タンパク質はaLFA-1の少なくとも 1 つの機能を阻害し、例えば、aLFA-1とaLFA-1のコグネイトリガンド（例えば、ICAMタンパク質）との結合相互作用を阻害する。かかる結合タンパク質を用いて炎症性疾患や本明細書に記載する他の疾患を治療または予防することができる。

10

【 0 1 3 1 】

#### LFA-1

リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）は白血球インテグリンサブファミリーのメンバーである。LFA-1はインテグリン サブユニット L（CD11a）と サブユニット 2（CD18）とのヘテロ二量体である。

【 0 1 3 2 】

白血球インテグリンサブファミリーの他のインテグリンはやはり 2サブユニット（CD18）を含むが、別個の サブユニットを有する。例えば、MAC-1は 2と M（CD11b）とのヘテロ二量体である。p150.95は 2と X（CD11c）とのヘテロ二量体である。Springer, T A (1990) Nature 346:425-433; Larson, R SおよびSpringer T A, (1990) Immunol Rev 114:181-217; Van der Vieren, Mら (1995) Immunity 3:683-690。白血球インテグリンは、正常な免疫反応および炎症反応にとって不可欠な、広範囲の接着相互作用を仲介している。LFA-1のそのコグネイトリガンドへの結合は、顕著な細胞効果を伴ってLFA-1の立体配座変化をもたらさう。クラスター化のみによって媒介されるLFA-1の機能は、リガンド結合によって媒介される機能に対して二次的であるようである。例えば、Kimら (2004) J. Cell Biol. 167:1241を参照のこと。

20

【 0 1 3 3 】

ヒトLFA-1の サブユニット（ LまたはCD11a）の代表的なアミノ酸配列は次のとおりである (gi|4504757|ref|NP\_002200.1) :

30

```
MKDSCI TVMAMALLSGFFFFAPASSYNLDVIRGARSFSPPRAGRHFYGRVQLQVGNQV I VGAPGEGNSTGSLYQCQSGTGHC
LPVTLRGSNYTSKYLGMTLATDPTDGS I LACDPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFRQNLQGPMLQGRPGFQEC I KGNVDLVFL
FDGMSLQPDFQK I LDFMKDVMKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDFSDYVVKWKDPDALLKHVKHMLLLTNTFGA I NYV
ATEVFREELGARPDATKVL I I TDGEATDSGN I DAAKDI I RY I I G I GKHFKTESQETLHKFASKPASEFVK I LDTFEKL
KDLFTELQKK I YV I EGTSKQDLTSFNMELSSSG I SADLSRGHAVVGAVGAKDWAGGFLDLKADLQDDTF I GNEPLTPEVR
AGYLGTVTWLPSRQKTSLLASGAPRYQHMGRLVLLFQEPQGGGHSVQVQ I HGTQ I GSYFQGGELCGVDVDQDGETELLL I
GAPLFYGEQRGGRVFI YQRRQLGFEEVSELQGDGPYPLGRFGEA I TALTD I NGDGLVDVAVGAPLEEQGVY I FNGRHGG
LSPQPSQR I EGTQVLSG I QWFGRS I HGVKDLGEGDGLADVAVGAESQMI VLSSRPVVDVMTLMSFSPA E I PVHEVECSYST
SNKMKEGVN I TICFQ I KSLYPQFQGRVLNLTYLQLDGHRTRRRGLFPGRHELRRN I AVTTSMSCTDFSHPVVCVQD
L I SP I NVSLNFSLWEEEGTPRDQRAQGD I PPI LRP SLHSETWE I PFEKNCGEDKKCEANLRVSFSPARSRALRLTAFAS
LSVELSLNLEEDAYWVQLDLHFPPGLSFRKVEMLKPHSQ I PVSCPEELPEESRLLSRALSCNVSSP I FKAGHSVALQMMF
NTLVNSSWGDVELHANVTCNNEDSDLLEDNSATT I IP I LYP I N I LI QDQEDSTLYVSFTPKGPK I HQVKHMYQVR I QPS
I HDHN I PTLEAVVGVPPQPPSEGP I THQWSVQMEPPVPCHYEDLERLPDAAEPCLPGALFRCPVFRQE I LVQV I GTLELV
GE I EASSMFSLCSSL I SFNSSKHFLYGSNASLAQVVMKVDVVEKQMLYLYVLSG I GGLLLLLL I F I VLYKVGFFKRN
LKEKMEAGRVPNG I PAEDSEQLASGQEAQDPGCLKPLHEKDSSESGGKD (配列番号30)。
```

40

【 0 1 3 4 】

ヒトLFA-1の サブユニット（ 2）の代表的なアミノ酸配列は次のとおりである (gi|4557886|ref|NP\_000202.1) :

```
MLGLRPPLLALVGLLSLGCVLSECTKFKVSSCREC I ESGPGCTWCQKLNFTGPGDPDS I RCDTRPQLLMRGCAADD I MD
```

50

PTSLAETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLPRGQAAAFNVTFRRAKGYPI DLYYLMDSLVSMLDDLRNVKKGDDLRLALNEI  
 TESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPKLRNCPNKEKECQPPFAFRHVLKLTNNSNQFQTEVKGKQLISGNLDAPEGGLDAM  
 MQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGALITPNDGRCHLEDNLYKRSNEFDYPSVQGLAHKLAENNIQPIF  
 AVTSMVMKTYEKLTEIIPKSAVGESESDSSNVVHLIKNAYNKLSSRVFLDHNALPDTLKVTYDSFCSNGVTHRNQPRGDC  
 DGVQINVPITFQVKVTATECIEQESFVIRALGFTDITVTVQVLPQCECRCRDRSLCHGKGFLECGICRCDTGYIKGN  
 CECQTQGRSSQEELEGSCRKDNNSICSGLGDCVCGQCLCHTSDVPGKLIYGQYCECDTINCERYNGVQCGGPGRLCFCG  
 KCRCHPGFEFSACQCERTTEGCLNPRRVECSGRGRRCNVCECHSGYQLPLCQCECPGCPSPCGKYISCAECLKFEKGPFG  
 KNCSAACPLQLSNNPVKGRTECKERDSEGCWVAYTLEQQDGMDRYLIYVDESRECVAGPNI AAVGGTVAGIVLIGILLL  
 VIWKALIHLSDLREYRRFEKEKLSQWNNDNPLFKSATTTVMNPKFAES (配列番号31)。

【0135】

10

活性型の白血球インテグリンと優先的に結合するタンパク質は、白血球（例えば、活性化された白血球）により媒介される白血球活性および生理学的活性を調節するために使用することができる。かかる結合タンパク質を用いて、白血球の移動、白血球の接着、または炎症を調節（例えば、抑制）することが可能である。

【0136】

インテグリンは、活性型と非活性型の立体配座を含めて、複数の立体配座をとることができる。追加の立体配座中間体も利用可能である。インテグリンの立体配座は、例えばインテグリンのアミノ酸配列を改変することで、一方に偏らせることができる。立体配座の偏りは、インテグリンの1つのドメイン（例えば、インテグリンI-ドメイン、プロペラドメイン）の内部、またはドメイン間、またはサブユニット間に導入しうる。一実施形態では、分子内または分子間ジスルフィド結合を遺伝子工学的に導入することによりインテグリンを改変する。改変インテグリン分子は天然インテグリンの立体配座の模擬体として使用される。

20

【0137】

インテグリン サブユニットのN-末端領域は7つの反復配列（それぞれ約60アミノ酸からなる）を含み、7-ブレードの プロペラドメイン（7-bladed -propeller domain）に折りたたまれていると予想されている（Springer, T A (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:65-72）。白血球インテグリン サブユニット（1、2、10、11、L、M、D、X、およびEサブユニットなど）は、約200アミノ酸の挿入ドメインつまりI-ドメインを含む（Larson, R Sら (1989) J Cell Biol 108:703-712; Takada, Yら (1989) EMBO J 8:1361-1368; Briesewitz, Rら (1993) J Biol Chem 268:2989-2996; Shaw, S Kら (1994) J Biol Chem 269:6016-6025; Camper, Lら (1998) J Biol Chem 273:20383-20389）。このI-ドメインは、プロペラドメインのシート2および3の間に挿入されていると予測される。M、L、1および2 I-ドメインの三次元構造は解明されており、それが金属イオン依存性接着部位(MIDAS)と呼ばれるユニークな二価カチオン配位部位を有するジヌクレオチド結合フォールドをとることがわかっている（Lee, J-0ら (1995) Structure 3:1333-1340; Lee, J-0ら (1995) Cell 80:631-638; Qu, AおよびLeahy, D J (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281; Qu, AおよびLeahy, D J (1996) Structure 4:931-942; Emsley, Jら (1997) J Biol Chem 272:28512-28517; Baldwin, E Tら (1998) Structure 6:923-935; Kallen, Jら (1999) J Mol Biol 292:1-9）。MサブユニットのC-末端領域は サンドイッチ構造に折りたたまれると予想されている（Lu, Cら (1998) J Biol Chem 273:15138-15147）。

30

40

【0138】

US 2002-0123614は、とりわけ、立体配座に偏りのあるインテグリン分子を取得して使用するための典型的な方法を開示している。一実施形態では、インテグリンがジスルフィド結合を用いて特定の立体配座に固定される。タンパク質の立体配座を設計および/または改造するためのコンピュータ使用のアルゴリズムが、例えばWO 98/47089に記載されている。SSBONDプログラム（Hazes, BおよびDijkstra, B W (1988) Protein Engineering 2:119-125）を用いると、適切な位置の残基対をシステインに変異させることによりジスルフィド結合をタンパク質構造中のどの位置に導入できるかを同定することができる。

50

## 【0139】

ジスルフィド結合の形成は、タンパク質の三次元構造内に適切に位置づけられた2個のシステイン残基間で起こりうる。したがって、ジスルフィド結合が形成されるようにアミノ酸配列中に少なくとも1個のシステイン置換を導入することによって、タンパク質を所望の立体配座で安定化させることができる。1個のシステイン置換の導入が実施される状況は、タンパク質の天然のアミノ酸配列の適切な位置に別のシステイン残基が存在してジスルフィド結合が形成される場合である。より一般的には、2個のシステイン置換を、ジスルフィド結合の形成を可能にする位置でタンパク質のアミノ酸配列に導入し、それにより、該タンパク質を所望の立体配座で安定化させる。別の実施形態では、システインで置換される残基のC 炭素間の距離が3.00~8.09 である。さらに別の実施形態では、ジスルフィド結合中のC 炭素間の距離が3.41~7.08 の範囲である。

10

## 【0140】

典型的には、システイン置換は、ジスルフィド結合の形成がタンパク質の1つの立体配座にのみ有利に働き、その結果該タンパク質がその特定の立体配座で安定化されるように導入される。システイン置換は、対象のポリペプチド（例えば、インテグリンポリペプチド）をコードするDNAの突然変異誘発により導入することができる。例えば、改変されたインテグリンI-ドメインポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、コードされたタンパク質に1以上のコドン（例えば、システインコドン）が導入されるように、インテグリン遺伝子のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチド置換を導入することによって、作製することができる。突然変異を核酸配列に導入するには、部位特異的突然変異誘発やPCR媒介突然変異誘発といった標準方法が用いられる。

20

## 【0141】

固定（ロック）された立体配座のインテグリンを取得して使用する別の方法は、例えば、Shimaoka, Mら（2003）Cell 112, 99-111; Shimaoka, Mら（2002）Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 31, 485-516; およびShimaoka, Mら（2001）Proc Natl Acad Sci U S A 98:6009-6014に記載されている。Luoら（2003）Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5):2403-8には、立体配座的に偏りのあるインテグリン（立体配座の優先性を変えるためにグリカン成分を用いている）が記載されている。Luoら, J Biol Chem. 2003 Dec 16（プリント前に電子ジャーナルで公開）, PMID: 14681220には、別の立体配座的に偏りのある、例えばジスルフィドで固定された立体配座が記載されている。

30

## 【0142】

例えば、立体配座的に偏りのあるインテグリンは、開放立体配座または閉鎖立体配座の方に偏りのある（例えば、固定された）改変型インテグリンI-ドメインを含みうる。開放立体配座はインテグリンのコグネイトリガンドと高親和性でもって結合することができる。

## 【0143】

ジスルフィド固定分子は、1個以上（例えば、2個）のシステインコドンを挿入する少なくとも1つのコドン置換を含む核酸配列から得られる。これらのコドンの位置は、システインで置換される残基のC 炭素間の距離が3.00~8.09 の範囲となる（例えば、タンパク質モデリングから予測される）ような位置でありうる。さらなる実施形態においては、ジスルフィド結合におけるC 炭素間の距離は3.41~7.08 の範囲とする。

40

## 【0144】

特定の立体配座、例えば活性型の「開放」立体配座または非活性型の「閉鎖」立体配座、の方に立体配座的に偏りのあるインテグリンI-ドメインの例には、次のものが含まれる。L K287C/K294C、E284C/E301C、L161C/F299C、K160C/F299C、L161C/T300C、およびL289C/K294C突然変異体、ならびに M Q163C/Q309CおよびD294C/Q311C突然変異体は、コグネイトリガンドと高いまたは中間の親和性でもって結合する「開放」立体配座にて安定化され、一方 L L289C/K294C突然変異体と M Q163C/R313C突然変異体はコグネイトリガンドと結合しない非活性型の「閉鎖」立体配座で安定化される。E284C/E301Cのコグネイトリガンドに対する親和性は、K287C/K294Cのそれにほぼ匹敵し、例えば高親和性である。L16

50

1C/F299C、K160C/F299C、およびL161C/T300Cのコグネイトリガンドに対する親和性は、野生型よりも顕著に高いが、高親和性 L I-ドメインであるK287C/K294Cよりも20~30倍低い。L161C/F299C、K160C/F299C、およびL161C/T300Cについては、本明細書では中間親和性 L I-ドメインと呼ぶ。

## 【0145】

LのI-ドメインは、以下の二次構造情報と共に、次のように記載される：

```

1  GNVDLVFLF DGSMSLQPDE FQKILDFMKD VMKKLSNTSY QFAAVQFSTS
      EEEEEEE E BTTS HHH HHHHHHHHHH HHHHTTTSSE EEEEEESSS

50  YKTEFDSDY VKRKDPDALL KHVKHMLLLT NTFGAINYVA TEVFREELGA
      EEESB HHHH HHHTTHHHHT SS      B      HHHHHHHHHH HHTTTGGGT

100 RPDATKVLII ITDGEATDSG NIDAAKDIIR YIIGIGKHFQ TKESQETLHK
      TTSEEEEEEE EE S S      GGGTTSEE EEEE SS      STTTGGGGTT

150 FASKPASEFV KILDTFEKLK DLFTELQKKI      ( 配列番号32 )
      TS SSHHHHE EETTTTTTTTT TTT
  
```

10

20

## 【0146】

例えば、PDB<sup>TM</sup>構造を参照されたい：(1) 1MQA 「リガンドまたは金属の不在下での高親和性 -Iドメインの結晶構造」 (mmdbid:21776)；(2) 1MQ9 「リガンド模倣結晶の接触を伴う高親和性 -Iドメインの結晶構造」 (mmdbid:21775)；(3) 1MQ8 「Icam-1との複合体中の -Iドメインの結晶構造」 (mmdbid:21774)；および(4) 1MJN 「中間親和性AIドメイン突然変異体の結晶構造」 (mmdbid:21755)。

## 【0147】

立体配座的に偏りのあるインテグリン分子は、インテグリン サブユニットからの改変型インテグリンI-ドメイン、つまり全成熟 サブユニット細胞外ドメイン、または全成熟 サブユニットだけを含んでもよいし、かつ/または、インテグリン サブユニット細胞外ドメインおよび/または全サブユニットとさらに会合していてもよい。一実施形態において、改変型インテグリンI-ドメインポリペプチドは可溶性タンパク質であり、例えば、ヘテロ二量体の可溶性タンパク質、または単量体の可溶性タンパク質である。

30

## 【0148】

実験データ (Huang, Cら (2000) J Biol Chem 275:21514-24) によって支持されるインテグリン サブユニットのI-様ドメインのモデルも作られている。このデータから、I-ドメインにおいて劇的な10 の立体配座移動を受ける、重要なC-末端 ヘリックスの位置が確認できる。I-ドメインとI-様ドメインはこの領域においてよくアライメントする。

## 【0149】

aLFA-1結合タンパク質の同定

いくつかの方法を用いて、aLFA-1や他の活性インテグリンと結合するタンパク質を同定することができる。こうした方法の多くは立体配座的に偏りのあるインテグリンタンパク質を標的として用いる。

40

## 【0150】

aLFA-1と結合する抗体を同定するための1つの代表的な方法は、立体配座的に偏りのあるLFA-1タンパク質またはその立体配座的に偏りのあるドメインを用いて、ヒト以外の動物 (非ヒト動物) を免疫することを含む。免疫した動物から脾細胞を単離して、これを用いて標準方法によりハイブリドーマ細胞を作製することができる。一実施形態において、非ヒト動物は1以上のヒト免疫グロブリン遺伝子を含むものである。

## 【0151】

50

aLFA-1と結合するタンパク質を同定するための別の代表的な方法は、タンパク質のライブラリーを用意し、そのライブラリーから、立体配座的に偏りのある分子（例えば、立体配座的に偏りのあるインテグリン、例えばaLFA-1）と結合する1以上のタンパク質を選択することを含む。この選択はいくつかの方法で行うことができる。例えば、ディスプレイライブラリーまたはタンパク質アレイの形のライブラリーを用意する。選択に先だって、非標的分子（例えば、非活性型立体配座のLFA-1分子）と相互作用するメンバーを除くためにライブラリーのプレスクリーニング（例えば、枯湯）を行ってもよい。

【0152】

立体配座的に偏りのある標的分子は、タグを付けて、組換えにより発現させることができる。一実施形態では、立体配座的に偏りのある標的分子を精製して、支持体、例えばアフィニティービーズ、または常磁性ビーズもしくは他の磁気応答性粒子に結合させる。

10

【0153】

立体配座的に偏りのある標的分子はまた、細胞の表面に発現させることもできる。その細胞と特異的に結合するディスプレイライブラリーのメンバーを選択する。また、インテグリンの内在性または他の野生型形態を使用することも可能である。例えば、インテグリンが活性化されたときだけ、細胞と特異的に結合するディスプレイライブラリーのメンバーを選択することができる。

【0154】

発現ライブラリー

一実施形態においては、活性型立体配座のインテグリン（例えば、aLFA-1）と結合するタンパク質を同定するために、ディスプレイライブラリーや他の発現ライブラリーを利用する。ディスプレイライブラリーは構成要素のコレクションであり、各構成要素はアクセス可能なタンパク質成分（例えば、FabまたはscFv）と、そのタンパク質成分をコードするかまたは識別する回収可能な成分（例えば、核酸）を含む。タンパク質成分はどのような長さのものであってもよく、例えば、3アミノ酸から300アミノ酸以上でありうる。選択に際しては、ライブラリーの各メンバーのタンパク質成分を、立体配座的に偏りのあるインテグリンタンパク質でプロービングし、タンパク質成分が該タンパク質と結合する場合には、ディスプレイライブラリーのそのメンバーを、例えば支持体上に保持させて、同定する。タンパク質成分は1以上の免疫グロブリン可変ドメインまたは別のドメインの変異体を含みうる。免疫グロブリンドメインのライブラリーを作製する方法は周知である。例えば、2004年2月19日付けの米国特許出願第60/546,354号、US 2004-0005709、およびUS 2002-0102613を参照されたい。

20

30

【0155】

ディスプレイライブラリーの保持されたメンバーを支持体から回収して分析する。分析には、増幅と、その後の同様の条件または異なる条件下での選択が含まれる。例えば、正の選択と負の選択を交互に行うことができる。分析はまた、タンパク質成分のアミノ酸配列の解析と、詳細な特性決定のための該タンパク質成分の精製を含みうる。

【0156】

ディスプレイライブラリーには様々なフォーマットが利用される。例としては以下のものが含まれる。

40

【0157】

ファージディスプレイ： 1つのフォーマットはウイルス、特にバクテリオファージを利用する。このフォーマットは「ファージディスプレイ」と呼ばれている。通常、タンパク質成分はバクテリオファージのコートタンパク質に共有結合で連結される。この連結は、コートタンパク質に融合されたタンパク質成分をコードする核酸の翻訳から生じる。この連結部は柔軟性のペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、または終結コドンの抑制の結果として組み込まれるアミノ酸を含んでいてもよい。ファージディスプレイは、例えば、以下の文献に記載されている： U.S. 5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haardら (1999) J. Biol. Chem 274:18218-30; Hoogenboo

50

mら (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; およびHoogenboomら (2000) *Immunol Today* 2:37 1-8。

【0158】

ファージディスプレイ系は糸状ファージ（ファージf1、fd、およびM13）や他のバクテリオファージについて開発されている。糸状ファージディスプレイ系は通常、バクテリオファージの表面上にタンパク質成分を提示させるために、マイナーなコートタンパク質（例えば、遺伝子III）への融合体を利用する。ディスプレイされるタンパク質を、非ペプチド結合を介して、コートタンパク質に物理的に会合させることも可能である。

【0159】

タンパク質成分をディスプレイしているバクテリオファージは、増殖させてから、標準的なファージ調製方法（例えば、増殖培地からのPEG沈降）を用いて回収することができる。個々のディスプレイファージの選択後、選択されたタンパク質成分をコードする核酸を、増幅後に、選択したファージを感染させた細胞から、またはファージそれ自体から単離することができる。個々のコロニーまたはプラークを拾い上げ、核酸を単離して配列決定する。

【0160】

他のディスプレイフォーマット： その他のディスプレイフォーマットには次のものが含まれる：細胞に基づくディスプレイ（例えば、WO 03/029456参照）、タンパク質-核酸融合体（例えば、US 6,207,446参照）、およびリボソームディスプレイ（例えば、Mattheakisら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022; Hanesら (2000) *Nat Biotechnol.* 18:1287-92; Hanesら (2000) *Methods Enzymol.* 328:404-30; ならびにSchaffitzelら (1999) *J Immunol Methods.* 231(1-2):119-35参照）。

【0161】

エピトープ特異的結合タンパク質： ディスプレイ技術を使用して、標的とする特定のエピトープに結合する結合タンパク質（例えば、抗体）を得ることもできる。エピトープは「立体配座」エピトープまたは「配列」エピトープとして分類される。立体配座エピトープは、たとえアミノ酸同士がその配列中で実質的に離れている（例えば、少なくとも1、2、4、6、8、または10アミノ酸だけ離れている）としても、適切に折りたたまれた標的の中に一定の相対配向を有するアミノ酸残基類を含む。配列エピトープは、タンパク質の折りたたみ状態が何であれ（例えば、天然の状態、またはほどけた状態）、抗体と結合するポリペプチド鎖の短鎖部分を含む。立体配座エピトープに対する結合タンパク質は、例えば、その特定のエピトープを欠くかまたはエピトープ内部で（例えば、アラニンにより）突然変異を起こしている競合性の非標的分子を使用することによって、同定することができる。そのような非標的分子は、以下に記載する負の選択法において、標的にディスプレイライブラリーを結合させるときの競合分子として、あるいは、例えば標的に特異的でないディスプレイライブラリーの解離しているメンバーを洗浄溶液中で捕獲するために、予備溶出剤として、使用することができる。別の実施形態では、エピトープ特異的結合タンパク質は、ディスプレイライブラリーのメンバーを、標的分子上の対象のエピトープと結合する競合結合タンパク質と共に溶出することにより同定される。配列エピトープと結合する結合タンパク質は、例えば標的タンパク質中に存在するアミノ酸配列を有する短いペプチドを用いて、選択することができる。往々にして、立体配座エピトープと結合する結合タンパク質は、その立体配座エピトープに関係するアミノ酸類のいくつかを含むペプチドとも弱く結合する。したがって、非常に低いストリンジェンシーでペプチドとの結合を選択してから、折りたたまれた標的タンパク質との結合を選択することができる。

【0162】

抗体親和性成熟： 一実施形態においては、標的と結合する結合タンパク質は、修飾された結合タンパク質のプールを得るために、例えば突然変異誘発により、修飾することができる。その後、修飾結合タンパク質を評価して、改変された機能特性（例えば、結合性の向上、安定性の向上、in vivoでの安定性の長期化）を有する1以上の改変型結合タンパク質を同定する。ある実施形態では、ディスプレイライブラリー技術を使用して、修飾結

10

20

30

40

50

合タンパク質のプールを選択またはスクリーニングする。その後、第2のライブラリーから、例えばより高いストリンジェンシーまたはより競合的な結合・洗浄条件を用いて、より高い親和性の結合タンパク質を同定する。他のスクリーニング法を使用してもよい。

【0163】

いくつかの実施形態では、突然変異誘発が、結合境界面にあると分かっている領域または結合境界面にあるらしい領域に向けられる。例えば、同定した結合タンパク質が抗体である場合には、突然変異誘発が本明細書に記載する重鎖もしくは軽鎖のCDR領域に向けられる。さらに、突然変異誘発を、CDRに近いまたは隣接したフレームワーク領域（例えば、特にCDR接合部から10、5、または3アミノ酸内にある、フレームワーク領域）に向けすることもできる。抗体の場合には、例えば段階的改善を行うために、突然変異誘発を1つまたは2,3のCDRに限定してもよい。

10

【0164】

一実施形態では、1以上の生殖系列（germline）配列とより類似している抗体を作るために突然変異誘発が使用される。1つの代表的な生殖系列化（germlining）法は以下のステップを含みうる。すなわち、単離した抗体の配列と類似している（例えば、特定のデータベースにおいて最も類似している）1以上の生殖系列配列を同定し、次にその単離した抗体に（アミノ酸レベルで）突然変異を漸増的に、組み合わせで、またはその両方にて起こさせる。例えば、一部または全部の可能な生殖系列変異をコードする配列を含む核酸ライブラリーを作製する。その後、突然変異させた抗体を評価して、例えば、単離した抗体と比べて1個以上の追加の生殖系列残基を有し、しかもまだ有用である（例えば、機能活性をもつ）抗体を同定する。一実施形態では、単離した抗体に可能なかぎり多くの生殖系列残基を導入する。

20

【0165】

一実施形態では、突然変異誘発がCDR領域に1個以上の生殖系列残基を挿入または置き換えて使用するために用いられる。例えば、生殖系列CDR残基は、改変される可変領域と類似している（例えば、最も類似している）生殖系列配列由来でありうる。変異誘発後、抗体の活性（例えば、結合活性や他の機能活性）を評価して、その生殖系列残基（類）が許容されるかを確認することができる。同様の突然変異誘発をフレームワーク領域で行ってもよい。

【0166】

生殖系列配列の選択は様々な方法で行うことができる。例えば、生殖系列配列は、それが予め決められた選択性または類似性の基準を満たすならば、選択されうる。その基準は、例えば、ある特定の同一性パーセント、例えば少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または99.5%の同一性である。選択は少なくとも2、3、5、または10の生殖系列配列を用いて行う。CDR1とCDR2の場合には、類似の生殖系列配列を同定することが、1つのそのような配列を選択することを含みうる。CDR3の場合には、類似の生殖系列配列を同定することが、1つのそのような配列を選択することを含みうるが、アミノ末端部分とカルボキシ末端部分に別々に寄与する2つの生殖系列配列を使用することを含んでいてもよい。他の実施形態では、例えばコンセンサス配列を形成するために、1より多いまたは2つの生殖系列配列を使用する。

30

40

【0167】

一実施形態では、特定の参照可変ドメイン配列（例えば、本明細書に記載の配列）に関して、関連した可変ドメイン配列は、ヒト生殖系列配列（すなわち、ヒト生殖系列核酸によりコードされるアミノ酸配列）中の対応する位置の残基と同一の残基である、参照CDR配列中の残基と同一でないCDRアミノ酸位置を少なくとも30、40、50、60、70、80、90、95、または100%有する。

【0168】

一実施形態では、特定の参照可変ドメイン配列（例えば、本明細書に記載の配列）に関して、関連した可変ドメイン配列は、ヒト生殖系列配列（例えば、参照可変ドメイン配列に関係した生殖系列配列）由来のFR配列と同一のFR領域を少なくとも30、50、60、70、80

50

、90、または100%有する。

【0169】

したがって、対象の抗体に類似した活性を有するが、1以上の生殖系列配列（特に、1以上のヒト生殖系列配列）にさらに類似している抗体を単離することが可能である。例えば、抗体はCDRの外側にある領域（例えば、フレームワーク領域）の生殖系列配列と少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5%同一でありうる。さらに、抗体はCDR領域中に少なくとも1、2、3、4、または5個の生殖系列残基を含んでいてもよく、その生殖系列残基は改変される可変領域に類似している（例えば、最も類似している）生殖系列配列に由来するものである。主に関心のある生殖系列配列はヒト生殖系列配列である。抗体の活性（例えば、結合活性）はもとの抗体の100、10、5、2、0.5、0.1、および0.001倍の範囲内でありうる。代表的な生殖系列配列としては、VKI-02、VL2-1、VKIII-L2::JK2、vg3-23、V3-23::JH4、およびV3-23::JK6が挙げられる。

10

【0170】

いくつかの代表的な突然変異誘発法には次のものが含まれる：エラープローンPCR (Leungら(1989) Technique 1:11-15)、組換え(例えば、USSN 10/279,633参照)、ランダム切断を用いるDNAシャフリング(Stemmer (1994) Nature 389-391; 「核酸シャフリング」と呼ばれる)、RACHITT™ (Cocoら(2001) Nature Biotech. 19:354)、部位特異的突然変異誘発(Zollerら(1987) Nucl Acids Res 10:6487-6504)、カセット突然変異誘発(Reidhaar-Olson (1991) Methods Enzymol. 208:564-586)、および縮重オリゴヌクレオチドの組み込み(Griffithsら(1994) EMBO J 13:3245)。

20

【0171】

抗体親和性成熟の一例では、本明細書に記載の方法を用いて、初めに、標的に対して少なくとも最小の結合特異性または最小の活性（例えば、1nM、10nM、または100nM未満の結合に対する平衡解離定数）でもってaLFA-1と結合する、ディスプレイライブラリーからの結合タンパク質を同定する。最初に同定した結合タンパク質をコードする核酸配列を変異導入用の鋳型核酸として用いて、例えば、最初の結合タンパク質と比べて向上した特性（例えば、結合親和性、反応速度、または安定性）を有する第2の結合タンパク質を同定する。あるいはまた、1以上のCDRのアミノ酸配列を核酸ライブラリー設計用のガイドとして用いることができ、かかる核酸ライブラリーは単離された配列と多くの近隣配列をコードする核酸を含む。そのような多種多様な核酸を最初の単離物を含むディスプレイベクター中に導入することができ、そのライブラリーから改善された変異体を選択する。

30

【0172】

off-rate選択：遅い解離速度は、特にポリペプチドとその標的との相互作用に関して、高親和性を予測させるので、本明細書に記載の方法を用いて、標的との結合相互作用について所望の（すなわち、低下した）解離速度を有する結合タンパク質を単離することができる。

【0173】

ディスプレイライブラリーからゆっくり解離する結合タンパク質を選択するために、そのライブラリーを固定化した標的と接触させる。次に、固定化標的を、非特異的にまたは弱く結合した生体分子を除去する第1溶液で洗浄する。その後、固定化標的を、飽和量の遊離標的（すなわち、粒子に結合されていない標的の複製）を含む第2溶液により溶出する。遊離標的が標的から解離した生体分子と結合する。再結合は、かなり低濃度の固定化標的に対して飽和量の遊離標的によって効果的に防止される。

40

【0174】

第2溶液は、実質的に生理的なまたはストリンジェントな溶液条件とすることができる。一般的には、第2溶液の溶液条件は第1溶液の溶液条件と同一である。第2溶液のフラクションを回収して、時間的に速いフラクションと遅いフラクションとを区別する。より遅いフラクションは、速いフラクション中の生体分子よりも遅い速度で標的から解離する生体分子を含んでいる。

【0175】

50

さらに、インキュベーション時間を延長させた後でも標的と結合した状態で残っているディスプレイライブラリーのメンバーを回収することも可能である。これらはカオトロピック条件を用いて解離させることができ、また、標的に結合させたままで増幅することもできる。例えば、標的と結合したファージを細菌細胞に接触させることができる。

#### 【0176】

特異性の選択およびスクリーニング：ディスプレイライブラリーの状況のもとで、「選択」とは、ディスプレイライブラリーの多くのメンバーを標的と接触させて、結合するものを回収して増やすプロセスをさす。選択は、無数のメンバー（例えば、 $10^{10}$ を超えるメンバー）を含むライブラリーから行うことができる。ディスプレイライブラリーの状況のもとで、「スクリーニング」とは、ライブラリーの単離されたメンバーを標的との結合について1つずつ試験するプロセスをさす。自動化によって、何千もの候補を多くの並列プロセスでスクリーニングしうる。本明細書に記載するディスプレイライブラリー選択法には、非標的分子と結合するディスプレイライブラリーのメンバーを廃棄する選択プロセスを含めてもよい。

10

#### 【0177】

非標的分子（例えば、LFA-1結合抗体に対するもの）の例には、例えば、LFA-1以外のインテグリンが含まれる。LFA-1結合抗体（例えば、活性型LFA-1と優先的に結合する抗体）に対する別の例では、非標的分子は活性型以外の立体配座（例えば、非活性型立体配座）のLFA-1分子でありうる。

#### 【0178】

一実施形態においては、いわゆる「負の選択」ステップを用いて、標的と、関連した非標的分子と、関連するが明らかに異なる非標的分子とを区別する。ディスプレイライブラリーまたはそのプールを非標的分子と接触させる。非標的に結合しないサンプルのメンバーを回収して、標的分子との結合についての後続の選択に用いるか、または後続の負の選択にさえも使用する。負の選択ステップは、標的分子と結合するライブラリーのメンバーを選択する前であっても後であってもよい。

20

#### 【0179】

別の実施形態では、スクリーニングステップを用いる。標的分子との結合についてディスプレイライブラリーのメンバーを選択して単離した後、それぞれの単離したライブラリーメンバーを、非標的分子（例えば、先に挙げた非標的）と結合するその能力について試験する。例えば、このデータを得るには、ハイスループットELISAスクリーニングを利用しうる。また、このELISAスクリーニングを使用すると、ライブラリーメンバーの標的への結合についての定量的データを得ることもできる。非標的および標的と結合するデータを比較して（例えば、コンピュータとソフトウェアを使用）、aLFA-1と特異的に結合するライブラリーメンバーを同定する。

30

#### 【0180】

本明細書に記載するディスプレイライブラリーの選択およびスクリーニング法は、標的分子上の特定の部位に結合するディスプレイライブラリーのメンバーを選択する選択またはスクリーニングプロセスを含みうる。例えば、本明細書に記載する抗体を高濃度で用いる溶出は、そのような抗体によって結合されたエピトープと結合するファージを選択する。aLFA-1の特定のエピトープと結合するファージは、バッファー中で該エピトープを認識する競合抗体の存在下および不在下でELISAを行うことによって、スクリーニングすることができる。

40

#### 【0181】

##### 二次スクリーニング法

ディスプレイライブラリーを用いて、標的と結合する候補ディスプレイライブラリーメンバーを選択することができる。そのような各候補ディスプレイライブラリーメンバーまたはaLFA-1結合タンパク質を、例えば標的に対するその結合特性についてさらに特徴づけるために、さらに分析する。各候補ディスプレイライブラリーメンバーを1回以上の二次スクリーニングアッセイに供する。そのアッセイは、結合特性、生理学的特性（例えば、

50

細胞毒性、腎クリアランス、免疫原性)、構造的特性(例えば、安定性、立体配座、オリゴマー化状態)、または別の機能特性(例えば、白血球などのインテグリン発現細胞の活動を調節する能力、または炎症もしくは炎症関連反応を調節する能力)のためでありうる。同じアッセイを、条件を変えて、繰り返し行うことにより、例えばpH、イオンまたは熱感受性を調べることができる。

#### 【0182】

適宜に、アッセイにおいて、ディスプレイライブラリーメンバーを直接使用したり、ディスプレイされたポリペプチドをコードする核酸から得られた組換えポリペプチド、またはディスプレイされたポリペプチドの配列に基づいて合成された合成ペプチドを使用することができる。任意の供給源からの候補aLFA-1結合タンパク質の場合には、そのタンパク質を、例えばそのような供給源から、または組換え生産によって、取得することができる。結合特性についての代表的アッセイには次のものが含まれる。

#### 【0183】

##### 代表的な生物学的アッセイ

候補aLFA-1結合タンパク質は、その活性についてin vitroで(例えば、無細胞系もしくは細胞系で)またはin vivoで(例えば、下記のモデル動物で)評価することができる。例えば、前記タンパク質を、LFA-1発現細胞の活性(例えば、LFA-1発現細胞の結合活性)を阻害するその能力について評価する。別の例では、前記タンパク質を、活性型LFA-1を提示する細胞をターゲティングするその能力について評価する。

#### 【0184】

LFA-1発現細胞のコグネイトリガンドへの結合は、例えば細胞アッセイを用いて、評価することができる。ICAM-1は、例えば白血球、内皮、および皮膚繊維芽細胞上に発現され(Dustinら, J. Immunol. 137: 245-254 (1986))、ICAM-2は静止している内皮およびリンパ球に発現され(de Fougerollesら, J. Exp. Med. 174: 253-267 (1991))、そしてICAM-3は単球および静止リンパ球に発現される(de Fougerollesら, J. Exp. Med. 179: 619-629 (1994))。したがって、LFA-1発現細胞と、他の白血球、内皮細胞、単球、および皮膚繊維芽細胞との間で細胞接着アッセイ(例えば、蛍光標識した細胞を使用)を行うことができる。

#### 【0185】

ICAM結合に関する別の代表的アッセイは次のとおりである。ICAM-1をヒト扁桃腺から精製し、以前に記載されたように96ウェルプレートにコーティングする(LuおよびSpringer, (1997) J Immunol 159:268-278)。LFA-1発現細胞は、蛍光色素2',7'-ビス-(カルボキシエチル)-5(および-6)-カルボキシフルオレセイン・アセトキシメチルエステル(BCECF-AM)で標識し、L15/FBS中に約 $1 \times 10^6$ 個/mlで再懸濁させる。50  $\mu$ lの細胞懸濁液を、ICAM-1コーティングウェル内で、試験化合物(例えば、候補aLFA-1結合タンパク質)の不在または存在下で等量のL15/FBSと混合する。このアッセイは、活性化するモノクローナル抗体(CBRLFA-1/2、10  $\mu$ g/ml)の存在下および不在下で行ってもよい。

#### 【0186】

二価カチオンの影響を調べるため、BCECF-AM標識細胞を、5mM EDTAを含有するTSバッファー、pH7.5 (20mM Tris, pH 7.5、150mM NaCl)を用いて2回洗浄し、続いてTSバッファー、pH7.5で2回洗浄する。その後、細胞を、1mM  $MgCl_2$ および他の二価カチオンおよび2mM EDTAを添加したTSバッファー、pH7.5中に $5 \times 10^5$ 個/mlで再懸濁させた。100  $\mu$ lの細胞懸濁液をICAM-1コーティングウェルに添加する。37  $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした後、未結合の細胞をMicroplate AUTOWASHER<sup>TM</sup>(Bio-Tek Instruments, Winooski, Vt.)で洗い流す。各ウェル中の総投入細胞および結合細胞の蛍光量をFluorescent Concentration Analyzer (IDEXX, Westbrook, Me.)で定量する。結合細胞の数は、サンプルウェルあたりの総投入細胞に対するパーセントとして表すことができる。

#### 【0187】

以下の代表的アッセイは、LFA-1に依存する細胞-細胞相互作用をモジュレートする試験化合物の能力に及ぼす試験化合物(例えば、aLFA-1結合タンパク質)の効果を評価するも

10

20

30

40

50

のである。このアッセイでは、マウスLFA-1およびICAM-1を両方とも発現し、かつPMAによる活性化の際にLFA-1依存的ホモタイプ凝集を示すリンパ腫細胞系EL-4を使用する。細胞を96ウェルプレートで50ng/ml PMAおよび変化量の試験化合物の存在下にインキュベートする。37℃、5% CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートした後、凝集の程度を顕微鏡で観察して、次のようにスコアで評価した：0は、実質的にどの細胞もクラスター化していないことを示す；1は、10%未満の細胞が凝集していることを示す；2は、50%未満のクラスター化を示す；3は、最大100%の細胞が小さくゆるく凝集していることを示す；4は、ほぼ100%の細胞が大きなクラスターとして存在することを示す；5は、ほぼ100%の細胞が非常に大きい緻密なクラスターとして存在することを示す。

#### 【0188】

さらに別の代表的アッセイは、*in vivo*でLFA-1機能を阻害する試験化合物の能力を評価するものである。このアッセイは、生体内顕微鏡検査で末梢リンパ節(LN)の微小循環系を視覚化することを含む。簡単に述べると、TGFβマウスからのLN細胞懸濁液の小ボラス(20~50 μl)を大腿動脈カテーテルから逆方向に注入し、ビデオトリガーキセノンアークストロボスコープからの蛍光エピイルミネーションによって腸骨下部のLNにおいて視覚化する。試験化合物の不在下での対照TGFβ細胞挙動を記録した後、T<sup>GFP</sup>細胞注入の5分前に試験化合物(例えば、所望の濃度で)の動脈内注入によってマウスを前処理した。そのシーンをビデオテープに記録し、オフライン解析を行った。回転フラクションは、細静脈に入ったTGFβ細胞の総数に対する回転細胞数のパーセントとして計算する。粘着(強固な接着)フラクションは、細静脈内で回転するT<sup>GFP</sup>細胞の数のうち20秒未満の間に強固に接着性になったT<sup>GFP</sup>細胞のパーセントとして求めることができる。結果は次のように半定量的にスコアで評価される。-: 0%、+ -: 0~5%、+: 5~20%、++: 20~40%、+++ : 40~60%、++++: 60~80%、+++++: 80~100%。

#### 【0189】

血管内皮は、単球/顆粒球が接着、血管外遊出、および分化の際に相互作用することのできる基層である。血管壁と単球/顆粒球の相互作用に関する*in vitro*アッセイは、放射性標識したまたはフルオレセイン標識した単球/顆粒球調製物を血管内皮培養物に結合させることから成り、Arnaoutら、*J. Cell Physiol.* 137:305 (1988)に記載されている。Mentzerら、*J. Cell Physiol.* 125:285 (1986)には、リンパ球接着アッセイが記載されている。顆粒球凝集アッセイは、Arnaoutら、*New Engl. J. Med.* 306:693 (1982)に記載されたとおりに行うことができる。凝集はザイモサン(zymosan)活性化自己由来血清により、または走化性ペプチド(例えば、FMLP)を用いて誘導することができる。その後、血小板アグレゴメーター(aggregometer)を使って、光透過の漸増変化として凝集を記録する。これらの結果は位相差顕微鏡で確認することができる。走化性は、例えばDanaら、*J. Immunol.* 137:3259 (1986)に記載されるように、評価することができる。

#### 【0190】

タンパク質(例えば、本明細書に記載の抗体)はまた、炎症もしくは炎症性疾患を調節する能力について培養下で評価することも可能である。例えば、細胞培養を利用して白血球の接着をモニタリングする。化合物を固相表面に固定させ、接着分子を発現している細胞の接着を、該表面との相互作用について評価する。このアッセイに適している細胞として、白血球、例えばT細胞、B細胞、単球、好酸球、および塩基球が挙げられる。代表的な白血球細胞系としては、JurkatおよびU937細胞が含まれる。

#### 【0191】

一実施形態においては、タンパク質(例えば、本明細書に記載の抗体)が、本明細書に記載するアッセイにおいて統計的に有意な効果を有する。タンパク質についてのアッセイは、適宜に、対応する対照アッセイ、例えば1以上の成分(例えば、試験化合物、特定の細胞、特定の抗体、カチオンなど)を含まないアッセイと比較してもよい。

#### 【0192】

#### モデル動物

aLFA-1結合タンパク質はモデル動物、例えば炎症性疾患、過剰なLFA-1活性により特徴

10

20

30

40

50

づけられる疾患、またはLFA-1により媒介される疾患のためのモデル動物で評価することができる。

【0193】

乾癬用のモデル動物はいくつか利用可能である。インテグリン結合タンパク質（例えば、本明細書に記載のaLFA-1結合タンパク質）の有効性は、乾癬のモデル動物、例えばBNX移植乾癬皮膚モデルで試験することができ、このモデルはWrone-Smithら（1996）*J Clin Invest.* 98(8):1878-87 に記載されている。さらなる例としては、次のものが含まれる。Schonら（1997）*Nat Med.* 3:183-8 は、マウス乾癬様疾患をもつマウスを記載している。このマウスは、ナイーブCD4<sup>+</sup> T細胞を用いてscid/scidマウスを再構成することにより作られた。その他の乾癬用のモデルマウスも免疫不全動物を利用している。Sugaiら（1998）*J Dermatol Sci* 17:85-92 では、ヒト乾癬病巣がscidマウスに移植された。Yamamotoら（1998）*J Dermatol Sci* 17:8-14 は、重症複合免疫不全(scid)マウスに移植した全厚乾癬皮膚の下に、黄色ブドウ球菌毒素Bで刺激したリンパ球を皮下に注入することを記載している。Sundbergら（1997）*Pathobiology* 65(5):271-86 は、乾燥肌（flaky skin: fsn）突然変異マウスにおける乾癬型皮膚炎および全身障害の発生ならびに進行を記載している。flaky skin (fsn) 突然変異マウスは、血液の異常を伴う乾癬のモデルマウスとして記載されている。Hongら（1999）*J. Immunol.* 162:7480-7491 は、乾癬の別のモデル動物を記載している。US 6,410,824 は、免疫不全宿主動物に、ナイーブ免疫担当Tリンパ球を、少なくとも1つの前炎症性サイトカインおよびポリクローナル活性化剤と共に導入することによって、モデル動物を作ること記載している。移植されたT細胞は宿主動物の主要組織適合抗原に寛容であるが、1以上の副組織適合遺伝子座でミスマッチがある。移植を受けた動物は、ヒト乾癬に認められる組織学的特徴（例えば、乳頭間隆起、重症の表皮肥厚、および真皮へのTh1細胞の浸潤）を含む慢性皮膚疾患を発病する。

【0194】

US 6,462,020 は、関節炎の代表的なモデルマウスであるタイプIIコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルマウスを記載している。このモデルマウスを使用すると、タイプIIコラーゲン誘導関節炎の組織学的、X線撮影的、臨床的様相に対するaLFA-1結合タンパク質の効果を評価することができる。マウスCIAに発生する関節炎病変の組織病理学は、ヒト患者の慢性関節リウマチ（RA）の組織病理学と多くの点で類似している。マウスCIAはRAの可能性のある治療処置を研究する上で有用なモデルである。

【0195】

以下は代表的なモデルCIAマウスである。材料および方法：この研究には体重25gのDBA/1(2)雌マウス（Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me. またはB&K Universal, Kent Wash.）を使用する。この系統のマウスは異種タイプIIコラーゲンの注入によってCIAに罹りやすい。ウシコラーゲン（BC）、完全フロインドアジュバント（CFA）および不完全フロインドアジュバント（ICFA）はSigma Chemicalから得ることができる。免疫用の抗原は0.1M酢酸中で処理し、CFAまたはICFAを用いて製剤化した。

【0196】

関節炎の誘導。免疫感作プロトコル：研究期間中、予め決められた間隔においてCFA中のタイプIIコラーゲン100µgをマウスに注入する。

【0197】

このマウスを、予め決められた間隔で関節炎の発症について検査する。推定される関節炎の証拠としては、2回の連続した観察により認められる前肢および/または後肢の少なくとも1つの指関節の腫脹および紅斑がある。

【0198】

関節炎の確認診断。関節の組織学的検査：適当な間隔において犠牲にした動物の足指関節を取り出し、固定し、脱石灰化し、パラフィンに包埋し、切片とし、染色して、一般的な細胞と構造の特徴を観察し、適宜に、各関節のパンヌスの軟骨マトリックスを検出する。組織の顕微鏡写真のデジタル化を利用して、また、上記のような標準エリア・ポイントカウント法を適用して、細胞充実度および炎症領域を定量化する。

## 【 0 1 9 9 】

指関節のX線像評価は、タイプIIコラーゲンで免疫した後の関節変化の発生を検出するために、この研究のためにマンモグラフィイメージング装置を改良した。関節の軟組織（パルス）の平均面積を、コンピュータデジタル化X線写真の解析により測定し、同時に、隣接する硬組織の密度変化を、各X線写真を撮るときに含めた内部標準との比較により測定する。変化する硬組織密度およびパルス面積のためのベースライン対照として、追加のマウスを同一期間にわたって使用し、密度および面積のデータを比較する。対照マウスと実験マウスの密度および面積の差の有意性は、各時点での両側t検定を用いて評価する。

## 【 0 2 0 0 】

関節炎の評価。関節炎の発症について動物を毎日観察する。各肢の併発の重症度を0から4のスケールで等級づけることにより関節炎指数を出す。スコアは関節周辺の紅斑および浮腫の程度、ならびに関節の変形に基づく。内側から外側のくるぶしまでの足首の太さを一定張力のカリパスで測定することにより、後肢の腫脹も定量化する。

## 【 0 2 0 1 】

US 2003-0161810 は、炎症性疾患（慢性関節リウマチを含む）のためのヒト以外のモデル動物を提供する。そこに記載される動物はヒト滑液を含む。US 2003-0176389 は、デキストラ硫酸ナトリウム誘導大腸炎のモデルマウスを記載している。

## 【 0 2 0 2 】

aLFA-1結合タンパク質は、好中球の移動に及ぼす効果についてアッセイすることができる。好中球移動のための1つのモデルはマウスチオグリコール酸誘導腹膜炎である。チオグリコール酸をマウスの腹腔内に注射し、その直後に試験すべきタンパク質を、例えば腹腔内または皮下に、投与する。マウスを4時間後に犠牲にし、腹腔を洗浄して、洗浄液中の好中球の総数を数える。

## 【 0 2 0 3 】

aLFA-1結合タンパク質は、虚血/再灌流障害に及ぼす効果についてアッセイすることができる。前記タンパク質を、例えば心臓虚血/再灌流障害のモデル (Abdeslam Oubenaissaら, *Circulation*, 94, Suppl. II, 254-258, 1996) で試験する。このタンパク質を次のように試験することもできる：

マウスをaLFA-1結合タンパク質または対照で処置する。体重20~25gのマウスをイソフルランで麻酔し、右腎臓の管を微小血管クランプで60分間締め付ける。60分の虚血後、微小血管クランプを取り除く。左腎臓の管（腎動脈、静脈および尿道）は4-0外科用縫合糸を使って結紮する。左（非虚血）腎臓を取り出し、腹腔を3-0外科用縫合糸で閉じる。対照群にも虚血群と同じ手順を施すが、右腎臓の管の締め付けを行わない。

## 【 0 2 0 4 】

再灌流の24時間後、1週間後、および2週間後にCO<sub>2</sub>吸入により動物を犠牲にする。犠牲にした直後に、0.04mlの7.5% K<sub>3</sub> EDTA溶液を入れた3.0ml VACUTAINER™チューブ(Becton-Dickenson)中に血液サンプルを心臓穿刺により回収する。血漿を分離して、さらなる分析に供するまで-20 で保存する。血漿クレアチンと血液尿素窒素（BUN）を分析する。犠牲後、腎臓を生理食塩水でフラッシュ洗浄し、直ちに液体窒素中で瞬間凍結させ、分析まで-70 で保存する。腎臓のミエロペルオキシダーゼ活性(MPO)は、Bradleyらの方法 (*J. Invest. Dermatol.*, 78, 206-209, 1982)に従って測定することができる。

## 【 0 2 0 5 】

aLFA-1結合タンパク質は、血管新生化異所心臓移植に及ぼす効果についてアッセイすることができる。受容マウスをaLFA-1結合タンパク質または対照で処置する。マウスドナー心臓を受容マウスの腹部血管に移植する：11/0 Ethilon (Ethicon, Norderstedt, Germany)連続縫合糸を用いるend-to-side吻合により腕頭動脈を大動脈に、右肺動脈を下大静脈に吻合連結する。動物を6/0 Vicryl (Ethicon)で2層に閉じ、完全に回復するまで温かく保持した。全体的な虚血時間は40~50分の範囲であり、そのうち25~35分を4 とする。吻合（10~15分）中は移植片を冷やしておく。

10

20

30

40

50

## 【0206】

移植後、移植片の鼓動を毎日評価（触診）して、移植片の機能をモニタリングする。拒絶反応は、心臓の鼓動が停止したときに、完全であるとみなす。全ての実験において、移植片の組織学的検査により拒絶を確認する。

## 【0207】

イヌの心筋梗塞に伴う再灌流障害についての代表的アッセイは、例えば、Simpsonら, *J. Clin. Invest.* 81:624 (1988) に記載されている。Takeshimaら, *Stroke*, 23(2):247-252 (1992) は、ネコの一過性局所脳虚血モデルを記載している。Takeshimaらは、微小血管クリップを用いてMCAを閉塞し、前もって配置した結紮糸を引き締めることによってCCAを閉塞した。Lindsbergら *J. Neurosurg.* 82:269-277 (1995) は、重症の脊髄虚血（腹部大動脈に導入しておいたカテーテル先端のバルーンをふくらますことによる）のモデルウサギを記載している。さらなる追加のモデルとしては、可逆的脊髄モデル（スネア結紮閉塞器具を必要とする）および不可逆的ミクロスフェアモデルがある。Clarkら, *Stroke* 22(7): 877-883 (1991)。

10

## 【0208】

Bowesら, *Neurology* 45:815-819 (1995) では、ウサギ脳塞栓発作モデルにおいて血栓崩壊の有効性を高める特定の抗体の能力が評価された。このモデルでは、塞栓を形成させるために、多数の小さい血塊（組織ホモジナイザーで血餅を破碎することにより作製）をウサギの頸動脈循環系に注入する。塞栓形成の18時間後に各動物の神経機能を次の3ポイントスケールで評価することができる：(1)正常な活動、(2)異常な活動、または(3)死亡。各処置群につき、ウサギの50%に永久的な神経損傷を生じさせるのに必要な血塊の量（ED<sub>50</sub>）を求める。このモデルまたは同様のモデルを使って、本明細書に記載する抗体を血栓崩壊の効力について評価して、発作を防止し、治療し、または他の方法で軽減することができる。

20

## 【0209】

Bednarら, *Stroke* 23(1):152 (1992) は、動脈閉塞（自己血塊を前脳循環系に送達）が実験中に除去されない血栓塞栓性発作のモデルウサギを記載している。血栓塞栓現象の30分後に、ウサギに結合タンパク質（例えば、aLFA-1結合タンパク質）またはビヒクルを投与した。塞栓形成後、全身低血圧の最初の45分を含めて、合計4時間にわたって動物を評価する。

30

## 【0210】

aLFA-1結合タンパク質は、喘息または気道過反応性障害に対する効果を、例えばUS 5,730,983に記載されるモデル動物を用いて、評価することができる。

## 【0211】

一実施形態では、あるタンパク質（例えば、本明細書に記載の抗体）がモデル動物において統計的に有意な効果を有する。例えば、そのタンパク質は炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、またはLFA-1により媒介される疾患の症状に対して統計的に有意な効果を及ぼす。

## 【0212】

さらなるアッセイ

ELISA： ディスプレイライブラリーによりコードされるタンパク質は、ELISAアッセイを用いて結合特性について評価することもできる。例えば、プレートの底面に標的（例えば、限定量の標的）をコーティングしておいたマイクロタイタープレートに接触させる。そのプレートをバッファーで洗って、非特異的に結合したポリペプチドを除去する。その後、プレートに結合したタンパク質の量を、該ポリペプチド（例えば、該ポリペプチドのタグまたは一定の部分）を認識しうる抗体でプレートを探査することにより測定する。抗体は、アルカリホスファターゼ（適切な基質が与えられると、比色産物を生じる）のような酵素に連結させる。該タンパク質は細胞から精製してもよいし、例えば糸状バクテリオファージコートとの融合体として、ディスプレイライブラリー方式でアッセイしてもよい。あるいはまた、標的分子（例えば、立体配座的に偏りのあるLFA-1）を発現する細胞（

40

50

例えば、生きているかまたは固定された細胞)をマイクロタイタープレートに配置して、そのペプチドと抗体(ディスプレイライブラリー中に存在するか、またはディスプレイライブラリーから選択により取得されたもの)との親和性を調べるために使用してもよい。

#### 【0213】

別のタイプのELISAアッセイでは、分岐鎖ライブラリーの各ポリペプチドを用いてマイクロタイタープレートの異なるウェルにコーティングする。次いで、一定の標的分子を用いてELISAを進めて、各ウェルに問い合わせる。

#### 【0214】

均一結合アッセイ： 候補タンパク質と標的との結合相互作用は均一アッセイ(すなわち、アッセイの全成分を添加した後では、それ以上の液体操作が必要でない)を用いて分析することができる。例えば、均一アッセイとして蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を用いることができる(例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照のこと)。均一アッセイのもう一つの例はAlpha Screen (Packard Bioscience, Meriden CT)である。

#### 【0215】

表面プラズモン共鳴(SPR)： ディスプレイライブラリーから単離した分子と標的との結合相互作用は、SPRを用いて解析することができる。SPRまたは生体分子相互作用解析(Biomolecular Interaction Analysis: BIA)は、相互作用する物質のいずれをも標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を検出する。BIAチップの結合表面での質量の変化(結合現象を示す)が、その表面に近い光の屈折率の変化(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)をもたらす。屈折率の変化は検出可能なシグナルをもたらす、かかるシグナルを生体分子間のリアルタイム反応の指標として測定する。SPRの使用法は、例えば、米国特許第5,641,640号; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; SjolanderおよびUrbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szaboら (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705、ならびにBIAcore International AB (Uppsala, Sweden)により提供されるオンラインリソースに記載されている。

#### 【0216】

SPRからの情報を用いて、平衡解離定数( $K_d$ )、および生体分子が標的に結合するための反応速度論的パラメーター( $K_{on}$ および $K_{off}$ を含む)の正確な定量的測定が得られる。こうしたデータは様々な生体分子を比較するために用いることができる。例えば、多様な鎖のライブラリーから選択された核酸によりコードされるタンパク質を比較して、標的に対して高い親和性を有するか、または遅い $K_{off}$ を有する個体を同定することができる。この情報はまた、構造-活性相関関係(SAR)を発展させるためにも使用することができる。例えば、親タンパク質の成熟体の反応速度論的および平衡結合パラメーターを親タンパク質の当該パラメーターと比較しうる。特定の結合パラメーター(例えば、高親和性および遅い $K_{off}$ )と相関する所与の位置の変異アミノ酸を同定する。この情報を構造モデリング(例えば、相同性モデリング、エネルギー最小化、または結晶学もしくはNMRによる構造決定)と組み合わせる。その結果、タンパク質とその標的との物理的相互作用を明確に理解することができ、これを他のデザインプロセスの指針として用いることができる。

#### 【0217】

タンパク質アレイ： ディスプレイライブラリーから同定されたポリペプチドを固相支持体(例えば、ビーズまたはアレイ)上に固定化することができる。タンパク質アレイの場合は、ポリペプチドのそれぞれを支持体上の唯一のアドレスで固定化する。一般的には、そのアドレスは二次元アドレスである。タンパク質アレイについては後述する(例えば、「診断薬」を参照のこと)。

#### 【0218】

細胞アッセイ： ライブラリー(前もってディスプレイライブラリーから同定されたもの)を宿主細胞に形質転換することにより候補タンパク質を選択することができる。例えば、ライブラリーは、ポリペプチドが細胞内で産生されるか、細胞から分泌されるか、または細胞表面に結合されるように、該ポリペプチドをコードしかつ発現を指令するセグメ

10

20

30

40

50

ントを含むベクター核酸配列を含みうる。aLFA-1と結合するポリペプチドについて細胞をスクリーニングまたは選択することができるが、例えば、細胞の表現型の変化または細胞媒介活性により検出する。例えば、aLFA-1と結合する抗体の場合、その活性は細胞接着、細胞侵入、またはリンパ球活性についての*in vitro*アッセイでありうる。

#### 【0219】

#### タンパク質の生産

標準的な組換え核酸法を用いてインテグリン結合タンパク質を発現させることができる。例えば、Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001) および Ausubelら, *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989))に記載される技法を参照されたい。一般的には、結合タンパク質をコードする核酸配列を核酸発現ベクターにクローニングする。タンパク質が複数のポリペプチド鎖を含む場合には、各鎖を発現ベクターにクローニングすることができるが、その発現ベクターは、例えば、同じまたは異なる細胞内で発現される同一のまたは異なるベクターでありうる。

#### 【0220】

抗体の生産：いくつかの抗体（例えば、Fab）は細菌細胞（例えば、大腸菌細胞）内で産生させることができる。例えば、Fabがディスプレイ構成要素とバクテリオファージタンパク質（またはその断片）との間に抑制可能な終結コドンを含むファージディスプレイベクター中の配列によってコードされる場合には、そのベクター核酸を、終結コドンを抑制することができない細菌細胞に導入する。この場合には、Fabが遺伝子IIIタンパク質に融合されず、周辺細胞質および/または培地に分泌される。

#### 【0221】

抗体は真核細胞においても産生させることができる。一実施形態では、抗体（例えば、scFv）を酵母細胞、例えば*Pichia*（例えば、Powersら, 2001, *J. Immunol. Methods*, 251:123-35を参照）、*Hansenula*、または*Saccharomyces*内で発現させる。

#### 【0222】

好ましい実施形態では、抗体は哺乳動物細胞において産生される。クローン抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させるのに好適な哺乳動物宿主細胞としては、以下が挙げられる：チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）（Urlaub & Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220に記載されるdhfr<sup>-</sup> CHO細胞を含む；この細胞は、例えばKaufman & Sharp, 1982, *Mol. Biol.* 159:601-621に記載されるような、DHFR選択マーカーと共に使用される）、リンパ球細胞系（例えば、NS0骨髓腫細胞およびSP2細胞）、COS細胞、ならびにトランスジェニック動物（例えば、トランスジェニック哺乳動物）由来の細胞。例えば、細胞は乳腺上皮細胞である。

#### 【0223】

多様化された免疫グロブリンドメインをコードする核酸配列のほかに、組換え発現ベクターはさらなる配列、例えば宿主細胞内でのベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子を含んでいてもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する（例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号および同第5,179,017号を参照のこと）。例えば、一般的に、選択マーカー遺伝子はベクターが導入されている宿主細胞に薬物（例えば、G418、ハイグロマイシン、メトトレキセート）に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（メトトレキセート選択/増幅を用いてdhfr<sup>-</sup>宿主細胞において使用）、およびneo遺伝子（G418選択用）が含まれる。

#### 【0224】

抗体またはその抗原結合部分の代表的な組換え発現系では、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによりdhfr<sup>-</sup> CHO細胞に導入する。この組換え発現ベクター内では、抗体重鎖および軽鎖遺伝子がそれぞれ、これらの遺伝子の高レベルの転写を駆動するエンハンサー/プロモーター調節エレメント（例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来するものであって、例え

10

20

30

40

50

ばCMVエンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメントまたはSV40エンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメント)と機能的に連結されている。組換え発現ベクターはDHFR遺伝子も担持しており、この遺伝子は、メトトレキセート選択/増幅を用いて、該ベクターでトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能にする。選択された形質転換宿主細胞を培養して抗体重鎖および軽鎖を発現させ、培地から完全な抗体を回収する。標準的な分子生物学的手法が、組換え発現ベクターを作製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養して、培地から抗体を回収するために用いられる。例えば、プロテインAまたはプロテインG結合マトリックスを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより抗体を単離することができる。

#### 【0225】

Fcドメインを含む抗体の場合、抗体産生系はFc領域がグリコシル化されている抗体をもたらすかもしれない。例えば、IgG分子のFcドメインはCH2ドメイン中のアスパラギン297でグリコシル化される。このアスパラギンは二分岐型オリゴ糖による修飾の部位である。このグリコシル化はFc受容体と補体C1qによって媒介されるエフェクター機能にとって必要であることが実証されている (BurtonおよびWoof, 1992, *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jeffersら, 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76)。一実施形態では、Fcドメインが、アスパラギン297に相当する残基を適切にグリコシル化する哺乳動物発現系で産生される。Fcドメインはまた、他の真核生物による翻訳後修飾を含んでいてもよい。

#### 【0226】

抗体をトランスジェニック動物に産生させることもできる。例えば、米国特許第5,849,992号には、トランスジェニック動物の乳腺において抗体を発現させる方法が記載されている。トランスジーンは、ミルク特異的プロモーター、対象の抗体をコードする核酸、および分泌のためのシグナル配列を含むように構築される。そのようなトランスジェニック哺乳動物の雌によって産生されたミルクは、そこに分泌された対象の抗体を含んでいる。抗体はミルクから精製してもよいし、いくつかの用途では直接使用してもよい。

#### 【0227】

トランスジェニックマウスの作製方法は次のとおりである。簡単に述べると、抗体をコードするターゲティング構築物を、受精卵母細胞の雄性前核に顕微注入する。その卵母細胞を偽妊娠養母の子宮に注入して子マウスに発生させる。一部の子孫がトランスジーンを組み込んでいる。

#### 【0228】

また、例えば天然のヒト(または部分的にヒト)免疫グロブリン遺伝子座を有する動物を用いて、免疫することによってaLFA-1と結合する抗体を製造することが可能である。非ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン配列(例えば、共通のヒトアミノ酸残基)を特定の位置に、例えば下記位置の1つ以上(好ましくは、少なくとも5、10、12、または全部の位置)に、挿入する置換を含むように改変することができる:(軽鎖の可変ドメインのFRでは)4L、35L、36L、38L、43L、44L、58L、46L、62L、63L、64L、65L、66L、67L、68L、69L、70L、71L、73L、85L、87L、98L、および/または(重鎖の可変ドメインのFRでは)2H、4H、24H、36H、37H、39H、43H、45H、49H、58H、60H、67H、68H、69H、70H、73H、74H、75H、78H、91H、92H、93H、および/または103H (Kabatのナンバリングに従う)。米国特許第6,407,213号を参照されたい。

#### 【0229】

標的タンパク質の製造: 立体配座的に偏りのあるLFA-1タンパク質の製造方法は、例えば、US 2002-0123614、Shimaoka, Mら (2003) *Cell* 112, 99-111; Shimaoka, Mら (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 485-516; およびShimaoka, Mら (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6009-6014、ならびにLuoら (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(5):2403-8に記載されている。

#### 【0230】

ビオチン化法: タンパク質、例えば免疫グロブリンタンパク質または標的タンパク質をビオチン化するために各種の方法を利用することができる。例えば、タンパク質を5倍

10

20

30

40

50

モル過剰のスルホ-NHS-SS-ビオチンと共に50mM HEPES、pH8.0、100mM NaCl中で一晩4 にてインキュベートする。遊離のビオチンは、例えば10kDa分子量カットオフメンブレンを備えたBIOMAX™装置を用いて、PBS、0.01% Tween 20へのバッファー交換により、または透析により除去する。タンパク質1モルにつき組み込まれたビオチン分子の数は、HABAアッセイを用いてメーカー（Pierce）の記載のとおり測定することができる。

#### 【0231】

##### 医薬組成物

別の形態において、本発明は、インテグリン結合タンパク質（例えば、抗体もしくは他のタンパク質）を含む組成物、例えば医薬として許容される組成物を提供する。インテグリン結合タンパク質は、例えば、製薬上許容される担体と共に製剤化された、活性型LFA-1と優先的に結合するタンパク質でありうる。本明細書中で用いる「医薬組成物」とは、治療用組成物だけでなく、診断用組成物、例えば標識された結合タンパク質（例えば、in vivoイメージング用）も包含する。

10

#### 【0232】

本明細書で用いる「製薬上許容される担体」には、生理的に適合しうる任意のまたは全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤が含まれる。担体は静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮投与（例えば、注射もしくは輸液による）に適したものでありうる。投与経路に応じて、結合タンパク質を不活性化しうる酸や他の自然条件の作用から結合タンパク質を保護する物質で組成物をコーティングしてもよい。

20

#### 【0233】

「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の所望の生物学的活性を保持しかついかなる望ましくない毒性作用も与えない塩をさす（例えば、Bergeら（1977）J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと）。そのような塩の例としては、以下のものが挙げられる：酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、無毒性の無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などから誘導されるもの、ならびに無毒性の有機酸、例えば脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などから誘導されるもの。塩基付加塩としては、次のものが挙げられる：アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどから誘導されるもの、ならびに無毒性の有機アミン、例えばN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどから誘導されるもの。

30

#### 【0234】

組成物は様々な剤形とすることができる。これらには、例えば、液体、半固体、および固体の剤形、例えば液状溶液剤（例：注射または注入可能な溶液）、分散液剤または懸濁液剤、錠剤、丸剤、粉剤、リポソーム、および座剤が含まれる。剤形は意図する投与様式および治療用途により変わりうる。典型的な組成物は注射または注入可能な溶液剤の形である。通常の投与様式は非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。例えば、インテグリン結合タンパク質は静脈内注入または注射により投与される。別の好ましい実施形態では、インテグリン結合タンパク質を筋肉内または皮下注射により投与する。

40

#### 【0235】

本明細書中で用いる「非経口投与」および「非経口的に投与する」とは、経腸および局所（外用）投与以外の投与様式を意味する。通常、非経口投与は注射により行われる。非経口投与には、例えば次のものが含まれる：静脈内、筋肉内、動脈内、嚢内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨下注射および注入。

#### 【0236】

医薬組成物は、一般的に、製造・貯蔵条件下で無菌であり、安定している。医薬組成物はまた、それが投与の規制および業界標準を満たすことを保証するために、試験することができる。例えば、製剤中の内毒素レベルは、カプトガニ血球抽出物アッセイ（Limulus

50

amebocyte lysate assay ; 例えば、Bio Whittaker製のキットを使用、ロット# 7L3790、感度0.125 EU/mL) を用いてUSP 24/NF 19法に従って検査しうる。医薬組成物の無菌性は、USP 24/NF 19法に従ってチオグリコレート培地を用いて測定しうる。例えば、チオグリコレート培地に製剤を接種して、35℃で14日間以上培養する。培地を定期的に検査して微生物の増殖を検出する。

#### 【0237】

組成物は、溶液剤、マイクロエマルジョン、分散液剤、リポソーム、または高濃度の結合タンパク質を送達するのに適した他の秩序構造として製剤化することができる。無菌の注射液剤は、必要量の結合タンパク質を1種以上の他の成分と共に適切な溶媒中に添加し、続いて濾過滅菌することにより調製する。一般的に、分散液剤は、基本となる分散媒と任意の他の成分を含む無菌ビヒクル中に結合タンパク質を添加することにより調製する。無菌注射液剤を調製するための無菌粉剤は、真空乾燥および凍結乾燥により調製することができる。液剤の適切な流動性を維持するには、例えば、レシチンのようなコーティングを使用するか、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持するか、または界面活性剤を使用する。注射用組成物の持続的吸収は、該組成物に、吸収を遅らせる物質(例えば、モノステアレート塩、ゼラチン)を含めることによって得られる。

10

#### 【0238】

インテグリン結合タンパク質は、適当であればどのような方法でも投与することができる。多くの適用例についての投与経路は静脈内注射または注入である。例えば、治療的適用の場合は、インテグリン結合タンパク質を静脈内注入で投与する。特定の実施形態では、制御放出製剤(インプラントを含む)およびマイクロカプセル化送達システムのように、結合タンパク質を急速放出から保護する担体を用いて、結合タンパク質を製剤化してもよい。生体分解性、生体適合性ポリマーを使用することができ、例えば、エチレンビニリアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などである。このような製剤を製造するための多くの方法が利用可能である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

20

#### 【0239】

本明細書に記載の化合物を非経口投与以外で投与するためには、該化合物の不活性化を防止する物質で化合物をコーティングするか、またはかかる物質と化合物とを同時に投与することが必要となるかもしれない。タンパク質は賦形剤と混合して、摂取可能な錠剤、バッカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤、ウェファー剤などの剤形で用いられる。特定の実施形態では、結合タンパク質を、例えば不活性希釈剤または同化可能な食用担体と共に、経口投与する。タンパク質はまた、硬質もしくは軟質ゼラチンカプセルに封入したり、錠剤に圧縮したり、被験者の食物もしくは飲物に直接加えたりしてもよい。

30

#### 【0240】

医薬組成物は医療器具で投与することができる。例えば、本明細書に記載の医薬組成物を、無針皮下注射器で投与してもよく、かかる器具は、米国特許第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号、および第4,596,556号に開示されている。インプラントおよびモジュールの例としては、次のものが挙げられる：制御された速度で薬物を分配するための埋め込み用微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号；皮膚から薬剤を投与するための治療用器具を開示する米国特許第4,486,194号；正確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号；連続薬物送達用の可変流動埋め込み型注入装置を開示する米国特許第4,447,224号；マルチチャンパー区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号；浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号。

40

#### 【0241】

投薬計画は、所望される最適な応答(例えば、治療応答)が得られるように調整する。例えば、1回のボラスを投与してもよいし、いくつかに分割した用量を経時的に投与し

50

てもよいし、あるいは治療状況の緊急性により示されるように用量を比例して減らしたり増やしたりしてもよい。投与のしやすさと投与量の均一性のために、非経口組成物を単位剤形として製剤化することが特に有利である。本明細書で用いる単位剤形とは、治療すべき被験者に単位用量として適した、物理的に分離した個別の単位をさす。各単位は、必要とされる製薬上の担体と共同で所望の治療効果を生み出すように計算された、所定量の結合タンパク質を含有する。単位剤形の規格は、(a)結合タンパク質の特徴および達成すべき特定の治療効果、および(b)特定の個体の感受性、により決定されかつ直接依存する。

#### 【0242】

本明細書に記載する抗体の治療上または予防上有効な量の代表的かつ非限定的範囲は0.01~20mg/kg、例えば1~10、0.01~10、0.03~5、0.02~2、または0.01~1mg/kgである。インテグリン結合タンパク質（特にaLFA-1結合抗体）は静脈内注入により投与することができる。投与量は改善しようとする症状のタイプと重症度により変化しうることに留意すべきである。さらに、特定の被験者については、個々の必要性に応じて、また、組成物を投与するまたは投与を監督する人の専門的判断に従って、具体的な投薬計画を時間経過につれて調整すべきであることを理解すべきである。また、本明細書に記載する投与量範囲は単なる例示であって、本発明の組成物の範囲もしくは実施を制限するものではないことを理解すべきである。

#### 【0243】

医薬組成物は「治療に有効な量」または「予防に有効な量」のインテグリン結合タンパク質、例えばaLFA-1結合タンパク質を含有する。「治療に有効な量」とは、所望の治療結果を達成するのに必要な投与量および時間で、所望の治療結果を達成するのに有効な量をさす。組成物の治療に有効な量は、疾病状態、年齢、性別、体重、個体において所望の応答を引き出すタンパク質の能力といった、諸要因により変化しうる。また、治療に有効な量は、組成物の毒性作用もしくは有害作用を、治療上有益な作用が補って余りあるような量でもある。「治療に有効な投与量」は、未処置の被験者と比べて、測定可能なパラメーター（例えば、炎症のパラメーター）を少なくとも約5、10、20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも60%、さらにより好ましくは少なくとも80%阻害することが好ましい。測定可能なパラメーター（例えば、炎症のパラメーター）を阻害する化合物の能力は、炎症のモデル動物系で評価することができる。あるいはまた、組成物のこの性質は、化合物の阻害能を、当業者に公知のアッセイによりin vitroで試験することにより評価することもできる。

#### 【0244】

「予防に有効な量」とは、所望の予防結果を達成するのに必要な投与量および時間で、所望の予防結果を達成するのに有効な量をさす。一般的には、予防量は疾病に先立ってまたはその初期に用いられるので、予防に有効な量は治療に有効な量よりも少なくなる。

#### 【0245】

##### 安定化および保持

一実施形態においては、インテグリン結合タンパク質（例えば、本明細書に記載のaLFA-1結合抗体もしくは他のインテグリン結合タンパク質）は、循環系（例えば、血液、血清、リンパ、または他の組織）中でのその安定化および/または保持を、例えば少なくとも1.5、2、5、10または50倍、改善する成分と物理的に結合される。例えば、aLFA-1結合リガンドをポリマー、例えば実質的に非抗原性のポリマー（ポリアルキレンオキシド、ポリエチレンオキシドなど）と結合させる。適当なポリマーは実質的に分子量により異なる。数平均分子量が約200~約35,000（または約1,000~約15,000、約2,000~約12,500）のポリマーを使用することができる。例えば、aLFA-1結合リガンドを水溶性ポリマー、例えば親水性ポリビニルポリマー（例：ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン）にコンジュゲートさせる。このようなポリマーの非限定的な例としては、ポリアルキレンオキシドホモポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン化ポリオール、そのコポリマー、およびそのブロックコポリマー（ただし、ブロックコポリマーの水溶性を維持する）が挙げられる。さらなる例について

は、例えば、2004年2月19日出願の米国特許出願第60/546,354号を参照されたい。

【0246】

#### 治療または予防処置

活性型インテグリン（例えば、aLFA-1）と結合するタンパク質は治療上および予防上の有用性を有する。例えば、これらの結合タンパク質は疾患、特に炎症、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、もしくはLFA-1媒介疾患の治療または予防のために被験者に投与される。

【0247】

aLFA-1と優先的に結合する結合タンパク質を用いて、aLFA-1を有する白血球がLFA-1のコグネイトリガンドと相互作用するのを防止することができる。aLFA-1結合タンパク質は、他の細胞または細胞外マトリックスと相互作用する白血球の能力を低下させる。例えば、aLFA-1結合タンパク質は内皮細胞と相互作用する白血球の能力を低下させる。

10

【0248】

前記結合タンパク質はaLFA-1と優先的に結合するので、LFA-1の非活性型立体配座と比べてaLFA-1に対する優先性を持ち合わせない結合タンパク質を用いて同等の結果を達成するのに要する濃度と比較して、より低い濃度の結合タンパク質がそのような相互作用を阻害するのに有効でありうる。

【0249】

インテグリン結合タンパク質は、炎症の少なくとも1つの症状を改善する（例えば、炎症パラメーターの統計的に有意な変化を生じさせる）のに有効な量で投与する。代表的なパラメーターとしては、局部温度、中心温度、腫脹（例えば、測定された腫脹）、発赤、局所もしくは全身白血球数、好中球の有無、サイトカインレベル、およびエラスターゼ活性が挙げられる。量的パラメーターに関して、変化の程度は、例えば少なくとも10、20、30、50、または80%でありうる。

20

【0250】

インテグリン結合タンパク質は炎症を軽減するのに有効な量で投与する。医療専門家は、被験者を検査することによって炎症の程度を評価することができる。

【0251】

インテグリン結合タンパク質は白血球の活動を抑えるのに有効な量で投与する。代表的な白血球の活動には、炎症部位への移動およびホーミング、内皮への付着が含まれる。一実施形態では、例えば白血球の局部濃度を下げするために、結合タンパク質を局所的に投与する。

30

【0252】

インテグリン結合タンパク質は投与計画（例えば、複数のボラス用量）の一部として投与することができる。一実施形態では、その用量は該タンパク質の同量（またはその20%もしくは10%以内）を含みうる。別の実施形態では、初期用量が1回以上の後続の用量よりも多いかまたは少なく、例えば、少なくとも10、20、50、60、70、または80%多いかまたは少ない。

【0253】

用量は、例えばインテグリン結合タンパク質の検出可能な血清濃度（その平均トラフ濃度が9、7、6、5、4、3、2、1、0.3、0.1、0.03、または0.01 μg/mlより低い）を達成するように、選択またはタイトレーションされる。

40

【0254】

本明細書中で用いる「処置する」または「処置」とは、インテグリン結合タンパク質を被験者に投与することである。このタンパク質は単独でまたは第2の薬剤と組み合わせて被験者、単離された組織、または細胞に投与しうる。該タンパク質は疾患、疾患の1以上の症状、または疾患に対する素因を予防または軽減するために投与しうる。細胞の処置には、細胞の活性（例えば、機能または生存能）の調節が含まれる。調節しうる白血球の代表的機能としては、結合、移動、付着、およびT細胞機能が挙げられる。調節することによって、疾患、例えば炎症、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、もしくはL

50

FA-1媒介疾患を仲介する細胞の能力を低下させることができる。もう一つの例は、炎症または炎症の指標を直接または間接的に軽減する活性である。例えば、軽減によってリンパ球の活性を減ずることができる。

【0255】

インテグリン結合タンパク質はまた、疾患、例えば炎症、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、もしくはLFA-1媒介疾患を防止するためにも使用することができる。予防的処置は、疾患、例えば炎症、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、もしくはLFA-1媒介疾患の発症または再発を防止したり遅らせたりする際に、被験者への1回または複数回投与で有効でありうる。

【0256】

本明細書中で用いる「被験者」には、ヒトおよびヒト以外の動物（非ヒト動物）が含まれる。ヒト被験者としては、疾患、例えば炎症、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、もしくはLFA-1媒介疾患に罹患しているかまたはその疑いのあるヒト患者が挙げられる。

【0257】

「ヒト以外の動物」または「非ヒト動物」には、あらゆる脊椎動物、例えば非哺乳動物（ニワトリ、両生類、爬虫類など）および哺乳動物（ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタなど）が含まれる。例えば、被験者は、本明細書に記載の抗体が交差反応するLFA-1またはLFA-1様抗原を発現する細胞を含む非ヒト哺乳動物でありうる。さらに、aLFA-1結合タンパク質は、獣医学のために、またはヒト疾患のモデル動物として、該結合タンパク質が相互作用するLFA-1またはLFA-1様抗原を発現する非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタ、マウス）に投与することができる。後者に関して、そのようなモデル動物は該結合タンパク質の治療効力を評価する（例えば、投与量および投与の時間経過を試験する）のに有用でありうる。

【0258】

aLFA-1結合タンパク質は、活性型LFA-1を含む細胞を選択的に阻害するか、不活性化するか、または死滅させることによって、例えば、炎症、白血球集団、または白血球の活動を抑制することができる。例えば、aLFA-1結合タンパク質を薬剤（例えば、毒素、放射性同位体、短範囲高エネルギー エミッターなどの細胞傷害性薬剤）にコンジュゲートさせてもよい。

【0259】

aLFA-1結合タンパク質は、天然の補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）を介して活性型LFA-1を提示する細胞を阻害するか、不活性化するか、または死滅させるために、*in vivo*で直接使用することができる。一実施形態において、該タンパク質は補体結合エフェクタードメイン、例えばIgG1、-2、もしくは-3由来のFc部分（例：機能性部分）または補体と結合するIgMの対応部分を含む。また、予防処置のためにaLFA-1結合タンパク質を用いることを含む死滅または除去方法も本発明に包含される。例えば、これらの物質を用いて、炎症性疾患の発症または進行を防止したり遅らせたりすることができる。

【0260】

aLFA-1結合タンパク質は、本明細書に記載する疾患を処置するための1以上の既存の療法と併用してもよい。「併用」とは部分的に重なり合う投与を意味する。例えば、被験者はaLFA-1結合タンパク質と別の治療（例えば、別の治療薬）を受け取っているが、両方の治療を同時に受けなくてもよい。例えば、被験者にまずaLFA-1結合タンパク質を注射し、その後別の治療薬を注射する。もう一つの例では、aLFA-1結合タンパク質と別の薬剤を1回の注射で一緒に投与する。

【0261】

代表的な併用に関して、aLFA-1結合タンパク質は以下の薬剤と併用することができる：シクロスポリン類、ラパマイシン類、もしくはアスコマイシン類、またはそれらの免疫抑制類似体、例えば、シクロスポリンA、シクロスポリンG、FK-506、ラパマイシン、40-0-(

10

20

30

40

50

2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシンなど; コルチコステロイド; シクロホスファミド; アザチオプレン; メトトレキサート; プレキナル; FTY 720; レフルノミド; ムニゾリビン (mnizoribine); ミコフェノール酸; ミコフェノール酸モフェチル; 15-デオキシスベルグアリン; 免疫抑制モノクローナル抗体、例えば白血球受容体 (例えば、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、もしくはCD58) またはそのリガンドに対するモノクローナル抗体; あるいは他の免疫調節化合物、例えばCTLA4Ig、または他の接着分子インヒビター、例えばセレクチンアンタゴニストおよびVLA-4アンタゴニストを含むモノクローナル抗体または低分子量インヒビター。これらの併用療法は、免疫調節レジメンの一部であってもよいし、または同種もしくは異種移植片の急性または慢性拒絶反応、炎症性疾患、または自己免疫疾患の治療または予防のためのレジメンの一部であってもよい。

10

## 【0262】

一実施形態においては、aLFA-1結合タンパク質は同種もしくは異種移植片に対する許容性を改善する目的で被験者に投与される。該タンパク質は移植の前、間、および/または後に投与される。移植には、例えば、皮膚、心臓、肝臓、肺、または腎臓の組織もしくは臓器が含まれる。例えば、移植には脾細胞も含まれる。aLFA-1結合タンパク質は、他の薬剤、例えばCD154もしくはCD45RBを標的とする薬剤 (例えば、これらのタンパク質を標的とする抗体または可溶性受容体)、および/またはラパマイシンとの併用で投与することができる。例えば、Rayatら (2005) Diabetes 54:443-451を参照されたい。

## 【0263】

炎症性疾患

代表的な炎症性疾患には以下が含まれる: 急性および慢性の免疫病理または自己免疫病理 (例えば、限定するものではないが、慢性関節リウマチ(RA)、若年性慢性関節炎(JCA))、皮膚病 (例えば、乾癬および接触皮膚炎)、移植片対宿主病(GVHD)、強皮症、真性糖尿病、アレルギー; 喘息、同種移植 (例えば、限定するものではないが、腎臓移植、心臓移植、骨髄移植、肝臓移植、膵臓移植、小腸移植、肺移植、および皮膚移植) に関連した急性または慢性免疫疾患; 慢性炎症性病理 (例えば、限定するものではないが、サルコイドーシス、慢性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、およびクローン病); 多発性硬化症; 血管炎症性病理 (例えば、限定するものではないが、汎発性血管内凝固症候群、アテローム硬化症、川崎病、および血管炎症候群、例えば、限定するものではないが、結節性多発性動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヘノッホ シェーンライン紫斑病、巨細胞性動脈炎、および腎臓の微視的血管炎; 慢性活動性肝炎; シェーグレン症候群; 乾癬性関節炎; 眼の炎症性疾患; 腸疾患に基づく関節炎; 反応性関節炎および炎症性腸疾患に関連した関節炎; 感染性疾患 (例えば、敗血症性ショック、外傷性ショック); ならびにブドウ膜炎。

20

30

## 【0264】

aLFA-1結合タンパク質は上記の疾患または障害の治療または予防に使用することができる。例えば、該タンパク質はそれぞれの疾患または障害の少なくとも1つの症状を緩和するのに有効な量で (局所的にまたは全身的に) 投与される。該タンパク質はまた、炎症、例えば炎症のパラメーター (例えば、局部温度、腫脹 (例えば、測定されたもの)、発赤、局所もしくは全身白血球数、好中球の有無、サイトカインレベル、エラスターゼ活性など) を改善しうる。該タンパク質の投与前、投与時、または投与後に、炎症のパラメーター (例えば、上記パラメーター) の1以上について被験者を評価することが考えられる。

40

## 【0265】

IBD: 炎症性腸疾患 (IBD) は一般に慢性の再発性の腸炎症を含む。IBDは2つの明確に区別される疾患であるクローン病と潰瘍性大腸炎 (UC) をさす。IBDの臨床徴候としては、間欠的な直腸の出血、締め付けるような腹痛、体重減少、および下痢が挙げられる。IBDをモニタリングするために、潰瘍性大腸炎臨床活動度指数のような臨床上的指数を使用することもできる。例えば、Walmsleyら Gut. 1998 Jul;43(1):29-32 およびJowettら (2003) Scand J Gastroenterol. 38(2):164-71を参照されたい。IBDの少なくとも1つの症状を改善するために、またはIBDの臨床指数を改善するために、インテグリン結合タンパク質 (例えば、本明細書に記載のaLFA-1結合抗体) を使用することができる。

50

## 【0266】

乾癬： 乾癬は、鱗屑と炎症を特徴とする慢性の皮膚疾患である。乾癬には、米国民の1.5~2パーセント、つまり500万人ほどが罹患している。乾癬を発症すると、一般的に、表皮が厚くなり、赤色調を呈し、銀色の鱗屑（斑(plaque)と呼ばれる）で覆われるようになる。乾癬は肘、膝、頭皮、下部背中、顔、手のひら、足の裏に特に好発する。この病気はまた指の爪、足の爪、口内や生殖器の軟組織も冒す。乾癬患者の約10%は関節炎の症状をもたらす関節の炎症を有する。乾癬の慢性皮膚炎症は肥厚性表皮角化細胞および浸潤性単核細胞（CD4+記憶T細胞、好中球、マクロファージを含む）と関連している。

## 【0267】

患者は静的な医師包括的評価（static Physician Global Assessment: sPGA）を用いて評価され、消失から非常に重症までの6カテゴリーからカテゴリースコアを受け取ることができる。スコアは斑点、鱗屑、および紅斑に基づく。

10

## 【0268】

乾癬の少なくとも1つの症状を改善するために、または乾癬の臨床指数（例えば、sPGA指数）を改善するために、インテグリン結合タンパク質（例えば、本明細書に記載のaLFA-1結合抗体）を使用することができる。該タンパク質は局所的または全身的に投与される。

## 【0269】

慢性関節リウマチ（RA）： この疾患は関節の内層および/または他の内部器官の炎症を特徴とする。これは一般的に慢性であるが、急激に悪化することもある。代表的な症状としては、関節の炎症、腫脹、動作困難、痛み、食欲低下、発熱、エネルギー低下、貧血、皮膚（特に、肘の後側などの圧力を受けやすい領域の皮膚）下の結節（リウマチ小結節）などがある。臨床分野では、慢性関節リウマチ（RA）は重症関節形成異常疾患の最も普通に見られる形態である。RAは進行性の疾患である。慢性関節リウマチや他の関節形成異常疾患の少なくとも1つの症状を軽減または予防するために、aLFA-1結合タンパク質を使用することができる。

20

## 【0270】

aLFA-1結合タンパク質は、慢性関節リウマチを治療するための他の薬剤、例えばNSAIDおよびアスピリン、鎮痛薬、およびコルチコステロイド（関節の痛み、こわばり、腫脹を軽減するのに役立つ）と共に投与することができる。代表的な薬剤には、疾患改善抗リウマチ薬（DMARD）、例えばメトトレキサート、レフルノミド、D-ペニシラミン、スルファサラジン、金療法、ミノサイクリン、アザチオプリン、ヒドロキシクロロキン（および他の抗マラリア薬）、シクロスポリン、Prosorba療法、および生物学的薬剤が含まれる。

30

## 【0271】

喘息

喘息は疾病の異質ファミリーである。それは刺激に対する気管気管支の過敏反応を特徴とする（McFadden, E. R.ら, In: Harrison's Principles of Internal Medicine, 第10版, Petersdorf, R. G.ら編, McGraw-Hill, NY (1983), pp.1512-1519); Kay, A. B., Allergy and Inflammation, Academic Press, NY (1987); これらの文献を参照することにより本明細書に引用する）。臨床的には、喘息は、気管気管支の急激な狭窄、くっついて離れない濃厚な分泌物、呼吸困難の発作、咳、および喘鳴音によって現れる。こうした症状のそれぞれの相対的寄与は不明であるが、その結果は、気道抵抗の増加、肺と胸郭の過膨張、換気およびの肺血流量の異常分布である。この疾患は、無徴候期間中に一時的な急性徴候として現れる。急性エピソードは低酸素症をもたらす、致命的でありうる。全世界の人口の約3%がこの病気で苦しんでいる。

40

## 【0272】

本明細書中で用いる「喘息」とは、アレルギー性または特異体質性の喘息をさす。アレルギー性喘息は通常、鼻炎、蕁麻疹、湿疹などの遺伝性のアレルギー疾患を伴っている。この症状は、空気伝染性抗原（例えば、花粉、環境上または職業上の汚染物質など）の皮内注射に対する陽性の膨疹・潮紅反応、ならびにIgE血清レベルの増加により特徴づけら

50

れる。アレルギー性喘息の発症は、多くの患者において、IgE抗体の存在と因果関係があるようである。上記の特徴を示さない喘息患者は、特異体質性の喘息をもつと考えられる。

【0273】

喘息の少なくとも1つの症状を改善するために、または喘息の臨床指数（例えば、気道応答性）を改善するために、インテグリン結合タンパク質（例えば、本明細書に記載のaLFA-1結合抗体）を使用することができる。該タンパク質は局所的に（例えば、吸入により）または全身的に（例えば、注射により）投与される。

【0274】

虚血/発作および他の心血管障害

本明細書に記載の結合タンパク質は、LFA-1が要因となる心血管障害の治療または予防にも使用することができる。そうした障害には、例えば、虚血/再灌流障害、例えば白血球媒介再灌流損傷（例えば、後血栓溶解療法）、心筋梗塞、発作、腸虚血、および腎不全または出血性ショックが含まれる。

【0275】

インテグリン結合タンパク質（例えば、本明細書に記載のaLFA-1結合抗体）は、上記障害のリスク（例えば、発作のリスク）がある被験者に、あるいは発作や他の心血管機能障害を有する被験者に投与することができる。例えば、該結合タンパク質を、そのような発作または他の心血管機能障害の前、最中、直後、またはその後のいずれかの時点（例えば、2、4、6、12、24、もしくは48時間以内）で投与する。一実施形態では、該結合タンパク質を所望の循環濃度に達するように少なくとも1、2、4、5、7、または10日間投与する。

【0276】

インテグリン結合タンパク質（例えばaLFA-1結合タンパク質、例えば本明細書に記載のaLFA-1結合抗体）は、局限性虚血発作、例えば血栓塞栓性発作、または大脳虚血発作を治療するために使用される。「局限性虚血発作」は、ある領域への血液供給の遮断によって引き起こされる（一般には、「主要な大脳動脈」（例えば、中大脳動脈、前大脳動脈、後大脳動脈、内頸動脈、椎骨動脈、または脳底動脈）のいずれか1つ以上の閉塞が原因で起こる）脳の損傷として定義される。「動脈閉塞」は通常、単一の塞栓または血栓である。大脳塞栓症発作は、Bowesら、Neurology 45:815-819 (1995)に記載のモデル（複数の凝血粒子が二次動脈または小動脈を閉塞する）のように、二次動脈または小動脈の閉塞から起こることがある。

【0277】

aLFA-1結合タンパク質は、発作に苦しんでいる被験者において、大脳血流量を増やしかつ/または梗塞サイズを縮小させるために投与することができる。投与は、例えば動脈閉塞の除去前に、行うことができる。例えば、大脳血流量の増加といった治療効果が認められるまで閉塞を取り除かない。この方法は、血栓溶解剤を投与しないで行ってよい。

【0278】

aLFA-1結合タンパク質は、ひとたび急性虚血発作の症状が診断されたら（例えば、神経学的検査での局所欠陥により示唆される）、可能なかぎり速やかに患者に投与する。急性虚血発作の診断には、神経学的検査と、任意に、神経イメージング技術、例えばコンピュータ断層撮影（CT）および磁気共鳴イメージング（MRI）（拡散強調画像法（DWI）および灌流画像法（PI）を含む）；血管イメージング（例えば、デュープレックス・スキャニング、経頭蓋ドプラー超音波およびレーザードプラー）；血管造影（例えば、コンピュータデジタル血管X線撮影法（DSA）およびMR血管造影法）；ならびに他の侵襲的もしくは非侵襲的技術を使用することができる。

【0279】

aLFA-1結合タンパク質は、発作の開始直後から約24時間までの任意の時点で少なくとも1回または連続的に投与することができる。特定の実施形態では、aLFA-1結合タンパク質をまず、発作開始から約15分（または30分または45分）と約5時間（または12時間または2

10

20

30

40

50

4時間)の間に1回投与する。例えば、発作の診断がついたらすぐに、aLFA-1結合タンパク質をまずボラス用量で投与し、続いて(例えば、最初のボラス用量の5~24時間後に)該アンタゴニストのボラス用量を投与する。別の例では、該タンパク質を連続的に投与する。

【0280】

#### 癌

インテグリン結合タンパク質(例えば、本明細書に記載するaLFA-1結合抗体)を用いてT細胞の増殖性疾患(例えば、T細胞白血病またはリンパ腫)を治療することができる。一実施形態では、該疾患が急性前骨髄球白血病である。治療可能な他の代表的疾患としては、骨髄性疾患、例えば急性前骨髄性白血病(APML)、急性骨髄性白血病(AML)、および慢性骨髄性白血病(CML)が挙げられる(Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol./Hematol. 11:267-97に概説される)。治療しうるリンパ球性悪性疾患としては、例えば、急性リンパ芽球性白血病(ALL)(B系列ALLとT系列ALLを含む)、慢性リンパ球性白血病(PLL)、前リンパ球性白血病(PLL)、有毛細胞白血病(HLL)、およびワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症(WM)が挙げられる。悪性リンパ腫の別の形態としては、例えば、非ホジキンリンパ腫およびその変異型、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、大顆粒リンパ球性白血病(LGF)、およびホジキン病が挙げられる。

【0281】

#### 診断用途

活性型インテグリン(例えば、aLFA-1)と結合する結合タンパク質はまた、in vitroおよびin vivoでの診断に使用することができる。一形態において、本発明は、aLFA-1の存在をin vitroまたはin vivoで(例えば、被験者のin vivoイメージングで)検出するための診断方法を提供する。

【0282】

一実施形態では、インテグリン結合タンパク質を用いてサンプル(例えば、生物学的サンプル)をin vitroで評価する。この方法は、(i)サンプルをaLFA-1結合タンパク質と接触させ、(ii) aLFA-1結合タンパク質とサンプル間の複合体の形成を検出する、ことを含んでなる。この方法はまた、参照サンプル(例えば、対照サンプル)を該結合タンパク質と接触させて、該結合タンパク質とサンプル間の複合体の形成の程度を、参照サンプルのそれと比較して判定する、ことをさらに含む。対照サンプルと比較して、サンプルでの該複合体の形成が統計的に有意に変化していれば、該サンプル中にaLFA-1が存在することを示す。サンプルは外科的または非外科的方法によって取得することができる。

【0283】

別の方法は、(i) aLFA-1結合タンパク質を被験者に投与し、(ii) aLFA-1結合タンパク質と被験者間の複合体の形成を検出する、ことを含んでなる。前記検出は、該複合体形成の位置または時期を調べることを含む。一実施形態では、被験者が本明細書に記載する疾患、例えば炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、またはLFA-1媒介疾患に罹患しているか、罹患している疑いがあるか、または罹患するリスクがある。

【0284】

aLFA-1結合タンパク質は、結合または未結合抗体の検出を容易にするために、検出可能な物質を用いて直接もしくは間接的に標識することができる。適当な検出可能物質としては、各種酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射性物質が挙げられる。

【0285】

aLFA-1結合タンパク質とaLFA-1との複合体形成は、aLFA-1に結合した該結合タンパク質または未結合の該結合タンパク質のいずれかを測定または視覚化することによって検出することができる。従来の検出アッセイ、例えば酵素免疫定量法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、または組織の免疫組織染色が使用可能である。aLFA-1結合タンパク質を標識することに加えて、サンプル中のaLFA-1の存在は、検出可能な物質で標識した標準品および未標識のaLFA-1結合タンパク質を利用した競合イムノアッセイによってアッセイ

10

20

30

40

50

することが可能である。このアッセイの一例では、生物学的サンプルと、標識した標準品と、未標識のaLFA-1結合剤を一緒にして、未標識の結合タンパク質と結合した標識標準品の量を測定する。サンプル中のaLFA-1の量は、aLFA-1結合剤と結合した標識標準品の量に反比例する。

**【0286】**

発蛍光団および発色団で標識された結合タンパク質を調製することができる。ができるのタンパク質は最大約310nmまでの波長を有する光を吸収するので、蛍光成分は310nm以上（好ましくは、400nm以上）に実質的な吸収を有するように選択すべきである。種々の蛍光剤および発色剤がStryer (1968) Science, 162:526 および Brand, L.ら (1972) Annual Review of Biochemistry, 41:843-868に記載されている。結合タンパク質は、米国特許第3,940,475号、第4,289,747号および第4,376,110号に記載されるような慣用方法によって、蛍光発色団で標識することができる。上記のいくつかの望ましい特性を備えた蛍光剤のグループはキサントゲン系色素であり、これにはフルオレセインやローダミンが含まれる。蛍光化合物のもう一つのグループはナフチルアミンである。発蛍光団や発色団で標識したら、該結合タンパク質を用いて、サンプル中のaLFA-1の存在または局在を、例えば蛍光顕微鏡検査（共焦点またはデコンボリューション顕微鏡検査など）により、検出することができる。

10

**【0287】**

組織学的解析： 本明細書に記載する結合タンパク質を用いて免疫組織染色を行うことができる。例えば、抗体の場合には、標識（精製タグもしくはエピトープタグなど）を用いて抗体を合成するか、または、例えば標識や標識結合基をコンジュゲートさせることにより、抗体を検出可能に標識する。例えば、キレーターを抗体に結合させてもよい。次いで、抗体を組織標本（例えば、顕微鏡用スライドガラス上の固定組織切片）に接触させる。結合させるためにインキュベーションした後、標本を洗浄して未結合抗体を除去する。その後、標本を例えば顕微鏡検査により解析して、抗体が標本に結合したか否かを同定する。抗体（または他のポリペプチドもしくはペプチド）は結合時に標識されていなくてもよい。結合および洗浄後に、抗体を標識して検出可能にする。

20

**【0288】**

タンパク質アレイ： aLFA-1結合タンパク質はまた、タンパク質アレイ上に固定させることができる。タンパク質アレイは、例えば医学的サンプル（単離された細胞、血液、血清、生検材料など）をスクリーニングするための、診断ツールとして使用される。言うまでもなく、タンパク質アレイは他の結合タンパク質（例えば、aLFA-1と結合するもの、またはヒアルロン酸のような他の標的分子と結合するもの）を含んでいてもよい。

30

**【0289】**

タンパク質アレイの作製方法は、例えばDe Wildtら (2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994; Luekingら (1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Ge (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, 1-VII; MacBeath & Schreiber (2000) Science 289:1760-1763; WO 01/40803 および WO 99/51773A1に記載されている。アレイ用のタンパク質は、例えば市販のロボット装置（例えば、Genetic MicroSystemsまたはBioRoboticsから入手可能）を使って、高速で点在させることができる。アレイ基体は例えばニトロセルロース、プラスチック、ガラス（例えば、表面改質ガラス）でありうる。アレイは多孔質マトリックス（例えば、アクリルアミド、アガロース、または他のポリマー）を含んでいてもよい。

40

**【0290】**

例えば、アレイは、De Wildt（前掲）に記載されるような、抗体のアレイでありうる。結合タンパク質を産生する細胞をアレイフォーマットのフィルター上で生育させる。タンパク質の産生をうながし、発現されたタンパク質を該細胞の位置のフィルターに固定させる。

**【0291】**

タンパク質アレイを標識した標的と接触させることにより、多様性鎖ライブラリーからの各固定化ポリペプチドへの標的の結合の程度を測定することができる。標的が標識され

50

ていない場合は、サンドイッチ法を使用することができ、例えば標識プローブを使用して、未標識標的の結合を検出する。

【0292】

アレイの各アドレスでの結合の程度に関する情報は、例えばコンピュータデータベースに、プロファイルとして記憶させることができる。タンパク質アレイを二通り作製して、例えば標的と非標的の、結合プロファイルを比較するのに使用する。かくして、タンパク質アレイを用いることにより、1以上の分子に対して所望の結合特性を有する多様性鎖ライブラリーの個々のメンバーを同定することが可能である。

【0293】

本明細書に記載するaLFA-1結合タンパク質はまた、aLFA-1の不溶性支持体への結合を検出する際にも使用することができる。例えば、サンプルをアレイ上に固定させ、aLFA-1結合タンパク質を用いてアレイ上のaLFA-1を検出する。

【0294】

FACS（蛍光活性化セルソーティング）： aLFA-1結合タンパク質を用いて、細胞（例えば、患者サンプルのようなサンプル中の細胞）を標識することができる。例えば、該タンパク質を使って細胞上の活性型インテグリン（例えば、活性型LFA-1）を検出する。結合タンパク質は一般的には、蛍光化合物と物理的に結合される（または結合可能である）。その後、蛍光活性化セルソーターを使用して（例えば、Becton Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose CA)から入手可能なソーターを使用；米国特許第5,627,037号；第5,030,002号；および第5,137,809号も参照）、細胞を選別する。細胞がソーターを通過するとき、レーザー光線が蛍光化合物を励起させ、同時に検出器が通過する細胞をカウントし、蛍光化合物が細胞に結合されているか否かを、蛍光を検出することで判定する。各細胞に結合された標識の量を定量化して解析し、それによりサンプルを特徴づける。

【0295】

また、ソーターは細胞を偏向させて、結合タンパク質と結合した細胞を、結合タンパク質と結合していない細胞から分離することができる。分離した細胞は培養および/または特性決定を行うことができる。

【0296】

in vivoイメージング： インテグリン結合タンパク質を用いて、活性型インテグリンを含む細胞（例えば、aLFA-1を提示する細胞）の存在をin vivoで検出することができる。この方法は、(i) 被験者（例えば、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、またはLFA-1媒介疾患を有する患者）に、検出可能なマーカーにコンジュゲートされたaLFA-1結合抗体を投与し、(ii) 該被験者を検出可能なマーカーの検出手段にさらす、ことを含んでなる。例えば、NMRまたは他の断層写真撮影手段により、患者を画像化する。

【0297】

診断イメージングに有用な標識の例としては次のものが挙げられる：放射性標識、例えば<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>99m</sup>Tc、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、および<sup>188</sup>Rh；蛍光標識、例えばフルオレセインおよびロータミン；核磁気共鳴活性標識；陽電子断層撮影（PET）スキャナーにより検出可能な陽電子放出アイソトープ；化学発光体、例えばルシフェリン；酵素マーカー、例えばペルオキシダーゼおよびホスファターゼ。短距離放射線発光体、例えば短距離検出器プローブにより検出可能なアイソトープも利用することができる。結合タンパク質をそのような試薬で公知の方法により標識する。例えば、抗体の放射性標識づけに関する技法についてのWensel & Meares (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York、およびD. Colcherら (1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816を参照されたい。

【0298】

放射性標識した結合タンパク質はまた、in vitro診断試験にも使用することができる。アイソトープで標識した結合タンパク質の特異的活性は、半減期、放射性標識のアイソトープ純度、また、標識がどのように抗体に組み込まれているか、に応じて変化する。

【0299】

10

20

30

40

50

ポリペプチドを放射活性アイソトープ ( $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$ など) で標識する方法は概して知られている。例えば、トリチウム (三重水素) 標識法は米国特許第4,302,438号に記載されている。ヨウ素化、トリチウム標識化、および $^{35}\text{S}$ 標識化の方法 (例えば、マウスモノクローナル抗体に適合させた方法) は、例えば、Goding, J.W. (Monoclonal antibodies : principles and practice : production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 第2版 London; Orlando: Academic Press, 1986. pp 124-126) およびそこに引用された参考文献に記載されている。抗体などのポリペプチドをヨウ素化するための他の方法は、Hunter & Greenwood (1962) Nature 144:945、Davidら (1974) Biochemistry 13:1014-1021、ならびに米国特許第3,867,517号および第4,376,110号に記載されている。イメージングに有用な代表的ラジオアイソトープには、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ が含まれる。抗体をヨウ素化するための方法は、Greenwood, F.ら (1963) Biochem. J. 89:114-123; Marchalonis, J. (1969) Biochem. J. 113:299-305; およびMorrison, M.ら (1971) Immunochemistry 289-297に記載されている。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識化法は、Rhodes, B.らによる、Burchiel, Sら (編), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-123 (1982) およびそこに引用された参考文献に記載されている。抗体を $^{111}\text{In}$ 標識化するのに適した方法は、Hnatowich, D.J.ら (1983) J. Immunol. Methods, 65:147-157、Hnatowich, D.ら (1984) J. Applied Radiation, 35:554-557、およびBuckley, R.G.ら (1984) F.E.B.S. 166:202-204に記載されている。

10

## 【0300】

20

放射性標識した結合タンパク質の場合は、該結合タンパク質を患者に投与し、該結合タンパク質が反応する細胞に局在化させ、放射性核スキャンニング (例えば、ガンマカメラまたは断層撮影法を使用) のような公知の技法を用いて *in vivo* で検出または「画像化」する。例えば、A.R. Bradwellら, "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwinら, (編), pp 65-85 (Academic Press 1985) を参照されたい。あるいはまた、陽電子放射型横断断層撮影スキャナー (例えば、Brookhaven National Laboratoryに設置されたPet VIと呼ばれている装置) は、放射性標識が陽電子 (例えば、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、および $^{13}\text{N}$ ) を放出する場合に使用することができる。

## 【0301】

30

MRIコントラスト剤: 磁気共鳴イメージング (MRI) は、生きている被験者の内部特徴を視覚化するためにNMRを使用するものであり、予後、診断、治療、手術に有用である。MRIは放射活性トレーサー化合物を用いないで使用することができ、明らかに有利である。いくつかのMRI技術がEP-A-0 502 814に要約されている。一般的には、異なる環境での水プロトンの緩和時間定数T1およびT2に関する差異が、画像を生成させるために使用される。しかし、これらの差異は、鮮明な高解像度の画像を得るには不十分なことがある。

## 【0302】

これらの緩和時間定数の差異はコントラスト剤によって増強することができる。そのようなコントラスト剤の例としては、いくつかの磁性物質、常磁性物質 (主にT1を変える) 、および強磁性または超常磁性物質 (主にT2応答を変える) が含まれる。キレート剤 (例えば、EDTA、DTPA、およびNTAキレート剤) を用いて、いくつかの常磁性物質 (例えば、 $\text{Fe}^{+3}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$ 、 $\text{Gd}^{+3}$ ) を結合する (また、その毒性を低減させる) ことができる。他の物質は粒子の形 (例えば、直径10  $\mu\text{m}$ 未満から約10nm) でありうる。粒子は強磁性、抗強磁性または超常磁性の特性をもち得る。粒子は、例えば磁鉄鉱 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、 $-\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、フェライト、および他の遷移元素の磁性無機化合物を含みうる。磁性粒子は非磁性物質を含むまたは含まない1以上の磁性結晶を含んでいてもよい。非磁性物質には、合成または天然の高分子物質 (セファロース、デキストラン、デキストリン、デンプンなど) が含まれる。

40

## 【0303】

aLFA-1結合タンパク質はまた、NMR活性 $^{19}\text{F}$ 原子または複数個の該原子を含む指示基で標識することができる。それは、(i) 自然界に豊富なフッ素原子の実質的に全てが $^{19}\text{F}$ アイ

50

ソトープであり、したがって、実質的に全てのフッ素含有化合物がNMR活性である；(ii) 多くの化学的に活性なポリフッ素化合物（例えば、無水トリフルオロ酢酸）が比較的低コストで市販されている；(iii) 多くのフッ素化合物は、ヘモグロビン代替品として酸素を運ぶために利用される過フッ素化ポリエーテルのように、ヒトでの使用が医学的に許容されることがわかっている、からである。そのようなインキュベーション時間を容認した後、Pykett (1982) Scientific American, 246:78-88に記載されるような装置を用いて全身MRIを実施し、活性型白血球の場所を突き止めて画像化する。

#### 【0304】

aLFA-1結合タンパク質（例えば、本明細書に記載の結合タンパク質）を評価することにより得られた情報は、マシン適合性媒体（例えば、コンピュータ読み取り可能またはコンピュータアクセス可能媒体）に記録することができる。この情報はコンピュータリプレゼンテーションとして、例えばデータベース（例えば、結合タンパク質を用いたイメージングの場合は、1個体または複数の個体の画像のデータベース）に記憶させることができる。「コンピュータリプレゼンテーション」とは、コンピュータによって操作され得る形式の情報をさす。コンピュータリプレゼンテーションを記憶させる行為は、その情報をコンピュータ操作に適した形式に設定する行為をさす。

10

#### 【0305】

##### キット

本発明の範囲内には、本明細書に記載する組成物（例えば、aLFA-1結合タンパク質を含む組成物）を含むキットも含まれる。一実施形態において、キットは、(a) aLFA-1結合タンパク質を含む組成物と、任意に、(b) 情報資料と、を含んでなる。情報資料は、本明細書に記載する方法および/または本明細書に記載する方法のための化合物の使用（例えば、治療、予防または診断上の使用）に関する説明的な、指令的な、マーケティング上の、または他の資料でありうる。例えば、情報資料は、疾患、例えば炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、または他のLFA-1媒介疾患を治療するための該組成物の投与方法について記述する。

20

#### 【0306】

一実施形態では、情報資料は、化合物を適当な方法で、例えば適当な用量、剤形、または投与様式（例えば、本明細書に記載する用量、剤形、または投与様式）で投与するための説明書を含むことができる。別の実施形態では、情報資料は、適当な被験者、例えばヒト、例えば炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、またはLFA-1媒介疾患に罹患しているか、あるいはそのリスクがあるヒト、を同定するための説明書を含むことができる。情報資料は、化合物の製造、化合物の分子量、濃度、有効期限日、バッチまたは製造場所の情報などについての情報を含んでいてもよい。キットの情報資料はその形態において制限されない。化合物に関する情報は、構造上の情報、例えばアミノ酸配列、商標名、FDAにより承認された名称、抗体のアイソタイプなどの情報を含みうる。多くの場合に、情報資料、例えば使用説明書は、印刷物として、例えば印刷した文、図面、および/または写真として、例えばラベルまたは印刷シートとして、提供される。しかし、情報資料は他のフォーマットとして提供されてもよく、例えば、コンピュータ読み取り可能媒体、ビデオ録画、またはオーディオレコーディングなどがある。別の実施形態では、キットの情報資料はリンクまたはコンタクト情報であって、例えば物理アドレス、eメールアドレス、ハイパーリンク、ウェブサイト、または電話番号などを含むことができ、この場合、キットのユーザーは化合物および/または本明細書に記載する方法でのその使用に関する実質的な情報を得ることができる。情報資料は任意に組み合わせたフォーマットで提供されてもよい。

30

40

#### 【0307】

aLFA-1結合タンパク質を含む組成物に加えて、組成物そのものが他の成分を含むこともでき、例えば溶媒もしくはバッファー、安定剤もしくは防腐剤、および/または本明細書に記載する症状または疾患（例えば、炎症性疾患、過剰なLFA-1活性を特徴とする疾患、もしくはLFA-1媒介疾患）を治療するための第2の薬剤を含みうる。あるいはまた、そのよ

50

うな他の成分をキットに含めてもよいが、aLFA-1結合タンパク質を含む組成物とは異なる組成物または容器内に含めてもよい。そのような実施形態では、キットは、化合物と他の成分とを混ぜ合わせるための、または化合物を他の成分と一緒に使用するための説明書を含むことができる。

【0308】

aLFA-1結合タンパク質を含む組成物は任意の形態、例えば液体、乾燥形態、または凍結乾燥形態で提供することができる。本組成物は実質的に純粋で、かつ/または無菌でありうる。aLFA-1結合タンパク質を含む組成物が液体の溶液で提供される場合、好ましくは、その溶液は水溶液であり、無菌の水溶液が好適である。aLFA-1結合タンパク質を含む組成物が乾燥形態として提供される場合には、一般的に、用時調製を適当な溶媒の添加により行う。溶媒（例えば、無菌の水またはバッファー）をキットに入れて提供してもよい。

10

【0309】

キットはaLFA-1結合タンパク質を含む組成物用の容器を1個以上含む。いくつかの実施形態では、キットは組成物用と情報資料用の別個の容器、分割するもの、または区画を含む。例えば、組成物をビン、バイアルもしくはシリンジに入れ、情報資料をプラスチックスリーブもしくはパケットに入れる。他の実施形態では、キットの別個の要素を分割されていない単一容器に収める。例えば、組成物をビン、バイアルもしくはシリンジに入れるが、この容器には情報資料がラベルの形で貼り付けてある。いくつかの実施形態では、キットは複数（例えば、1包み）の個々の容器を含み、各容器がaLFA-1結合タンパク質の1個以上の単位剤形（例えば、本明細書に記載の剤形）を含む。例えば、キットは複数のシリンジ、アンプル、foilパッケージ、またはブリストアパックを含み、各々が1単位用量の化合物を含む。キットの容器は気密性、耐水性（水分の変化または蒸発に対して不透過性）、および/または耐光性でありうる。

20

【0310】

キットは、aLFA-1結合抗体および診断のための説明書を含むことができ、例えば、aLFA-1結合タンパク質（例えば、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または他のポリペプチドもしくはペプチド）を使用して、*in vitro*で（例えば、本明細書に記載の疾患を有する患者からの生検材料または細胞といったサンプル中で）または*in vivo*で（例えば、被験者をイメージングすることにより）aLFA-1を検出する。キットはさらに少なくとも1種の追加の試薬、例えば標識または別の診断薬を含んでいてもよい。*in vivo*使用のために、リガンドを医薬組成物として製剤化することができる。

30

【0311】

本発明について以下の実施例でさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものとして解釈されるべきでない。

【実施例】

【0312】

D2-57 Fabを単離するために、Fabファージディスプレイライブラリーを低親和性野生型精製I-ドメインタンパク質上で枯渇させ、続いて高親和性固定開放型のI-ドメインLFA-1タンパク質上で正の選択を行った。D2-57 Fabは、マグネシウムの存在下で高親和性の固定（ロック）開放状態の精製I-ドメインタンパク質と結合するが、マグネシウムの不在下では結合しない。D2-57 Fabはマグネシウムの有無にかかわらず低親和性の固定（ロック）閉鎖状態の精製I-ドメインタンパク質と有意には結合しない。

40

【0313】

マグネシウムの存在下で、D2-57 Fabは全LFA-1（サブユニットが高親和性の固定開放状態のI-ドメインを含む）を発現している細胞（「HA細胞」）と結合するが、マグネシウムが存在しない場合には結合しない。D2-57はまた、マグネシウムの存在下で、細胞上に発現された活性型の野生型LFA-1タンパク質とも結合する。D2-57は、サブユニットが低親和性の固定閉鎖状態のI-ドメインを含むときの全LFA-1を発現している細胞（「LA細胞」）とは結合しない。これに対して、MHM24はHA細胞にもLA細胞にも結合する。

【0314】

50

再フォーマット化された全IgG1は、細胞を用いて試験したとき、Fab形態と同じ結合特異性を示す。

【0315】

P1-G10をFabの形（フォーマット）で提示するファージは、マグネシウムの存在下または不在下で、高親和性の固定開放型I-ドメインLFA-1タンパク質と結合するが、低親和性の固定閉鎖型とは結合しない。

【0316】

C1-54 Fabは、高親和性の固定開放型I-ドメインLFA-1タンパク質と低親和性の固定閉鎖型I-ドメインLFA-1タンパク質の両方に結合するが、マグネシウムの存在下では開放型と優先的に結合する。

【0317】

以下は代表的な抗体の可変領域の比較である：

可変領域 - 軽鎖

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
D2-57	QDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSIGSYLN	WYQQKTKAPKALII	AASSLQS
C1-54	QDIQMTQSPATLSVSPGERVTLS	TASQSVDSNLA	WYQQKPGQAPRLLVY	GASTRAT
P1-G10	QSV.LIQ.PPSVSVSPGQTASVTC	SGDALGQKYAS	WYQQKPGQSPVLVIF	QDSKRPS
	FR3-L	CDR3-L	FR4-L	
D2-57	GVPSRFSGSGGTDFITLTISSIQLEDFATYYC	QQSYSTP..S	FGQGTKVEIKRT	
C1-54	GVPARFSGSGGTAFITLTIIDSLQSEDFAVYYC	QQYNKWPYPYS	FGQGTKLEIKRT	
P1-G10	GIPERFSGSNSTATITISGTQAVDEADYYC	QAWDIT.AYV	FGTGTKVTVL	

それぞれ配列番号 33、34、および 35

10

20

30

40

可変領域 - 重鎖

	FR1-H	CDR1-H	FR2-H
D2-57	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS RYVMW	WVRQAPGKGLEWVS
C1-54	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS HYGMS	WVRQAPGKGLEWVS
P1-G10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS HYSMQ	WVRQAPGKGLEWVS
	CDR2-H		
D2-57	YIWPSGGNTYYADSVK		
C1-54	VISPSGGRTLYADSVK		
P1-G10	YIGSSGGNTYYADSVK		
	FR3-H	CDR3-H	FR4-H
D2-57	RFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAS SYDFW	SNAFDI WQQTMTVTVSS
C1-54	RFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAK HYSY	...AMDV WQQTMTVTVSS
P1-G10	RFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR G.TYNT	SPFDY WQQTMTVTVSS

それぞれ配列番号 36、37、および 38

10

20

30

可變領域 - 輕鎖 (核酸)

FR1-L

D2-57 CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC  
C1-54 CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCAC  
P1-G10 CAGAGCGTCTTGA.....CTCAGCCACCCCTCAGTGTCCGTCTCCCCAGGACAGACAGCCAG

CDR1-L

D2-57 CATCACTTGC CGGGCAAGTCAGAGCATTTGGCAGCTACTTAAAC TGGTATCAGCAGAAAAAC  
C1-54 CCTCTCCTGC ACGGCCAGTCAGAGTGTGACAGCAACTTAGCC TGGTATCAGCAAAAAACC  
P1-G10 CGTCACTTGC TCTGGAGATGCATTTGGGACAAAAAATATGCTTCC TGGTATCAACAGAAAGCC

(57)

JP 5054385 B2 2012.10.24

FR2-L

D2-57 AGGGAAGCCCTAAGGCCCTGATCTAT GCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATC  
C1-54 TGGCCAGGCTCCCAGACTCCTCGTCTAT GGTGCATCCACTAGGCCACT GGTGTCCCAGC  
P1-G10 AGGCCAGTCCCCTGTACTGGTCATCTTT CAAGATTCCAAAGCGGCCCTCA GGGATCCCCTGA

CDR2-L

FR3-L

D2-57 AAGGTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAACTTG  
C1-54 CAGGTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGCGTTCACTCTCACCATCGACAGCCTGCAGTCTG  
P1-G10 GCGGTTCTTGCTCCAATCTTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTG

CDR3-L

D2-57 AAGATTTTGCAACTTACTACTGT CAACAGAGTTACA.....GTACCCCTCG TTCGGCC  
 C1-54 AAGATTTTGCAGTTTATTACTGT CAGCAGTATAATAAGTGGCCCTCCGTACTCC TTTGGCC  
 P1-G10 TGGATGAGGCCGACTATTATTGT CAGGCGTGGACA...CTACAGCTTATGTC TTCGGAA

FR4-L

D2-57 AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA  
 C1-54 AAGGGACCAAGCTGGAGATCAAG  
 P1-G10 CTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTA

それぞれ配列番号 39、40、および 41

可変領域 - 重鎖 (核酸)

FR1-H

D2-57 GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGCTTGTTCAGCCCTGGTGGTCTTTACGTCCTT  
 C1-54 GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGCTTGTTCAGCCCTGGTGGTCTTTACGTCCTT  
 P1-G10 GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGCTTGTTCAGCCCTGGTGGTCTTTACGTCCTT

30

20

10

## CDR1-H

D2-57 TC TTGGCGCTGCTTCCGGATTTCAC TTTCTCT CGTTACGTTATGTGG TGGGTTCCGCCAAGCT  
 C1-54 TC TTGGCGCTGCTTCCGGATTTCAC TTTCTCT CATTACGGTATGTCT TGGGTTCCGCCAAGCT  
 P1-G10 TC TTGGCGCTGCTTCCGGATTTCAC TTTCTCT CATTACTTATGCAG TGGGTTCCGCCAAGCT

## FR2-H

## CDR2-H

D2-57 CCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TATATCTGGCCCTTCTGGTGGCAATACTTATTAT  
 C1-54 CCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT GTTATCTCTCCTTCTGGTGGCCGACTCTTTAT  
 P1-G10 CCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TATATCGGTTCTTCTGGTGGCAATACTTATTAT

## FR3-H

D2-57 GCTGACTCCGTTAAAGGT CGCTTCACTATCTTAGAGACAACCTTAAGAATACTCTCTAC  
 C1-54 GCTGACTCCGTTAAAGGT CGCTTCACTATCTTAGAGACAACCTTAAGAATACTCTCTAC  
 P1-G10 GCTGACTCCGTTAAAGGT CGCTTCACTATCTTAGAGACAACCTTAAGAATACTCTCTAC

## FR3-H (続き)

D2-57 TTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGGGAG TAGCTAC  
 C1-54 TTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGGGAA .....  
 P1-G10 TTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGGGAG AGGGACC



## 【表2】

表2: 代表的 ELISA データ

単離物番号	HA、Mg <sup>2+</sup> 存在	HA、Mg <sup>2+</sup> 不在	LA、Mg <sup>2+</sup> 存在	LA、Mg <sup>2+</sup> 不在
対照 #1	0.15	0.10	0.13	0.07
C1-54	1.02	0.55	1.17	0.49
D2-57	0.68	0.09	0.13	0.07
P1-G10	0.87	1.06	0.16	0.08
対照 #2	0.17	0.10	0.14	0.07
ファージなし	0.10	0.08	0.08	0.06
P1-G10, 細胞なし	0.05	0.06	0.05	0.05
ブランク	0.05	0.05	0.05	0.05

## 【0319】

HAはLFA-1の高親和性開放型を示す。LAはLFA-1の低親和性閉鎖型を示す。対照#1は異なる標的と結合するファージをさす。対照#2は異なる標的と結合する別のタンパク質である。数字は任意の単位である。

10

## 【0320】

D2-57の生殖系列化 (germlining)

D2-57軽鎖をヒト生殖系列配列と比較した。生殖系列配列 (例えば、VKI-02::JK1) に対する類似性の数を増加する1以上の改変を含むD2-57変異体を使用される。例えば、ある抗体は、1個以上の次の置換、例えば1、2、3、4、5または6個の次の置換 (または挿入)、例えばG30S、L40P、A46L、L80P、W96ins、およびS97Tを有するD2-57軽鎖を含みうる。多くの場合、A46はアラニンとして保持することが好ましい。例えば、該抗体はW96をもたらす挿入を含みうる。

30

## 【0321】

C1-54軽鎖をヒト生殖系列配列 (例えば、VKIII-L2) と比較した。ある抗体は、1個以上の次の置換、例えば1~11、2~5、または6~11個の次の置換 (または挿入)、例えばD1E、Q3V、V19A、T24R、D30S、V48I、V58I、A70E、D76S、K93N、およびP95a を有するC1-54軽鎖を含みうる。

## 【0322】

P1-G10軽鎖をヒト生殖系列配列 (例えば、VL2-1 aka VL3 11-7) と比較した。ある抗体は、1個以上の次の置換、例えば1~12、2~5、または6~12個の次の置換 (または挿入)、例えばQ1S、S2Y、V3E、V21I、A28K、Q31aD、S34C、F49Y、V81M、T93S、T94S、およびA95a(ins) を有するP1-G10軽鎖を含みうる。

40

## 【0323】

vg3-23関連重鎖はJH領域に以下の代表的配列を1つ以上含むことができる:

JH1 ---AEYFQHWGQGLVTVSS (配列番号45)  
 JH2 ---YWYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号46)  
 JH3 -----AFDIWGQGTMTVTVSS (配列番号47)  
 JH4 -----YFDYWGQGLVTVSS FDYWGQGLVTVSS (配列番号48)  
 JH5 -----NWFDPWGQGLVTVSS (配列番号49)  
 JH6 YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号50)

## 【0324】

抗体は、1個以上の次の置換、例えば1~9、2~5、または6~9個の次の置換、例えばR31

50

S、V33A、W35S、Y50A、W52S、P52aG、N56S、S94R、A99Y、I102Y、およびM108Lを有するD2-57重鎖を含みうる。したがって、この重鎖可変ドメインは生殖系列配列V3-23に対して10、7、6、または5個より少ない相違を含む。

【0325】

抗体は、1個以上の次の置換、例えば1~7、例えば1、2、3、4、5、6、または7個の次の置換、例えばH31S、G33A、V50A、P52aG、R56S、L58Y、およびK94Rを有するC1-54重鎖を含みうる。したがって、この重鎖可変ドメインは生殖系列配列V3-23に対して7、6、または5個より少ない相違を含む。

【0326】

抗体は、1個以上の次の置換、例えば1~7、例えば1、2、3、4、5、6、または7個の次の置換、例えばH31S、S33A、Q35S、Y50A、G52S、S52aG、およびN56Sを有するP1-G10重鎖を含みうる。したがって、この重鎖可変ドメインは生殖系列配列V3-23に対して10、7、6、または5個より少ない相違を含む。

【0327】

D2-57のHC CDR3の親和性成熟

D2-57の重鎖可変ドメインのCDR3領域に変異を含む変異体を作製した。そのような変異体から、高親和性(HA)I-ドメインと結合するクローンを、次の条件を用いて選択した：7.5分の結合時間、20nMのHA I-ドメイン、および1μMのD2-57 IgG1抗体との16時間のインキュベーション。活性型立体配座のLFA-1 I-ドメインと結合したいくつかの代表的な変異体は、重鎖のCDR3領域に、DX-2001配列の残基96から120までの次の配列を有する：

<--CDR3-->

12345678901

E05 96 CASSYDLWSNAFDKWGQGMVTVSS 120 (配列番号53由来)  
 A04 96 CASSYDLWSYAFEIWGQGMVTVSS 120 (配列番号55由来)  
 C09 96 CASSYDYWSNAFDSWGQGMVTVSS 120 (配列番号51由来)  
 F07 96 CASSFDFWSNAFDMWGQGMVTVSS 120 (配列番号52由来)  
 B04 96 CASSYDFWSNAYANWGQGMVTVSS 120 (配列番号56由来)  
 F05 96 CANSYDFRSNAFAVWGQGMVTVSS 120 (配列番号54由来)  
 C02 96 CANSFDFWSNAFELWGQGMVTVSS 120 (配列番号57由来)

\*\*.\*:\* \* \*: \*\*\*\*\*

【0328】

これらの重鎖可変ドメインのより完全な配列は次のとおりである：

C09変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCASSYDYWSNAFDSWGQGMVTVSS (配列番号51)。

【0329】

F07変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCASSFDFWSNAFDMWGQGMVTVSS (配列番号52)。

【0330】

E05変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCASSYDLWSNAFDKWGQGMVTVSS (配列番号53)。

【0331】

F05変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCANSYDFRSNAFAVWGQGMVTVSS (配列番号54)。

【0332】

A04変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY

LQMNSLRAEDTAVYYCASSYDLWSYAFEIWGQGMVTVSS (配列番号55)。

【0333】

B04変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCASSYDFWSNAYANWGQGMVTVSS (配列番号56)。

【0334】

C02変異体は下記の配列を含む：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKGLEWVSYIWPSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCANSDFWVSNAFELWGQGMVTVSS (配列番号57)。

【0335】

理論に拘束されるものではないが、CDR3の3位のアスパラギン酸は、I-ドメインに結合した $Mg^{2+}$ イオンと相互作用する可能性がある。このアスパラギン酸は、親和性成熟を受けた80の異なるFabのうち75で保存されていた。

【0336】

D2-57 (DX-1998.2)を有するHA細胞と84の異なるsFab単離物を用いるICAM-1ブロッキングアッセイを行った。HAおよびLA細胞を、10% FCS、100U/ml ペニシリン-ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、および0.1mM MEM非必須アミノ酸を添加したRPMI培地中で37、5%  $CO_2$ にて培養した。細胞を回収し、10mM EDTAを含有するHBSで1回洗い、続いてHBSで2回洗浄した。細胞を、プロトコルに示された活性化バッファー (HBS、10mM  $MgCl_2$ 、2mM EGTA) または不活性化バッファー (HBS、2mM  $MgCl_2$ 、2mM  $CaCl_2$ ) 中に再懸濁させた。骨髓腫IgGを添加してFc受容体をブロックした。抗体の添加後、ICAM-1/SV-PE複合体 (4:1) を加えた。30分後、細胞を洗浄して染色溶液中に再懸濁させた。GUAVA EXPRESS™プロトコルを用いてFACS解析を実施した。

【0337】

可溶性Fabを用いたアッセイにおいて、親和性成熟を受けた抗体のうち3つの抗体の $IC_{50}$ が、並行して行った可溶性Fab形態のD2-57についてが $11.5 \pm 4.8nM$ であったのに対して、 $8.6 \pm 3.1nM$ 、 $7.6 \pm 2.8nM$ 、および $6.5 \pm 2.6nM$ であった。

【0338】

DX-2001

以下はDX-2001軽鎖 (可変および定常) をコードする代表的な核酸配列である：

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA  
GAGCATTGGCAGCTACTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT  
TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCGTTCCGGCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAG  
AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC  
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA  
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
(配列番号58)。

【0339】

以下はDX-2001重鎖 (可変および定常) をコードする代表的な核酸配列である：

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCCTGCTTCCGGATT  
CACTTTCTCTCGTTACGTTATGTGGTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTATATCTGGCCTT  
CTGGTGGCAATACTTATTATGCTGACTCCGTTAAAGTCCGTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTAC  
TTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGTAGCTACGATTTTTGGAGTAATGCTTT  
TGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCT  
GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCCG  
TGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCCGGACTCTACTCCCTCAGCAG  
CGTAGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAAAAGCCAGCAACCAAGG  
TGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCATCATGCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTC

10

20

30

40

50

TTCTGTTCCTCCCAAAACCCAAGGACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG  
 CCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG  
 AGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG  
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAGCCACA  
 GGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC  
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGT  
 GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAATGA (配列番号59)。

【 0 3 4 0 】

以下はDX-2001軽鎖 (可変および定常) の代表的なアミノ酸配列である :

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQSIGSYLNWYQQKPKAPKAL IYAASLQSGVPSRFSGSGTDFTLT ISSLQP  
 EDFATYYCQSYSTPSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
 SVTEQDSKDSYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号60)。

【 0 3 4 1 】

以下はDX-2001重鎖 (可変および定常) IgG4の代表的なアミノ酸配列である :

EVQLLESGLGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVVRQAPGKLEWVSYIWPSSGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCASSYDFWSNAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSV  
 FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDLDS  
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号61)。

【 0 3 4 2 】

軽鎖の変更は、フレームワーク2の40位でのThrからProへの変更および/またはフレーム  
 ワーク3の80位でのLeuからProへの変更を含む。好ましくは、フレームワーク2の46位は (生殖系列Leuではなく) Alaである。

【 0 3 4 3 】

DX2001 (D2-57の生殖系列化変異体、IgG4) は、MgCl<sub>2</sub>/EGTA条件下にあるPBMC (末梢血  
 単核細胞) の小割合と結合する。この結合は、PMA (10ng/ml) またはDTT (500 μM) で20  
 分間処理すると、劇的に増加する。PMAまたはDTTによる処理は高親和性状態のLFA-1を誘  
 導する。ICAM-1はPBMCと同様の結合特性を有する。

【 0 3 4 4 】

PKC阻害剤であるGF109203Xおよびスタウロsporin (staurosporine) は、DX-2001のPB  
 MCへのPMA誘導結合をブロックした。

【 0 3 4 5 】

種特異性

健康な動物 (ラット、ヒツジ、ウサギ、イヌ、アカゲザル、カニクイザル、およびチン  
 パンジー) からの全血をValley Biomedical Products and Services, Incより入手した。  
 全血からPBMCを分離し、低接着6ウェルプレートで10% FBS、1X ペニシリン/ストレプトマ  
 イシンを添加したRPMI 1640中に一晩培養した。PBMCを回収し、ハックス平衡塩溶液 (H  
 BSS) 1X、10mM EDTAを含有する20mM HEPESバッファーで1回洗浄し、その後HBSで2回洗浄  
 した。細胞をHBSS中に2 × 10<sup>6</sup> 個/mlで再懸濁させ、96ウェルプレート (Costar丸底) にウ  
 エルあたり100 μlのアリコートを追加した。スピンドウン後、細胞ペレットを50 μlの活  
 性化バッファー (HBSS、10mM MgCl<sub>2</sub>、2mM EGTA) または不活性化バッファー (HBSS、2mM  
 CaCl<sub>2</sub>、2mM MgCl<sub>2</sub>) 中に再懸濁させた。いくつかのウェルについては、PMAまたはDTTを添  
 加して、最終濃度をそれぞれ10ng/mlまたは500 μMとした。その後、細胞を37 °Cで20分間  
 インキュベートした。細胞をDX-2001 (10 μg/ml) または陰性対照抗体Fc-A2 (抗-CD44-Fc  
 IgG<sub>4</sub> 10 μg/ml) と共にインキュベートした。

【 0 3 4 6 】

特定の種 (ヒト、ヒツジ、イヌ、ラット、ウサギ) 由来のCD-11aを認識する抗体を陽性  
 対照として用いた。ゆっくり振動させながら室温で30分間インキュベートした後、細胞を

10

20

30

40

50

、0.05%  $\text{NaN}_3$ を含有する220  $\mu\text{l}$ /ウェルのHBSSで2回洗浄し、HBSSで1:200に希釈した100  $\mu\text{l}$ /ウェルのPE標識二次抗体（抗ヒトIgG-PE、コード：709-116-149、Jackson Immunoresearch、および抗体マウスIgG-PE、コード：115-115-164、Jackson Immunoresearch）を用いて染色した。細胞を4で30分間インキュベートしてから、0.05%  $\text{NaN}_3$ を含有する220  $\mu\text{l}$ /ウェルのHBSSで2回洗浄し、200  $\mu\text{l}$ /ウェルのHBSS中に再懸濁させて、GUAVA EXPRESS™プロトコル（Guava Technologies, Inc., Hayward CA）を用いて解析した。

【0347】

DX-2001は、ヒトPBMCと同程度に良好なチンパンジーPBMCとの結合を示した。これらの種の細胞への結合は、PMA処理後に劇的に増加した。DX-2001は、カニクイザル、ラットおよびヒツジPBMCとの最小限の結合を示した。活性化条件での結合はPMA処理後にわずかに増加した。しかしながら、結合レベルはヒトおよびチンパンジーPBMCにおけるよりもはるかに低かった。DX-2001はアカゲザル、イヌおよびウサギPBMCとの有意な結合を示さない（表3にまとめてある）。

【表3】

種	細胞	処理なし	PMA	DTT
ヒト	PBMCs	++	++++	+++++++
チンパンジー	PBMCs	++	++++	++
カニクイザル	PBMCs	+	++~+++	++~+++
アカゲザル	PBMCs	-	-	ND
イヌ	PBMCs	-	-	ND
ウサギ	PBMCs	-	-	ND
ラット	PBMCs	+	++	ND
ヒツジ	PBMCs	+	++	ND
マウス	EL4 細胞系	-	ND	ND

【0348】

PMA処理を行わないhPBMCでのDX-2001の結合強度を「++」と定めた；PMA処理後の該結合強度を「++++」と定めた；DTT処理後の該結合強度を「+++++」と定めた。「-」：結合なし。N.D.：測定せず。7種の生物からの全PBMCの結合をhPBMC結合と比較した。

【0349】

HA細胞（すなわち、高親和性形態で固定されたLFA-1を発現している細胞）へのI-CAM結合を阻害するD2-57 IgGの能力を評価し、並行してMHM24 IgGと比較した。GUAVA™解析を用いて $\text{IC}_{50}$ 値を求めた。一実験では、D2-57およびMHM24 IgGの $\text{IC}_{50}$ 値は、それぞれ $0.18 \pm 0.02$ および $0.24 \pm 0.04\text{nM}$ であった。別の実験では、D2-57およびMHM24 IgGの $\text{IC}_{50}$ 値は、それぞれ $0.59 \pm 0.1\text{nM}$ （D2-57 IgGの第1ロット）および $0.62 \pm 0.16\text{nM}$ （D2-57 IgGの第2ロット）、ならびに $1.8 \pm 0.8\text{nM}$ （MHM24）であった。さらに別の実験では、D2-57およびMHM24 IgGの $\text{IC}_{50}$ 値は、それぞれ $0.24 \pm 0.02$ および $0.59 \pm 0.13\text{nM}$ であった。さらに別の実験では、D2-57およびMHM24 IgGの $\text{IC}_{50}$ 値は、それぞれ $0.68 \pm 0.2$ および $2.4 \pm 0.8\text{nM}$ であった。これらの実験から明らかになるパターンは、実験誤差の余地内で、D2-57がこの特定のアッセイ設定条件においてMHM24と同程度またはそれより良好な $\text{IC}_{50}$ 値を有する、ということである。

【0350】

ヒトPBMCとのI-CAM結合を阻害するD2-57 IgGの能力も評価した。4つの実験の平均は、D

10

20

30

40

50

2-57およびMGM24 IgGの $IC_{50}$ 値がそれぞれ $0.54 \pm 0.44$ および $0.33 \pm 0.17$ nMであることを示した。

【0351】

D2-57はICAM-1結合をブロックしただけでなく、PHA刺激リンパ球増殖をもブロックすることができた。PHA刺激リンパ球増殖アッセイの詳細については、例えば、Vermot Desrochesら、Scand. J. Immunol. 1991, 33: 277-286を参照されたい。このアッセイは、PHA（フィットヘマアグルチニン）刺激リンパ球増殖アッセイに対するD2-57（DX-1999）の効果を評価するものである。簡単に述べると、PBMCを連続希釈IgGの存在下にて $1 \mu\text{g/ml}$ のPHAで刺激した。3日間の刺激後、BrdU化学発光アッセイで増殖について細胞を分析した。

【0352】

IgG型のD2-57はまた、 $6.7\text{nM}$ の濃度で使用したとき、ケラチノサイト（角化細胞）へのHA細胞の結合をブロックした。D2-57による阻害の $IC_{50}$ 値は約 $1\text{nM}$ であった。ケラチノサイト接着アッセイの詳細については、例えば、Werther W. A.ら、J. Immunol. 1996, 157: 4986-4995を参照されたい。このアッセイは、ケラチノサイトへのHA細胞（HA発現K562細胞）の接着に抗LFA-1 IgG D2-57が及ぼす効果を評価するものである。簡単に述べると、HA細胞をカルセイン（calcein）AMで標識し、連続希釈した試験用IgGと共にインキュベートして、ケラチノサイト単層に添加した。インキュベーション後、単層を十分に洗い、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光を測定した。

【0353】

さらなる抗体選択を行って、D2-57の親和性成熟変異体を同定した。変異させた抗体を高親和性立体配座で固定されたI-ドメインと結合させ、その後 $1 \mu\text{M}$ のD2-57 IgG1抗体を用いて溶出させた。親和性が改善された3種の抗体は、3つの実験の平均に基づいて、 $0.83 \pm 0.55$ 、 $0.74 \pm 0.17$ 、および $0.54 \pm 0.33$ の $IC_{50}$ 値を示した。

【0354】

本発明の他の実施形態も特許請求の範囲に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0355】

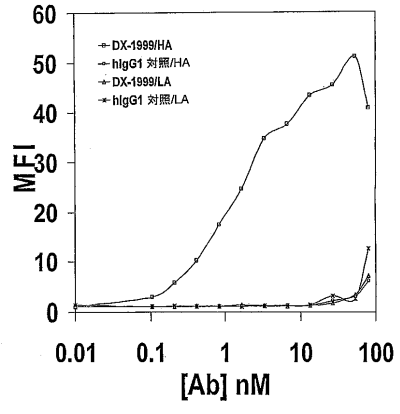
【図1】LA細胞（低親和性立体配座で固定されたI-ドメインを有するLFA-1を発現している細胞）と比べて、HA細胞（高親和性立体配座で固定されたI-ドメインを有するLFA-1を発現している細胞）へのDX-1999（D2-57ともいう）結合を評価する代表的実験からのグラフである。

10

20

30

【 図 1 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 B 5/055	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	G
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 B 5/05	3 8 3
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
		C 1 2 N 15/00	A
		C 1 2 P 21/08	
		G 0 1 N 33/53	D

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 コーエン, エドワード, エイチ.

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州, ベルモント

(72)発明者 ロンドン, アイザック, ジェイ.

アメリカ合衆国 9 4 1 3 1 カリフォルニア州, サンフランシスコ, マーケット ストリート  
3 7 3 1

(72)発明者 スプリンガー, ティモシー, エー.

アメリカ合衆国 0 2 1 6 7 マサチューセッツ州, ニュートン, ウッドマン ロード 3 6

(72)発明者 島岡 要

アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州, ブルックリン

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第0 2 / 0 1 8 5 8 3 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 16/00

C12N 15/00

CA/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	立体配座特异的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5054385B2</a>	公开(公告)日	2012-10-24
申请号	JP2006554260	申请日	2005-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司 该CB伯爵生物医学研究所有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧，合作社 该CB伯爵生物医学研究所，公司		
当前申请(专利权)人(译)	模具斧，合作社 该CB伯爵生物医学研究所，公司		
[标]发明人	コーエンエドワードエイチ ロンドンアイザックジェイ スプリングーティモシーエー 島岡要		
发明人	コーエン,エドワード,エイチ. ロンドン,アイザック,ジェイ. スプリングー,ティモシー,エー. 島岡 要		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61P29/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P37/06 A61B5/055 A61P35/00 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C07K16/2845 C07K2317/32 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C07K16/46 A61K39/395.V A61K39/395.Y A61P29/00 A61P17/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P37/06 A61K39/395.G A61B5/05.383 A61P35/00 C12N15/00.A C12P21/08 G01N33/53.D		
优先权	60/546354 2004-02-19 US		
其他公开文献	JP2008506631A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 本发明提供筛选结合蛋白(例如抗体)的方法,所述结合蛋白结合活性构象整联蛋白(例如,活性形式LFA-1(aLFA-1))与LFA的无活性构象相比较提供。在一个实施方案中,结合蛋白抑制LFA-1的至少一种功能,例如,抑制LFA-1与LFA-1的同源配体(例如,ICAM蛋白)的结合相互作用。这种结合蛋白可用于治疗或预防炎症性疾病和其他疾病。

名称	アミノ酸配列	
D2-57 LC	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASQSIGSYLN WYQQKTPGKAPKALIIY AASSLQS	
配列番号 22	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQLEDFAFYIC QQSYSTPS FGQGTKVEIKRT	10
D2-57 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS RYVMW WVRQAPGKLEWVS YIWPSGGNTYYADSVKG	
配列番号 23	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS SYDFWSNAFDI WGQGTMTVSS	
DX-2001 LC	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASQSIGSYLN WYQQKTPGKAPKALIIY AASSLQS	20
配列番号 24	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQLEDFAFYIC QQSYSTPSFGQGTKVEIKRT	
DX-2001 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS RYVMW WVRQAPGKLEWVS YIWPSGGNTYYADSVKG	
配列番号 25	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS SYDFWSNAFDI WGQGTMTVSS	30
C1-54 LC	DIQMTQSPATLSVSPGERVTLSC TASQSVDSNLA WYQQKPGQAPRLLVY GASTRAT	
配列番号 26	GVPARFSGSGSFTAFTLIDLSQSEDFAVYYIC QQYNKWPFPYS FGQGTKLEIKRT	