

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4309383号
(P4309383)

(45) 発行日 平成21年8月5日(2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A G
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00

請求項の数 4 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-224609 (P2005-224609)
 (22) 出願日 平成17年8月2日(2005.8.2)
 (62) 分割の表示 特願平10-524645の分割
 原出願日 平成9年10月20日(1997.10.20)
 (65) 公開番号 特開2006-36779 (P2006-36779A)
 (43) 公開日 平成18年2月9日(2006.2.9)
 審査請求日 平成17年8月2日(2005.8.2)
 (31) 優先権主張番号 08/757,205
 (32) 優先日 平成8年11月27日(1996.11.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗CD11a抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：5を有する重鎖可変領域及び配列番号：2を有する軽鎖可変領域を含むヒト化抗 - CD11a抗体からなる、患者におけるLFA-1介在性疾患の治療剤であって、前記疾患が、喘息、リウマチ関節炎、移植における移植片対宿主拒絶、多発性硬化症、乾癬、全身性ループスエリテマトーデス、皮膚炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎から選択される治療剤。

【請求項2】

配列番号：5を有する重鎖可変領域及び配列番号：2を有する軽鎖可変領域を含むヒト化抗 - CD11a抗体からなる、T細胞依存免疫機能の阻害剤。

【請求項3】

患者におけるLFA-1介在性疾患を治療するための医薬の製造における、配列番号：5を有する重鎖可変領域及び配列番号：2を有する軽鎖可変領域を含むヒト化抗 - CD11a抗体の使用であって、前記疾患が、喘息、リウマチ関節炎、移植における移植片対宿主拒絶、多発性硬化症、乾癬、全身性ループスエリテマトーデス、皮膚炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎から選択される使用。

【請求項4】

T細胞依存免疫機能を阻害するための医薬の製造における、配列番号：5を有する重鎖可変領域及び配列番号：2を有する軽鎖可変領域を含むヒト化抗 - CD11a抗体の使用

。【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般にヒト化抗CD11a抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

リンパ球機能関連抗原1(LFA-1; CD11a/CD18)は、免疫学的応答及び炎症のために必須な細胞の相互作用の間に白血球粘着に含まれる(Larsonら、Immunol. Rev. 114:181-217(1990))。LFA-1は、 α 2インテグリンファミリーのメンバーであり且つユニークサブユニット、CD11a及び β 2サブユニット、CD18、共通の他の α 2インテグリンレセプターMac-1及びp150,95からなる。LFA-1のリガンドは、白血球、内皮及び皮膚の線維芽細胞上で発現した、細胞間接着分子ICAM-1(Dustinら、J. Immunol. 137:245-254(1986))、休眠内皮及びリンパ球上で発現したICAM-2(de Fougerollesら、J. Exp. Med. 174:253-267(1991))、及び単球と休眠リンパ球で発現したICAM-3(de Fougerollesら、J. Exp. Med. 179:619-629(1994))を含む。

10

【0003】

LFA-1とICAMsに対するモノクローナル抗体(MAbs)は、インビトロで、T細胞活性化(Kuypersら、Res. Immunol. 140:461(1989))、T細胞依存B細胞増殖(Fischerら、J. Immunol. 136:3198-3203(1986))、標的細胞渙散(Krenskyら、J. Immunol. 131:611-616(1983))、及び脈管内皮へのT細胞の接着(Loら、J. Immunol. 143:3325-3329(1989))を含む幾つかのT細胞依存免疫機能を抑制することが示されている。マウスにおいて、抗CD11a MAbsは、タンパク質抗原に対する耐性(タナカら、Eur. J. Immunol. 25:1555-1558(1995))、及び心臓(Cavazzana-calvoら、Transplantation 59:1576-1582(1995))、ナカクラら、Transplantation 55:1112-417(1993))、骨髄(Cavazzana-Calvoら、Transplantation 59:1576-1582(1995))、van Dijkenら、Transplantation 49:882-886(1990))、角膜(Heら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35:3218-3225(1994))、小島(ニシハラら、Transplantation Proc. 27:372(1995))及び甲状腺(Talentoら、Transplantation 55:418-422(1993))同種移植片の存続延長を誘導する。

20

30

【0004】

ヒトにおいて、抗CD11a MAbsは、骨髄移植後の移植片不全を予防し、(Fischerら、Blood 77:249-256(1991))、Stoppaら、Transplant Intl. 4:3-7(1991))及びコルチコステロイド及びアザチオプリンに加えて、抗CD11a MAbsによって予防的に処理した腎臓同種移植片の予備の臨床的研究が有望視される(Hourmantら、Transplantation 58:377-380(1994))。移植拒絶に対する現行の治療は、OKT3、ネズミの抗ヒトCD3 MAbs、及びシクロスポリンAの使用を含む。OKT3治療は、有効であるがしかし、幾つかの望ましくない副作用を有する；その使用は、発熱、悪寒及び胃腸の苦痛の結果を生じる腫瘍壊死因子、インターフェロン、インターロイキン-2、及びインターロイキン-6を含む多数のサイトカインの放出の結果を生じる(再考のため、Parlevlietら、Transplant Intl. 5:234-246(1992))、Dantalら、Curr. Opin. Immunol. 3:740-747(1991)参照)。シクロスポリンAは有効であるが、しかしまた、深刻な副作用をも有する(再考のため、Barry, Drugs, 44:554-566(1992)参照)。

40

【特許文献1】米国特許第4,665,077号

【特許文献2】米国特許第4,120,649号

【特許文献3】WO 90/08187

【特許文献4】米国特許第5,114,721号

【特許文献5】WO 90/11294

【特許文献6】WO 91/01133

【特許文献7】EP340,109

50

- 【特許文献 8】米国特許第4,816,567号
- 【特許文献 9】EP 404,097
- 【特許文献 10】WO 93/11161
- 【特許文献 11】米国特許第4,675,187号
- 【特許文献 12】米国特許第4,275,149号
- 【特許文献 13】WO 96 / 27011
- 【特許文献 14】米国特許第4,676,980号
- 【特許文献 15】WO 94 / 11026
- 【特許文献 16】米国特許第4,485,045号
- 【特許文献 17】米国特許第4,544,545号 10
- 【特許文献 18】米国特許第5,013,556号
- 【特許文献 19】WO 81 / 01145
- 【特許文献 20】WO 88 / 07378
- 【特許文献 21】米国特許第4,975,278号
- 【非特許文献 1】Dustinら、J. Immunol . 137: 245-254(1986)
- 【非特許文献 2】de Fougerollesら、J. Exp. Med . 174:253-267(1991)
- 【非特許文献 3】de Fougerollesら、J. Exp. Med . 179:619-629(1994)
- 【非特許文献 4】Kuypersら、Res. Immunol . 140:461(1989)
- 【非特許文献 5】Fischerら、J. Immunol . 136:3198-3203(1986)
- 【非特許文献 6】Krensky ら、J. Immunol.131:611-616(1983) 20
- 【非特許文献 7】Loら、J. Immunol . 143:3325-3329(1989)
- 【非特許文献 8】タナカら、Eur. J. Immunol . 25:1555-1558(1995)
- 【非特許文献 9】Cavazzana-calvoら、Transplantation 59:1576-1582(1995)
- 【非特許文献 10】ナカクラら、Transplantation 55:1112-417(1993)
- 【非特許文献 11】Cavazzana-Calvoら、Transplantation 59:1576-1582(1995)
- 【非特許文献 12】van Dijkenら、Transplantation 49:882-886(1990)
- 【非特許文献 13】Heら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci . 35:3218-3225(1994)
- 【非特許文献 14】ニシハラら、Transplantation Proc . 27:372(1995)
- 【非特許文献 15】Talentoら、Transplantation 55:418-422(1993)
- 【非特許文献 16】Fischerら、Blood 77:249-256(1991) 30
- 【非特許文献 17】Stoppaら、Transplant Intl . 4:3-7(1991)
- 【非特許文献 18】Hourmantら、Transplantation 58:377-380(1994)
- 【非特許文献 19】Parlevliet ら、Transplant Intl . 5:234-246(1992)
- 【非特許文献 20】Dantalら、Curr. Opin. Immunol . 3:740-747(1991)
- 【非特許文献 21】Barry, Drugs , 44:554-566(1992)
- 【非特許文献 22】Champeら、J. Biol. Chem . 270:1388-1394(1995)
- 【非特許文献 23】Quら、Proc.Natl.Acad.Sci.92:10277-10281(1995)
- 【非特許文献 24】Offnerら、Science 251 :430-432(1991)
- 【非特許文献 25】Kohlerら、Nature 256:495(1975)
- 【非特許文献 26】Clacksonら、Nature 352:624- 628(1991) 40
- 【非特許文献 27】Marksら、J. Mol. Biol . 222:581-597(1991)
- 【非特許文献 28】Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984)
- 【非特許文献 29】Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest , 5th Ed. Public Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , MD. (1991)
- 【非特許文献 30】ChothiaとLesk J. Mol. Biol . 196:901-917(1987)
- 【非特許文献 31】Jonesら、Nature 321:522-525(1986)
- 【非特許文献 32】Reichmannら、Nature 332:323-329(1988)
- 【非特許文献 33】Presta, Curr. Op. Struct. Biol . 2:593-596(1992)
- 【非特許文献 34】Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)
- 【非特許文献 35】Zapataら、Protein Eng . 8(10):1057-1062(1995) 50

- 【非特許文献 3 6】Hieldら、Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165(1988)
- 【非特許文献 3 7】Evanら、Hol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616(1985)
- 【非特許文献 3 8】Paborskyら、Protein Engineering 3(6):547- 553(1990)
- 【非特許文献 3 9】Hildrethら、Eur. J. Immunol. 13:202-208(1983)
- 【非特許文献 4 0】Hunsonら、Anal. Biochem., 107 :220(1980)
- 【非特許文献 4 1】Morimotoら、Jornal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107 117(1992)
- 【非特許文献 4 2】Brennanら、Science 229:81(1985)
- 【非特許文献 4 3】Kostelnyら、J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)
- 【非特許文献 4 4】Gruberら、J. Immunol. 152:5368(1994) 10
- 【非特許文献 4 5】Caronら、J. Exp Med. 176:1191 1195(1992)
- 【非特許文献 4 6】Shopes、B. J. Immunol. 148:2918-2922(1992)
- 【非特許文献 4 7】Wolffら、Cell Research 53:2560-2565(1993)
- 【非特許文献 4 8】St evensonら、Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)
- 【非特許文献 4 9】Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:368 8(1985)
- 【非特許文献 5 0】Hwangら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030(1980)
- 【非特許文献 5 1】Martinら、J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)
- 【非特許文献 5 2】Gabizonら、J. National Cancer Inst.81(19): 1484(1989)
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】 20
- 【0005】
- 本発明は、ヒト化抗CD11a抗体を提供する。好ましい抗体は、ヒトCD11aのIドメインに(例えば、ここで定義したような「エピトープMHM24」)に結合し、及び/又は約 1×10^{-8} M又はより強い親和性(affinity)とともにCD11aと結合する。好ましい実施態様において、該抗体は、ICAM-1を発現する通常のヒト表皮ケラチノサイトへのジャーカット細胞の接着を防ぐために約1nMまでのIC50(nM)値を有する。好ましいヒト化抗体は、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいて約1nMまでのIC50(nM)の値を有するそれらである。MLRアッセイにおけるヒト化抗体のこのIC50は、インビボで予め試験されているネズミMAb25.3のそれよりも著しく良好である (Fischerら、Blood 77:249-256(1991);Stoppaら、Transplant Intl.4:3 7(1991);H 30 ourmantら、Transplantation 58:377 380(1994))。
- 【課題を解決するための手段】
- 【0006】
- ヒト化抗CD11a抗体は、図1中のヒト化抗体MHM24F(ab)₂の、CDR1(GYSFTGHWHN;配列番号:10)及び/又はCDR2(MIHPSDSETRYNQKFKD;配列番号:11)及び/又はCDR3(GIYFYGTTYFDY;配列番号:12)のアミノ酸配列を備える重鎖可変領域及び/又は図1中のヒト化抗体MHM24F(ab)₂の、CDR1(RASKTISKYLA;配列番号:13)及び/又はCDR2(SGSTLQS;配列番号:14)及び/又はCDR3(QQHNEYPLT;配列番号:15)のアミノ酸配列を備える軽鎖可変領域を有し得る。他の実施態様において、該抗体は、ヒト化MHM24抗体F(ab)₂のCDRsの1又はそれ以上のアミノ酸配列変異体を備え、該変異体は、CDR残基内又は隣接した1又はそれ以上のアミノ酸挿入及び/又はCDR残基内又は隣接した削除及び/又はCDR残基の置換(そのような変異体を生成するための好適なタイプのアミノ酸代替とする置換と共に)を備える。そのような変異体は、約 1×10^{-8} MまでのヒトCD11aの結合親和力を通常は有するであろう。 40
- 【0007】
- 好適な実施態様において、該ヒト化抗体は、配列番号:2のアミノ酸配列を備える軽鎖可変領域及び/又は図1中のヒト化抗体MHM24F(ab)₂の配列番号:5のアミノ酸配列を備える重鎖可変領域及び/又はそのアミノ酸配列変異体を包含する。
- 【0008】 50

ここに記載した通り、アカゲザルCD11a(即ち、「アカゲザル化」抗体)に結合するための能力を与えるために、ヒトCD11a抗原と結合するが、しかしアカゲザルCD11a抗原と有意ではない、ヒト化抗体を後で工作することは可能とされている。この実施態様において、アカゲザルCD11aと結合する抗体は、例えば配列番号：23中のCDR2アミノ酸配列を備え得る。他のCDRsは、ヒト化MHM24抗体F(ab)₂8のためのそれらと同じとされ得る。かくして、該抗体は、配列番号：2中のアミノ酸配列を備える軽鎖と任意に結合した、配列番号：24中の「アカゲザル化」重鎖のアミノ酸配列を備え得る。該抗体の各種の形が、ここに意図される。例えば、該抗CD11a抗体は、完全長抗体(例えば、ヒト免疫グロブリン定常領域を有する)又は抗体フラグメント(例えば、F(ab')₂)とされ得る。さらに、該抗体は、検出可能な標識で標識化、固相上で固定化及び/又は異質な化合物(細胞毒性剤のような)と接合され得る。

10

【0009】

該抗体の診断的及び治療的な使用が意図される。一つの診断的な適用において、本発明は、抗CD11a抗体に、CD11aタンパク質の含有を疑われるサンプルをさらすこと及びそのサンプルへの抗体の結合を測定することを備えるCD11aタンパク質の存在を測定するための方法を提供する。この使用のため、本発明は、CD11aタンパク質を検出するための抗体を用いるための抗体を備えるキットと指示とを提供する。

【0010】

本発明はさらに：該抗体をコード化する分離した核酸；その核酸を備えるベクター、該ベクターにより形質転換される宿主細胞によって認識した配列を制御するために任意に操作可能に結合した；そのベクターを備える宿主細胞；その核酸が発現されるように宿主細胞を培養すること、及び、任意に、宿主細胞培養物から(例えば宿主細胞培養培地から)抗体を回収することを備える該抗体の製造のための方法を提供する。本発明はまた、ヒト化抗CD11a抗体と製薬的に許容されるキャリア又は賦形剤とを備える組成物も提供する。治療的な使用のためのこの組成物は無菌であり且つ凍結乾燥され得る。本発明はさらに、哺乳動物にヒト化CD11a抗体の製薬的有効量を投与することを備える、LFA-1介在疾患に罹った哺乳動物を処置するための方法を提供する。そのような治療的使用のため、他の免疫抑制剤又は接着分子アンタゴニスト(例えば、別のLFA-1アンタゴニスト又はVLA-4アンタゴニスト)が、該ヒト化抗CD11a抗体の前、後又は同時のいずれかで該哺乳動物に共投与され得る。

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

I. 定義

他に指示されぬ限り、ここで用いた場合、用語「CD11a」は、いずれかの哺乳動物からの、しかし好ましくはヒトからのLFA-1のサブユニットに関する。該CD11aは、天然ソースの分子から分離され得るし、又は合成手段により生産され得る(例えば、組換えDNA技術を用い)。ヒトCD11aのためのアミノ酸配列は、例えば、欧州特許第362526B1中に記載される。用語「Iドメイン」は、Champeら、J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)及び/又はQuら、Proc. Natl. Acad. Sci. 92:10277-10281(1995)中に記載したこの分子のその領域に関する。ヒトCD11a Iドメイン(配列番号：7)とアカゲザルCD11a Iドメイン(配列番号：8)のアミノ酸配列は、図2の図面中に図示される。

40

【0012】

ここで用いた場合、用語「エピトープMHM24」は、他に示さない限り、MHM24抗体(後述を参照)に結合するヒトCD11aのIドメイン中の領域に関する。このエピトープは、配列番号：9のアミノ酸配列を、及び任意に、CD11a及び/又はCD18の他のアミノ酸残基を含む。用語「LFA-1介在疾患」は、リンパ球上のLFA-1レセプターを含んだ細胞接着相互作用によって生じられる病理学的な状態に関する。そのような疾患の実例は、乾癬を含む炎症性皮膚疾患のようなT細胞炎症性の応答；炎症性の腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎のような)と関連した応答；成人呼吸窮迫症候群；皮

50

膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；湿疹及び喘息のようなアレルギー状態；T細胞及び慢性炎症性応答の浸潤を含む状態；皮膚知覚過敏反応(ウルシ皮膚炎(poison ivyとpoison oak)を含む)；アテローム硬化症；白血球接着不全；リウマチ様動脈炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、糖尿病、多発性硬化症、レナード症候群、自己免疫性甲状腺炎、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、若年開始糖尿病、及びサイトカイン及び脈管中に典型的に見出されるTリンパ球が介在した遅延形知覚過敏に関連した免疫応答、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び脈管炎のような自己免疫疾患；悪性貧血；慢性閉塞性肺疾患(COPD)；気管支炎；インスリン炎；鼻炎；蕁麻疹；糸球体腎炎；白血球漏出を含む疾患；CNS炎症性疾患；敗血症又は外傷に対する多器官二次的損傷症候群；自己免疫性溶血性貧血；ミエセミアグラビス(myelhemia gravis)；抗原抗体複合体介在性疾患；ネフローゼ症候群；悪性疾患(例えば、慢性リンパ球性白血病又はヘアリーセル白血病のようなB細胞悪性疾患)；移植片対宿主又は宿主対移植片を含む全ての形の移植の疾患；HIVとライノウイルス属感染；肺の線維症二次器官内への腫瘍細胞の転化などを含む。

10

【0013】

付属する治療のためにここで用いるような、用語「免疫抑制剤」は、その移植片が移植されている中での宿主の免疫系を抑制又はマスクするように作用する物質に関する。これは、サイトカイン生産を抑制する、自動抗原発現をダウンレギュレーションする又は抑制する、或いはMHC抗原をマスクする物質を含むであろう。そのような剤の実例は、2-アミノ 6-アリール 5-置換化ピリミジン(米国特許第4,665,077号参照)、アザチオプリン(又はシクロフォスファミド、もしアザチオプリンに対する不利な反応があれば)；プロモクリプチン；グルタルアルデヒド(米国特許第4,120,649号中に記載した通り、MHC抗原をマスクする)；MHC抗原及びMHCフラグメントのための抗イディオタイプ抗体；シクロスポリンA；グルココルチコイド、例えばプレドニゾン、メチルプレドニゾン、及びデキサメタゾンのようなステロイド；抗インターフェロン、又は抗体を含むサイトカイン又はサイトカインレセプターアンタゴニスト；抗腫瘍壊死因子抗体；抗腫瘍壊死因子抗体：抗インターロイキン 2抗体及び抗IL 2レセプター抗体；抗L3T4抗体；異種抗リンパ球グロブリン；全T抗体、好ましくは抗CD3又は抗CD4/CD4a抗体；LFA 3結合領域を含む可能性ペプチド(1990年7月26日公開のWO 90/08187)；ストレプトキナーゼ；TGFβ；ストレプトドルナーゼ；宿主からのRNA又はDNA；FK506；RS 61443；デオキシスパガリン；ラパマイシン；T細胞レセプター(米国特許第5,114,721号)；T細胞レセプターフラグメント(Offnerら、Science 251 :430-432(1991)；WO 90/11294；及びWO 91/01133)；及びT10B9のようなT細胞レセプター抗体(EP340,109)を含む。これらの剤は、CD11a抗体と同時に又は隔たった時間で投与され、且つ当該技術において述べられたと同じ又はそれよりも劣った投薬量で用いられる。好ましい付属の免疫抑制剤は、患者の経歴と同じく、実施されている移植の形を含めた治療されている疾患の形を含む多くのファクターに基づくであろうが、しかし一般に全般に好ましくは、該剤は、シクロスポリンA、グルココルチコイド(基も好ましくはプレドニゾン又はメチルプレドニゾン)、OKT 3モノクローナル抗体、アザチオプリン、プロモクリプチン、異種抗リンパ球グロブリン、又はそれらの混合物から選

20

30

40

【0014】

「処置(treatment)」は、治療的な処置と予防的又は予防手段の両方に関する。処置の必要におけるそれらは、疾患が予防されるべき者であるそれらと同じく、疾患を既に持ったそれらを含む。

【0015】

処置の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどの飼育又は家畜動物、及び動物園、運動用、又は愛玩動物を含んだ哺乳動物として分類されるいずれかの動物に関する。好ましくは、その動物はヒトである。

【0016】

50

ここで用いたような用語「移植片」は、被術者内に移植するためのドナーから得た生体材料に関する。移植片は、小島細胞及び神経誘導細胞(例えばシュワン細胞)のような分離した細胞、新生児の羊膜、骨髄、造血前駆体細胞のような組織、及び皮膚、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、甲状腺葉、肺、腎臓、脈管器官(例えば、血管又は食道)等の器官のような多様な材料を含む。脈管器官は、食道、血管、又は尿管の損傷部分に代えて用いることができる。皮膚移植片は、やけどのみならず、損傷を受けた腸に、- 或いは横隔膜ヘルニアの様な一定の欠陥を塞ぐことに調製するために使用され得る。該移植片は、死体又は生存ドナーからのいずれかの、ヒトを含むいずれかの哺乳動物ソースから得られる。好ましくは、該移植片は、骨髄又は心臓のような器官であり、且つ該移植片のドナー及び宿主は、HLAクラスII抗原に適合される。

10

【0017】

ここで用いた用語「ドナー」は、移植片が得られる、死亡した又は生きた哺乳動物種に関する。好ましくは、該ドナーはヒトである。ヒトドナーは、主要血液群の交差が同種移植の生存に不利益となる可能性の障壁であることから、生理学的検査において性状で且つ同じ主要ABO血液群であるボランティアの血液関連ドナーが好適である。しかしながらそれは、例えばA、B又はAB受容者内へのO型ドナーの腎臓の移植が可能となる。

【0018】

用語「移植」及びそのパリエーションは、その移植が同系の(ここでドナーと受容者は一般に同一である)、同種異系の(ここでドナーと受容者は遺伝的起源が異なるが、同じ種である)、又は異種の(ここでドナーと受容者は異なる種からのものである)のいずれかの、宿主内への移植片の挿入に関する。かくして、典型的なシナリオにおいて、宿主がヒトであり且つ移植片は、同じか異なる遺伝的起源のヒトから得られた同系移植片である。別のシナリオにおいて、移植片は、ヒト受容者宿主内に移植したヒヒの心臓のような、及び例えばブタの心臓弁、又はヒト宿主内に移植した動物ベータ小島細胞又は神経細胞のような系統発生的に広く分離した種からの動物を含む、それが移植される者とは異なる種から得られる。

20

【0019】

宿主による「移植した移植片の抵抗増加」は、それが移植された宿主中の移植片の生存を延長させること、即ち、それが他者からの移植を良好に許容するだろうように宿主免疫系を抑制することに関する。

30

【0020】

「間欠性の」又は「周期性の」投与は、一定期間の時間、及び一以上の数に分離することか好適である規則的なインターバルで継続する投与である。

【0021】

疾患の「選択された耐性」は、疾患の原因となる特異的な因子のための宿主の免疫系によって許容されること、しかし第2の同種の又は異種の移植片を拒絶する宿主の能力を維持することに関する。好ましくは、その耐性は該免疫系が他方を完全なままにしておくようなものである。

【0022】

用語「LFA-1アンタゴニスト」は、ICAM-1とのLFA-1の相互作用の競合的インヒビターとして作用する分子に関する。そのような分子の実例は、CD11a(例えば、ここに記載したヒト化抗CD11a)又はCD18又は両方、ICAM-1に対する抗体、及びペプチドのような他の分子(例えば擬ペプチドアンタゴニスト)のいずれかに対し向けられる抗体を含む。

40

【0023】

用語「VLA-4」は、VCAMとのVLA-4の相互作用の競合的インヒビターとして作用する分子に関する。そのような分子の実例は、VLA-4又はVCAM及び他の分子(例えば擬ペプチドアンタゴニスト)のいずれかに対して向けられる抗体を含む。

【0024】

用語「抗体」は、モノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクロー

50

ナル抗体、多特異性抗体(例えば二特異性抗体)、及びそれらが望ましい生物学的活性を示す限り、抗体フラグメントを最も広く理解し且つ特異的に包含することにおいて用いられる。

【0025】

「抗体フラグメント」は、完全長抗体の部分、一般的に抗原の結合する又はその可変領域を備える。抗体フラグメントの実例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvフラグメント；二量体；線状抗体；単鎖抗体分子；及び抗体フラグメントから形成した多特異性抗体を含む。

【0026】

ここで使用したような用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体に関し、即ちその集団に含まれる個別の抗体は、微量において存在され得る自然発生的変異の可能性を除き同一とされる。モノクローナル抗体は、単独抗原サイトに対して向けられている、高度に特異的なものである。さらに、異なる決定要素(エピトープ)に対し向けられた異なる抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体調製物に対して、それぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に対して向けられる。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られているような抗体の特徴を示し、且ついずれかの特別な方法によって抗体の生産を要求することを構成するためのものでない。本発明に従い使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製され得るし、又は組換えDNA法によって作製され得る(例えば米国特許第4,816,567号参照)。該「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clacksonら、Nature 352:624-628(1991)とMarksら、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)中に記載した技法を用い、ファージ抗体ライブラリーからも分離され得る。

【0027】

ここでのモノクローナル抗体は、特有な種又は特有な抗体クラス又はサブクラスに属するものから得られた抗体における配列と同一であるか又は一致する相同物である重及び/又は軽鎖の部分において「キメラの」抗体(免疫グロブリン)を特異的に含む一方で、該鎖の残りは別な種又は別な抗体クラス又はサブクラスに属するものから得られた抗体における配列と同一であるか又は一致する相同物、同様にそれが望まれる生物学的活性を示す限りは、そのような抗体のフラグメントである(米国特許第4,816,567号；及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

【0028】

ここで用いる場合、用語「超可変領域」は、抗原結合のために応答可能である抗体のアミノ酸残基に関する。該超可変領域は、「相補的検出領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(即ち、軽鎖可変ドメイン中の残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変領域中の31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)；Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び/又は「超可変ループ」(即ち、軽鎖可変ドメイン中の残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変領域中の26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3)；ChothiaとLesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))からのアミノ酸残基を備える。「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここに記載したような超可変領域残基以外のそれら可変領域残基である。

【0029】

非ヒト化(例えばネズミ)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから得た最小配列を含むキメラの抗体である。大部分のために、ヒト化抗体は、受容者の超可変領域残基が、望ましい特異性、親和性、及び容量を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような非ヒト種からの超可変領域残基によって置換された(ドナー抗体)ヒト免疫グロブリン(受容体抗体)とされる。幾つかの実例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、一致する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、受容者抗体において又はドナー抗体において見出されない残基を備える。こ

10

20

30

40

50

これらの修正は、抗体の効率をさらに洗練するために実行される。一般に、該ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンのそれに一致する超可変ループの全て又は実質的に全てである、及びFR領域の全てが又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれである可変領域の、少なくとも1、及び典型的には2つの実質的に全てを備えるであろう。該ヒト化抗体は任意に、免疫グロブリン、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部も含むであろう。更なる詳細のために、Jonesら、Nature 321:522-525(1986);Reichmannら、Nature 332:323-329(1988);及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照。

【0030】

「単鎖Fv」又は「sFv」抗体フラグメントは、抗体のV_HとV_Lドメインとを備え、これらのドメインは、単ポリペプチド鎖中に存在される。一般に、該Fvポリペプチドは、V_HとV_Lドメイン間に、抗原結合化のための望ましい構造を形成するためのsFvを与えるペプチドリンカーをさらに備える。sFvの再考のため、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, RosenbergとMoore eds. Springer-Verlag, New York, pp.269-315(1994)中のPluckthunを参照。

10

【0031】

用語「ダイアボディ(diabodies)」は、2の抗原結合サイトを持つ小さい抗体フラグメントに関し、フラグメントは同じポリペプチド鎖中に軽鎖可変領域(V_L)に接合した重鎖可変領域(V_H)とを備える(V_H-V_L)。同じ鎖上の2つのドメイン間を対にすることを許す非常に短いリンカーを用いることにより、その領域は別の鎖の相補的ドメインと対をなすことを強いるとともに、2つの抗原結合サイトを創作する。ダイアボディは、例えば、EP 404,097;WO 93/11161;及びHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)においてより完全に記載される。

20

【0032】

この出願を通して使用した場合、「線状抗体」の表現は、Zapataら、Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)中に記載される抗体に関する。簡略には、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成するタンデムFdセグメントの対(V_H C_H1 V_H C_H1)を備える。線状抗体は、二特異的又は多特異的とされ得る。

【0033】

「分離した抗体」は、その自然な環境の成分から同定され且つ分離され及び/又は回収されている一つである。その自然環境の汚染成分は、該抗体の診断的又は治療的使用を妨げるであろう材料であり、酵素、ホルモン及び他の蛋白様の又は非蛋白様の溶質を含み得る。好適な実施態様において、該抗体は、(1)ローリー法によって測定されるような抗体の95重量%より以上に、最も好ましくは99重量%以上に、(2)スピニングカップシークエネーターの使用によってN-末端又は中間のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な度合いに、又は(3)クマシーブルー又は、適当には銀染色を用いて還元又は非還元条件下でSDS PAGEによって均質化するために精製されるであろう。分離した抗体は、抗体の自然環境の少なくとも1の構成要素が存在されないであろうことから、組換え細胞内の本来の位置の抗体を含む。通常、しかしながら、分離した抗体は、少なくとも1の精製化工程によって調製されるであろう。

30

40

【0034】

ここで使用した場合、用語「エピトープタグ化」は、「エピトープタグ」に融合した抗CD11a抗体に関する。エピトープタグポリペプチドは、それに対する抗体を作製することができ、それがCD11a抗体の活性を妨げないような十分に短いものに対するエピトープを提供するために十分な残基を有する。該エピトープタグは好ましくは、それに対する抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないために十分独自性である。好適なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基を、大抵は8-50アミノ酸残基(好ましくは9-30残基)を有する。事例は、flu H Aタグポリペプチド及びその抗体12CA5 (Hieldら、Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165(1988)); c-mycタグ及びそれに対する8F9, 3C7, 6E10, G4, B7及び9E10抗体(Evanら、Hol. Ce

50

II. Biol. 5(12):3610-3616(1985)); 及びヘルペス単純ウイルスグリコプロテインD (g D) タグ及びその抗体(Paborskyら、Protein Engineering 3(6):547- 553(1990))を含む。ある実施態様において、そのエピトープタグは、「サルベージレセプター結合エピトープ」である。

【0035】

ここで用いたような、用語「サルベージレセプター結合エピトープ」は、Ig G分子(例えば、Ig G1、Ig G2、Ig G3、又はIg G4)のFc領域のエピトープに関し、すなわち、Ig G分子のインビボでの血漿半減期を増加させるために応答可能である。

【0036】

ここで使用したような用語「細胞毒性剤」は、細胞の機能を抑制する又は妨げる及び/又は細胞の分解の原因となる物質に関する。その用語は、放射性アイソトープ(I 131、I 125、Y 90及びRe 186)、化学療法剤、及び細菌の、カビの、植物又は動物の酵素学的活性毒のような毒物、又はそのフラグメントを含むことが意図される。

10

【0037】

「化学療法剤」は、癌の治療において有用な化合物である。化学療法剤の実例は、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスホアミド、チオテパ、タキソテール(docetaxel)、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、ミトザントロン、ピンクレイスチン、ピノールエルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カーミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン(米国特許第4,675,187号参照)、メルファラン及びナイトロジェンマスタードに
関係したその他のものを含む。

20

【0038】

本発明において用いたような、用語「プロドラッグ」は、製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形に関し、即ち、親薬剤に比べて腫瘍細胞への細胞毒性が劣るものであり、且つより活性な形に酵素的に活性化され又は転換され得るものである。例えば、Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 61 5th Meeting Belfast(1986)及びStellaら、"Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardtら(ed.),pp.247-267, Humana Press(1985)を参照。本発明のプロドラッグは、制限されるものではないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、サルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸変成プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、
ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換したフェノキシアセトアミドプロドラッグ又は任意に置換したフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン及びより活性な細胞毒性フリードラッグに変換され得る他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。本発明において使用するためのプロドラッグ型に誘導化が可能な細胞毒性医薬の実例は、制限されることなしに、上記の化学療法剤を含む。

30

【0039】

ここで使用した場合、用語「標識」は、抗体に直接又は間接的に接合される検出可能な化合物又は組成物に関する。該標識は、それ自身によって検出可能とされ得るし(例えば放射性同位体標識又は蛍光標識)、又は酵素標識のケースにおいて、検出可能な基質化合物又は組成物の触媒的
化学交代し得る。

40

【0040】

「固相」によって、本発明の抗体が接着可能であるような非水性マトリックスが意味される。ここに包含される固相の実例は、ガラス(例えば制御化多孔ガラス)、ポリサッカリド(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで部分的に又は完全に形成されたそれらを含む。ある実施態様において、該背景に基づいて、該固相は、アッセイプレートのウェルを含むことができる; 他においてそれは、精製カラムである(例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム)。この用語

50

はまた、米国特許第4,275,149号中に記載されるそのような、分離し得る粒子の不連続な固相をも含む。

【0041】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬剤(ここに記載した抗CD11a及び、任意の化学療法剤のような)のデリバリーのため有用とされる、各種のタイプの脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤から構成される小さなベシクルである。該リポソームの成分は、生物膜の脂質配列に似た二層形態において通例は配置される。

【0042】

「分離した」核酸分子は、抗体核酸の天然ソースにおいてそれが通常に結合されることによって少なくとも1の汚染核酸分子から同定され且つ分離される核酸分子である。分離した核酸分子は、自然においてそれが見出されるものにおける形又はセッティング以外のものである。分離した核酸分子は、それ故に、天然細胞中に存在するそのような核酸分子と区別される。しかしながら、分離した核酸分子は、例えばその核酸分子が、染色体において天然細胞のそれと異なる配置である場合には、該抗体が通常発現する細胞中に含まれた核酸分子を含む。表現「コントロール配列」は、特有な宿主生物中の操作可能に結合したコード化配列の発現のために必要なDNA配列に関する。原核生物のために好適とされるコントロール配列は、例えばプロモーター、任意のオペレーター配列、及びリポソーム結合サイトを含む。真核生物は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られる。

【0043】

核酸は、それが別の核酸配列との機能的な相関関係中に置かれた場合、「操作可能に結合」される。例えば、プレ配列用DNA又は分泌のリーダーは、もしそれがポリペプチドの分泌において参加するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドのためのDNAに操作可能に結合され；プロモーターとエンハンサーは、該配列の転写にそれが影響を与える場合、コード化配列に操作可能に結合されるリポソーム結合サイトは、もしそれが翻訳を促進するために置かれた場合、コード化配列に操作可能に結合される。一般に、「操作可能に」は、結合されているDNA配列が隣接しており、且つ、分泌リーダーのケースにおいて、隣接し且つリーディング相においてであることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接されるように有してはいない。結合は、便利な制限サイトでの結紮によって達成される。もしそのようなサイトが存在しないなら、該合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーは、通常のプラクティスに従って使用される。

【0044】

ここで用いたように、用語「細胞」、「細胞系」、及び「細胞培養」は、相互に取り替え可能に用いられ、且つそのような定義の全ては、結果物を含む。かくして、用語「形質転換」及び「形質転換した細胞」は、転移の数に関係なく最初に受ける細胞とそれから得られた培養物を含む。それはまた、全ての結果物が、意図的な又は偶然の突然変異のために、DNA内容物において完全な同一性とされなくとも良いとも解される。独創的に形質転換した細胞においてスクリーンされると同じ機能又は生物学的活性を有する変異結果物が含まれる。個別な定義が意図される場合に、その内容から明らかとされるであろう。

【0045】

II. 発明を実施するための形態

A. 抗体調製

非ヒトCD11a抗体をヒト化するための方法が以下の実施例中に記載される。抗CD11a抗体をヒト化するために、非ヒト抗体出発材料が調製される。そのような抗体を精製するための典型的な方法が以下のセクション中に記載される。

【0046】

(i) 抗原調製

抗体の調製用に使われるべきCD11a抗原は、例えばCD11a又はCD11aフラグメントの細胞外ドメインの可溶型(例えばCD11a Iドメインフラグメントのような「MHM24エピトープ」を備えるCD11aフラグメント)とされ得る。代替的に、

10

20

30

40

50

その細胞表面でCD11aを発現する細胞が、抗体を生成するために使用され得る。そのような細胞は、CD11a且つ任意に、CD18を発現するために形質転換でき、又は他の天然発生細胞(例えば、ヒトリンパ芽球細胞、Hildrethら、Eur. J. Immunol. 13:202-208(1983)参照)又はジャーカット細胞(後述の実施例参照)とされ得る。抗体を生成するために有用なCD11aの他の形態は、当業者にとって明らかであろう。

【0047】

(ii) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連抗原とアジュバントとの複数の皮下(s.c.)又は腹腔内(i.p.)注射によって好ましくは生起される。例えばキーホールリムペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、又は二機能又は誘導化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を経て接合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を経て)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂、又はR¹N=C=N R、式中RとR¹は異なるアルキル基、を用いるダイズトリプシンインヒビターのような、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質に関連抗原を接合するのに有用とされ得る。

10

【0048】

動物は、例えばフロイント完全アジュバントの3容量と共に、該タンパク質又は結合物の100 µg又は5 µg(それぞれウサギ又はマウスのための)を複数サイトで皮下的に溶液を注入することによって、抗原、免疫原性接合体、又は結合化による誘導体に対して免疫化される。1ヶ月後、該動物は、複数サイトでの皮下注射によってフロイント完全アジュバント中のオリジナルの量の1/5から1/10のペプチド又は接合体によってブーストされる。7日から14日後、該動物は放血され、かつその血清が抗体力価について分析される。動物は力価プラトーまでブーストした。好ましくは、該動物は同じ抗原の接合によってブーストされるが、異なるタンパク質に及び/又は異なる架橋剤を通して接合される。接合体はまた、タンパク質融合として組み換え細胞培養中に作製され得る。また、明礬のような凝集剤は、免疫応答を増大するために適当に用いられる。

20

【0049】

(iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作製され得る。

30

【0050】

ハイブリドーマ法において、マウス、又はハムスター又はマカク属サル等の他の適当な宿主動物は、免疫化のために使用したタンパク質の特異的に結合するであろう抗体を生産する又は生産する可能性のあるリンパ球を引き出すために上述したように免疫化される。代替的に、リンパ球は、インビトロにおいて免疫化され得る。リンパ球は次いで、ハイブリドーマ細胞を形成するため、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用い、骨髓腫細胞と融合させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103(Academic Press, 1986))。

40

【0051】

かくて調製したハイブリドーマ細胞は、シード化され且つ、非融合、親の骨髓腫細胞の成長又は生存を抑制する1又はそれ以上の物質を好ましくは含有する適当な培地中で培養される。例えば、もしその親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠いたならば、典型的なハイブリドーマのための培地は、HGPRT 欠損細胞の成長を防止する物質、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0052】

好ましい骨髓腫細胞は、選択した抗体生産細胞を、効率的に融合し安定な高レベル生産を支持する、及びHAT培地のような培地への感受性のあるそれらである。これらの中で、好ましい骨髓腫細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, サンディエゴ

50

、カリフォルニア、米国から利用可能なM O P - 21とM . C . - 11マウス腫瘍から得られるそれら、及びAmerican Type Culture Collection , Rockville , メリーランド、米国から利用し得るS P 2又はX 6 3 - A g 8 6 5 3細胞のようなネズミ骨髄腫系である。ヒト骨髄腫及びマウス ヒト異種骨髄腫細胞系は、ヒトモノクローナル抗体の生産のためにも記載されている(K ozbor, J . Immunol . , 133:3001(1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications , pp.51-63(Harcel Dekker , Inc. , New York , 1987))。

【 0 0 5 3 】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地は、該抗原に対し向けられたモノクローナル抗体の生産のために分析される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって又はラジオイムノアッセイ(R I A)又は酵素免疫吸着アッセイ(E L I S A)のようなインビトロでの結合アッセイによって測定される。

【 0 0 5 4 】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Hunsonら、Anal. Biochem. , 107 :220(1980)のスキッチャード分析によって測定され得る。

【 0 0 5 5 】

ハイブリドーマ細胞が望ましい特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を生産することが同定された後、そのクローンは、制限した希釈法によりサブクローン化されて良く且つ標準の方法により増殖される(Goding、Monoclonal Antibodies :Principles and Practice , pp.59-103(Academic Press , 1986))。この目的のための適当な培地は、例えばD M E M又はR P M I 1 6 4 0培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物中の腹水腫瘍としてインビボで増殖させ得る。

【 0 0 5 6 】

該サブクローンによって分泌したモノクローナル抗体は、例えばプロテインA セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような通常の免疫グロブリン精製法によって、培地、腹水液、又は血清から適切に分離される。

【 0 0 5 7 】

D N Aコード化モノクローナル抗体は、直ちに分離され、且つ通常の方法(例えば、モノクローナル抗体の重及び軽鎖をコード化する遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)を用いて配列決定される。該ハイブリドーマ細胞は、そのようなD N Aの好適なソースとして奉仕する。一度の分離で、該D N Aは、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得するために、大腸菌、類人猿C O S細胞、チャイニーズハムスター卵(C H O)細胞、又は別のやり方で免疫グロブリンタンパク質を生産しない骨髄腫細胞のような宿主細胞内に移入される、発現ベクター内に配置され得る。抗体の組換え体生産は、より詳細に後述されるであろう。

【 0 0 5 8 】

(i v) ヒト化及びアミノ酸配列変異体

下記の実施例は、抗C D 1 1 a抗体のヒト化のための手順を記載する。ある実施態様において、ヒト化抗体のアミノ酸配列変異体を生産するため、特にこれらがヒト化抗体の結合親和性又は他の生物学的特性を改善する場合に望ましいものとされ得る。

【 0 0 5 9 】

ヒト化抗C D 1 1 a抗体のアミノ酸配列変異体は、ヒト化抗C D 1 1 a抗体D N Aを変える適当なヌクレオチドを導入することによって、又はペプチド合成によって調製される。そのような変異体は、ヒト化抗C D 1 1 a F (ab)- 8のために示したアミノ酸配列(例えば、配列番号2及び5のような)の中の残基の削除、及び/又は挿入及び/又は置換を包含する。最終的な構造で生起するように作製される削除、挿入、及び置換のいずれかの組合せは、最終の構造が望ましい特徴を所有するように提供される。変更したアミノ酸はまた、グリコシル化サイトの数又は位置を変更するような、ヒト化抗C D 1 1 a抗体の後

10

20

30

40

50

翻訳プロセスをも変え得る。変異誘発のための配置が好適とされたヒト化抗CD11a抗体ポリペプチドの一定の残基又は領域の同定のための有用な方法は、CunninghamとWells Science, 244:1081-1085(1989)によって開示されたような「アラニン走査変異誘発」と称される。ここで、残基又は標的残基の群が同定され(例えば、arg, asp, his, lys, 及びgluのような荷電した残基)、及びCD11a抗原によってアミノ酸の相互作用に影響を及ぼすような中性又は陰性に電荷したアミノ酸(最も好ましくはアラニン又はポリアラニン)によって置換される。その置換体に機能的な選択性を示すそれらのアミノ酸配置は、更なる導入又は置換のサイトで、又はそのための他の変異体によって精製される。かくして、アミノ酸配列変異体を導入するためのサイトが予め決定される一方、変異それ自身の本質は、予め決定される必要はない。例えば、与えられたサイトでの変異の遂行を分析するために、ala走査又はランダム変異誘発が標的コドン又は領域で導入され且つ発現したヒト化抗CD11a抗体変異体は、望ましい活性のためにスクリーンされる。

10

【0060】

アミノ酸配列挿入物は、単一又は多数のアミノ酸残基の配列間挿入体と同様に、100又はそれ以上の残基を含む1残基からポリペプチドまでの長さを範囲内とするアミノ及び/又はカルボキシ末端融合を含む。末端挿入体の実例は、N-末端メチオニル残基を持ったヒト化抗CD11a抗体又はエピトープタグに融合した該抗体を含む。ヒト化CD11a抗体分子の他の挿入の変異体は、抗体の血清半減期を増加させる、酵素又はポリペプチドのヒト化抗CD11a抗体のN-又はC-末端への融合物を含む(後述を参照)。

【0061】

20

変異体の別の型は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、取り除いたヒト化抗CD11a抗体分子中の少なくとも1のアミノ酸残基を有し且つ異なる残基がその場所に挿入される。代りの変異誘発のため最も重要なサイトは、超可変ループを含むが、しかしFR交代もまた意図される。後述の実施例中の表IVは、変更され得る超可変領域残基のためのガイダンスを提供する。抗原結合中の含まれた超可変領域残基又はFR残基は、相対的に保存的な手法において一般に置換される。そのような保存的置換は「好適な置換体」の頭書きの下に表I中に示した。もしそのような置換が生物学的活性における変化を生じる結果となるなら、表I中の「典型的な置換体」に示した又はアミノ酸クラスに関する更なる後述のようなより本質的な変化が導入され且つその生産物がスクリーンされる。

【0062】

30

【表 I】

表 I

最初の残基	典型的な置換体	好適な置換体
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	glu
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

【 0 0 6 3 】

該抗体の生物学的特性における実質的な修正は、(a) 例えばシート又はヘリカル組織のような、その置換のエリアにおけるポリペプチドバックボーンの構造、(b) 標的サイトでの分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖のかさ、を維持することについてのその効果において顕著に相違する置換体を選択することによって達成される。自然に生じる残基は、通例の側鎖特性の基づいた基の中に分割される：

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

【 0 0 6 4 】

非保存置換は、別のクラスのためにこれらクラスの一つのメンバーを交換することを伴うであろう。ヒト化抗CD11a抗体の適切な構造を維持することにおいて包含されない

10

20

30

40

50

いずれかのシステイン残基はまた、分子の酸化安定性を改善するため及び異常な交差反応を防止するために、一般にセリンによって置換され得る。逆に、システイン結合は、その安定性を改善するために抗体に付加され得る（特に、抗体がFvフラグメントのような抗体フラグメントである場合）。

【0065】

該抗体のアミノ酸変異体の別のタイプは、抗体の本来のグリコシル化パターンを変更する。変更によって抗体中に見出される1又はそれ以上の炭水化物部分を削除すること及び抗体中に存在しない1又はそれ以上のグリコシル化を加えることを意味する。

【0066】

抗体のグリコシル化は、典型的にN-結合化又はO-結合化のいずれかである。N-結合化は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の接合に関する。トリペプチド配列 アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン X トレオニン（式中Xはプロリン以外のいずれかのアミノ酸）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的接合のための認識配列とされる。かくして、ポリペプチド中のこれらトリペプチドのいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化サイトを創製する。O-結合化グリコシル化は、5 ヒドロキシプロリン又は5 ヒドロキシリシンが使用され得るとしても、ヒドロキシアミノ酸、最も普通にはセリン又はトレオニンへの糖N-ガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの接合に関する。

10

【0067】

抗体へのグリコシル化サイトの付加は、それが1又はそれ以上の上述したトリペプチド配列(N-結合化グリコシル化サイトのための)を含むようなアミノ酸配列を変更することによって有利に達成される。その変更はまた、本来の抗体の配列への1又はそれ以上の残基(O-結合化グリコシル化サイトのための)の付加又はそれによる置換によってなされ得る。

20

【0068】

ヒト化抗CD11a抗体のアミノ酸配列変異体をコード化する核酸分子は、当該分野で周知の各種の方法によって調製される。これらの方法は、制限されることなく、天然ソースからの分離(自然発生的アミノ酸配列変異体のケースにおいて)又はオリゴヌクレオチド介在(又はサイト管理化)変異誘発、PCR変異誘発、及びヒト化抗CD11a抗体の早期調製変異体又は非変異型のカセット変異誘発による調製を含む。

30

【0069】

通常、ヒト化抗CD11a抗体のアミノ酸配列変異体は、重鎖又は軽鎖のいずれかの本来のヒト化抗体アミノ酸配列(例えば、配列番号：2又は5のような)との少なくとも75%の、好ましくは少なくとも80%の、より好ましくは(は少なくとも85%の、より好ましくは少なくとも90%の、最も好ましくは少なくとも95%の、アミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するであろう。この配列に関する同一性と相同性は、もし必要なら、配列同一性最大パーセントを達成するために、及び配列同一性の一部のようないずれかの保存置換(上記表I中に定義した通りの)を考慮しないために、配列を揃え及びギャップを導入した後に、ヒト化抗CD11a残基と同一性のある配列候補中のアミノ酸残基のパーセンテージとしてここに定義される。抗体配列内へのN末端、C末端、又は内部拡大、削除又は、挿入のないものは、配列同一性又は相同性に影響を及ぼすように構成されるべきである。

40

【0070】

(v) 生物学的特性のためのスクリーニング

ヒト化抗CD11a抗体中に望ましいとされるようにここに同定した特徴を有する抗体がそのためにスクリーンされる。

【0071】

興味のある抗体によって結合CD11a上のエピトープに結合する抗体のためのスクリーニングのために(例えば、CD11aへのMHM24抗体の結合をブロックするそのの)、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and

50

David Lane(1988)中に記載されたそのような、ルーチンの交差ブロック化アッセイが実行され得る。代替的に、例えば、Champeら、J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)中に記載したような、エピトープマッピングは、興味あるエピトープを結合する抗体かどうかを決定することができる。

【0072】

抗体親和性(例えばヒトCD11a又はアカゲザルCD11aのための)は、後述の実施例中に記載した通り末梢血液単核細胞又はアカゲザル白血球のいずれかを用いて結合飽和によって決定され得る。抗体親和性を決定するためのこの方法に従い、リンパ球又はアカゲザル白血球は、ウェル当たり170 μ lの容量でプレートに加えられ、且つプレートは室温で2時間インキュベートされる。インキュベーションの後、細胞が収穫され、10回洗浄される。サンプルが次いで計数される。飽和プロットのナノモルと4パラメーター曲線適合性に対する分当たりのカウント(結合対トータル)の形を変えたデータは、Kd(app)値の決定が実行される。好ましいヒト化抗体は約 1×10^{-7} までの;好ましくは約 1×10^{-8} までの、より好ましくは約 1×10^{-9} までの;最も好ましくは約 2×10^{-10} のKd値を持ったヒトCD11aを結合するそれらである。

【0073】

それはまた、「ケラチノサイト単層接着アッセイ」における有益な抗接着特性を有するヒト化抗体を選択することも望まれる。好適な抗体は、約250nMまでの;好ましくは約100nMまでの;より好ましくは約1nMまでの及び通常のヒト表皮ケラチノサイト発現ICAM-1へのジャーカット細胞の接着を防止するために最も好ましくは0.5nMまでのIC50(nM)値を有するそれらである。このアッセイに従い、通常のヒト表皮ケラチノサイトは、培養フラスコから取り除かれ、 5×10^5 生存細胞/mlの濃度でリンパ球アッセイ培地中に懸濁される。0.1 μ l/ウェルのアリコートは、ついで平底96ウェルプレート中で一晚培養され;適当なウェルは、100単位/ウェルでインターフェロンガンマの添加によって刺激される。ジャーカットクローンE6-1細胞は標識され、洗浄され、 1×10^6 細胞/mlに再懸濁され、30分間、4で500ng/mlで2倍連続希釈を開始することでインキュベートされる。ケラチノサイト単層からの培地の除去の後、標識化細胞の0.1ml/ウェルが加えられ且つ1時間、37でインキュベートされる。該ウェルは、未結合細胞を取り除くために洗浄され、かつ蛍光が測定される。

【0074】

望ましいヒト化抗CD11a抗体は、ヒトリンパ球を用いる混合リンパ球応答(MLR)アッセイにおいて、約100nMまでの;好ましくは約50nMまでの;より好ましくは約5nMまでの、及び最も好ましくは約1nMまでのIC50(nM)値を有するそれらである。ヒト及びアカゲザルの両方のMLRのために、二つの無関係なドナーからの末梢血液が、ヘパリン化全血から分離され、後述の実施例中に記載した通りの添加物によってRPMI 1640(GIBCO)中、 3×10^6 細胞/mlの濃度に再懸濁される。該刺激細胞は、照射によって非応答性が作られる。ウェル当たり 1.5×10^5 細胞の濃度のレスポナー細胞は、96ウェル、平底プレート中の等しい数の刺激細胞とともに共培養される。10nMの濃度で開始する2倍連続希釈物が、200 μ l/ウェルの全量を与えるための培養物に加えられる。その培養物は、5日間、5%CO₂中、37でインキュベートされ、ついで16時間、³H]チミジンの1 μ Ci/ウェルによりパルスされ、且つ³H]チミジン結合が測定される。

【0075】

(vi) 抗体フラグメント

ある実施態様において、ヒト化抗CD11a抗体は、抗体フラグメントである。各種の技術が、抗体フラグメントの生産のために発展している。伝統的には、これらのフラグメントは、完全な抗体の蛋白分解性消化を経て誘導される(例えば、Morimotoら、Jornal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)及びBrennanら、Science 229:81(1985)参照)。しかしながら、これらのフラグメントは、組換え宿主細胞によって現

10

20

30

40

50

在は直接生産され得る。例えば、F a b' S Hフラグメントは、大腸菌から直接回収することができ、且つF (a b')₂フラグメントを形成するため化学的に対化される(Carterら、Bio/Technology 10:163-167(1992))。別なアプローチに従い、F (a b')₂フラグメントは、組換え宿主細胞培養から直接分離され得る。抗体フラグメントの生産のための他の方法は、熟練した専門家に明らかとなるであろう。

【 0 0 7 6 】

(v i i) 多特異的抗体

いずれかの実施態様において、少なくとも2つの異なるエピトープのための結合特異性を有する多特異性(例えば二特異性)ヒト化抗CD 1 1 a抗体を生成することが望ましいものとされ得る。二特異性抗体の実例は、CD 1 1 aタンパク質の2つの異なるエピトープに結合し得る。代替的に、抗CD 1 1 aアームは、T細胞レセプター分子(例えばCD 2又はCD 3)、又はCD 1 1 a発現細胞に細胞防御メカニズムを集中するためのFc R I (CD 6 4)、Fc R II (CD 3 2)、及びFc R III (CD 1 6)のようなIg G (Fc R)のためのFcレセプター、のような白血球上の誘発化分子に結合するアームを結合させ得る。二特異的抗体は、CD 1 1 aを発現する細胞に対する細胞毒因子を局在化するためにも使用され得る。これらの抗体は、CD 1 1 a結合アームと、細胞毒因子(例えば、サポリン、抗インターフェロン、ピンカアルカロイド、リチンA鎖、メトトレキサート又は放射性同位体ハプテン)を結合するアームとを所有する。二特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメント(例えば、F (a b')₂二特異性抗体)。

【 0 0 7 7 】

二特異性抗体を作製するための別なアプローチに従い、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最小化するために加工することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1又はそれ以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きい側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)によって置換される。大きい側鎖と同じか又は似たサイズの埋め合わせとなる「キャビティ」は、より小さいもの(例えばアラニン又はトレオニン)によって大きいアミノ酸側鎖を置換することによって第2の抗体分子の界面上に創製される。これは、ホモダイマーのような他の望まれていない終端生産物を越えるヘテロダイマーの収量を増加するためのメカニズムを提供する。1996年9月6日に公表のWO96 / 27011を参照。

【 0 0 7 8 】

二特異性抗体は、架橋化又は「異結合」抗体を含む。例えば、該異結合抗体中の一つの抗体は、アビジン、その他にビオチンに結合し得る。異結合抗体は、いずれかの好適な架橋法を用いて作製され得る。適当な架橋剤は、当該分野で周知であり、多数の架橋技法と一緒に、米国特許第4,676,980号中に開示される。

【 0 0 7 9 】

抗体フラグメントから二特異性抗体を生成するための方法は、文献中にも記載されている。例えば、二特異性抗体は、化学結合を用い調製することができる。Brennanら、Science 229:81(1985)は、その手順を記載し、そこでの完全な抗体は、F (a b')₂フラグメントを生成するため蛋白分解的に切断される。これらのフラグメントは、近傍のジチオールを安定化するため及び分子間ジスルフィド形成を防止するためにジチオール錯化剤ヒ酸ナトリウムの存在中で還元される。該F a b' フラグメントは、チオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F a b' TNB誘導体の一つは、メルカプトエチルアミンによる還元によりF a b' チオールに再変換され、さらに二特異性抗体を形成するため他のF a b' - TNB誘導体の等モル量と混合される。生産した二特異性抗体は、酵素の選択的な固定化のための剤として使用され得る。

【 0 0 8 0 】

最近の進歩は、二特異性抗体を形成するために化学的に対化され得る大腸菌からのF a b' S Hフラグメントの直接回収を容易にしている。Shalabyら、J. Exp. Med. 175:217-225(1992)は、完全なヒト化二特異性抗体F (a b')₂分子の生産を記載する。それぞれ

10

20

30

40

50

の F a b' フラグメントは、大腸菌から独自に分泌され且つ二特異的抗体を形成するためにインビトロにおいて指向した化学的対化にかけられる。かくして形成した二特異性抗体は、ヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を誘発すると同じく、H E R 2 レセプター及び通常のヒト T 細胞を過発現する細胞に結合され得る。

【 0 0 8 1 】

組換え細胞培養から直接に二特異性抗体フラグメントを作製及び分離するための各種の技法もまた、記載されている。例えば、二特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて作製されている。Kostelnyら、J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって異なる抗体の F a b' 部分に結合した。該抗体ホモダイマーは、モノマーを形成するためにヒンジ領域で還元され、抗体ヘテロダイマーを形成するために再酸化される。この方法は、抗体ホモダイマーの生産のためにも利用され得る。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)によって記載される「ディアボディー」技法は、二特異性抗体フラグメントを作製するための代替的なメカニズムを提供している。該フラグメントは、あまりに短いため同じ鎖上の2つのドメイン間の対化を与えないリンカーによって軽鎖可変ドメイン (V_L) に結合した重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。従って、一つのフラグメントの V_H と V_L ドメインは、別のフラグメントの相補的な V_H と V_L ドメインとともに対を成すことを強制され、それによって2つの抗原結合サイトを形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーの使用によって二特異性抗体フラグメントを作製するための別な戦略もまた、報告されている。Gruberら、J. Immunol. 152:5368(1994)参照。代替的に、該二特異性抗体は、Zapataら、Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)中に記載した通り生産した「線状抗体」とされ得る。

【 0 0 8 2 】

二価以上を持つ抗体が意図される。例えば、三特異性抗体が調製される。Tuttら、J. Immunol. 147:60(1991)。

【 0 0 8 3 】

(viii) 他の変形

ヒト化抗 C D 1 1 a 抗体の他の変形が意図される。例えば、癌の治療におけるような抗体の有効性の増大のために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を修正することが希望され得る。例えばシステイン残基は、F c 領域中に導入されて良く、それによってこの領域において鎖間のジスルフィド結合形成を与える。かくして生成したホモダイマーの抗体は、内在化容量を改善して良く及び/又は相補介在殺細胞化及び抗体依存細胞毒性 (A D C C) を増加し得る。Caronら、J. Exp Med. 176:1191-1195(1992)とShopes、B. J. Immunol. 148:2918-2922(1992)を参照。増大した抗腫瘍活性を持つホモダイマー抗体は、Wolffら、Cancer Research 53:2560-2565(1993)中に記載したようなヘテロ二機能性架橋剤を用いても調製され得る。代替的に、抗体は、二つの F c 領域を有するように加工することができ且つそれによって増加した相補溶解性及び A D C C 能力を有し得る。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)を参照。

【 0 0 8 4 】

本発明はまた、化学療法剤、毒(例えば、細菌、カビ、植物又は動物由来の酵素的活性毒、又はそれらのフラグメント)、又は放射性同位体(すなわち、放射性接合体)のような細胞毒性剤に結合したここに記載した抗体を含む免疫接合体に関連する。そのような免疫接合体の生成において利用される化学療法剤は、上述されている。使用され得る酵素的活性毒及びそのフラグメントは、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシン A 鎖(シュードモナスアエルギノーサからの)、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデクシン A 鎖、アルファサルシン、Aleurites fordii タンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americana タンパク質(PAPI, PAPII, 及び PAP-S)、momordica charantia インヒビター、クルシン、クロチン、サバオナリア オフィシナリスインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンを含む。核種の放射性核種が、放射性接合体抗 C D 1 1 a 抗体の生産のために利用可能である。実例は、212 B i、131 I、131 I n、90 Y 及び 186 R e を含む。

【 0 0 8 5 】

抗体と細胞毒性剤の接合物は、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二機能性誘導体(ジメチルアジピミダート塩酸のような)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベラートのような)、アルデヒド(グルタルアルデヒドのような)、ビスアゾ化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミンのような)、ジイソシアナート(トリレン2,6-ジイソシアナートのような)、及びビス 活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンのような)のような各種の二機能性タンパク質カップリング剤を用いて作製される。例えば、リチン免疫毒は、vitettaら、Science 238:1098(1987)中に記載されたように調製され得る。炭素-14-標識化1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、抗体への放射性ヌクレオチドの共役のための典型的なキレート化剤である。WO 94/11026を参照。

10

【 0 0 8 6 】

別な実施態様において、該抗体は、腫瘍予備標的化において利用のための「レセプター」(ストレプトアビジンのような)に接合されて良く、ここで該抗体-レセプター接合物は、清澄化剤を用いる循環からの非結合共役物の除去と細胞毒性剤(例えば放射性核種)に共役される「リガンド」(例えばアビジン)の投与に続いて患者に投与される。

【 0 0 8 7 】

ここに開示した抗CD11a抗体は、イムノリポソームとしても調製され得る。抗体を含んだリポソームは、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:368-8(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4,485,045号と4,544,545号中に記載されたような、当該分野で周知の方法により調製される。増加した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号中に開示される。

20

【 0 0 8 8 】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導化ホスファチジエタノールアミン(PEG-PE)を含んだ脂質組成物とともに逆相エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、望ましい直径を持ったリポソームを得るため定義されたポアサイズのフィルターを通して押し出しされる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交互反応を経て、Martinら、J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)中に記載されたようなリポソームに共役され得る。化学療法剤(ドキソルピシンのような)は、リポソームの内部に任意に含有せしめ得る。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19): 1484(1989)を参照。

30

【 0 0 8 9 】

本発明の抗体は、活性抗癌薬にプロドラッグを変える(例えば、ペプチジル化学療法剤、WO 81/01145を参照)プロドラッグ活性化酵素に抗体を接合することによってADEPT中で使用され得る。例えば、WO 88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照。

【 0 0 9 0 】

ADEPTのために有用な免疫接合体の酵素成分は、それをより活性化する、細胞毒性形態に変換するためのそのような手法においてプロドラッグに作用することができるいずれかの酵素を含む。

40

【 0 0 9 1 】

本発明に方法において有用である酵素は、制限されることなしに、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬に変換するために有用なアルカリホスファターゼ; スルファート含有プロドラッグを遊離の薬に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ; 非毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬、5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ; ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬に変換するのに有用である、セラティアプロテアーゼ、セルモリシン、ズプチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(カテプシンB及びLのような)のようなプロテアーゼ; D-アミノ酸置換体を含むプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ; グリコシル化プロドラッグ

50

を遊離の薬に変換するのに有用な ガラクトシダーゼとノイラミニダーゼのような炭水化物切断酵素； ラクタム誘導体化薬を遊離の薬に変換するのに有用な ラクタマーゼ；及びそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基によってそのアミン窒素において誘導体化した薬を遊離の薬に変換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼのようなペニシリンアミダーゼを含む。代替的に、「アブザイム」として当該分野において周知でもある、酵素活性を持った抗体は、本発明のプロドラッグを遊離の活性薬に変換するために使用され得る(例えば、Massey、Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体 アブザイム接合体は、腫瘍細胞集団へのアブザイムのデリバリーのためにここに記載したように調製され得る。

【0092】

本発明の酵素は、上述したヘテロ二機能性架橋試薬の使用のような当該分野で周知の方法によって抗CD11a抗体に共有的に結合され得る。代替的に、本発明の酵素の少なくとも機能的活性部分に結合した本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を備える融合タンパク質は、当該分野で周知の組換えDNA技術を用いて構成され得る(Neubergerら、Nature 312:604-608(1984)を参照)。

【0093】

本発明のある実施態様において、例えば腫瘍穿通を増加するために、完全な抗体と言うよりはむしろ、抗体フラグメントを使用することが望ましいとされ得る。このケースにおいて、その血清半減期を増加するために抗体フラグメントを変更することが望ましいとされ得る。これは、例えば、抗体フラグメント中へのサルベージレセプター結合エピソードの合併によって達成され得る(例えば、抗体フラグメント中の適当な領域の変異によって、又はペプチドタグ内への該エピソードの合併によって、すなわち末端又は中位でのいずれか一方で抗体フラグメントに融合される、例えばDNA又はペプチド合成によって)。1996年10月17日公表のWO 96/32478を参照。

【0094】

サルベージレセプター結合エピソードは、一般に領域を構成し、ここで、Fcドメインの一又はそれ以上のループからのいずれか一つ又はそれ以上のアミノ酸残基は、抗体フラグメントの類似位置に転移される。より好ましくは、Fcドメインの1又は2つのループからの3又はそれ以上の残基は、転移される。さらにより好ましくは、該エピソードは、Fc領域の(例えばIgGの)CH2ドメインから取り出され且つ該抗体のCH1、CH3、又はV_H領域、或いは一以上のそのような領域に転移される。代替的に、該エピソードは、Fc領域のCH2ドメインから取り出され、該抗体フラグメントのC_L領域又はV_L領域、或いは両方、に転移される。

【0095】

最も好ましい実施態様において、該サルベージレセプター結合エピソードは、該配列(5'から3')：PKNSSMISNTP(配列番号：16)を備え、且つ、HQSLGTQ(配列番号：17)、HQNLSDGK(配列番号：18)及びHQNISDGK(配列番号：19)、又は特に該抗体フラグメントがFab又はF(ab')₂である場合、VISSHLGQ(配列番号：20)からなる群から選択される配列を任意にさらに備える。別の最も好ましい実施態様において、該サルベージレセプター結合エピソードは、配列(5'から3')：HQNLSDGK(配列番号：18)、HQNISDGK(配列番号：19)、又はVISSHLGQ(配列番号：20)と配列：PKNSSMISNTP(配列番号：16)を含むポリペプチドである。

【0096】

ヒト化CD11a抗体の共有結合修飾もまた、本発明の範囲内に含まれる。それらは、化学合成によって又はもし適用可能であれば、該抗体の酵素的又は化学的切断によって作製され得る。該抗体の共有結合修飾の他のタイプは、選択した側鎖又はN-又はC-末端残基との反応が可能な有機誘導化剤によって抗体の標的化アミノ酸残基の反応により分子内に導入される。

【0097】

最も普通にはシステイニル残基が、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導

10

20

30

40

50

体を与えるために、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドのような 八口アセタート(及び相対するアミン)と反応される。システニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、プロモ-(5-イミドゾイル)プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ 2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロ水銀ベンゾアート、2-クロロ水銀 4-ニトロフェノール、又はクロロ 7-ニトロベンゾ 2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導される。

【0098】

ヒスチジル残基は、この剤がヒスチジル側鎖のための相対的に特異的であるため、pH5.5-7.0でジエチルピロカーボナートとの反応により誘導される。臭化パラプロモフェナシルも有用である；その反応は、pH6.0で0.1Mカコジル酸ナトリウム中で好ましくは実行される。

10

【0099】

リシニル及びアミノ末端残基は、コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応させる。これら剤による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転する影響を有する。アミノ含有残基を誘導体化するための他の好適な試薬は、メチルピコリンイミダート、リン酸ピロキサル、ピロキサル、塩化ホウ素水素化物トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオンのようなイミドエステル、及びグリオキシラートとのトランスアミナーゼ触媒反応を含む。

【0100】

アルギニル残基は、フェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサンジオン、及びニンヒドリンのそれらのうちの1又は幾つかの通常の試薬との反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpKaのためにその反応がアルカリ条件において実行されることを要求する。さらに、これらの試薬は、アルギニンエプシロンアミノ基と同じくリシンの基と反応し得る。

20

【0101】

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によってチロシル残基内にスペクトルの標識を導入することへの特別な関心により作製され得る。最も普通には、N-アセチルイミジゾールとテトラニトロメタンが、それぞれO-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体を形成するために使用される。チロシル残基は、ラジオイムノアッセイにおける使用のために標識化タンパク質を調製するために、¹²⁵I又は¹³¹Iを用いてヨウ素化される。

30

【0102】

カルボキシル側鎖(アスパルチル又はグルタミル)は、1-シクロヘキシル 3-(2-モルホリニル 4-エチル)カルボジイミド又は1-エチル 3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルフェニル)カルボジイミドのようなカルボジイミド(R-N=C=N-R')(式中RとR'は異なるアルキル基である)との反応によって選択的に修飾される。さらに、アスパルチルとグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミル残基に変換される。

【0103】

グルタミニルとアスパラギニル残基は、それぞれの相当するグルタミルとアスパルチル残基にしばしば脱アミド化される。これら残基は、中性又は塩基性条件下で脱アミド化される。これら残基の脱アミド化形態は本発明の範囲内にある。

40

【0104】

他の修飾は、プロリンとリシンの水酸化、セリル又はトレオニル残基の水酸基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のアミノ基のメチル化(T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86(1983))、N-末端アミンのアセチル化、いずれかのC-末端カルボニル基のアミド化を含む。

【0105】

別のタイプの共有結合修飾は、該抗体への化学的又は酵素的カップリンググリコシルを

50

含む。これらの方法は、それらがN-又はO-結合グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞中で該抗体の生産が要求されないことにおいて有効である使用したカップリングモードに基づいて、その糖は、(a)アルギニンとヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)システインのそのような遊離スルフィドリル基、(d)セリン、トレオニン、又はヒドロキシプロリンのそのような遊離水酸基、(e)フェニルアラニン、チロシン、又はトリプトファン of のそのような芳香族残基、又は(f)グルタミンのアミド基に付着させ得る。これらの方法は、1987年9月11日公表のWO 87 / 05330中に、及びAplinとWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp.259-306(1981)中に記載される。

【0106】

該抗体上に存在するいずれかの炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は同等の化合物に該抗体をさらすことを要求する。この処理は、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除く大部分の又は全ての糖の切断の結果となり、一方抗体は完全に残される。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddinら、Arch. Biochem. Biophys. 259:52(1987)により及びEdgeら、Anal. Biochem., 118:131(1981)により記載される。該抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら、Meth. Enzymol. 138:350(1987)により記載されるような、各種のエンド及びエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。

10

【0107】

該抗体の共有結合修飾の別なタイプは、米国特許第4,640,835号；4,496,689号；4,301,144号；4,670,417号；4,791,192号又は4,179,337号中に記載の手法において、各種の非タンパク質ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つに該抗原を結合することを備える。

20

【0108】

B. ベクター、宿主細胞、及び組換え方法

本発明はまた、ヒト化抗CD11a抗体をコードする単離核酸、該核酸を具備するベクター及び宿主細胞、並びに該抗体を産生するための組換え技術も提供する。

【0109】

前記抗体の組換え産生のため、それをコードする前記核酸が単離され、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現を行うために複製ベクターへ挿入される。モノクローナル抗体をコードするDNAを直ぐに単離して通常の方法(例えば当該抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブにより)を使用して配列決定する。多くのベクターが入手可能である。ベクターの構成には一般的に、以下のものの一又はそれ以上を含むがこれには限定されない：シグナル配列、複製起点、一又はそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終止配列。

30

【0110】

(i) シグナル配列要素

本発明の抗CD11a抗体は、組換え的に直接に産生するのみならず、好ましくはシグナル配列又は他のポリペプチドであって成熟した蛋白質又はポリペプチドのN末端に特異的開裂部位を有する非相同性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして産生してもよい。選択される非相同的シグナル配列は宿主細胞により認識されて処理(即ち、シグナルペプチダーゼにより)されるものである。未変性の抗CD11a抗体シグナル配列について認識も処理も行わない原核性の宿主細胞の場合、このシグナル配列は例えば以下の群よりなる原核細胞のシグナル配列から選択される：アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダー。酵母の分泌の場合、未変性のシグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(サッカロマイセス(Saccharomyces)及びクレイベロマイセス(Kluyveromyces)の因子リーダーを含む)、酸ホスファターゼリーダー、C. アルビカンス(albicans)グルコアミラーゼリーダー、又はWO90/13646に記載のシグナルにより置換され

40

50

ていてもよい。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳類シグナル配列はウイルス性分泌リダー、例えば単純ヘルペスの g D シグナルと同様に入手可能である。

【 0 1 1 1 】

そのような前駆体領域は、抗 C D 1 1 a 抗体をコードする D N A にリーディングフレームにおいて連結される。

【 0 1 1 2 】

(i i) 複製起点要素

発現用及びクローニング用ベクターのいずれも、一又はそれ以上の選択した宿主内でベクターを複製させることを可能にする核酸配列を含んでいる。一般的に、クローニングベクターにおいては、この配列は宿主の染色体 D N A とは独立に複製することを可能にするものであり、複製起点又は自律性複製配列を含んでいる。このような配列は種々の細菌、酵母、及びウイルスに対して知られている。プラスミド p B R 3 2 2 由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適し、2 μ プラスミド起点は酵母に適し、そして種々のウイルス起点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V、又は B P V) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有益である。一般的に、複製起点の構成要素は、哺乳類の発現ベクター (S V 4 0 の起点を典型的に使用しても良いが、これは初期プロモーターを含むという理由のみのためである) には必要ではない。

【 0 1 1 3 】

(I I I) 選択遺伝子要素

発現及びクローニングベクターには、選択遺伝子、又は選択可能マーカーともいう、を含むことができる。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質やその他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、又はテトラサイクリンに対して抵抗性を与え、(b) 栄養要求性欠損を補完し、又は (c) 例えば桿菌に対する D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のように、複合培地からは得られない重要な栄養素を供給する、蛋白質をコードする。

【 0 1 1 4 】

選択スキームの一つの例は、宿主細胞の成長を停止させる薬剤を使用する。非相同性遺伝子でうまく形質転換された細胞は、薬剤抵抗を与える蛋白質を産生し、よって選択プログラムで生存する。このような優性選択の例は、ネオマイシン、マイコフェノール酸 (Mycophenolic acid)、ハイグロマイシンの薬剤を使用する。

【 0 1 1 5 】

哺乳動物細胞用の適切な選択マーカーの別の例は、D H F R、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン - I、及び - I I、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等のように、抗 C D 1 1 a 抗体核酸を取り上げるコンピテント細胞を同定することを可能にするものである。

【 0 1 1 6 】

例えば、D H F R 選択性遺伝子で形質転換された細胞はまず、D H F R のアンタゴニストであるメトトレキセート (M t x) を含む培養液中の形質転換体の全てを培養することによって同定される。野生型の D H F R を用いる場合の適切な宿主細胞は、D H F R 活性に欠失があるチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞株である。

【 0 1 1 7 】

或いは、宿主細胞 (特には内在性の D H F R を含む野生型の宿主) を、抗 C D 1 1 a 抗体、野生型 D H F R 蛋白質、及びアミノグリコシド 3 ' - ホスホトランスフェラーゼ (A P H) 等の別の選択マーカーをコードする D N A 配列で形質転換又は同時形質転換したものは、アミノグリコシド系抗生物質、例えばカナマイシン、ネオマイシン若しくは G 4 1 8 の選択性マーカー用選択剤を含む培養液中で細胞増殖させることにより選択することが可能である。米国特許番号 4 , 9 6 5 , 1 9 9 を参照。

【 0 1 1 8 】

酵母で使用する適切な選択遺伝子は、酵母プラスミド Y R p 7 中に存在する t r p 1 遺伝子である (S t i n c h c o m b ら、N a t u r e、2 8 2 : 3 9 (1 9 7 9))。こ

10

20

30

40

50

の *trp1* 遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く、酵母の変異株、例えば ATCC 番号 44076 又は PEP4-1 用の選択マーカーを提供するものである (Jones, Genetics, 85:12 (1977))。酵母細胞のゲノム中の *trp1* 障害の存在は、次に、トリプトファンが欠如する中で増殖する形質転換体を検出するのに効果的な環境を提供する。同様に、Leu2-欠失酵母株 (ATCC 20,622、又は 38,626) は、Leu2 遺伝子を持つ既知のプラスミドで補完される。

【0119】

更に、1.6 μ m 環状プラスミド pKD1 に由来するベクターは、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 酵母の形質転換に用いることができる。或いは、組換え子ウシキモシンの大量の生産用の発現システムが *K. ラクチス* (*Lactis*) に対して報告されている (Van der Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990))。クルイベロマイセスの工業用株による、成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌用の、安定な多コピー発現ベクターもまた開示されている (Fleer, Bio/Technology, 9:968-975 (1991))。

【0120】

(iv) プロモーター要素

発現用及びクローニング用ベクターは通常、宿主生物により認識され、抗 CD11a 抗体核酸に機能的に連結されるプロモーターを含んでいる。原核性宿主で使用するのに適するプロモーターには、*phoA* プロモーター、 λ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、及び *tac* プロモーター等のようなハイブリッドプロモーターが含まれる。しかしながら、他の既知の細菌性プロモーターも適している。細菌系で使用されるプロモーターはまた、抗 CD11a 抗体をコードする DNA に機能的に連結されたシャイン-ダルガーノ (*S.D.*) 配列を含んでいる。

【0121】

真核細胞についてもプロモーターが知られている。実質的に全ての真核遺伝子は、転写が開始される部位の上流、約 25 乃至 30 塩基に位置する AT-リッチな領域を有している。多くの遺伝子の転写開始点の上流 70 乃至 80 塩基に見られる別の配列は、CNCATA 領域であり、ここで N はいかなるヌクレオチドをも意味する。多くの真核遺伝子の 3' 末端には、ポリ A テイルをコード配列の 3' 末端に付加するシグナルとなりえる AATAA 配列がある。これらの配列の全ては、真核発現ベクター中に適切に挿入されている。

【0122】

酵母宿主で用いるのに適切な促進性配列の例には、3-ホスホグリセレートキナーゼ、又はエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ビルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼ等の他の解糖系酵素用のプロモーターが含まれる。

【0123】

他の酵母プロモーターで、増殖条件により転写が制御されるという付加的な利点を有する誘導性プロモーターであるものは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクローム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトースの利用に関する酵素用のプロモーター領域である。酵母中での発現に使用する適切なベクター及びプロモーターは、更には EP73, 657 中に記載されている。酵母エンハンサーもまた、酵母プロモーターと有利に使用される。

【0124】

哺乳動物宿主細胞中におけるベクターからの抗 CD11a 抗体の転写は、例えばポリオマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2 型)、

10

20

30

40

50

ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、そして最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)等のようなウイルスのゲノムから得たプロモーターや、非相同性の哺乳動物性プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、更には熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより制御されているが、但しそのようなプロモーターは宿主細胞系と適合するものであるという条件がつく。

【0125】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターはSV40の複製起点をも含むSV40制限断片として都合よく得られる。ヒトサイトメガロウイルスの極初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として都合よく得られる。哺乳類の宿主で、ウシパピローマウイルスをベクターとして利用した、DNAを発現させる系が、米国特許番号4,419,446に開示されている。この系を改変したものが、米国特許番号4,601,978に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下にあるヒト γ -インターフェロンcDNAをマウス細胞で発現させたReyesらの文献(Nature, 297:598-601(1982))を参照。或いは、ラウス肉腫ウイルスの末端反復配列もプロモーターとして使用することができる。

【0126】

(v) エンハンサーエレメント要素

本発明の抗CD11a抗体をコードするDNAについての、高等真核生物による転写はしばしば、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することで増大する。哺乳類の既知の遺伝子(グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、及びインスリン)より、多くのエンハンサー配列が知られている。しかしながら典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する例としては、複製起点の後側(100-270bp)にあるSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターのエンハンサー、複製起点の後側にあるポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる真核性プロモーターを活性化する宜進生配列エレメントについての、Yanivの文献(Nature, 297:17-18(1982))も参照されたい。エンハンサーは、ベクター中の抗CD11a抗体をコードする配列の5'又は3'側に接合させても良いが、好ましくはプロモーターより5'側に位置させる。

【0127】

(vi) 転写終止要素

真核宿主細胞(酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞性生物由来の有核細胞)中で使用される発現ベクターにはまた、転写の終止及びmRNAの安定化に必要な配列が含まれるであろう。このような配列は通常は、真核性若しくはウイルス性のDNA、又はcDNAの非翻訳領域の5'、ときには3'より得ることができる。これらの領域には、抗CD11a抗体をコードするmRNAの非翻訳領域におけるポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチド配列が含まれる。有益な転写終止要素の一つは、ウシ成長ホルモンポリアデニレーション領域である。WO94/11026及びその中で開示されている発現ベクターを参照されたい。

【0128】

(vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

本願においては、ベクター中のDNAを発現、又はクローニングするベクターに適する宿主としては、上記したような、原核細胞、酵母、又は高等な真核細胞がある。この目的に適した原核細胞には、グラム陰性又はグラム陽性の生物等のような真正細菌、例えばエシェリシア(Escherichia)(例:大腸菌(E.coli))、エンテロバクター(Enterobacter)、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ(Salmonella)(例:サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium))、セラチア(Serratia)(例:セラチアマルセスカンス(Serratia marcescens))、及び赤痢菌(Shigella)のようなエンテロバクテリア科と同様に、桿菌(Bacilli)(例:B.サブチリス(subtilis)、B.リヒェニフォルミス(licheniformis))(例

10

20

30

40

50

: 1989年4月12日発行のDD266, 710に開示されているB.リヒェニフォルミス (*licheniformis*) 41P)、シュードモナス (*Pseudomonas*) (例: P.アエルギノサ (*aeruginosa*)) 及びストレプトミセス (*Streptomyces*) が含まれる。他の株、例えばE. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31, 537)、及びE. coli W3110 (ATCC 27, 325)も適しているが、大腸菌クローニング宿主のうちの好ましいものの一つは、E. coli 294 (ATCC 31, 446)である。これらは限定するものではなく、例示するものである。

【0129】

原核細胞に加えて、糸状真菌、又は酵母のような真核性の微生物も、抗CD11a抗体をコードするベクターのクローニング又は発現用の宿主として適する。サッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、又はベーカース酵母として知られるものは、低級な真核性宿主微生物の中では最もよく使用される。しかしながら、数多くの他の属、種、及び株が入手可能でありまた本願でも有益であり、例えばシゾサッカロミセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) ; クルイペロミセス (*Kluyveromyces*) 宿主 (例: K.ラクチス (*lactis*)、K.フラギリス (*fragilis*) (ATCC 12, 424)、K.ブルガリクス (*bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、K.ウイカラミイ (*wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、K.ワルチイ (*waltii*) (ATCC 56, 500)、K.ドロソフィラルム (*drosopilarum*) (ATCC 36, 906)、K.サーモト・レランス (*thermotolerans*)、及びK.マルキシアヌス (*marxianus*)) ; ヤロウミア (*yarrowia*) (EP 402, 226) ; ピチア パストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070) ; カンジダ (*Candida*) ; トリコデルマ レエシア (*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234) ; ニューロスボラ クラッサ (*Neurospora crassa*) ; シュワンニオマイセス (*Schwanniomyces*) (例: シュワンニオマイセス オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)) ; 及び糸状菌類 (例: ニューロスボラ (*Neurospora*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、トリポクラディウム (*Trypocladium*)、及びアスペルギルス (*Aspergillus*) 宿主 (例: A.ニズランス (*nidulans*)、及びA.ニガー (*niger*)) がある。

【0130】

グルコシル化した抗CD11a抗体を発現するための適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎生物の細胞の例としては植物及び昆虫の細胞がある。多数のバキュロウイルス株及び変異体、並びにスポドプテラ フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (イモムシ)、アエデス アエギプチ (*Aedes aegypti*) (カ)、アエデス アルボピクタス (*Aedes albopictus*) (カ)、ドロソフィラ メラノガスタ (*Drosophila melanogaster*) (ショウジョウバエ)、及びボンビクス モリ (*Bombyx mori*) などの宿主由来の、対応する許容性昆虫宿主細胞が同定されている。数多くの形質移入用ウイルス株、例えばオートグラフィ カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPVのL-1変異体、及びボンビクス モリ (*Bombyx mori*) NPVのBm-5株が入手可能であり、このようなウイルスは本発明によれば、本願のウイルスとして使用することが可能であり、特にスポドプテラ フルギペドラ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞の形質移入用に使用できる。

【0131】

ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物細胞培養を宿主として使用することが可能である。

【0132】

しかしながら、脊髄生物の細胞が最も興味を持たれていて、脊髄生物の細胞の培養 (組織培養) による増殖は、日常的な方法になっている。有益な哺乳類宿主細胞の例としては、SV40で形質転換したサルの腎臓CV-1株 (COS-7, ATCC CRL1651) ; ヒト胎児性腎臓株 (293、又は懸濁培養中で増殖させた293細胞のサブクローン、Grahamら、J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Ur laubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)) ; マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather、Biol

10

20

30

40

50

. *Reprod.* 23:243-251 (1980)); サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL70); アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト頸部癌細胞 (HELA, ATCC CCL2); イヌ腎臓細胞 (MDCK, ATCC CCL34); パッファロラット肝臓細胞 (BRL3A, ATCC CRL1442); ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL75); ヒト肝臓細胞 (HepG2, HB8065); マウス乳腺癌 (MMT060562, ATCC CCL51); T R I細胞 (Matherら, *Annal. N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝細胞腫株 (HepG2) である。

【0133】

宿主細胞は、上記の抗CD11a抗体産生用の発現用又はクローニング用ベクターで形質転換されて、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅させるために適切に改変した通常の栄養培地中で培養される。

【0134】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗CD11a抗体を産生するのに使用した宿主細胞は、種々の培地中で培養することができる。商業的に入手可能な培地、例えばハムF10 (シグマ)、最小必須培地 (MEM) (シグマ)、RPMI-1640 (シグマ)、及びダルベッコ改変イーグル培地 ((DMEM)、シグマ) 等が当該宿主細胞を培養するのに適している。更に、Hamら (*Meth. Enz.* 58:44 (1979))、Barnesら (*Anal. Biochem.* 102:255 (1980))、米国特許番号の4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 若しくは5,122,469; WO90/03Z130; WO87/00195; 又は米国特許番号のRe 30,985に記載される何れも、当該宿主細胞用の培地として使用することができる。これらの培地の何れも必要であればホルモン、及び/又は他の成長因子 (例えばインスリン、トランスフェリン、又は上皮細胞成長因子)、塩 (例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩)、緩衝液 (例えばHEPES)、ヌクレオチド (例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質 (例えばゲンタマイシン (商標) 薬剤)、微量元素 (マイクロモルの範囲の最終濃度で通常は存在する無機化合物と定義される)、及びグルコース又は等価なエネルギー源で補充していてもよい。当業者に知られる他の必要な補充物のいかなるものも、適切な濃度で含めることができる。温度、pH等の培養条件は、発現用に選択した宿主細胞で以前に使用したものであり、当業者には明らかである。

【0135】

(ix) 抗CD11a抗体の精製

組換え技術を使用すると、当該抗体は細胞内で、周辺質の空間で、又は直接培地中へ分泌されるようにして産生することが可能である。抗体を細胞内で産生するならば、第一段階として粒子状の細片、即ち宿主細胞又は溶解断片を、例えば遠心又は超遠心により除去する。Carterらは、大腸菌の周辺質空間に分泌される抗体の単離方法を記載している (*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。簡単にいうと、細胞ペーストを酢酸ナトリウム (pH3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスホニルフルオリド (PMSF) 存在下で約30分間解凍する。細胞細片は遠心で除去できる。抗体が培地中に分泌される場合には、そのような発現系の上清は、一般的にはまず、商業的に入手可能な蛋白質濃縮フィルター、例えばアミコン又はミリポアベリコン限外ろ過ユニットを使用して濃縮する。PMSF等のプロテアーゼ阻害剤を、以後のいかなる工程に含ませて蛋白分解を阻害することができ、また抗生物質を含めて外来性の汚染物質の増殖を防止しても良い。

【0136】

細胞より調製される抗体組成物は、例えばヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することができるが、中でもアフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィ

10

20

30

40

50

ニティリーリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在するいずれかの免疫グロブリンのFc領域種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを利用して、ヒトの1、2、又は4重鎖に基礎を置く抗体を精製することができる(Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。全てのマウスアイソタイプ、及びヒトの3に対しては、プロテインGが推奨される(Gussら、EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。アフィニティリーリガンドを付けるマトリックスは、多くはの場合、アガロースであるが、他のマトリックスでもよい。機械的に安定なマトリックス、例えば制御されたポアガラス又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどは、アガロースで行うものよりも、より大きい流速とより短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3領域を具備する場合、Bakerbond ABX(商標)レジン(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有益である。蛋白精製の他の技術、例えばイオン交換カラム、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、アニオン若しくはカチオン交換レジン(例えばポリアスパラギン酸カラム)でのヘパリンSEPHAROSE(商標)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸沈殿などによる分画も、回収する抗体によっては可能である。

【0137】

予備的精製工程に引き続いて、興味のある抗体及び汚染部質を具備する混合物を、pHが2.5乃至4.5の間の溶出緩衝液を、好ましくは低塩濃度(例:約0乃至0.25Mの塩)において使用する低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーにかける。

【0138】

C. 製剤

所望の精製度の抗体と、適宜生理学的に許容されるキャリア、賦形剤、又は安定化剤を混合することにより、凍結乾燥した製剤、又は水溶液の形態で、保存用の治療用抗体製剤を調製する(Remington's Pharmaceutical Sciences、16版、Osol, A. 編集、(1980))。許容可能なキャリア、賦形剤、又は安定化剤は使用する投薬量及び濃度において摂取者に毒性がないものであり、またリン酸塩、クエン酸塩、若しくは他の有機酸などの緩衝液;アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤;保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム;塩化ヘキサメトニウム;塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム;フェノール、ブチル若しくはベンジルアルコール;メチル若しくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン;カテコール;レゾルシノール(resorcinol);シクロヘキサノール;3-ペンタノール;及びm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)のポリペプチド;血清アルブミン、ゲラチン、又は免疫グロブリン等の蛋白質;ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー;グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン等のアミノ酸;モノサッカライド、ジサッカライド、並びにグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物;EDTA等のキレート剤;ショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖;ナトリウムなどの塩形成対イオン;金属錯体(例:Zn-蛋白質錯体);及び/又はTWEEN(商標)、PLURONICS(商標)、又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0139】

ここでの製剤はまた、治療する特定の適応症に必要な一よりも多い活性化合物、好ましくはそれぞれが互いに有害とならない、相補的な活性を有するものを含んでいても良い。例えば、免疫抑制剤をさらに提供することが望ましいかもしれない。そのような分子は適切には、意図する目的に効果的である量において組合せて存在する。

【0140】

有効成分はまた、例えばコアセルベーション法や界面重合により調整されるマイクロカプセル中に取り込ませてもよいが、この例としてはそれぞれコロイド性ドラッグデリバリーシステム中(例えばリポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)、又はマクロエマルジョン中におけるヒドロキシメチルセルロース若

10

20

30

40

50

しくはゲラチン - ミクロカプセル、及びポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセルがある。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、16版、Osol, A. 編集、(1980)に開示されている。

【0141】

インビボ投与に使用する製剤は、無菌である必要がある。これは無菌のろ過膜によるろ過で直ぐに達成される。

【0142】

持続性放出の製剤を調製してもよい。持続性放出の適切な例には、固体の疎水性ポリマーでできた、抗体を含む半透過性マトリックスが含まれるが、これは例えばフィルムやマイクロカプセルのように形作られた物品の形態をとる。持続性の放出マトリックスの例は、10
 ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許番号3,773,919)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸の共重合体、非分解性エチレンビニルアセテート、分解性乳酸-グリコール酸共重合体(例えばLupron Depot(商標)(乳酸-グリコール酸共重合体と酢酸ロイプロリドを具備する注射用マイクロ粒子))、及び
 ポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-ビニルアセテート及び乳酸-グリコール酸等のようなポリマーが100日以上の間分子の放出を可能にするのに対し、ある種のヒドロゲルは蛋白質をより短い期間しか放出しない。カプセル化した抗体が体内に長期間残る場合、37で水分に露出される結果としてそれらは変性するか、又は凝集し、生物学的活性の喪失がおき、免疫原性の変化が起る可能性がある。関与する機構
 20
 に応じて安定化する合理的な戦略が発明されうる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィドの交換による分子間S-S結合の形成であることが発見されれば、スルフィドリル残基を修飾したり、酸性溶液から凍結乾燥したり、含有水分を調節したり、適切な添加剤を使用したり、特別なポリマーマトリックス組成物を開発したりして、安定化を達成することが可能である。

【0143】

D. 抗体の非治療的使用

本発明の抗体は、アフィニティー精製媒介物として使用することができる。この方法においては、セファデックスレジンやフィルター紙のような固相に当該抗体を当該技術分野でよく知られた方法を使用して固定化する。固定化された抗体をCD11a蛋白質(又はその断片)を含む、精製用試料と接触させ、その後に支持体を、試料中のCD11a蛋白質以外の物質を実質的に全て除去する適切な溶媒で洗浄するが、CD11aは固定化された抗体に結合している。最後に支持体を、CD11aを抗体から放出させる他の適切な溶媒、例えばグリシン緩衝液、pH5.0で洗浄する。
 30

【0144】

抗CD11a抗体はまた、CD11a蛋白質の診断用アッセイ、例えばその発現を特別な細胞、組織、又は血清中で検出することにおいて有益である可能性がある。

【0145】

診断的適用においては、当該抗体は検出可能な成分で標識されるであろう。以下のカテゴリーに分類することが可能な、数多くの標識が入手可能である：
 40

(a) ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、及び ^{131}I のような放射性同位体。例えばCurrent Protocol in Immunology(第1巻、2巻、Coligenら編集、Wiley-Interscience、New York、New York、Publishers、(1991))に記載される技術を使って、抗体を放射性同位体で標識することができ、また放射性はシンチレーションカウンターを使用して測定できる。

(b) 希土類キレート(例えばユーロピウムキレート)のような蛍光標識又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、及びテキサスレッドが入手可能である。蛍光性の標識は、例えば上記のCurrent Protocol in Immunologyに開示されている技術を利用して抗体に共役させることができる。蛍光は蛍光定量機を使用して定量することができる。
 50

(c) 種々の酵素 - 基質標識が入手可能であり、米国特許番号 4, 275, 149 は、これらのいくつかについてのレビューを提供している。この酵素は一般に、種々の技術で測定することができる色素生産性基質の化学的变化を触媒する。例えば、この酵素は基質中の色の变化を触媒してもよいが、これは分光学的に測定することが可能である。或いは、この酵素は基質の蛍光又は化学発光を変化させてもよい。蛍光の変化を定量する技術は上記に記載してある。化学発光基質は、化学反応により電氣的に励起し、次いで(例えば化学発光定量機で)測定可能な光を発するか、又は蛍光受容体へエネルギーを与える。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ、細菌性ルシフェラーゼ; 米国特許番号 4, 737, 456)、ルシフェリン、2, 3 - ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRPO)のようなペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ)、ヘテロサイクリックオキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等が含まれる。酵素を抗体に共役する技術は、O'Sullivanらの酵素免疫アッセイで使用するための酵素 - 抗体共役物の調製方法に記載されている(Methods in Enzym. 編集 J. Langone & H. Van Vunakis; Academic press, New York, 73: 147 - 1616 (1981))。

10

【0146】

20

酵素 - 基質の組合せの例は、例えば以下のものが含まれる:

(i) ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRPO)と基質としての過酸化水素; ここで過酸化水素は、色素前駆体(例えばオルトフェニレンジアミン(OPD)、又は3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンヒドロクロリド(TMB))を酸化する;

(ii) アルカリホスファターゼ(AP)と色素生産性基質としてのパラ - ニトロフェニルホスフェート; 及び

(iii): α -D - ガラクトシダーゼ(α -D - Gal)と色素生産性基質(例えばp - ニトロフェニル - α -D - ガラクトシダーゼ)又は蛍光生産性基質の4 - メチルウンベルリフェリル - α -D - ガラクトシダーゼ(4-methylumbelliferyl - α -D - galactosidase)。

30

【0147】

他の数多くの酵素 - 基質の組合せも当業者にとって入手可能である。これらの一般的レビューとしては、米国特許番号 4, 275, 149 及び 4, 318, 980 を参照されたい。

【0148】

ときには標識は抗体に間接的に共役される。熟練者はこれを達成する種々の技術を知っているであろう。例えば、抗体はビオチンや上記したラベルについての3つの広いカテゴリーのいかなるものに対してもアビジンで共役させることができるし、その逆も可能である。ビオチンは、選択的にアビジンに結合し、よってこの標識は抗体とこの間接的方法によって共役されることが可能である。或いは、標識と抗体との間接的な共役を達成するため、当該抗体を小さいハプテン(例えばジゴキシン)と共役して、上記した標識の異なるタイプのものの一つを抗 - ハプテン抗体(例えば抗 - ジゴキシン抗体)と共役させる。故に、標識の抗体との間接的共役が達成される。

40

【0149】

本発明の別の態様においては、抗CD11a抗体は標識される必要はなく、その存在はCD11a抗体に結合する標識抗体を使用して検出されることが可能である。

【0150】

本発明の抗体はいかなる既知のアッセイ方法、例えば競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイにおいても用いることができる(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techni

50

ques, pp 147 - 158 (CRC Press, Inc. 1987)。

【0151】

競合的結合アッセイは、限られた量の抗体との結合に対して、標識した標準物質が試験試料分析物と競合する能力に依存している。試験試料中のCD11aの量は、抗体に結合する標準物質の量と反比例する。結合する標準物質の量を決定するのを促進するため、抗体は一般的には競合の前又は後で不溶化させて、抗体に結合した標準物質及び分析物が、結合しないで残った標準物質及び分析物質と便利に分離できるようにする。

【0152】

サンドイッチアッセイは、二つの抗体を使用するが、それぞれは検出する蛋白質の異なる免疫原性部分、又はエピトープに結合することができる。サンドイッチアッセイにおいては、試験試料分析物は、固相支持体に固定されている第一抗体によって結合され、その後第二抗体が分析物に結合し、よって不溶性の三部複合体を形成する。例えば米国特許番号4,376,110を参照されたい。第二抗体はそれ自体で検出可能部を標識されていても良く（直接的サンドイッチアッセイ）、又は検出可能部で標識された抗-免疫グロブリン抗体を使用して測定することも可能である（間接的サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの一つのタイプはELISAアッセイであり、この場合には検出可能な部分は酵素である。免疫組織化学の場合、腫瘍試料は新鮮なものであっても又は凍結されたものであっても、或いはパラフィン中に包埋され、例えばホルマリン等の保存料により固定されていてもよい。

【0153】

抗体は、インビボの診断アッセイにも使用することが可能である。一般的に、抗体は放射性核種（例えば ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、又は ^{35}S 等）で標識されていて、免疫シンチオグラフィを使用して腫瘍が位置づけられるようになっている。

【0154】

E. 診断キット

便宜上の問題として、本発明の抗体はキット、即ち予め決められた量の試薬を、診断アッセイの実施用の指示書とともに組み合わせてパッケージしたものと提供することが可能である。抗体が酵素で標識されている場合には、キットには当該酵素により要求される基質及び補助因子が含まれるであろう（例えば検出可能な発色団又は蛍光団を提供する基質前駆体）。更に、安定化剤や、緩衝液（例：ブロック緩衝液又は溶解緩衝液）等の他の添加物を含めることが可能である。種々の試薬の相対量を大きく変化させて、アッセイの感受性を実質的に最適化する試薬についての溶液中の濃度を規定する。特に試薬は、溶解すると適切な濃度の試薬溶液を提供する賦形剤を含み、通常は凍結乾燥された乾燥粉末とすることかできる。

【0155】

F. 抗体についての治療的使用

本発明の抗CD11a抗体は、本願に記載する種々のLFA-1媒介性疾患を治療するのに使用することができるように考慮されている。

【0156】

この抗CD11a抗体は、いかなる適切な手段によって投与することができ、これには非経口的、皮下的、腹腔内、肺内、及び鼻孔内投与が含まれるが、部分的な免疫抑制治療の場合には、必要とあらば病巣内投与（灌流適用、又はさもなくば移植前に移植片を抗体に接触させることを含む）が含まれる。非経口的な注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下的投与が含まれる。更に、抗CD11a抗体は適切にはパルス注入により投与され、特に抗体を減少させて行う。好ましくは、投薬は注射により行われ、最も好ましくは静脈内又は皮下的注射により行われるが、これらは投薬が短期間であるか又は慢性的であるかにより、一部依存する。

【0157】

疾患の予防又は治療の場合、抗体の適切な投薬量は治療する疾患のタイプ、上に定義し

10

20

30

40

50

たように疾患の重症度及び経緯、予防若しくは治療目的で投与するか否か、以前の治療、患者の臨床的病歴、及び抗体に対する反応、並びに従事している医者の慎重さによっても依存するであろう。抗体は適切には一回、又は一連の治療に渡って患者に投与される。

【0158】

疾患のタイプ及び重症度に依存するが、例えば一又はそれ以上の別々の投与によっても、又は連続的な注入によっても、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 乃至 $15 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば 0.1 乃至 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$) の抗体が、患者に対する初期的な投薬量の候補である。典型的な一日当たりの投与量は、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 乃至 $100 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲か、それより多いが、これは上記したような因子に依存する。数日間又はそれよりも長い期間、繰り返して投与する場合には、疾患の症状が望ましく抑制されるまで治療は持続される。しかしながら、他の投薬療法も有益であるかもしれない。治療の進行は通常の技術及びアッセイによって簡単にモニターされる。規範的な投薬療法が WO 94 / 04188 に開示されている。

10

【0159】

抗体組成物は、好ましい医学的習慣によって、製剤化、服用、及び投与される。この点において考慮する要素には、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳類、個々の患者の臨床的狀態、疾患の原因、用剤のデリバリー部位、投与方法、投与のスケジュール、及び医学従事者に知られる他の要素が含まれる。投与する抗体の "治療的に有効な量" とは、上記のような考慮により決まるであろうし、またこれは LFA-1 媒介性の疾患を予防、回復、又は治療すること (リウマチ性関節炎の治療、炎症性反応の低減、免疫賦活薬の許容誘導、ホストによる移植片の拒絶若しくはその逆が生じるかもしれない免疫反応の防止、又は移植片の生存の引き延ばしが含まれる) に必要な最小の量のことである。このような量は好ましくは、ホストにとって毒性のあるか、より顕著にホストを感染に感受性を与える量よりも低い。

20

【0160】

抗体は必ずしもそうである必要はないが、問題となっている疾患の予防若しくは治療に現在使用されている一又はそれ以上の薬剤とともに適宜製剤化される。例えば、リウマチ性関節炎においては、抗体はグルココルチコステロイドと組み合わせて与えられる。更に、T細胞受容体ペプチドセラピーは、適切には自己免疫性脳脊髄炎の臨床的サインを予防するための補助的セラピーである。移植片の場合、抗体は上に定義したような、例えばシクロスポリン A などの免疫抑制剤とともに、又はこれとは別にして投与されて、免疫抑制効果を調節する。或いは、又は更に、VLA-4 アンタゴニスト若しくはその他の LFA-1 アンタゴニストを LFA-1 媒介性疾患に苦しむ哺乳動物に投与してもよい。このような他の薬剤の効果的な量は、製剤中に存在する抗 CD11a 抗体の量、治療する疾患又は処置のタイプ、及び上記で考察した他の要素に依存する。これらは一般に同じ投薬量で、また上記で用いたような投与経路で用いられるか、又はこれまで用いた投薬量の約 1 乃至 99% で用いられる。

30

【0161】

G. 製造物

本発明の別の態様においては、上記した疾患の治療に有益である物質を含んだ製造物が提供される。この製造物は、容器及びラベルを具備している。適切な容器には例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管が含まれる。この容器は、ガラスやプラスチックなどの種々の物質から形成されていてもよい。この容器は、状態を処置するのに効果的な組成物を保持し、また無菌のアクセスポートを有していても良い (例えば容器は、皮下組織注射用の針で突き刺すことが可能なストッパーを有する静脈用溶液バッグやバイアルであってもよい)。組成物中の有効成分は、抗 CD11a 抗体である。容器の上、又はそれに取付たラベルは、当該組成物が選択する状態の治療に用いられることを表示する。製造物は更に、第二の容器であって薬学的に許容される緩衝液、例えばリン酸塩緩衝生理食塩水、リングル (Ringer's) 溶液、及びデキストロース溶液等を含んだものを具備していても良い。更には、商業的若しくは使用者的観点から望ましい他の物質を含んでも良く、これには他の、緩衝液、希釈液、フィルター、針、シリンジ、及び使用にあつ

40

50

ての指示書を含んだパッケージ挿入物などが含まれる。

【実施例】

【0162】

ヒト化抗CD11a抗体の産生

本実施例は、マウス抗ヒトCD11aモノクローナル抗体であるMHM24 (Hildrethら、Eur. J. Immunol. 13: 202-208 (1983))のヒト化、及びインビトロでの生物学的有効性を記載する。マウスのMHM24についての以前の研究においては、他の抗CD11a抗体のように、T細胞の機能を阻害することを示している (Hildrethら、J. Immunol. 134: 3272-3280 (1985); Doughertyら、Eur. J. Immunol. 17: 943-947 (1987))。マウスの及びヒト化したMAbsの両方は、ヒトT細胞がヒトケラチノサイトに接着するのを効果的に防止し、またMHCクラスII抗原の応答性のモデルである、混合リンパ球応答 (MLR) における非自己性リンパ球へ応答したT細胞の増殖も防止する (McCabeら、Cellular Immunol. 150: 364-375 (1993))。しかしながら、マウスの (Reimannら、Cytometry, 17: 102-108 (1994))、及びヒト化したMAbsはヒト以外の霊長類のCD11aとは、チンパンジーのCD11aを除いて交差反応しなかった。アカゲザルにおける前臨床的研究に役立つヒト化MAbを得るため、可変重鎖領域における相補性決定領域の一つである、CDR-H2における4つの残基を代えることによりアカゲザルのCD11aに結合するように、ヒト化したMAbを再操作した。アカゲザルのCD11a I-領域のクローニング及び分子モデリングは、ヒトCD11a I-領域中のリジン残基の、アカゲザルCD11a I-領域中のグルタミン残基への変化が、マウスの及びヒト化したMAbsがアカゲザルCD11aへ結合しない理由であることを示唆した。

【0163】

材料及び方法

(a) ヒト化したF(ab')₂の構築

マウスの抗-ヒトCD11aMAb、MHM24 (Hildrethら、Eur. J. Immunol. 13: 202-208 (1983); Hildrethら、J. Immunol. 134: 3272-3280 (1985))をクローン化して配列決定した。突然変異誘発に有益であり、そして同様に大腸菌内でF(ab)を発現させるためのプラスミドを得るためにファージミドpEMX1を構築した。pB0475 (Cunninghamら、Science 243: 1330-1336 (1989))の誘導体であるファージミドpb-0720に基づき、pEMX1は、ヒト化した - サブグループI重鎖及びヒト化したサブグループIII重鎖 (VH-CH1) をコードするDNA断片と、アルカリホスファターゼプロモーター及びシャイン-ダルガーノ配列を含んでいるが、これら両者は以前に記載された別のpUC119に基づくプラスミドであるpAK2 (Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992))に由来するものである。ユニークなSpeI制限部位がまた、F(ab)の軽鎖及び重鎖をコードするDNAの間に挿入されている。

【0164】

ヒト化したMHM24の最初のF(ab)変異体を構築するため、部位特異的突然変異誘発 (Kunkel、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985))を、デオキシウリジンを含有する、pEMX1の鋳型に対して行った；六つのCDRの全てをMHM24配列に変化させた。他のF(ab)変異体の全ては、F(ab)-1の鋳型より構築した。二本鎖及び一本鎖DNAを調製するため、プラスミドを、大腸菌株XL-1 Blue (Stratagene、San Diego、CA)に形質転換した。それぞれの変異体については、軽鎖及び重鎖の両方ともに、ジデオキシヌクレオチド法を使って完全に配列決定した (シーケナーゼ、U.S. Biochemical Corp.)。プラスミドは、MM294の誘導体である大腸菌株16C9に形質転換して、5 µg/mlのカルベニシリンを含んだLBプレートにまいて、蛋白発現用に単一コ

10

20

30

40

50

コロニーを選択した。この単一コロニーを100 µg/mlカルベニシリンを含む5 mlのLB培地中で、37 °Cで5 - 8時間増殖させた。この5 mlの培養物を500 mlのAP5 - 100 µg/mlカルベニシリンに加えて、4リットルのバッフル付震盪フラスコ中で37 °Cで16時間増殖させた。APS培地は、1.5 gのグルコース、11.0 Hycase SF、0.6 gの酵母抽出物(保証済)、0.19 gのMgSO₄(無水物)、1.07 gのNH₄Cl、3.73 gのKCl、1.2 gのNaCl 120 mlの1 Mトリエタノールアミン pH 7.4、を1 Lの水へ加えたものからなり、0.1 µmのSeal-Keenフィルターを通して無菌化した。

【0165】

細胞はILの遠心ボトル(Nalgene)中で3000 × gで遠心して回収し、上清を取り除いた。1時間の凍結後、ペレットを25 mlの冷却した10 mM MES - 10 mM EDTA、pH 5.0(緩衝液A)中に再懸濁した。250 µlの0.1 M PMSF(シグマ)を加えて蛋白分解を阻害し、10 mg/mlの雌鳥卵白のリゾチームのストックを3.5 ml加えて、細菌の細胞壁の溶解を援助した。氷上で1時間穏やかに震盪した後、試料を40,000 × gで15分間遠心した。緩衝液Aで上清を50 mlにして、緩衝液Aで平衡化した2 ml DEAEカラムにかけた。フロースルーを、緩衝液Aで平衡化したプロテインG - セファロースCL - 4B(ファルマシア)カラム(0.5 mlのベッド容量)にかけた。カラムを10 mlの緩衝液Aで洗浄して、3 mlの0.3 Mグリシン、pH 3.0で溶出して1,25 mlの1 M トリス、pH 8.0に入れた。F(ab)を次いで、セントリコン - 30(アミコン)を使用してPBSへ緩衝液交換し、最終容量を0.5 mlに濃縮した。全てのF(ab)についてSDS - PAGEゲルを行って純度を確認し、またエレクトロスプレー質量分析によりそれぞれの変異体の分子量を確認した。

【0166】

(b) キメラ及びヒト化したIgGの構築

キメラ(chIgG1)のヒトIgG1変異体、及びヒト化した(HuIgG1)MHM24について、適切なマウス又はヒト化した可変軽鎖及び可変重鎖(F(ab) - 8、表II)領域をそれぞれ、pRKベクターとして以前記載されているもの(Gormanら、DNA Protein Eng. Tech. 2:3(1990))へ別々にサブクローニングした。HuIgG1軽鎖及び重鎖のプラスミドについて部位特異的突然変異導入(Kunkel、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488(1985))を行って、アラニン - スキャン変異体を構築した。それぞれの変異体のDNA配列はジデオキシヌクレオチド配列決定法により確認した。

【0167】

高効率法(Grahamら、J. Gen. Virol. 36:59(1977); Gormanら、Science, 221:551(1983))を利用して、重鎖及び軽鎖のプラスミドを、アデノウイルスで形質転換したヒト胎児性腎臓細胞株、293(Grahamら、J. Gen. Virol. 36:59(1977))に同時形質移入した。培地を無血清のものに交換して、5日間、毎日回収した。プロテインA - セファロースCL - 4B(ファルマシア)を使用して、上清のプールから抗体を精製した。溶出した抗体を、セントリコン - 30(アミコン)を使用してPBSに緩衝液交換し、0.5 mlに濃縮して、Millex - GV(ミリポア)でフィルターにかけて無菌化して、4 °Cで保存した。

【0168】

抗体の濃度は、全Ig - 結合性ELISAで決定した。参照用のヒト化抗 - p185HERIgG1(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285(1992))の濃度はアミノ酸組成分析により決定した。96穴プレートのそれぞれのウェルを1 µg/mlのヤギ抗 - ヒトIgGF(ab')₂(Cappel Laboratories, Westchester, PA)で4 °Cで24時間コートした。精製した抗体を希釈し、二つ一組にしてコート済プレートに加えた。1.5時間のインキュ

10

20

30

40

50

ベーション後、プレートにPBS-0.02% Tween 20で洗浄し、1:2000に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ共役ヒツジ抗-ヒトIgGF(ab')₂を加えた。1.5時間のインキュベーション後、プレートに洗浄して0.1mlの0.2mg/mlのo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド-0.01%過酸化水素-PBSを加えた。10分後、2Mの硫酸で反応を停止させ、490nmのODを測定した。

【0169】

(c) アカゲザルCD11aI-領域のクローニング

RT-PCR及びヒトCD11aDNA配列由来のプライマーを使用してアカゲザルのI領域のDNA配列を得た。簡単にいうと、Fast Track mRNA精製キット(Invitrogen)を使用して、mRNAを約10⁷のアカゲザルリンパ球より単離した。MuLV逆転写酵素を利用して、10µgのmRNAを逆転写した。次いで、第一鎖cDNAを以下のプライマーを使用して40サイクルのPCRで増幅させた:

5'-CACTTTGGATACCGCGTCCTGCAAGGT-3' (前向き) (配列認識番号: 21)、及び

5-CATCCTGCAAGGTCTGCCTTCAGGTCA-3' (逆向き) (配列認識番号: 22)。

【0170】

アガロース電気泳動により、予想したサイズの単一バンドをPCR反応物から精製した。PCR産物を制限酵素Sse8387I(タカラ)で消化し、同じ制限酵素で消化済のヒトCD11a含有プラスミドに連結した。ヒトCD11a配列には二つのSse8387I部位があり、一つはI-領域の何れか側にある。得られたプラスミドはアカゲザルI-領域でヒトI-領域を置換したヒトCD11aからなるキメラをコードしている。DNA配列分析により、ヒトとアカゲザルとの間で5アミノ酸の違いがあることが判明した。一つはI-領域のN-末端領域側にあり(Thr59Ser)、その他の4つはI-領域自身内にあった: Val133Ile、Arg189Gln、Lys197Glu、及びVal308Ala(図2)。

【0171】

(d) F(ab)及びIgGのジャーカット細胞への結合のFACSscan分析

ヒト化した及び対照の抗体について、PBS-0.1%BSA-10mMアジ化ナトリウムで連続的に希釈したもので、10⁶のジャーカットT-細胞の一定分量を、4で45分間インキュベーションした。細胞を洗浄し、次いでフルオレセイン共役ヤギ抗-ヒトF(ab')₂(Organon Teknika, Westchester, PA)中で、4で45分間インキュベーションした。細胞を洗浄してFACSscan(Becton Dickinson, Mountain View, CA)で分析した。8×10³の細胞をリストモードで得て、前光スキャッター対側光スキャッターでゲートして、これによって死滅細胞及び細片を除外した。

【0172】

(e) 見かけのKdsを決定するための飽和結合

Iodo-Gen(Pierce, Rockford, IL)を、製造者の指示に従って使用して、放射性標識した抗体を調製した。50µgの抗体及び1mCiの¹²⁵I(DuPont, Wilmington, DE)をそれぞれのチューブに加えて、25で15分間インキュベーションした。放射性標識した蛋白質を、0.2%ゲラチン含有のハンクの均衡塩溶液(HBSS, Life Technologies, Grand Island, NY)で平衡化したPD-10カラム(ファルマシア, Uppsala, Sweden)を使用して、残りのフリー遊離¹²⁵Iから精製した。

【0173】

リンパ球分離培地(LSM, Organon Teknika, Durham, NC)を製造者の指示に従って使用して、単核細胞を、二人の提供者より得た、ヘパリン処理済ヒト末梢血から精製した。血液は、400×gで40分間25で、ブレーキなしで遠

10

20

30

40

50

心した。LSMと血漿の界面の細胞を回収して、次いでHBSS - 0.2%ゲラチン中に再懸濁した。

【0174】

デキストラン沈殿により二匹のアカゲザルの個体より回収した、ヘパリン処理済末梢血より、リンパ球を精製した。血液は、等量のPBS中の3%デキストランT500（ファルマシア）で希釈して、25 で30分間放置して沈殿させた。沈殿後、上清中に残っている細胞を回収して、400 x gで5分間遠心して沈殿させた。残った赤血球は、蒸留水及び2 x HBSSを使用した、2サイクルの低浸透圧性溶解により除去した。赤血球の溶解後、細胞をPBSで洗浄して、次いでHBSS - 0.2%ゲラチン中に再懸濁した。

【0175】

抗体の親和性は、末梢血単核細胞（マウスMHM24及びHuIgG1）、又はアカゲザルリンパ球（MHM23、RhIgG1）の何れかを使用して、飽和結合により決定した。それぞれのアッセイでは、放射性標識した抗体を、4つ一組にしてHBSS - 0.2%ゲラチンで連続的に希釈した。非特異的結合は、最終濃度500 nMの相同性非標識抗体を二つ一組にして連続的に希釈して加えることにより決定した。ヒトリンパ球又はアカゲザルリンパ球を、1ウェル当たり170 µlの容量でプレートに加えた。プレートを、軌道プレート震盪機上で2時間、室温でインキュベーションした。インキュベーション後、SKATRON（商標）細胞回収器（Lier, Norway）を使用して回収し、0.25%ゲラチン及び0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBSで10回洗浄した。次いで試料は、LBK Wallac GammaMaster ガンマカウンター（Gaithersburg, MD）中で1分間カウントした。データは、毎分のカウント数から、ナノモル濃度に変換し、次いで飽和プロットの4変数曲線最適化（結合対全）を行ってKd (app) 値を決定した。

【0176】

(f) ケラチノサイト単層接着アッセイ

正常なヒト上皮ケラチノサイト（Clonetics, San Diego, CA）を、トリプシン - EDTAで培養フラスコより除去し、遠心し、リンパ球アッセイ培地（RPMI 1640 (GIBCO) - 10%ウシ胎児血清 - 1%ペニシリン/ストレプトマイシン）中に、 5×10^5 生細胞/mlの濃度で再懸濁した。0.1 ml/ウェルの一定分量を次いで、底が平面の96穴プレート中で一晚培養した；インターフェロン - ガンマ（Genentech, South San Francisco, CA）を100単位/ウェルで加えて、適当なウェルを刺激した。

【0177】

ジャーカット細胞クローンE6-1（ATCC, Rockville, MD）又は精製済アカゲザルリンパ球（MLR法を参照されたい）を、20 µg/mlのCalcein AM（Molecular Probe, Eugene, OR）で、37 で45分間標識した。リンパ球アッセイ培地で3回洗浄した後、ジャーカット又はアカゲザルリンパ球細胞を 1×10^6 細胞/mlに再懸濁し、連続的に希釈した抗体とともに、4 で30分間インキュベーションした。ケラチノサイトの単層より培地を除去した後、0.1 ml/ウェルの標識済細胞を加えて、37 で1時間インキュベーションした。ウェルを0.2 ml/ウェル/回で、37 のリンパ球培地で5回洗浄して、非接着細胞を除去した。Cytofluor 2330（ミリポア, Bedford, MA）を使用して、蛍光を測定した。

【0178】

アカゲザルのI - 領域を有するヒトCD11aを具備した、アカゲザル - ヒトキメラCD11a（Rh/HuCD11a）を、部位特異的突然変異導入（Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)）により、ヒトCD11aをコードしたデオキシウリジン含有鋳型プラスミド上で構築した。4つの残基を変化させた：Val133Ile、Arg189Gln、Lys197Glu、及びVal1308A1a（図2）。RH/HuCD11bi及びヒトCD11aをコードするブラ

10

20

30

40

50

スミド (EP 364, 690) を、高効率法 (Grahamら、J. Gen. Virol. 36: 59 (1977); Gormanら、Science, 221: 551 (1983)) を利用して、アデノウイルスで形質転換したヒト胎児性腎臓細胞株、293 (Grahamら、J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)) に同時形質移入した。Rh/HuCD11aで形質移入した293細胞を、20 µg/mlのCalcein AMで、37 °Cで45分間標識した。リンパ球アッセイ培地で3回洗浄した後、Rh/HuCD11aで形質移入した293細胞を、 1×10^6 細胞/mlに再懸濁し、連続的に希釈した抗体とともに、4 °Cで30分間インキュベーションした。培地をケラチノサイト単層より除去した後、0.1 ml/ウェルの標識済293細胞を加えて、37 °Cで1時間インキュベーションした。ウェルを、0.2 ml/ウェル/回の、37 °Cのリンパ球培地で5回洗浄して、非接着細胞を除去した。Cytofluor 2300を使用して蛍光を測定した。

【0179】

(g) ICAM接着アッセイ

Maxisorp (Nunc) 96穴のプレートを0.1 ml/ウェルの1 µg/ml ヤギ抗-ヒトIgG Fc (Caltag) で、37 °Cで1時間コートした。プレートをPBSで3回洗浄した後、プレートを1% BSA-PBSで、25 °Cで1時間ブロックした。次いでプレートをPBSで3回洗浄し、0.1 ml/ウェルの50 ng/ml 組換えヒトICAM-IgGを加えて、一晩インキュベーションした。

【0180】

ICAM-IgGは、ヒトIgG Fcに融合させたヒトICAMの5つの細胞外領域からなる。ヒトICAM-1 (Simmonsら、Cell, 331: 624-627 (1988)、及びStautonら、Cell, 52: 925-933 (1988)) イムノアドヘシンの発現用のプラスミドで、pRK.5dICAMGaIgと呼ばれるものを構築した。これは、ICAM-1のIg-様領域を5つ、サブチリシンBPN'のH64A変異体であるGenenase I (Carterら、Proteins: Structure Function, and Genetics 6: 240-248 (1989)) により認識される6アミノ酸の開裂部位、及びヒトIgG1 (Ellisonら、Nucleic Acids Research 10: 4071-4079 (1982)) のFc領域をpRK5ベクター (Eatonら、Biochemistry 25: 8343-8347 (1986)) に含むものである。ヒト胎児性腎臓293細胞 (Grahamら、J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)) をpRK.5dICAMGaIg、及びRSV-neoプラスミド (Gormanら、Science, 221: 551-553 (1983)) で安定に形質転換して、ICAM Igの5つの領域 (5dICAM Ig) を発現する細胞株を作り出した。ヒトIgG Fcに対する抗体 (Caltag、Burlingame, CA) 及びICAM-1 (BBIG-II; R&D System、Minneapolis, MN) を使用した酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) により、分泌した5dICAM Igを20 µg/ml発現するクローンを選択した。0.01 M HEPES緩衝液 (pH 7.0)、0.15 M NaCl (HBS)、で平衡化したProtein Aカラム (Prosep A、Bioprocessing, Ltd.、Durham, England) にこの細胞株の細胞培養の上清をかけ、カラムをHBS、次いで0.01 M HEPES緩衝液 (pH 7.0)、0.5 M NaCl、0.5 M TMAc (テトラ-メチルアンモニウムクロリド) で洗浄して、非特異的結合物質を除去した。HBSで、TMAc緩衝液をカラムから完全に洗浄し、5dICAM Igを0.01 M HEPES (pH 7.0)、3.5 M MgCl₂ 及び10% (w/v) グリセロールで溶出した。Protein AプールをHBSに対して徹底的に透析して濃縮した。

【0181】

精製したアカゲザルのリンパ球 (MLR法を参照されたい) を、20 µg/mlのCalcein AM (Molecular Probe、Eugene, OR) で37 °Cで4

10

20

30

40

50

5分間標識した。リンパ球アッセイ培地で3回洗浄した後、アカゲザルリンパ球細胞を 1×10^6 細胞/ml に再懸濁し、連続的に希釈した抗体とともに、4 で30分間インキュベーションした。ICAM-IgGでコートしたプレートより培地を除去した後、0.1ml/ウェルの標識済細胞を加えて、37 で1時間インキュベーションした。ウェルを0.2ml/ウェル/回で、37 のリンパ球培地で5回洗浄して、非接着細胞を除去した。Cytofluor 2330 (Millipore, Bedford, MA) を使用して、蛍光を測定した。

【0182】

(h) 一方向混合リンパ球応答 (MLR)

ヒト及びアカゲザルのMLRに対し、リンパ球分離培地 (Organon Teknika, Durham, NC) を使用して、二つの関連していない提供者に由来する末梢血リンパ球を、ヘパリン処理した全血より単離した。リンパ球は、RPMI 1640 (GIBCO) - 10% ヒトAB血清 - 1% グルタミン - 1% ペニシリン/ストレプトマイシン - 1% 非必須アミノ酸 - 1% ビルビン酸塩 - $5 \times 10^{-5} M$ 2-メルカプトエタノール - $50 \mu g/ml$ ゲンタマイシン - $5 \mu g/ml$ ポリミキシンB中に 3×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁した。セシウム照射装置中で3000ラッドの放射を行って、刺激細胞を非反応性にした。ウェル当たり 1.5×10^5 細胞の濃度の応答細胞を、等数の刺激細胞とともに、96ウェルの平底プレート中で一緒に培養した。2倍ずつ連続して希釈したそれぞれの抗体を、培養物に加えて全量を $200 \mu l$ /ウェルにした。培養物を、5% CO₂ 中で37 で5日間培養した後、 $1 \mu Ci$ /ウェルの [³H]チミジンとともに16時間、パルスした。 [³H]チミジンの取り込みを、Beckmanシンチレーションカウンターで測定した。アッセイは3つ一組にして行った。ヒト化抗-ヒトp185HERMAb (Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992)) を、HuIgG1及びRhIgG1に対するアイソタイプ対照として使用した。マウス抗-ハムスターtPAMAb (Genentech) を、MHM23MAbに対するアイソタイプ対照 (マウスIgG1) として使用した。MAb25.3は、Immunotech社 (Westbrook, ME) より購入した。

【0183】

(i) マウス及びヒト化MHM24にコンピュータグラフィックスモデル

VL及び、VH領域の配列 (図1A及びB) を使用して、マウスのMHM24VL-VH領域のコンピュータグラフィックスモデルを構築した。このモデルを使って、どのフレームワーク残基をヒト化抗体へ組み込むべきかを決定した。F(ab)-8のモデルもまた構築して、マウスのフレームワーク残基の正しい選択を確認した。モデルの構築は、以前記載されたようにして (Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Eigenbrotら、J. Mol. Biol. 229: 969 (1993)) 行った。

【0184】

結果

(a) ヒト化

ヒト重鎖サブグループIII及び軽鎖サブグループIのコンセンサス配列をヒト化のフレームワークとして使用した (Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)) (図1A及びB)。このフレームワークをうまく使用してマウスの他の抗体のヒト化に成功した (Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Pretaら、J. Immunol. 151: 2623-2632 (1993); Eigenbrotら、Proteins 18: 49-62 (1994))。ヒト化変異体の全てをまず作製して大腸菌内で発現したF(ab)sについての結合性によりスクリーニングした。典型的な収量としては、500mlの震盪フラスコ当たり、0.2-0.5mgのF(ab)であっ

10

20

30

40

50

た。マスペクトロスコープによって、それぞれのF (a b) の質量は5質量単位内にあることが確認された。

【 0 1 8 5 】

CDR - H 1 は H 2 8 - H 3 5 残基を含んでいたが、これには K a b a t ら (S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s . 5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h , B e t h e s d a , M D . (1 9 9 1)) 、 及 び C h o t h i a ら (N a t u r e , 3 4 2 : 8 7 7 - 8 8 3 (1 9 8 9)) の露出残基の全てが含まれていた。他の超可変ループは、C h o t h i a ら (1 9 8 9) に従って定義した。軽鎖の残基数はLの接頭辞が付き、重鎖の残基数はHの接頭辞が付く。

【 0 1 8 6 】

【表 I I】

表II ヒト化MHM24変異体の、ジャーカット細胞上のヒトCD11aへの結合

変異体	鎖型	変化 ^a	目的	EC50 F(ab)/ EC50 F(ab)-2 ^b		
				平均	S.D.	N
F(ab)-1	Human FR	ArgH71Val	直線的 CDR 交換	結合なし		2
F(ab)-2	F(ab)-1	AlaH60Asn AspH61Gln SerH62Lys ValH63Phe GlyH65Asp	伸張化 CDR-H2 (Kabat ら (1991))	1.0		4
F(ab)-3	F(ab)-2	PheH67Ala	ハックンク CDR-H2	1.2	0.33	3
F(ab)-4	F(ab)-2	ValH71Arg	ハックンク CDR-H1,H2	2.9		1
F(ab)-5	F(ab)-2	AsnH73Lys LysH75Ser AsnH76Ser	VH 中のフレームワーク 8-7*	0.043	0.015	4
F(ab)-6	F(ab)-5	SerL53Thr GluL55Gln	伸張化 CDR-L2	0.012	0.005	4
F(ab)-7	F(ab)-6	PheH27Tyr	伸張化 CDR-H1	0.004	0.002	4
F(ab)-8	F(ab)-7	SerH75Lys SerH76Asn	VH 中のフレームワークを ヒトに戻す	0.004	0.002	4
HuIgG1 ^c				0.004	0.002	4
chIgG1 ^d				0.006	0.005	4

a マウスの残基は太字；残基数はKabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991) による。

b 平均及び標準偏差は独立したそれぞれのFACSscan分析に対して計算した割合の平均である；F(ab)-2のEC50は771±320ng/mlであった。

c HuIgG1は、ヒトの軽鎖及び重鎖の定常部に融合されたF(ab)-8 VL及びVH領域である。

d chIgG1は、ヒトの軽鎖及び重鎖の定常部に融合したマウスのVL及びVH領域を有するキメラIgGである。

【0187】

最初の変異体であるF(ab)-1においては、CDR残基はマウスの抗体からヒトのフレームワークへと移行されている。更に、残基H71について、ヒトのArgからマウスのValに変化させたが、それはこの残基がCDR-H1及びCDR-H2のコンホメーションに影響することが以前に示されたからである(Chothiaら、Nature

10

20

30

40

50

、342:877-883(1989); Tramontano J. Mol. Biol. 215:175(1990)。このF(ab)では検出可能な結合は見られなかった。F(ab)-2においては、CDR-H2は、配列に基づく定義(即ち、残基H60-H65を含む)を含むように伸長された。ヒトCD11aに対するF(ab)-2の結合のEC50は、 $771 \pm 320 \text{ ng/ml}$ であったが、これはキメラIgG1のEC50($5.2 \pm 3.0 \text{ ng/ml}$)よりも148倍弱いものである。

【0188】

以前行ったヒト化においては、CDR-H1及びCDR-H2に隣接するフレームワークループ(FR-3)中の残基が結合に影響することが発見されている(Eigenbrodtら、Proteins 18:49-62(1994))。F(ab)-5においては、このループ中の3つの残基が対応するマウスのもの代えられていて、またこの変異体は結合において23倍の改善がみられた(表II)。ヒトのL53及びL55の残基をマウスのものにする(即ち、SerL53Thr、及びGluL55Gln)、更に4倍も結合が改善された(F(ab)-6、表II);これはCDR-L2を、構造に基づく定義(残基L50-L52)から、配列に基づく定義(残基L50-L56)に効果的に変換した。CDR-H1において引き続いて行ったPheH27からマウスのTyrへの変換により、更に3倍の改善がなされた(F(ab)-7;表II)。最後に、マウスの及びヒト化したMHM24のモデルに基づいて、FR-3における3つのマウス残基のうち2つ(H75及びH76)をヒトに戻し、この二つの残基は結合にはなんら影響を与えないことがわかった(F(ab)-7及びF(ab)-8を参照;表II)。F(ab)-8のEC50の平均はキメラIgGのものよりも若干良かった(表II)。必ずしもヒトからマウスへの変化の全てが結合を改善したわけではない。PheH67をマウスのAlaに変化させたか、それはこの部位が結合に影響を与えることが以前にわかっていたが(Prestaraら、J. Immunol. 151:2623-2632(1993))、効果が明らかではなかったためである(F(ab)-3、表II)。ValH71をヒトArgに戻すと、結合性が3倍減少したが(F(ab)-4、表II)、これはF(ab)-1にValH71を取り込むことを支持する。

【0189】

F(ab)-8由来のVL及びVH領域を、ヒトIgG1の定常領域に移行した。全長の無処置の抗体であるHuIgG1は、F(ab)-8と同等のEC50を示し、全長のキメラIgG1と比較したときには改善されていた(表II)。アラニン-スキャン及びMLRアッセイ用の標準物質としての使用を含む(以下参照)HuIgG1の全てのアッセイのデータを考慮すると、ヒトCD11aに対するHuIgG1のEC50は、 $0.042 \pm 0.072 \text{ nM}$ ($N=15$)であった。飽和結合アッセイも更に行って、見かけの解離定数 $K_d(\text{app})$ を決定した:マウスMHM24については $0.15 \pm 0.02 \text{ nM}$;HuIgG1については $0.15 \pm 0.04 \text{ nM}$ (表III)。

【0190】

10

20

30

【表 I I I】

表 I I I ヒトリンパ球及びアカゲザル白血球に対する飽和結合による見かけの K_d

	μMHM24 $K_d(\text{app})$ nM	HuIgG1 $K_d(\text{app})$ nM	μMHM23 $K_d(\text{app})$ nM	$\text{RhlgG1 } K_d(\text{app})$ nM
ヒトドナー 1	0.16 +/- 0.01	0.11 +/- 0.02		
ヒトドナー 2	0.13 +/- 0.02	0.18 +/- 0.03		
アカゲザルドナー 1			3.9 +/- 0.31	3.9 +/- 1.04
アカゲザルドナー 2			4.5 +/- 0.51	n.d.
アカゲザルドナー 3				2.8 +/- 1.1 ^a
アカゲザルドナー 3				2.7 +/- 0.9

a アカゲザルのドナー 3 についてのアッセイは、 RhlgG1 についての二つのバッチを使用して行った；このアッセイは 1 mg/ml の HuIgG1 の存在下で、 Fc 受容体相互作用をブロックして行った。

【0191】

(b) CDR 残基のアラニン - スキャン

どの CDR 残基がヒト CD11a への結合に関与するのかを決めるため、 HuIgG1 の CDR 残基についてのアラニン - スキャン (Cunninghamら、Science、244:1081 (1989)) を行った。それぞれの変異体について、ジャーカット細胞上の CD11a への結合を試験した。軽鎖においては、CDR-L3 のみが結合に寄与した。 HisL91 は、大きな効果があったが (表 IV)、この側鎖は一部が埋まっているはずであるから、おそらくはコンホメーション的なものであろう。残基 AsnL92 及び TyrL94 はより適度の効果があり、それぞれ 3 倍及び 12 倍の減少があった。しかしながら、これらの二つの残基を (GluL93A1a と同様に) アラニンに同時に変化させると、結合については付加的な影響を与えることがないことに注目されたい (変異体 L3、表 IV)。

【0192】

10

20

30

【表IV】

表IV ヒト化したMHM24のCDR残基についてのアラニンスキャン

変異体 IgG1		ヒト CD11a Var.EC50/HuIgG1 EC50 ^b			7H79 ^a & CD11a Var.EC50/HuIgG1 EC50 ^c		
		平均	S.D	N	平均	S.D.	N
CDR-H1		GYSFTGHWMN					
H1 ^d	A A A	5.9	0.8	2	nb		
SerH28Ala	A	6.9	0.1	2	nb		
ThrH30Ala	A	1.7	0.3	2	1.3		
GlyH31Ala	A	1.2	0.1	2	2.4		
HisH32Ala	A	2.3	0.2	2	nb		
TrpH33Ala	A	>870		1	nb		
CDR-H2		MIHPSDSETRYNQKFKD					
H2	A A A	14.1	7.8	10	0.055	0.050	15
H2B	A A A	>600		2	nb		
H2A1	A A	10.8	7.3	6	0.013	0.012	10
H2A2	A A	1.9	0.1	2	1.1	0.1	2
H2A3	A A	4.6	0.2	2	1.3		
HisH52Ala	A S	1.5	0.2	2	0.7		
HisH52Ser	S	5.0	0.3	2	nb		
SerH53Ala	A	1.8	0.1	2	0.7		
AspH54Ala	A	147	18	2	0.3		
SerH55Ala	A	1.3	0.1	2	1.3		
SerH55Asn	A N	2.1	0.2	2	nb		
SerH55Gln	A Q	2.9	1.4	2	6.7		
GlnH56Ala	A	4.0	0.6	2	0.3		
ArgH58Ala	A	1.1	0.1	2	3.3		
GlnH61Ala	A	4.1	0.1	2	5.3		
LysH62Ala	A	1.8	0.2	2	4.9		
LysH64Ala	A	2.5	0.1	2	1.2		
AspH65Ala	A	0.8	0.1	2	1.1		
FR-3							
LysH73Ala		5.2	0.9	2	nb		
LysH73Arg		4.6	1.1	2	5.5		
CDR-H3		GIYFYGTITYFD					
H3	A A	>900		2	nb		
H3B	A A A	34.7	13.6	2	nb		
TyrH97Ala	A	10.9	2.1	2	nb		
TyrH99Ala	A	1.4	0.1	2	nb		
ThrH100aAla	A	2.3	0.6	2	nb		

10

20

30

表 IV (続き)

変異体 IgG1		ヒト CD11a Var.EC50/HuIgG1 EC50 ^b			アカゲザル CD11a Var.EC50/HuIgG1 EC50 ^c		
		平均	S.D	N	平均	S.D.	N
ThrH100bAla	A	1.4	0.2	2	nb		
TyrH100cAla	A	7.6	1.0	2	nb		
CDR-L1	RASKTISKYLA						
L1	AA AA	1.3	0.3	3	1.0		
CDR-L2	SGSTLQS						
L2	A AA	1.1	0.0	2	nb		
SerL50Ala	A	1.2	0.5	2	2.7		
SerL52Ala	A	1.1	0.2	2	13.3		
ThrL53Ala	A	0.9	0.4	2	0.7		
CDR-L3	QQHNEYPLT						
L3	AAA	>900		2	nb		
HisL91Ala	A	>900		2	nb		
AsnL92Ala	A	3.3	0.7	2	3.3		
GluL93Ala	A	1.7	0.2	2	2.9		
TyrL94Ala	A	11.8	0.1	2	nb		
hu4D5 ^e		>900		5	nb		

a CDRとFR-3は、Kabatら(1991、上記)に定義されるものである。

b ヒトのCD11aに対するHuIgG1のEC50=0.042nM(S.D.=0.072;N=15)。

c アカゲザルのCD11aに対するHuIgG1のEC50=45.6nM(S.D.=40.4;N=16);アカゲザルノCD11aに対する全ての値は、特に断らないかぎり単一の結合アッセイに対するものである;nbはHuIgG1よりも10倍以上弱い、変異体の結合を意味する。

d 多重アラニン変異体:

- H1, SerH28Ala/TheH30Ala/HisH32Ala;
- H2, HisH52Ala/SerH53Ala/SerH55Ala;
- H2B, AspH54Ala/GluH56Ala/ArgH58Ala;
- H2A1, HisH52Ala/SerH53Ala;
- H2A2, SerH53Ala/SerH55Ala;
- H2A3, HisH52Ala/SerH55Ala;
- H3, TryrH97Ala/TyrH99Ala;
- H3B, ThrH100aAla/ThrH100bAla/TyrH100cAla;
- L1, LysL27Ala/ThrL28Ala/SerL30Ala/LysL31Ala;
- L2, SerL50Ala/SerL52Ala/ThrL53Ala;
- L3, AsnL92Ala/GluL93Ala/TyrL94Ala。

e hu4D5はヒト化した抗-p185HER2抗体であり、huMHM24抗体(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:4285(1992))と同じIgG1フレームワークを有するものである。

【0193】

重鎖においては、CDR-H2及びCDR-H3は結合に関する顕著な貢献をしている。CDR-H1のTrpH33Ala残基は大きな効果を有するが、TrpH33が一部において埋まっているはずであるためコンホメーション変化によるものであると思われる。結合について最も重要な単一残基は、CDR-H2中のAsp-H54である;この残基をアラニンに代えると、結合について147倍の減少が起きる(表IV)。CDR-

10

20

30

40

50

H2中の、結合に関する他の残基には、GluH56、GlnH61、及びLysH64(表IV)が含まれる。CDR-H3においては、TyrH97Alaにより、結合が11倍減少し、TyrH100cAlaにより結合が8倍減少した。CDR-L3のように、複数のCDR-H3残基を同時にアラニンに変化させると、結合についての、非付加的な大きな変化が起きた(変異体H3と、TyrH97Ala及びTyrH99Alaとの対比を参照されたい;表IV)。更に、ヒト化したものに含まれるFR-3のLysH73残基はまた、アラニン又はアルギニンへ変化したときには、結合について5倍の減少を示した(表IV)。

【0194】

(c) アカゲザルCD11aへ結合させるためのHuIgG1の再改変

マウスMHM24及びHuIgG1は共に、アカゲザルCD11aへの結合について約1000倍の減少を示した: HuIgG1は、アカゲザルCD11aに対して 45.6 ± 40.4 nM (N=16)であるEC50を有し、これに対し、ヒトCD11aに対してのEC50は 0.042 ± 0.072 nMである。MHM24の生物学、毒性及び有効性において、霊長類モデルは重要であるため、HuIgG1のアカゲザルCD11aに対する結合を改善することは、有益であると思われる。初期においては、アカゲザルにとっては重要であるがヒトにとってはそうではないものが変化されるようにして、MAbの超可変領域の残基でヒトCD11a及びアカゲザルのCD11aへの結合に重要であるものが決定された。従って、アラニン-スキャン変異体もまた、末梢血リンパ球上のアカゲザルのCD11aに対してアッセイにかけられた。最も重要な発見は、多重アラニン-変異体株の一つであるH2変異体が、HuIgG1よりも18倍よくアカゲザルCD11aに結合したことである(表IV)。しかしながら、H2変異体に含まれる3つの残基における個々の変異は、結合について最小の改善しか示さなかった: HisH52Ala、0.7倍改善、SerH53Ala、0.7倍改善、及びSerH55Ala、1.3倍悪化(表IV)。これら3つの残基における一連の二重変異は、HisH52Ala-SerH53Alaの組合せが最も良いことを示したが、これによってHuIgG1に比較して77倍の改善が提供される(変異体H2A1, H2A2, 及びH2A3を参照、表IV)。更に、HuIgG1におけるAspH54は、ヒトCD11aについて最も重要な結合性残基であるが、AspH54Ala及びGluH56Ala変異体はまた、HuIgG1よりも3倍の改善を示した(表IV)。

【0195】

アカゲザルのCD11aへの結合を改善するがヒトCD11aへの結合は低減しないと思われる、部位H54における単一の置換を発見するため、部位H54を種々のアミノ酸で置換した。全ての置換において、1オーダー以上の大きさにて結合性が低減されたが、一方、AspH54Asn置換によりアカゲザルの結合が10倍改善された(表V)。

【0196】

10

20

30

【表V】

表V AspH54におけるアミノ酸置換

AspH54 を下記に 変化	変異体 EC50/HuIgG1 EC50 ^a		
	ヒト	CD11a ^b	アカゲザルCD11a ^c
	平均	S.D.	
Ala	147	18	0.3
Asn	26	1	0.1
Gln	20	1	4.4
Glu	16	2	>25
Ser	>100		0.9
Arg	>250		>25
Lys	>100		3.8
His	>300		>25
Thr	>450		>25
Met	>150		>25
Leu	>300		>25

a ヒトCD11aに対するHuIgG1のEC50=0.042 nM (S. D. =0.072; N=15);
アカゲザルCD11aに対するHuIgG1のEC50=45.6 nM (S. D. =40.4;
N=16)。

b 値は二つのアッセイの平均である。

c 値は単一のアッセイの平均である。

【0197】

部位H52 - H53での変異について、非付加的効果が見られたので、これらを部位H54及びH56における種々の変化と組み合わせた(表VI)。全ての変異体に対しては、H52及びH53はアラニンであった。一つのシリーズにおいては、部位H54はAsnであり、部位H56はGlu(オリジナル)、Ala、Asn、又はGlnであった。これらの変異体のいずれも、H2A1変異体をうわまる、アカゲザルCD11aへの改善した結合を示さなかった(表VI)。別のシリーズにおいては、部位H54はAlaであり、H56はGlu(オリジナル)、Ala、Ser、又はAsnであり、再び、H2A1よりも悪かった。第三のシリーズにおいては、部位54はSerであり、部位H56はGlu(オリジナル)、Ala、Ser、又はAsnであった。これらの変異体の内の二つは、H2A1変異体と比較して改善された、アカゲザルCD11aに対する結合を示した(H2C11及びH2C12、表VI)。これら二つの変異体についてのアカゲザルCD11aのEC50は、H2C11については 0.11 ± 0.11 nM (N=9)であり、H2C12については 0.19 ± 0.08 (N=7)であった。これらの値は、ヒトCD11aに対するHuIgG1のEC50(0.042 nM)よりも3倍から5倍弱いものであるが、アカゲザルCD11aに対するHuIgG1のEC50(45.6 nM)よりも24.0倍から415倍も改善されている。H2C12は以後、RhIgG1と呼ぶ。飽和結合実験由来の見かけのKd値は、マウスMHM23がアカゲザルCD18に結合したのと同様に、RhIgG1がアカゲザルCD11aに対して結合することを示した(表III)。

【0198】

【表VI】

表VI ヒト及びアカゲザルのCD11aに対するCDR-H2の結合

変異体 IgG1	配列	Var.EC50/HuIgG1 EC50 ^a		
		ヒト CD11a	アカゲザル CD11a	
			平均	S.D.
H2C2	A	2.6	>100	
H2C3	A A A N	>100	>100	
CDR-H2	M I H P S D S E T R Y	1.0	1.00	
H2A1	A A	10.8	0.013	0.012(N=10)
H2C1	A A N	>100	0.56	0.01
H2C4	A A N A	>100	0.38	0.06
H2C5	A A N N	46	0.11	0.02
H2C6	A A N Q	>100	0.21	0.01
H2C8	A A A	12.7	0.38	
H2C7	A A A A	2.4	1.03	0.05
H2C10	A A A S	14.2	0.22	0.03
H2C9	A A A N	34.3	0.22	0.04
H2C13	A A S		0.10	0.06
H2C14	A A S A		0.021	0.013
H2C12	A A S S		0.004	0.001 (N=7)
H2C11	A A S N	24.9	0.002	0.001(N=9)

a ヒトCD11aに対するHuIgG1のEC50=0.042nM(S.D.=0.072,N=15);
アカゲザルCD11aに対するHuIgG1のEC50=45.6nM(S.D.=40.4;N=16);
アカゲザルCD11aについての全ての値は、注記した場合を除いて、二つの独立した結合アッセイの平均値である。

【0199】

HuIgG1-ヒトCD11aの相互作用については、AspH54が最も重要な残基であった(表IV);この残基を他のアミノ酸に代えると、顕著に結合性を低減したが、そのなかでは、Glu、Asn、及びGlnへ代えるものが最も減少が低かった。しかしながら、HuIgG1-アカゲザルCD11aの相互作用の場合には、AspH54は、この残基をAlaやAsnに代えると結合が改善されるので有害であった(表V)。ヒト及びアカゲザルのCD11aの結合の間の差異を理解するため、後者をアカゲザルPBLライブラリーよりクローン化した。図2は、アカゲザルCD11aI-領域は、ヒトCD11aI-領域とは、4つの部位:133、189、197、308のみにおいて異なっていることを示している。以前、MHM24のヒトCD11aエピトープが、残基197-203にマッピングされたが(Champeら、J.Biol.Chem.270:1388-1394(1995))、これにはアカゲザルにおける、ヒトLys197からアカゲザルGlu197への変化が含まれている。

【0200】

(d) ケラチノサイト細胞付着アッセイ

マウスMHM24、キメラIgG1及びHuIgG1を、ジャーカット細胞(LFA-1を発現するヒトT-細胞)の、ICAM-1を発現する正常なヒト上皮ケラチノサイトへの付着を阻止する能力について比較した。3つの抗体全ては、同様のIC50で同様に振る舞った(図3)(表VII)。

【0201】

【表VII】

表VII MHM24変異体による細胞付着の阻止

mAb	IC50 値 (nM)			
	ジャーカット:HuK ^a	RhLy ^b :HuK 平均 S.D. N	RhLy:HuICAM ^c 平均 S.D. N	Rh/HuCD11a ^d :HuK 平均 S.D. N
murMHM24	0.09			
HuIgG1	0.13			
chIgG1	0.10			
RhIgG1		119 86 4	5.3 4.5 3	4.9 0.2 2
MHM23		1.6 1.5 3	1.2	1.4 0.1 2

a HuK=正常なヒト上皮ケラチノサイト

b RhLy=アカゲザルリンパ球

c HuICAM=組換えのヒトICAM-1 d Rh/HuCD11a=アカゲザルI-領域を有するヒトCD11aをヒト293細胞へ形質移入したもの

【0202】

マウス及びヒト化したMHM24のいずれも、アカゲザルとカニクイザルのリンパ球がヒトケラチノサイトに付着するのを阻止しなかった。ヒトケラチノサイトに対するアカゲザルリンパ球の付着を阻止することにおいて、RhIgG1をマウスの抗-ヒトCD18抗体MHM23(Hildrethら、Eur. J. Immunol. 13:202-208(1983); Hildrethら、J. Immunol. 134:3272-3280(1985))と比較すると、RhIgG1はMHM23よりも74倍、効果が低い(図4A、表VII)。しかしながら、組換えのヒトICAM-1を(ヒトケラチノサイトの代わりに)プレートにコートすると、RhIgG1はMHM23よりも4倍効果が低いのみであった(図4B、表VII)。I-領域がアカゲザルに変異したヒトCD11a(Val133Ile、Arg189Gln、Lys197Glu、Val308Ala)を具備するキメラCD11aを、ヒト胎児性腎臓293細胞内へ形質移入した。これらのRh/HuCD11a-293細胞についての、ヒトケラチノサイトへの付着を阻止することにおいて、RhIgG1は再び、MHM23よりも4倍低かった(図4C、表VII)。

【0203】

RhIgG1に対する、対照のアイソタイプ抗体(ヒト化抗-p185HER2抗体; Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285(1992))、及びMHM23(マウスMAb354、マウスIgG1抗-ハムスターtpA)は、ヒトケラチノサイトに対するアカゲザルリンパ球の結合も、ヒトケラチノサイトに対する組換えICAM-1(図4A、4B)、やRh/HuCD11a(図4C)の結合も阻止することはなかった。これは、アカゲザルリンパ球:ヒトケラチノサイトアッセイにお

10

20

30

40

50

けるマウスMHM23と比較した場合の、R I g G 1の低減した成績は、(MHM23のマウスFcと比較したときの)H u I g G 1のヒトFcのアカゲザルリンパ球との予期せぬ相互作用によるものではないことを示唆しているが、これはアカゲザルCD11aへの結合が可能なR h I g G 1の濃度を低減させるかもしれない。組換体のヒトI C A M - 1のデータは、R h I g G 1はアカゲザルリンパ球に結合していて、マウスMHM23とほとんど同様に付着を阻止していることを示している(図4B、表V I I)。R h / H u C D 1 1 a - 2 9 3のデータ(図4C、表V I I)は、R h I g G 1が、ヒトケラチノサイト上の標的には結合しておらず(H u I g G 1と比較した場合)、これはアカゲザルCD11aへ結合することが可能なR h I g G 1の濃度を低減させるかもしれない。更に、アカゲザルI g G 1に対するR h I g G 1のKd(a p p)は、1mg/mlのヒトI g G 1有(アカゲザルドナー3)の場合、無し(アカゲザルドナー1)の場合と同様であった(表I I I)。これは、R h I g G 1の結合が、アカゲザルCD11aに特異的であることを示している。

【0204】

(e) 混合リンパ球応答アッセイ

MLRにおいては、H u I g G 1はマウスMHM24よりも2倍弱いI C 5 0値を示した(表V I I I、図5)。

【0205】

【表V I I I】

表V I I I 混合リンパ球応答アッセイの結果

mAb ^a	IC50 値 (nM)		
	平均	S.D.	N
murMHM24	0.19	0.06	3
HuIgG1	0.38	0.14	4
mAb 25.3	3.8	1.0	2
RhIgG1	23.4	11.4	2
MHM23	30.4	24.0	3

a murMHM24、HuIgG1、及びmAb25.3はヒトMLRで試験した；RhIgG1及びMHM23は、アカゲザルMLRで試験した。

【0206】

マウスの及びヒト化したMAbsは、MAb25.3よりも10倍から20倍、うまくいったが、MAb25.3は以前に*in vivo*で試験されている(Fisherら、Blood77:249-256(1991)；Stoppaら、Transplant Intl.4:3-7(1991)；Hourmantら、Transplantation、58:377-380(1994))。アカゲザル-結合性変異体のRhIgG1は、マウスMHM23よりも若干だけよいIC50を示した(表V I I I)。異なる応答者：刺激者の血液提供者を、独立したアッセイにおいて使用したが、結果は顕著には異ならなかった。アカゲザルCD11aに対するRhIgG1のKdは、ヒトCD11aに対するHuIgG1のKdよりも26倍低く(表I I I)、これはMLRアッセイに由来するIC50値に反映されている(表V I I I)。

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1A】図1Aは、ネズミMHM24軽鎖(配列番号：1)、ヒト化MHM24 F(ab)

8 軽鎖(配列番号: 2)、サブグループ軽鎖 I (hum I) のヒトコンセンサス配列(配列番号: 3) のアミノ酸配列を示した。

【図 1 B】図 1 B は、ネズミ M H M 2 4 重鎖(配列番号: 4)、ヒト化 M H M 2 4 F (ab) 8 重鎖(配列番号: 5)、重鎖サブグループ III (hum III) のヒトコンセンサス配列(配列番号: 6) 及び実施例の「アカゲザル化」抗体変異体重鎖(配列番号: 2 4) のアミノ酸配列を示した。図 1 A と 1 B において、配列超可変性に基づいた超可変性領域(Kabat ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) は、ブラケット内に納められ、且つ F (ab) 抗原複合体の構造に基づく超可変ループ(Chothia ら、Nature 342:8767(1989)) は、イタリックとした。残基の番号付けは、a, b, 及び c で示した挿入物によって、Kabat らに従う。

10

【図 2】図 2 は、ヒト C D 1 1 a I -ドメイン(配列番号: 7) 及びアカゲザル C D 1 1 a I ドメイン(配列番号: 8) の配列を示した。鎖とヘリックスは、下線を付し、且つ Qu ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 92:10277-10281(1995) に従い標識される。該アカゲザル I ドメイン配列(r h C D 1 1 a) は、ヒト I ドメインと 4 つの相違のみであることを示した。M H M 2 4 M A b (配列番号: 9) のための結合エピトープは、肉太字で示した(Champe ら、J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995))。

【図 3】図 3 は、ネズミ M H M 2 4 (詰まった円)、キメラ M H M 2 5 (開放三角)、ヒト化 M H M 2 4 (HuIgG1) (詰まった四角)、及びヒト I g G 1 アイソタイプコントロール(+) による通常のヒトケラチノサイトへのヒトジャーカット T 細胞の抑制を表す。パーセント結合は、標識化ジャーカット細胞の蛍光により測定した。

20

【図 4 A】図 4 A は、通常のヒトケラチノサイトに対するアカゲザルリンパ球の結合の抑制を示した。アカゲザル結合 M H M 2 4 (RhIgG1) (詰まった四角)、抗 C D 1 8 M H M 2 3 (詰まった円)、ヒト I g G 1 アイソタイプコントロール(+) による抑制。

【図 4 B】図 4 B は、プレート上に被覆した組換えヒト I C A M 1 に対するアカゲザルリンパ球の結合の抑制を示した。アカゲザル結合 M H M 2 4 (RhIgG1) (詰まった四角)、抗 C D 1 8 M H M 2 3 (詰まった円) 及びネズミ I g G 1 アイソタイプコントロール(+) による抑制。

【図 4 C】図 4 C は、通常のヒトケラチノサイトに対するアカゲザル/ヒト C D 1 1 a キメラ-移入化 2 9 3 細胞の結合の抑制を示した。アカゲザル結合 M H M 2 4 (RhIgG1) (詰まった四角)、抗 C D 1 8 M H M 2 3 (詰まった円)、ヒト I g G 1 アイソタイプコントロール(+) による抑制。

30

【図 5】図 5 は、ヒトリンパ球反応アッセイ(M L R) が、ネズミ M H M 2 4 (詰まった円)、ヒト化 M H M 2 4 (HuIgG1) (詰まった四角)、及びヒト化アイソタイプ I g G コントロール(詰まったダイヤモンド) によってブロック化されることを示した。パーセント刺激インデックス(% S I) は、M A b 不在での最大応答に対し与えられた M A b 濃度での応答の比である。データは、少なくとも 2 つの異なる刺激/応答対を用いる複数アッセイの実例である。

【 図 1 A 】

```

MHM24      1      10      20      30      40
            DVQITQSPSYLAASPGETISINC(RASKTISKYLA)WYQEKFGKTNKLLIY
F(ab)-8    DIQMTQSPSSLSASVGRVITTC(RASKTISKYLA)WYQKPGKAPKLLIY
            .....
humkI      DIQMTQSPSSLSASVGRVITTC(RASQSISNYLA)WYQKPGKAPKLLIY

MHM24      60      70      80      90
            (SGSTLQS)GIPSRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAMYYC(QQHNEYPLT)
F(ab)-8    (SGSTLQS)GVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYC(QQHNEYPLT)
            .....
humkI      (AASSLES)GVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYC(QQYNSLPWT)

MHM24      100
            FGQGTKLELKR
F(ab)-8    FGQGTKVEIKR
humkI      FGQGTKVEIKR

```

【 図 1 B 】

```

MHM24      1      10      20      30      40
            EVQLQQPQAGELMRPGASVKLSCKASGYSTP(GHWMN)WVRQAPGKGLEWIG
F(ab)-8    EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTP(GHWMN)WVRQAPGKGLEWVG
            .....
humIII     EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTP(SYAMS)WVRQAPGKGLEWVS
RhIgG1     EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTP(GHWMN)WVRQAPGKGLEWVG

MHM24      50 a      60      70      80 abc      90
            (MIHPDSESTRYNQKFKD)KATLTVDRSSSSAYQLSPSTSEDSAVYYCAR
F(ab)-8    (MIHPDSESTRYNQKFKD)RFTISVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR
            .....
humIII     (VISGDSGGTYADSVKVG)RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR
RhIgG1     (MIAFASSESTRYNQKFKD)RFTISVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR

MHM24      100      110
            (GIYFYGTTYFDY)WGQGTLLTVSS
F(ab)-8    (GIYFYGTTYFDY)WGQGTLLTVSS
            .....
humIII     (G-----FDY)WGQGTLLTVSS
RhIgG1     (GIYFYGTTYFDY)WGQGTLLTVSS

```

【 図 2 】

```

130      140      150      160      170
humCD11a  KGRVLDLVELEDGSMISLQPEDEOKILDEMKDVMKLLSNTSYQFAAVQF
rhCD11a   I          α1          β2

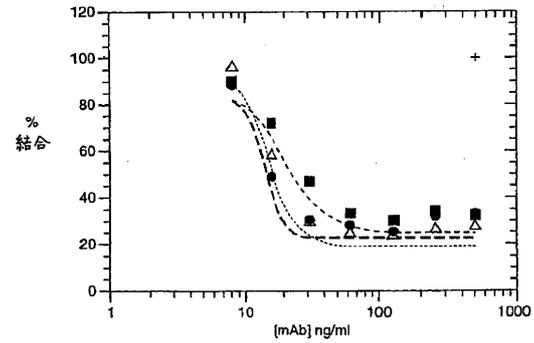
180      190      200      210
humCD11a  STSYKTEFDESDYVKKRQKDFDALLKRVKEMLLLTNTEGAINYVATEV
rhCD11a   Q          E          β2' α2 α3 α4

230      240      250      260
humCD11a  FREELGARPDAKVLILLDGEATDSGNIDAAKDLIRYIIGIKHFQ
rhCD11a   β3          α5          β4

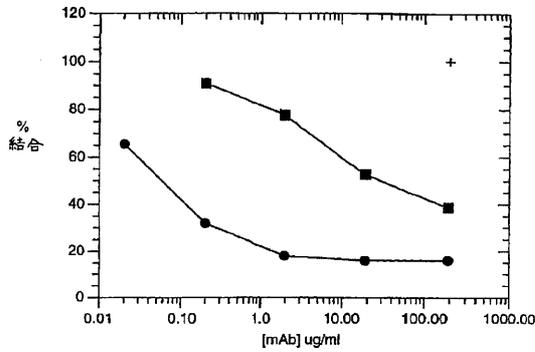
270      280      290      300      310
humCD11a  TRESQETLHKEASKKASEFVKILDTEFKLKDLETELOKKIYVIE
rhCD11a   α6          β5          α7 A

```

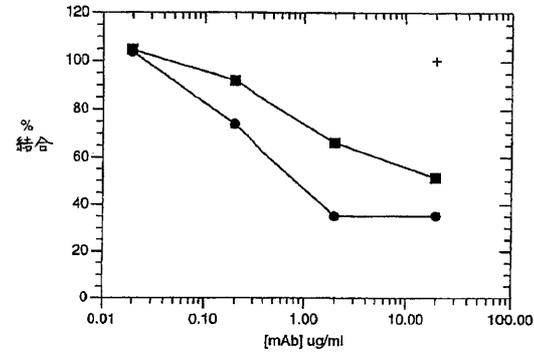
【 図 3 】



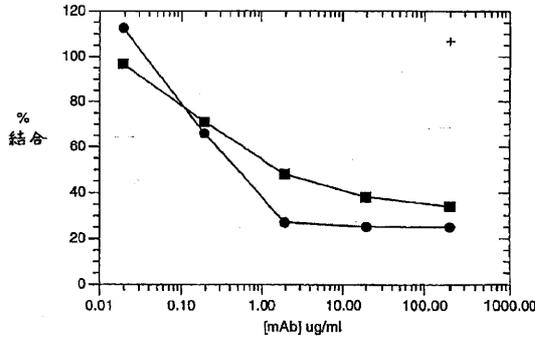
【 図 4 A 】



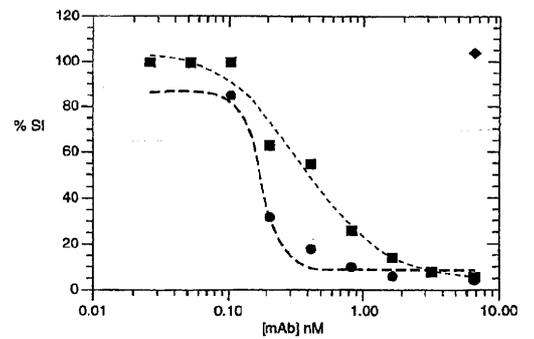
【 図 4 C 】



【 図 4 B 】



【 図 5 】



【配列表】

0004309383000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 29/00 (2006.01) A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/06 (2006.01) A 6 1 P 37/06

(72)発明者 ボーラ・エム・ジャルデュー
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 1 0 9・サン・フランシスコ・# 1 0 4・パシフィック・
 アベニュー・8 9 6

(72)発明者 レオナルド・ジー・プレスタ
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 1 0 9・サン・フランシスコ・# 2 0 6・ゴーフ・ストリ
 ート・1 9 0 0

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 HILDRETH,J.E. et al, A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated l
 ympholysis, Eur J Immunol, 1 9 8 3年, Vol.13, No.3, p.202-8
 Edwards CP,, Identification of amino acids in the CD11a I-domain important for binding
 of the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) to intercellular adhesion mole
 cule-1 (ICAM-1), J Biol Chem, 1 9 9 5年, Vol.270, No.21, p.12635-40

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 9 9 / 0 0

专利名称(译)	人源化抗CD11a抗体		
公开(公告)号	JP4309383B2	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	JP2005224609	申请日	2005-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ポーラエムジャルデュー レオナルドジープレスタ		
发明人	ポーラ・エム・ジャルデュー レオナルド・ジー・プレスタ		
IPC分类号	A61K39/395 A61P1/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/00 A61P29/00 A61P37/06 G01N33/53 A61K38/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 C07K16/2845 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2319/00 C12N2799/022		
FI分类号	A61K39/395.ZNAG A61P1/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/00 A61P29/00 A61P37/06 A61K39/395.N A61K39/395.DZN.A A61K39/395.GZN.A A61P1/04 A61P17/06 A61P25/00.101 A61P29/00.101 C07K16/28 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA46 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	08/757205 1996-11-27 US		
其他公开文献	JP2006036779A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供人源化抗CD11a抗体的各种用途。 解决方案：本发明是人源化抗CD11a抗体，其特异性结合人CD11aI结构域并防止Jurkat细胞与表达ICAM-1的正常人表皮角质形成细胞粘附至约1nM本发明涉及人源化抗CD11a抗体，其在混合淋巴细胞应答测定中可具有IC 50 (nM) 值和/或IC50 (nM) 值高达约1nM，以及该人源化抗CD11a抗体的各种用途。 [所选图]无

最初の残基	典型的な置換体	好適な置換体
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	gln	gln
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu