(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2014-193164
(P2014-193164A)
(43)公開日　平成26年10月9日(2014.10.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C084
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 130 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-92573(P2014-92573)
(22)出願日　平成26年4月28日(2014.4.28)
(62)分割の表示　特願2010-547002(P2010-547002)の分割
原出願日　平成21年2月19日(2009.2.19)
(31)優先権主張番号　61/066,539
(32)優先日　平成20年2月20日(2008.2.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　509050328
ジーツー　インフラメイション　プロプライエタリー　リミテッド
オーストラリア国　ニュー　サウス　ウェールズ　２０１０，ダーリングハースト，３８４　ヴィクトリア　ストリート　レベル　１０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ヒトにおける診断方法および／または治療方法に適したヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の提供。
【解決手段】特定のアミノ酸配列の１つまたは複数と少なくとも９３％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン軽鎖、ならびに／またはｉｉ）特定のアミノ酸配列の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン重鎖を含み、ヒトＣ５ａＲに結合する、実質的に精製された、かつ／または組換えのヒト化抗体、該抗体と結合している治療薬を含むコンジュゲート、該コンジュゲートをコードするポリヌクレオチド、該ヌクレオチドヒトを含むベクター、及び該ベクターを含む宿主細胞。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３および配列番号４８の１つまたは複数と少なくとも９３％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン軽鎖、ならびに／または
ｉｉ）配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６および配列番号３９の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン重鎖を含み、ヒトＣ５ａＲに結合する、実質的に精製された、かつ／または組換えのヒト化抗体。
【請求項２】
免疫グロブリン重鎖が、配列番号３４、配列番号３５および配列番号３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１に記載のヒト化抗体。
【請求項３】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３１、配列番号３２および配列番号３３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１または請求項２に記載のヒト化抗体。
【請求項４】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項５】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項６】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３２として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項７】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項８】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３５として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項９】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３２として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３５として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１０】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３５として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１１】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３２として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１２】
免疫グロブリン軽鎖が、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含

み、免疫グロブリン重鎖が、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１３】
ｉ）免疫グロブリン軽鎖が、配列番号４０および配列番号４１の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、
ｉｉ）免疫グロブリン重鎖が、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４および配列番号４５の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む定常領域を含む、
請求項１から１２のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１４】
２本の重鎖および２本の軽鎖からなる４ポリペプチド鎖構造、単鎖抗体、ダイアボディ、トリアボディまたはテトラボディである、請求項１から１３のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１５】
ヒトＣ５ａＲに結合する抗体フラグメントである、請求項１から１４のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
【請求項１６】
前記フラグメントが、Ｆａｂフラグメントまたは単一ドメイン抗体である、請求項１５に記載のヒト化抗体。
【請求項１７】
配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３および配列番号４８の１つまたは複数と少なくとも９３％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、実質的に精製された、かつ／または組換えの免疫グロブリン軽鎖。
【請求項１８】
配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６および配列番号３９の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、実質的に精製された、かつ／または組換えの免疫グロブリン重鎖。
【請求項１９】
請求項１７に記載の免疫グロブリン軽鎖および／または請求項１８に記載の免疫グロブリン重鎖を含み、ヒトＣ５ａＲに結合する、実質的に精製された、かつ／または組換えの抗体。
【請求項２０】
請求項１から１６または１９のいずれか一項に記載の抗体および前記抗体に直接的または間接的に結合している治療薬を含むコンジュゲート。
【請求項２１】
治療薬が、細胞毒、放射性同位体、免疫調節薬、抗血管新生薬、毒素、抗増殖薬、アポトーシス促進剤、化学療法剤および治療用核酸からなる群から選択される、請求項２０に記載のコンジュゲート。
【請求項２２】
毒素が緑膿菌外毒素またはその誘導体である、請求項２１に記載のコンジュゲート。
【請求項２３】
治療薬が、リンカーを介して抗体に間接的に結合している、請求項２０から２２のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２４】
リンカーが、４－（４’アセチルフェノキシ）ブタン酸（ＡｃＢｕｔ）、３－アセチルフェニル酸性酸（ＡｃＰａｃ）、４－メルカプト－４－メチル－ペンタン酸（アミド）およびその誘導体からなる群から選択される、請求項２３に記載のコンジュゲート。
【請求項２５】
請求項１から１６または１９のいずれか一項に記載の抗体および前記抗体に直接的または間接的に結合している検出可能な標識を含むコンジュゲート。

【請求項２６】
前記標識が、放射標識、蛍光標識、酵素標識および造影剤からなる群から選択される、請求項２５に記載のコンジュゲート。
【請求項２７】
請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体もしくはその鎖、請求項１７に記載の免疫グロブリン軽鎖、請求項１８に記載の免疫グロブリン重鎖、ならびに／または請求項２０から２３、２５もしくは２６のいずれか一項に記載のコンジュゲートをコードする単離および／もしくは外因性ポリヌクレオチド。
【請求項２８】
請求項２７に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項２９】
請求項２７に記載のポリヌクレオチドおよび／または請求項２８に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項３０】
請求項２９に記載の細胞を含む非ヒトトランスジェニック生物。
【請求項３１】
請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体、請求項１７に記載の免疫グロブリン軽鎖、請求項１８に記載の免疫グロブリン重鎖、請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項２７に記載のポリヌクレオチド、請求項２８に記載のベクターおよび／または請求項２９に記載の宿主細胞ならびに担体を含む組成物。
【請求項３２】
抗体を産生するプロセスであって、ポリヌクレオチドが発現され、抗体が産生されるように、請求項２９に記載の宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞が、請求項２７に記載の少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むプロセス。
【請求項３３】
免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖が、一続きのポリヌクレオチドにある２つの別個のオープンリーディングフレームによってコードされる、請求項３２に記載のプロセス。
【請求項３４】
宿主細胞培養物から抗体を回収することをさらに含む、請求項３２または請求項３３に記載のプロセス。
【請求項３５】
ヒトＣ５ａＲとそのリガンドとの相互作用を阻害するための方法であって、細胞を、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体または請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲートに曝露することを含む方法。
【請求項３６】
細胞におけるヒトＣ５ａＲ活性を阻害するための方法であって、細胞を、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体または請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲートに曝露することを含む方法。
【請求項３７】
対象において障害を治療または予防する方法であって、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体、請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項２７に記載のポリヌクレオチド、請求項２８に記載のベクター、請求項２９に記載の宿主細胞および／または請求項３１に記載の組成物を対象に投与することを含む方法。
【請求項３８】
障害が免疫病理学的障害である、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
免疫病理学的障害が自己免疫疾患である、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】

障害が炎症性疾患である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
炎症性疾患が急性炎症または慢性炎症である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
免疫病理学的障害または炎症性疾患に白血球遊走および／または白血球活性化が関与する、請求項３９から４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
免疫病理学的障害または炎症性疾患に補体活性化が関与する、請求項３９から４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
対象において治療薬を炎症部位に送達するための方法であって、請求項２０から２４のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはそれをコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む方法。
【請求項４５】
遺伝物質を、Ｃ５ａＲを提示する細胞に導入するための方法であって、前記細胞を、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体または請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲートと接触させることを含み、抗体またはコンジュゲートが遺伝物質に結合している、またはそれと会合している方法。
【請求項４６】
試料中のヒトＣ５ａＲの存在または非存在を検出する方法であって、試料を、請求項１から１６または１９のいずれか一項に記載の抗体および／または請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲートと接触させること、ならびに試料をヒトＣ５ａＲと抗体またはコンジュゲートとの結合について分析することを含む方法。
【請求項４７】
対象において障害を診断するための方法であって、対象またはそれから得られた試料を、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体または請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲートと接触させること、および対象または試料をヒトＣ５ａＲと抗体またはコンジュゲートとの結合について分析することを含む方法。
【請求項４８】
対象から得られた組織標本または組織もしくは体液の亜分画を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
障害が免疫病理学的障害である、請求項４７または請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
対象において障害を治療または予防するための医薬品としての、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体、請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項２７に記載のポリヌクレオチド、請求項２８に記載のベクター、請求項２９に記載の宿主細胞および／または請求項３１に記載の組成物の使用。
【請求項５１】
対象において治療薬を炎症部位に送達するための医薬品を製造するための、請求項２０から２４のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはそれをコードするポリヌクレオチドの使用。
【請求項５２】
対象において障害を治療または予防するための医薬品としての、請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体、請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項２７に記載のポリヌクレオチド、請求項２８に記載のベクター、請求項２９に記載の宿主細胞および／または請求項３１に記載の組成物の使用。
【請求項５３】
対象において治療薬を炎症部位に送達するための医薬品としての、請求項２０から２４のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたはそれをコードするポリヌクレオチドの使用

。

【請求項５４】

請求項１から１６もしくは１９のいずれか一項に記載の抗体、請求項２０から２６のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項２７に記載のポリヌクレオチド、請求項２８に記載のベクター、請求項２９に記載の宿主細胞および／または請求項３１に記載の組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ヒトＣ５ａ受容体に結合するヒト化抗体ならびに治療薬および診断薬としてのその使用を対象とする。本発明はさらに、前記ヒト化抗体をコードする核酸配列および組換え宿主細胞におけるその発現を対象とする。特に、本発明は、ヒトＣ５ａ受容体に特異的に結合するマウス抗体７Ｆ３に由来するヒト化抗体を対象とする。

【背景技術】

【０００２】

補体タンパク質Ｃ３～Ｃ５はそれぞれタンパク質分解されると、アナフィラトキシンと呼ばれるシグナル伝達分子を有するアミノ末端カチオン性断片が生じる。これらの中で最も強力であるＣ５ａは、最も広範な応答を誘発する。白血球の辺縁趨向および浸潤、顆粒結合性タンパク質分解酵素の放出、活性化酸素および窒素由来ラジカルの生成、血流および毛細管漏出の変化、ならびに平滑筋の収縮能力などの炎症反応の要素を考慮すると、Ｃ５ａ分子は「完全な」前炎症性メディエータである。ナノモル以下からナノモルのレベルでは、Ｃ５ａ分子は、すべての骨髄細胞系列（好中球、好酸球および好塩基球、マクロファージおよび単球）の走化性を誘発し、プロスタグランジンによって著しく増強される血管透過性および白血球循環を引き起こす。より高いナノモル濃度では、脱顆粒およびＮＡＤＰＨオキシダーゼの活性化が誘発される。生物活性のこの幅は、他の炎症性メディエータとは対照的である。Ｃ５ａは、関節リウマチ、乾癬、敗血症、再潅流傷害および成人呼吸窮迫症候群を含めた様々な発病に関与するとされている（ＧｅｒａｒｄおよびＧｅｒａｒｄ、１９９４；ＭｕｒｄｏｃｈおよびＦｉｎｎ、２０００）。

【０００３】

Ｃ５ａの活性は、Ｃ５ａがその受容体（Ｃ５ａＲ）に結合することによって媒介される。Ｃ５ａＲは、７回膜貫通型Ｇタンパク質共役受容体のファミリーに属する。Ｃ５ａＲは、約１ｎＭのＫｄを有する、Ｃ５ａの高アフィニティー受容体であり、白血球を含めたいくつもの様々な細胞型に位置する。細胞当たりの受容体数は極めて多く、白血球当たり最大２００，０００部位である。受容体の生物学的活性化は、結合が飽和する範囲を上回った場合に起こる。

【０００４】

Ｃ５ａＲ構造は、７回膜貫通型の受容体ファミリーに従い、細胞外Ｎ末端を有し、その後に細胞内ループおよび細胞外ループとして交互に並ぶヘリックス間ドメインでつながれた７回膜貫通ヘリックスが続き、細胞内Ｃ末端ドメインで終結する。Ｃ５ａＲは、伸長したＮ末端細胞外ドメインを含む。この大きなＮ末端ドメインは、ＩＬ－８およびｆＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅ（ＦＭＬＰ）受容体ファミリーを含めた、ペプチドと結合するＧタンパク質共役受容体に典型的である。

【０００５】

ＣＲアンタゴニストによってＣ５ａ応答が阻害されると、他の補体成分に影響を及ぼすことなくＣ５ａを介して媒介される急性炎症反応が低減する。この目的のために、Ｃ５ａＲペプチドアンタゴニストおよび抗Ｃ５ａ受容体抗体が以前に報告されている（Ｗａｔａｎａｂｅら、１９９５；Ｐｅｌｌａｓら、１９９８；Ｋｏｎｔｅａｔｉｓら、１９９４；Ｋａｎｅｋｏら、１９９５；Ｍｏｒｇａｎら、１９９３）。例えば、ＷＯ９５／００１６４には、Ｃ５ａＲのＮ末端ペプチド（残基９～２９）に対する抗体が記載されている。

【０００６】
　また、ＷＯ０３／０６２２７８にはＣ５ａＲに対する抗体が記載されている。こうしたマウス抗体のうち３つは、７Ｆ３、６Ｃ１２および１２Ｄ４と呼んだ。こうした抗体は、Ｃ５ａとその受容体の結合を遮断し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＣ５ａによって誘導される好中球の遊走を停止し、動物モデルにおける炎症を抑える点で極めて有効であることなど、優れた特性を有することが示された。慢性疾患を制御するためには、この抗体を数カ月または数年にわたり継続的に投与することが必要である可能性がある。しかし、マウス抗体を投与することの１つの欠点は、ヒト免疫系が、マウス抗体に対してそれ自体の抗体を生成し得ること（ＨＡＭＡ応答）である。ＨＡＭＡ応答は、血液からマウス抗体を迅速に除去することによってマウス抗体を中和する可能性があり、したがってマウス抗体のその標的への結合が阻止される。
【０００７】
　ＨＡＭＡ応答の発生を回避するために、採用されている１つの戦略は、非エピトープ結合領域中の多くの「外来性」残基をヒト配列で置き換えることにより、マウス抗体を「ヒト化」することである。しかし、このプロセスは抗原性の喪失をもたらすことが多い。さらに、抗体をヒト化する技術分野の研究者らは、ヒトの療法において使用するためのすべての必要要件を有するヒト化抗体を確実に産生するための適切なガイドラインを特徴付けることに取り組んだ。
【０００８】
　ヒト化手順の主要な問題は、抗原に対するアフィニティーの喪失であり（Ｊｏｎｅｓら、１９８６）、ある例では、抗原がタンパク質である場合は特に１０分の１以下である（Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、１９８８）。当然、いかなるアフィニティーの喪失も極めて望ましくない。少なくとも、それは、いっそう多くのヒト化抗体を患者に注射しなければならず、費用がさらにかかり、有害作用のリスクが高まることを意味する。さらに重要なことには、アフィニティーが低減された抗体は、補体溶解、抗体依存性細胞傷害またはウイルス中和などの生物学的機能に劣る可能性がある。したがって、ヒト化に基づく治療用途または診断用途に有用である決定的な抗体の構造は現在予測できず、有用なヒト化抗体を得るためには、何回かの反復といくつかの技法の使用が必要とされることが多い。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
　診断方法および／または治療方法に使用することができる、代替および／または改良のＣ５ａＲアンタゴニストが必要とされている。特に、ヒトにおける前記診断方法および／または治療方法に適したヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の開発が必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
　Ｃ５ａＲに結合するが、劣った結合特異性および／または他の望ましくない特徴を有する多数のヒト化抗体が作製されている。しかし、本発明者らは、ヒトにおける診断方法および／または治療方法に使用するのに適した活性を有する関連のヒト化抗体をいくつか作製した。
【００１１】
　第１の態様において、本発明は、
　ｉ）配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３および配列番号４８の１つまたは複数と少なくとも９３％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン軽鎖、および／または
　ｉｉ）配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６および配列番号３９の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン重鎖を含み、ヒトＣ５ａＲに結合する、実質的に精製された、かつ／または組換えのヒト化抗体を提供する。
【００１２】

好ましい実施形態において、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３４、配列番号３５および配列番号３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。より好ましくは、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。

【００１３】

別の好ましい実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３１、配列番号３２および配列番号３３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。より好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。

【００１４】

特に好ましい実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４または配列番号４５として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。より好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４３または配列番号４５、より好ましくは配列番号４５として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００１５】

一実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４２または配列番号４３として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００１６】

別の実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３２として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４２または配列番号４３として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００１７】

さらなる実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４２、配列番号４３または配列番号４４として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００１８】

別の実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３４として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４または配列番号４５として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００１９】

別の実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３１として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３５として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４３として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００２０】
さらなる実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３５として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４３として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。
【００２１】
別の実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３２として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４３として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。
【００２２】
さらなる実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３３として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３６として示されるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。好ましくは、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、免疫グロブリン重鎖は、配列番号４３として示されるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。
【００２３】
好ましい実施形態において、抗体は、ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループにあるエピトープＥＥＹＦＰＰ（配列番号３８）に結合する。さらなる実施形態において、抗体は、ヒトＣ５ａＲのＮ末端にあるエピトープＰＤＹＧＨＹＤＤＫＤＴＬＤＬＮＴＰＶＤＫＴ（配列番号５９）に検出可能に結合しない。
【００２４】
好ましい実施形態において、抗体は、ヒトＣ５ａＲに７Ｆ３の少なくとも８倍以内、より好ましくは７Ｆ３の少なくとも４倍以内、さらに好ましくは７Ｆ３の少なくとも３倍以内のアフィニティーで結合する。
【００２５】
好ましい実施形態において、本発明の抗体は、ヒトＣ５ａＲを発現するヒト好中球に対して４．５ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$を有する。代替の実施形態において、本発明の抗体は、３ｎＭ未満、２ｎＭ未満または１ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$を有する。Ｃ５ａＲを発現するヒト好中球に対する抗体のＥＣ$_{50}$は、実施例３に記載のとおり決定することができる。
【００２６】
別の実施形態において、本発明の抗体は、ヒト好中球遊走を少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、さらに好ましくは少なくとも８０％低減することができる。さらなる実施形態において、本発明の抗体は、Ｃ５ａＲによって誘発されるヒト好中球遊走を遮断する能力が７Ｆ３よりも高い、好ましくは７Ｆ３の少なくとも２倍、さらに好ましくは７Ｆ３の５倍である。ヒト好中球遊走の低減は、実施例５に記載のとおり決定することができる。
【００２７】
さらなる実施形態において、本発明の抗体は、ヒト好中球を検出可能に活性化しない。好中球活性化は、実施例７に記載のとおり、ＣＤ６２ＬおよびＣＤ１１ｂの発現および／またはスーパーオキシド産生を分析するによって決定することができる。
【００２８】
さらに別の実施形態において、本発明の抗体は、ｅｘ　ｖｉｖｏで血液から好中球または単球を検出可能に枯渇させない。ｅｘ　ｖｉｖｏでの好中球または単球の枯渇は、実施例８および９に記載のとおり決定することができる。
【００２９】
さらなる実施形態において、本発明の抗体は、抗体濃度３０μｇ／ｍｌ未満、より好ましくは１０μｇ／ｍｌ未満、より好ましくは５μｇ／ｍｌ未満、より好ましくは１μｇ／

ｍｌ未満で、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球中へのＣａ$^{2+}$流入を遮断することができる。Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球中へのＣａ$^{2+}$流入の遮断は、実施例６に記載のとおり決定することができる。

【００３０】

一例を挙げると、本発明の抗体は、非枯渇型（non-depleting）および非活性化型（non-activating）である。本明細書に記載のこのような抗体の例は、ｈＡｂ－Ｑである。代替の実施形態において、本発明の抗体は、枯渇型（depleting）および非活性化型である。本明細書に記載のこのような抗体の例は、ｈＡｂ－Ｎである。

【００３１】

好ましい実施形態において、

ｉ）免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４０および配列番号４１の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、

ｉｉ）免疫グロブリン重鎖が、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４および配列番号４５の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。より好ましくは、

ｉ）免疫グロブリン軽鎖は、配列番号４１と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む定常領域を含み、

ｉｉ）免疫グロブリン重鎖は、配列番号４５と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む定常領域を含む。

【００３２】

ヒト化抗体は、当技術分野で知られている任意の適当な構造を有することができる。例としては、それだけに限らないが、２本の重鎖および２本の軽鎖からなる４ポリペプチド鎖構造、単鎖抗体、ダイアボディ（diabody）、トリアボディ(triabody)またはテトラボディ(tetrabody)、ならびに抗体フラグメント、例えば、それだけに限らないが、Ｆａｂフラグメントまたは単一ドメイン抗体が挙げられる。

【００３３】

別の態様において、本発明は、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３および配列番号４８の１つまたは複数と少なくとも９３％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、実質的に精製された、かつ／または組換えの免疫グロブリン軽鎖を提供する。

【００３４】

好ましい実施形態において、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号３１と少なくとも９３％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。

【００３５】

さらなる態様において、本発明は、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６および配列番号３９の１つまたは複数と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む、実質的に精製された、かつ／または組換えの免疫グロブリン重鎖を提供する。

【００３６】

好ましい実施形態において、免疫グロブリン重鎖は、配列番号３６と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む可変領域を含む。

【００３７】

別の態様において、本発明は、本発明の免疫グロブリン軽鎖および／または本発明の免疫グロブリン重鎖を含み、ヒトＣ５ａＲに結合する、実質的に精製された、かつ／または組換えの抗体を提供する。

【００３８】

さらに、本発明の抗体およびこの抗体に直接的または間接的に結合している治療薬を含むコンジュゲートも提供される。治療薬の例としては、それだけに限らないが、細胞毒、放射性同位体（例えば、ヨウ素－１３１、イットリウム－９０もしくはインジウム－１１１）、免疫調節薬、抗血管新生薬、抗新血管形成薬および／または他の血管形成薬、毒素、抗増殖薬、アポトーシス促進剤、化学療法剤および治療用核酸が挙げられる。

【００３９】

一実施形態において、毒素は緑膿菌外毒素またはその誘導体である。

【００４０】

さらなる実施形態において、治療薬は、リンカーを介して抗体に間接的に結合している。例としては、それだけに限らないが、４－（４’アセチルフェノキシ）ブタン酸（ＡｃＢｕｔ）、３－アセチルフェニル酸性酸（ＡｃＰａｃ）、４－メルカプト－４－メチル－ペンタン酸（アミド）およびその誘導体が挙げられる。

【００４１】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体およびこの抗体に直接的または間接的に結合している検出可能な標識を含むコンジュゲートを提供する。適当な標識の例としては、それだけに限らないが、放射標識、蛍光標識、酵素標識および造影剤が挙げられる。

【００４２】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体もしくはその鎖、本発明の免疫グロブリン軽鎖、本発明の免疫グロブリン重鎖、ならびに／または本発明のコンジュゲートをコードする単離および／もしくは外因性ポリヌクレオチドを提供する。

【００４３】

好ましくは、ポリヌクレオチドは、配列番号５２から５７のいずれか１つとして示される配列を含む。

【００４４】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。好ましくは、ベクターは発現ベクターである。より好ましくは、ポリヌクレオチドは、プロモーターと作動可能に連結している。

【００４５】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび／または本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞または動物細胞などの任意の細胞型とすることができる。

【００４６】

さらに、本発明の細胞を含む非ヒトトランスジェニック生物も提供される。

【００４７】

さらに、本発明の抗体、本発明の免疫グロブリン軽鎖、本発明の免疫グロブリン重鎖、本発明のコンジュゲート、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターならびに／または本発明の宿主細胞および担体を含む組成物も提供される。

【００４８】

別の態様において、本発明は、抗体を産生するプロセスであって、ポリヌクレオチドが発現され、抗体が産生されるように、本発明の宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞が、本発明の少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むプロセスを提供する。

【００４９】

一実施形態において、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖は、一続きのポリヌクレオチド上の２つの別個のオープンリーディングフレームによってコードされる。

【００５０】

好ましくは、このプロセスは、宿主細胞培養物から抗体を回収することをさらに含む。

【００５１】

さらなる態様において、本発明は、ヒトＣ５ａＲとそのリガンドとの相互作用を阻害するための方法であって、細胞を、本発明の抗体または本発明のコンジュゲートに曝露することを含む方法を提供する。

【００５２】

好ましくは、リガンドはヒトＣ５ａである。

【００５３】

好ましくは、抗体またはコンジュゲートは、細胞に対する少なくとも一部のリガンド結合を阻止する。

【００５４】

別の態様において、本発明は、細胞におけるヒトＣ５ａＲ活性を阻害するための方法であって、細胞を、本発明の抗体または本発明のコンジュゲートに曝露することを含む方法を提供する。

【００５５】

２つの前述の態様に関して、これらの方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでもｉｎ　ｖｉｖｏでも実施することができる。

【００５６】

別の態様において、本発明は、対象において障害を治療または予防する方法であって、本発明の抗体、本発明のコンジュゲート、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞および／または本発明の組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。

【００５７】

一実施形態において、障害は、自己免疫疾患などの免疫病理学的障害である。

【００５８】

別の実施形態において、障害は、急性炎症または慢性炎症などの炎症性疾患である。

【００５９】

別の実施形態において、免疫病理学的障害または炎症性疾患に白血球遊走および／または白血球活性化が関与する。

【００６０】

さらなる実施形態において、免疫病理学的障害または炎症性疾患に補体活性化が関与する。

【００６１】

治療または予防することができる障害の例としては、それだけに限らないが、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患、過敏性肺炎、間質性肺炎、アナフィラキシー応答、過敏性応答、薬物アレルギー、虫刺されアレルギー、炎症性腸疾患、脊椎関節症、強皮症、乾癬、皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹、血管炎、関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、若年発症糖尿病、腎炎（nephritides）、自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病、移植片拒絶、アテローム性動脈硬化症、皮膚または器官の白血球浸潤を伴う癌、再灌流傷害、卒中発作、成人呼吸窮迫症候群、血液学的悪性疾患、サイトカイン誘導毒性、多発性筋炎、皮膚筋炎、類天疱瘡、アルツハイマー病、肉芽腫性疾患、血友病性滑膜炎、痛風、感染に伴う有害な炎症反応、ＳＡＲ、敗血症、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、関節リウマチ、抗リン脂質抗体症候群、加齢黄斑変性、膜性増殖性糸球体腎炎およびデンスデポジット病が挙げられる。

【００６２】

本発明の方法は、他の既知の療法と組み合わせて実施することができる。したがって、一実施形態において、この方法は、障害を治療または予防するための少なくとも１つの他の化合物を投与することをさらに含む。このような他の療法は、同時または順次に提供することができる。

【００６３】

当業者に理解されるように、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターおよび／または宿主細胞は、対象に投与される場合、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗体またはコンジュゲートが発現されるような適当な条件下に置かれる。

【００６４】

好ましくは、抗体、コンジュゲート、ポリヌクレオチド、ベクターおよび／または宿主細胞は、本発明の組成物として投与される。

【００６５】

別の態様において、本発明は、対象において治療薬を炎症部位に送達するための方法であって、本発明のコンジュゲートまたはそれをコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む方法を提供する。

【００６６】

さらなる態様において、本発明は、遺伝物質を、Ｃ５ａＲを提示する細胞に導入するための方法であって、この細胞を、本発明の抗体または本発明のコンジュゲートと接触させることを含み、抗体またはコンジュゲートが遺伝物質に結合している、またはそれと会合している方法を提供する。

【００６７】

遺伝物質の例としては、ＤＮＡ、ＲＮＡまたはその組合せが挙げられる。好ましい実施形態において、遺伝物質は、少なくとも部分的に二本鎖のＤＮＡまたは少なくとも部分的に二本鎖のＲＮＡである。

【００６８】

好ましい実施形態において、Ｃ５ａＲを提示する細胞は、白血球、例えば、顆粒球（例えば、好中球、好塩基球、好酸球）、単球、肥満細胞および形質細胞様樹状細胞、ならびに組織中の免疫細胞、例えば、マクロファージ（例えば、小膠細胞、肝クッパー細胞、腎糸球体メサンギウム細胞）、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球、血管内皮細胞、心筋細胞、星状細胞、神経幹細胞、希突起膠細胞、滑膜細胞、関節軟骨細胞、刺激肝細胞、気管支上皮細胞、角化細胞および胸腺細胞からなる群から選択される。特に好ましい実施形態において、Ｃ５ａＲを提示する細胞は、白血球、例えば、顆粒球（例えば、好中球、好塩基球、好酸球）、単球、肥満細胞および形質細胞様樹状細胞、ならびに組織中の免疫細胞、例えば、マクロファージ（例えば、小膠細胞、肝クッパー細胞、腎糸球体メサンギウム細胞）からなる群から選択される。

【００６９】

さらに別の態様において、本発明は、試料中のヒトＣ５ａＲの存在または非存在を検出する方法であって、試料を、本発明の抗体および／または本発明のコンジュゲートと接触させること、ならびに試料をヒトＣ５ａＲと抗体またはコンジュゲートとの結合について分析することを含む方法を提供する。

【００７０】

試験することができる適当な試料の例としては、必ずしもそれだけに限らないが、血液、血清、血漿ならびに細胞または組織生検が挙げられる。

【００７１】

別の態様において、本発明は、対象において障害を診断するための方法であって、対象またはそれから得られた試料を、本発明の抗体または本発明のコンジュゲートと接触させること、および対象または試料をヒトＣ５ａＲと抗体またはコンジュゲートとの結合について分析することを含む方法を提供する。

【００７２】

したがって、この方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでもｉｎ　ｖｉｖｏでも実施することができる。

【００７３】

一実施形態において、この方法は、対象から得られた組織標本または組織もしくは体液の亜分画を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施される。

【００７４】

別の実施形態において、この方法は、対象において抗体とＣ５ａＲを提示する細胞との複合体が形成されるような条件下で、造影剤で標識した本発明の抗体を対象に投与すること、およびこの複合体をイメージングすることを含む。

【００７５】

好ましくは、障害は免疫病理学的障害である。

【００７６】

さらに、対象において障害を治療または予防するための医薬品を製造するための、本発明の抗体、本発明のコンジュゲート、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞および／または本発明の組成物の使用も提供される。

【００７７】

さらに、対象において治療薬を炎症部位に送達するための医薬品を製造するための、本

発明のコンジュゲートまたはそれをコードするポリヌクレオチドの使用も提供される。

【００７８】

さらに、対象において障害を治療または予防するための医薬品としての、本発明の抗体、本発明のコンジュゲート、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞および／または本発明の組成物の使用も提供される。

【００７９】

さらに、対象において治療薬を炎症部位に送達するための医薬品としての、本発明のコンジュゲートまたはそれをコードするポリヌクレオチドの使用も提供される。

【００８０】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体、本発明のコンジュゲート、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞および／または本発明の組成物を含むキットを提供する。

【００８１】

明らかであるように、本発明の一態様の好ましい特色および特徴は、本発明の多くの他の態様に適用可能である。

【００８２】

当業者に理解されるように、本発明の多くの態様において、定義済みの分子（抗体または免疫グロブリンなど）は、指定の配列番号の配列を含むこととは対照的に、前記配列から本質的になる、またはより好ましくはそれからなることが好ましい。

【００８３】

本発明は、以下の非限定的な実施例によって、また添付の図面を参照して以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【００８４】

【図１】図１は、マウス７Ｆ３軽鎖Ｖｋ領域に対する最大の相同性を有するヒトＩｇ軽鎖配列のＣｌｕｓｔａｌＷアラインメントを示す図である。７Ｆ３について規定されたＣＤＲを四角で囲んだ。コンセンサスフレームワーク配列が示される（ｈＶｋＦＷ　Ｃｏｎｓ）。

【図２Ａ】図２は、マウス７Ｆ３重鎖Ｖｈ配列に対する最大の相同性を有するヒトＩｇの重鎖Ｖ領域配列（Ａ）およびＪ領域配列（Ｂ）のＣｌｕｓｔａｌＷアラインメントを示す図である。７Ｆ３について規定されたＣＤＲを四角で囲んだ。７Ｆ３　ＣＤＲを移植するために、示されたＶ領域（ｈＶｈｖＦＷ　Ｃｏｎｓ）およびＪ領域（ｈＶｈｊＦＷ　Ｃｏｎｓ）に関するコンセンサスフレームワーク配列を連結して、コンセンサス配列（ｈＶｈＦＷ　Ｃｏｎｓ）を作製した（注意：Ｄ領域はＣＤＲ－Ｈ３内に含まれる）。

【図２Ｂ】図２Ａの続き

【図３】図３は、図１のコンセンサスヒトＶｋフレームワーク配列と、マウス７Ｆ３　Ｖｋ配列とのアラインメントを使用して、ヒト化７Ｆ３　Ｖｋ軽鎖配列、ｈ７Ｖｋを作製したことを示す図である。マウス７Ｆ３　ＣＤＲ（囲み）を、ｈＶｋＦＷコンセンサスフレームワーク配列中に移植した。アスタリスク付の３つのアミノ酸を、マウス７Ｆ３フレームワーク配列に逆変異させた。

【図４】図４は、ヒト化ＲＮＯＫ２０３ＶＬ配列とマウス７Ｆ３　Ｖｋ配列とのアラインメントを使用して、ヒト化７Ｆ３　Ｖｋ軽鎖配列、ｈ７ａＶｋを作製したことを示す図である。マウス７Ｆ３　ＣＤＲ（囲み）を、ＲＮＯＫ２０３ＶＬフレームワーク配列中に移植した。

【図５】図５は、ＫＶ２Ｆ－ＨＵＭＡＮ由来ＶＬＣＤ１８－Ｑ配列とマウス７Ｆ３　Ｖｋ配列とのアラインメントを使用して、ヒト化７Ｆ３　Ｖｋ軽鎖配列、ｈ７ｂＶｋを作製したことを示す図である。マウス７Ｆ３　ＣＤＲ（囲み）を、ＶＬＣＤ１８－Ｑフレームワーク配列中に移植した。

【図６】図６は、ヒト化７Ｆ３　Ｖｋ配列とマウス７Ｆ３　Ｖｋ配列とのアラインメントを示す図である。コンセンサス配列ｈ７Ｆ３　ＶｋＣｏｎｓは、３つのヒト化配列のコン

センサスである。ＣＤＲを四角で囲んだ。ヒト化７Ｆ３　Ｖｋ配列間の差異を、黒の背景に白字で示した。

【図７】図７は、図２Ａおよび２Ｂのコンセンサスヒトｖｈフレームワーク配列と、マウス７Ｆ３　Ｖｈ配列とのアラインメントを使用して、ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ重鎖配列、ｈ７Ｖｈを作製したことを示す図である。マウス７Ｆ３　ＣＤＲ（囲み）を、ｈＶｈＦＷコンセンサスフレームワーク配列中に移植した。アスタリスク（＊）付のアミノ酸を、マウス７Ｆ３フレームワーク配列に逆変異させた。＃付のアミノ酸を、本文中で議論したような代替の残基に変異させた。

【図８】図８は、ヒトＳＧＩ－ＶＨ配列とマウス７Ｆ３　Ｖｈ配列とのアラインメントを使用して、ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ重鎖配列、ｈ７ａＶｈを作製したことを示す図である。マウス７Ｆ３　ＣＤＲ（囲み）を、ＳＧＩ－ＶＨフレームワーク配列中に移植した。アスタリスク（＊）付のアミノ酸を、マウス７Ｆ３フレームワーク配列に逆変異させた。

【図９】図９は、ヒトＨＧ３配列とマウス７Ｆ３　Ｖｈ配列とのアラインメントを使用して、ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ重鎖配列、ｈ７ｂＶｈを作製したことを示す図である。マウス７Ｆ３　ＣＤＲ（囲み）を、ＨＧ３フレームワーク配列中に移植した。アスタリスク（＊）付のアミノ酸を、マウス７Ｆ３フレームワーク配列に逆変異させた。

【図１０】図１０は、ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ配列とマウス７Ｆ３　Ｖｈ配列とのアラインメントを示す図である。コンセンサス配列ｈ７Ｆ３ＶｈＣｏｎｓは、３つのヒト化配列のコンセンサスである。ＣＤＲを四角で囲んだ。ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ配列間の差異を、黒の背景に白字で示した。

【図１１】図１１は、ヒト好中球上のｈＣ５ａＲからの、ヒト化７Ｆ３抗体およびマウス７Ｆ３による^{125}Ｉ－Ｃ５ａの置換を比較する、競合的リガンド結合アッセイを示す図である。

【図１２Ａ】図１２は、Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲトランスフェクタント上のｈＣ５ａＲからの、ヒト化７Ｆ３抗体およびマウス７Ｆ３による^{125}Ｉ－Ｃ５ａの置換を比較する競合的リガンド結合アッセイを示す図である。

【図１２Ｂ】図１２は、Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲトランスフェクタント上のｈＣ５ａＲからの、ヒト化７Ｆ３抗体およびマウス７Ｆ３による^{125}Ｉ－Ｃ５ａの置換を比較する競合的リガンド結合アッセイを示す図である。

【図１２Ｃ】図１２は、Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲトランスフェクタント上のｈＣ５ａＲからの、ヒト化７Ｆ３抗体およびマウス７Ｆ３による^{125}Ｉ－Ｃ５ａの置換を比較する競合的リガンド結合アッセイを示す図である。

【図１３】図１３は、ｘ軸上に$\log_{10}$（上のパネル）および線形（下のパネル）スケールでプロットした、４℃でのヒト好中球に対する抗Ｃ５ａＲ抗体の飽和結合を示す図である。

【図１４】図１４は、ペプチドＥＬＩＳＡを示す図である：ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ由来の１２マー配列（各々１つずつずれた）を含む一連の重複するペプチド（１～２２番）および配列番号３７由来の残基１７３～２０５を含む３３マー（２３番）に対する、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｊ（パネルＡ）およびｈＡｂ－Ｑ（パネルＢ）の結合。ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ由来の１２マー配列（Ａ１番）、単一のＡｌａ変異を有する１２マーを含む一連の変異ペプチド（Ａ２～Ａ１３番）、およびスクランブル化ペプチド（Ａ１４番）に対する、ｈＡｂ－Ｊ（パネルＣ）およびｈＡｂ－Ｑ（パネルＤ）の結合。

【図１５】図１５は、種々の希釈でＥＬＩＳＡプレート上を被覆したペプチドＰＥＰ１（配列番号３７の残基９～２９）に対する、ヒト化抗Ｃ５ａＲ　ｍＡｂのｈＡｂ－ＪおよびＱまたは抗Ｃ５ａＲ　ｍＡｂ　Ｓ５／１（５μｇ／ｍｌ）の結合を示す図である。

【図１６】図１６は、走化性アッセイを示す図である：５μｇ／ｍｌの７Ｆ３および種々のヒト化７Ｆ３抗体の存在下での、１ｎＭのＣ５ａに対するヒト好中球の遊走。

【図１７】図１７は、抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑ（閉じたひし形）および７Ｆ３（白い四角）による、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球の走化性の阻害を示す図である。４つ

の別個の実験からの平均（±標準誤差）結果を、抗体なしの対照試料の最大遊走の百分率（上パネル）として、または、遊走細胞の平均数（下パネル）として示す。ｘ軸上の単位は、μｇ／ｍｌでのｌｏｇ$_{10}$Ａｂ濃度である。

【図１８】図１８は、親マウス抗体７Ｆ３ならびにヒト化抗体ＪおよびＱによる、Ｃ５ａによって駆動されるｈＣ５ａＲ／Ｌ１．２トランスフェクタント細胞遊走の阻害を示す図である。

【図１９】図１９は、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球の走化性が、高濃度のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑとのプレインキュベーション後に抑制されたことを示す図である。

【図２０】図２０は、種々の濃度のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑと共にプレインキュベートした細胞の、Ｃ５ａによって誘発される走化性の前および後に、ヒト好中球上の未結合のＣ５ａＲのレベルと結合した抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑのレベルとの間で観察された、半比例の関係を示す図である。

【図２１】図２１は、種々の濃度のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑと共にプレインキュベートした、ヒト好中球上の結合した抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑのレベル（Ｃ５ａによって誘発される走化性の前および後）と細胞遊走の阻害との間で観察された関係を示す図である。

【図２２】図２２は、種々の濃度のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑと共にプレインキュベートしたヒト好中球上の、Ｃ５ａによって誘発されるＣＤ１１ｂ発現の阻害を示す図である。

【図２３】図２３は、種々の濃度のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑと共にプレインキュベートしたヒト好中球上の、Ｃ５ａによって誘発されるＣＤ６２Ｌの下方制御の阻害を示す図である。

【図２４】図２４は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－ＱおよびｈＡｂ－Ｊ、ＰＢＳまたは顆粒球活性化因子ｆＭＬＰとヒト全血との１時間のインキュベーション後の、好中球上のＣＤ１１ｂ（パネルＡ）およびＣＤ６２Ｌ（パネルＢ）の発現を示す図である。

【図２５】図２５は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－ＧもしくはｈＡｂ－Ｊ、またはＣ５ａとヒト全血との２０分間のインキュベーション後の、ＰＢＳ対照に対する好中球上のＣＤ１１ｂ（パネルＡ）およびＣＤ６２Ｌ（パネルＢ）発現を示す図である。

【図２６】図２６は、ｈＡｂ－Ｑ、ｈＩｇＧアイソタイプ対照抗体単独またはｈＩｇＧ抗体＋１００ｎＭ　ヒトＣ５ａと共にインキュベートしたヒト全血における、相対的なＣＤ１１ｂ発現（パネルＡ）およびＣＤ６２Ｌ発現（パネルＢ）の変化によって示される、好中球の活性化を示す図である。

【図２７】図２７は、ｈＡｂ－Ｑ（抗Ｃ５ａＲ　ａｂともいう）それ自体は、固相に結合したヒト好中球がスーパーオキシドを産生するように刺激することはないが、Ｃ５ａによる産生の惹起と反対の作用をすることを示す図である。

【図２８】図２８は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑまたは対照（リツキシマブ、無関係のヒトＩｇＧ４、ＰＢＳ）との４時間のｅｘ　ｖｉｖｏインキュベーション後の、ヒト血液１ｍｌ当たりのＢ細胞、単球および好中球の平均数（±標準偏差）を示す図である。

【図２９】図２９は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑまたは対照抗体（リツキシマブ、無関係のヒトＩｇＧ４）との４時間のｅｘ　ｖｉｖｏインキュベーション後の、ヒト血液１ｍｌ当たりのＢ細胞、単球および好中球の、ＰＢＳ対照に対する平均％枯渇（±標準偏差）を示す図である。

【図３０】図３０は、１％ウサギ補体の存在下での、１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブおよびｈＩｇＧ４、または２０μｇ／ｍｌのポリクローナル抗Ｃ５ａＲ抗体とのインキュベーション後の、特異的ＣＤＣ（％ＴｏＰｒｏ３＋ｖｅ（溶解済み）Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞）を示す図である。

【図３１】図３１は、１０％ヒト血清の存在下での、１～１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブおよびｈＩｇＧ４とのインキュベーション後の、特異的ＣＤＣ（％非生存Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞）を示す図である。１０％熱不動化ウシ血清と共にインキュベート

した各試料について、非特異的溶解が既に差し引かれている。
【図３２】図３２は、特異的ＡＤＣＣ（「培地のみ」および「標的のみ」のバックグラウンドを差し引いた後の、「標的＋エフェクター」試料における％標的細胞溶解）：１０％熱不動化胎児ウシ血清を含む培地中で、ヒトＰＢＭＣエフェクター細胞＋１００μｇ／ｍｌ抗体と共にインキュベートした後の、％非生存（ＴＰ３＋ｖｅ）Ｒａｍｏｓ　Ｅ２標的細胞を示す図である。
【図３３】図３３は、特異的ＡＤＣＣ（「培地のみ」および「標的のみ」のバックグラウンドを差し引いた後の、「標的＋エフェクター」試料における％標的細胞溶解）：１０％ヒトドナー血清を含む培地中で、ヒトドナーＰＢＭＣエフェクター細胞＋１～１００μｇ／ｍｌの抗体と共にインキュベートした後の、％非生存（ＴＰ３＋ｖｅ）Ｒａｍｏｓ　Ｅ２標的細胞を示す図である。
【図３４】図３４は、炎症性関節炎のモデルにおける疾患の進行を示す図である。１０ｍｇ／ｋｇ　抗ｈＣ５ａＲ抗体Ｇ、ＭおよびＮの５日目の腹腔内投与後の、ｈＣ５ａＲノックインマウス（１群当たりｎ＝６）におけるＫ／ＢｘＮ血清によって誘発される炎症の復帰が、群平均臨床スコアの変化によって示される。
【図３５】図３５は、炎症性関節炎のモデルにおける疾患の進行を示す図である。１～１０ｍｇ／ｋｇの抗ｈＣ５ａＲ抗体ＣおよびＪの５日目の腹腔内投与後の、ｈＣ５ａＲノックインマウス（１群当たりｎ＝４～５）におけるＫ／ＢｘＮ血清によって誘発される炎症の復帰が、群平均臨床スコアの変化によって示される。
【図３６】図３６は、炎症性関節炎のモデルにおける疾患の進行を示す図である。１～１０ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑの５日目の腹腔内投与後の、ｈＣ５ａＲノックインマウス（１群当たりｎ＝１０＋）におけるＫ／ＢｘＮ血清によって誘発される炎症の復帰が、群平均の足サイズ（Ａ）および臨床スコア（Ｂ）の変化によって示される。
【図３７】図３７は、種々の用量のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体、対照抗体またはＰＢＳのｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の、占有されたＣ５ａＲの経時的なレベルを示す図である。
【図３８】図３８は、種々の用量のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体、対照抗体またはＰＢＳのｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の、未結合のＣ５ａＲの経時的なレベルを示す図である。
【図３９】図３９は、関節の炎症を有するマウスに５日目に治療的に投与されたｈＡｂ－Ｑの、経時的な血清濃度を示す図である。
【図４０】図４０は、０日目および２日目にＫ／ＢｘＮ血清を注射し、５日目に１０ｍｇ／ｋｇのヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を注射したマウスにおける、臨床スコア（足および関節における炎症のレベル）と、占有されたＣ５ａ受容体のレベルと、ｈＡｂ－Ｑの血清濃度との間の関係を示す図である。
【図４１】図４１は、０日目および２日目にＫ／ＢｘＮ血清を注射し、５日目に３ｍｇ／ｋｇのヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を注射したマウスにおける、臨床スコア（足および関節における炎症のレベル）と、占有されたＣ５ａ受容体のレベルと、ｈＡｂ－Ｑの血清濃度との間の関係を示す図である。
【図４２】図４２は、０日目および２日目にＫ／ＢｘＮ血清を注射し、５日目に１ｍｇ／ｋｇ　ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を注射したマウスにおける、臨床スコア（足および関節における炎症のレベル）と、占有されたＣ５ａ受容体のレベルと、ｈＡｂ－Ｑの血清濃度との間の関係を示す図である。
【図４３】図４３は、トランスジェニックマウスでの毒物学研究および薬理学研究における、ｈＡｂ－Ｑに関する統合されたＰＫ／ＰＤモデルの模式図を示す図である。
【図４４】図４４は、毒物学研究（注釈中Ｔｏｘで示す）および薬理学研究（注釈中ＫＲＮで示す）における、ｈＡｂ－Ｑ（抗Ｃ５ａＲ　ａｂともいう）の種々の静脈内、皮下および腹腔内投薬に関する、モデルが予測しそして観察された濃度（左）および占有率（右）対時間を示す図である。毒物学研究のために、ＰＫ試料を、投薬後１日目および投薬後４３日目に採取した。４３日目のデータを定常状態と仮定し、６回目の投薬を追跡するために考慮した。平均群値：ひし形、個々のマウス：白丸、標的コンパートメントを介してフィットさせたモデル：太線。

【図４５】図４５は、薬理学研究において実験的に誘発した関節炎の阻害に対するｈＡｂ－Ｑの影響に関する、ＰＫ／ＰＤモデルの模式図を示す図である。このモデルは、図４３中に示したＰＫ／ＰＤモデルで計算した占有率を組み込んでいる。
【図４６】図４６は、トランスジェニックマウスにおける、５日目に投与されたｈＡｂ－Ｑの種々の腹腔内投薬での、０日目の炎症チャレンジ後の占有率（左）および足サイズの変化（右）対時間を示す図である。平均郡測定値：色で塗りつぶしたひし形。個々のマウス値：色つきの中白の丸。各群におけるフィットしたモデル：色つき線。
【図４７】図４７は、ヒトでの予測のために適用したＰＫ／ＰＤモデルの模式図を示す図である。このモデルは、標的媒介性の体内動態で増強された、典型的なＩｇＧパラメーターを使用する２コンパートメントモデルからなる。V_1＝中央体積。V_2＝末梢体積。ＣＬ＝クリアランス。Ｑ＝分布クリアランス。ｋｏｆｆ／ｋｏｎ＝会合／解離に関する速度定数。ターンオーバー＝標的を刷新し、結合した抗体を除去するのにかかる時間。２標的コンパートメントを使用して、標的が血液の内側および外側の両方に分布すると考えられることを反映した。
【図４８】図４８は、抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）の静脈内投薬後の、薬物動態（左）および占有率（右）に関するモデル予測を示す図である。定量化の下限を水平線によって示す。
【図４９】図４９は、抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）の皮下投薬後の、薬物動態（左）および占有率（右）に関するモデル予測を示す図である。定量化の下限を水平線によって示す。
【発明を実施するための形態】
【００８５】
全般的な技術
別段に具体的な定義がなされない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語および科学用語は、当業者（例えば、細胞培養、分子遺伝学、抗体技術、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、および生化学）により一般的に理解される意味と同じ意味を有すると理解されるものとする。
【００８６】
別段に示されない限り、本発明で用いられる組換えタンパク質法、細胞培養法、および免疫学的技法は、当業者によく知られた標準的な手順である。このような技法は、Ｊ．Ｐｅｒｂａｌ、「Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９８４）；Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）；Ｔ．Ａ．Ｂｒｏｗｎ（編）、「Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ」、第１巻および第２巻、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）；Ｄ．Ｍ．ＧｌｏｖｅｒおよびＢ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ（編）、「ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ」、第１～４巻、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９５および１９９６）；ならびにＦ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８、現在までのすべての改定を含めた）；ＨａｒｌｏｗおよびＤａｖｉｄ Ｌａｎｅ（編）、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）；ならびにＪ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎら（編）、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（現在までのすべての改定を含めた）などの出典中の文献全体において記載および説明されている。
【００８７】
精選された定義
本明細書で用いられる「Ｃ５ａ受容体」、「Ｃ５ａＲ」、「Ｃ５ａＲ１」、または「ヒ

トＣ５ａＲ」、およびその突然変異体は、当技術分野でＣ５ａアナフィラトキシン受容体およびＣＤ８８抗原としても知られているヒト補体成分５受容体１を指す。Ｃ５ａＲは、７回膜貫通型Ｇタンパク質共役受容体ファミリーに属し、Ｃ５ａに結合する（Ｇｅｒａｒｄおよび Ｇｅｒａｒｄ、１９９１）。ヒトＣ５ａＲのアミノ酸配列の例は配列番号３７に示されているが、この分子の天然の対立遺伝子突然変異体もまた「Ｃ５ａＲ」という用語によって包含されることを当業者は認識しているであろう。ヒトＣ５ａＲの各ドメインは、以下：

アミノ酸１～３７　細胞外ドメイン：Ｎ末端
アミノ酸３８～６１　膜貫通ドメイン
アミノ酸６２～７１　細胞内ドメイン
アミノ酸７２～９４　膜貫通ドメイン
アミノ酸９５～１１０　細胞外ドメイン：細胞外ループ１
アミノ酸１１１～１３２　膜貫通ドメイン
アミノ酸１３３～１４９　細胞内ドメイン
アミノ酸１５０～１７４　膜貫通ドメイン
アミノ酸１７５～２０６　細胞外ドメイン：細胞外ループ２
アミノ酸２０７～２２７　膜貫通ドメイン
アミノ酸２２８～２４２　細胞内ドメイン
アミノ酸２４３～２６４　膜貫通ドメイン
アミノ酸２６５～２８３　細胞外ドメイン：細胞外ループ３
アミノ酸２８４～３０７　膜貫通ドメイン
アミノ酸３０８～３５０　細胞内ドメイン：Ｃ末端

のとおりに規定されている。

【００８８】

本明細書で用いられる「対象」という用語は、任意の動物、特に、ヒト、ウマ、ウシ、ネコ、およびイヌなどの哺乳動物を意味し、適切な場合は、「患者」という用語と互換的に用いることができる。対象はヒトであることが好ましい。

【００８９】

本明細書で用いられる「治療すること」、「治療する」、または「治療」、およびその変化形は、障害の少なくとも１つの症状を軽減または除去するのに十分な治療有効量の本発明の抗体を投与することを包含する。

【００９０】

本明細書で用いられる「予防すること」、「予防する」、もしくは「予防」、またはその変化形は、疾患の少なくとも１つの症状を発症することから対象を保護すること、または障害の症状の重症度を軽減することを指す。

【００９１】

本明細書で用いられる「細胞の曝露」という用語は、Ｃ５ａＲが細胞に存在する場合に、抗体がヒトＣ５ａＲに接触／結合することが可能であるように、抗体が供給されることを指す。

【００９２】

「５０％の有効濃度」（「EC_{50}」と略記する）という用語は、本発明の抗体が標的とする分子に対する所与の効果（例えば、ヒトＣ５ａＲに対するヒトＣ５ａの結合を阻害／置換すること）の５０％に必要とされる該抗体の濃度を表す。より低値のEC_{50}はより強力な抗体に対応することが、当業者により理解される。

【００９３】

本明細書で用いられる「阻害すること」という用語は、規定の活性を低減すること、またおそらくは、完全に除去することを指す。規定の活性は、少なくとも５０％低減されることが好ましく、より好ましくは少なくとも７５％、またさらにより好ましくは少なくとも９０％低減される。

【００９４】

本明細書で用いられる「約」という用語は、具体的な値の＋／－５％の範囲を指す。

【００９５】

本明細書全体において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という語、または「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」もしくは「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変化形は、言及される要素、十進数、もしくはステップ、または複数の要素、複数の十進数、もしくは複数のステップの群の包含を含意するが、他の任意の要素、十進数、もしくはステップ、または複数の要素、複数の十進数、もしくは複数のステップの群の除外を含意するものではないと理解される。ある実施形態では、ある分子が規定の配列「から本質的になる」。別の実施形態では、ある分子が規定の配列「からなる」。

【００９６】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体

免疫グロブリンという用語は、４本の鎖すべてがジスルフィド結合により相互に結合される、１対の低分子量の軽（Ｌ）鎖および１対の重（Ｈ）鎖である２対のポリペプチド鎖からなる、構造的に関連する糖タンパク質のクラスを指す。免疫グロブリンの構造は十分に特徴付けられており、例えば、「Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」、第７章（Ｐａｕｌ，Ｗ．編、第２版、Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．（１９８９））を参照されたい。略述すると、各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略記する）および重鎖定常領域（本明細書ではC_Hと略記する）を含むことが典型的である。重鎖定常領域は、３つのドメインC_H1、C_H2、およびC_H3を含むことが典型的である。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略記する）および軽鎖定常領域（本明細書ではC_Lと略記する）を含むことが典型的である。軽鎖定常領域は、１つのドメインC_Lを含むことが典型的である。V_H領域およびV_L領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）とも称し、フレームワーク領域（ＦＲ）と称するより保存的な領域が間に散在する、超可変的な領域（または構造的に規定されるループの配列および／もしくは形態において超可変的であり得る超可変領域）へとさらに細分することができる。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、少なくともV_LドメインおよびV_Hドメインを含む。

【００９７】

各V_HおよびV_Lは、以下の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４でアミノ末端からカルボキシ末端へと並ぶ３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからなることが典型的である（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、１９８７も参照されたい）。この領域内にあるアミノ酸残基の番号付けは、Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ．（１９９１）（本明細書では、Ｋａｂａｔにおける、またはＫａｂａｔによる可変ドメイン残基の番号付け、などの表現は、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについてのこの番号付けシステムを指す）に記載の方法により実施される。この番号付けシステムを用いると、あるペプチドの実際の直鎖アミノ酸配列は、該可変ドメインのＦＲもしくはＣＤＲの短縮または同ＦＲもしくはＣＤＲへの挿入に対応する、より少数であるかまたは追加のアミノ酸を含有する場合がある。

【００９８】

本明細書で用いられる「ヒト化抗体」という用語は、本明細書において、該親抗体の抗原結合特性を保持するかまたは実質的に保持するが、ヒトにおける免疫原性はより低度な非ヒト抗体、典型的にはマウス抗体に由来する抗体を指す。構造的および機能的な特色により定義される本発明の抗体により、「ヒト化抗体」という用語は、「抗体」と互換的に用いられる。

【００９９】

本明細書で用いられる相補性決定領域（ＣＤＲ）という用語は、免疫グロブリン結合部位の可変フラグメント（Ｆｖ）領域の結合アフィニティーおよび結合特異性を共に規定するアミノ酸配列を指す。

【０１００】
本明細書で用いられるフレームワーク領域（ＦＲ）という用語は、ＣＤＲの間に挟み込まれるアミノ酸配列を指す。抗体のこれらの部分は、ＣＤＲを適切な指向性に保持する（ＣＤＲが抗原に結合することを可能とする）のに用いられる。軽鎖または重鎖の可変領域は、フレームワーク、また典型的に３つのＣＤＲを含む。
【０１０１】
本明細書で用いられる定常領域（ＣＲ）という用語は、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分を指す。対象のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域は、５つのアイソタイプ：アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミューのいずれかから選択することができる。さらに、各サブクラスの重鎖（重鎖のＩｇＧサブクラスなど）が異なるエフェクター機能の一因となり、したがって、所望の重鎖定常領域を選択することにより、所望のエフェクター機能を有する抗体を産生することができる。好ましい重鎖定常領域は、ガンマ１（ＩｇＧ１）、ガンマ２（ＩｇＧ２）、ガンマ３（ＩｇＧ３）、およびガンマ４（ＩｇＧ４）であり、より好ましくはガンマ４（ＩｇＧ４）である。突然変異Ｓｅｒ２２８Ｐｒｏ（「Ｐ」突然変異と称する）および／またはＬｅｕ２３５Ｇｌｕ（「Ｅ」突然変異と称する）を伴うガンマ４（ＩｇＧ４）アイソタイプの結晶化可能フラグメント（Ｆｃ）領域がより好ましい。特に好ましい重鎖定常領域配列は、配列番号４２～４５として示される。軽鎖定常領域は、カッパ型またはラムダ型であり得、カッパ型であることが好ましい。特に好ましい軽鎖定常領域配列は、配列番号４０および４１として示される。
【０１０２】
好ましい実施形態において、本明細書に記載の免疫グロブリン軽鎖可変領域は、本明細書に記載の免疫グロブリン軽鎖定常領域に直接的に接合される。同様に、さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載の免疫グロブリン重鎖可変領域は、本明細書に記載の免疫グロブリン重鎖定常領域に直接的に接合される。したがって、好ましい実施形態において、配列番号３１として示されるアミノ酸配列のＣ末端は配列番号４１として示されるアミノ酸配列のＮ末端に直接的に接合され、配列番号３６として示されるアミノ酸配列のＣ末端は配列番号４５として示されるアミノ酸配列のＮ末端に直接的に接合される。
【０１０３】
標準的な組換えＤＮＡ法を用いることにより、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変領域および定常領域を記載のとおりに接合させて、（（１つまたは複数の）前記免疫グロブリン鎖を産生するのに）適する宿主において発現し得る（接合された可変ドメインおよび定常ドメインをコードする）ポリヌクレオチドを作製することもでき、ペプチド化学反応を用いることにより、接合された可変ドメインおよび定常ドメインを合成することもできることを、当業者は理解するであろう。
【０１０４】
本発明のヒト化抗体は、親抗体、すなわち、受託番号第００１１０６０９号の下に、２０００年１１月６日にＥＣＡＣＣに寄託されたハイブリドーマにより産生された、７Ｆ３と称するモノクローナル抗体の結合特性の大部分を保持している。特に、本発明のヒト化抗体は、このようなヒト化抗体を産生するのに用いられた親抗体により認識される抗原に特異的に結合する能力を保持する。該ヒト化抗体は、該親抗体と同じであるかまたは実質的に同じ抗原結合アフィニティーおよび抗原結合アビディティを示すことが好ましい。理想的には、該抗体のアフィニティー（K_D）は、該親抗体のアフィニティーの１０倍を超えず、より好ましくは約５倍を超えず、該アフィニティーは、該親抗体のアフィニティーの３倍を超えないことが最も好ましい。抗原結合アフィニティーをアッセイするための方法は当技術分野においてよく知られており、これには、最大半量結合アッセイ、競合アッセイ、およびスカチャード分析が含まれる。適切な抗原結合アッセイは、本出願において記載されている（例えば、実施例３を参照されたい）。
【０１０５】
当業者が理解するとおり、「アビディティ」は、抗体および抗原など２つの分子間にお

ける相互作用の全体的な強さに関する。アビディティは、相互作用のアフィニティーおよび価数の両方に依存する。さらに、「アフィニティー」は、分子（例えば、抗体）およびリガンド（例えば、抗原）の単独の結合部位間における結合の強さに関する。リガンドＹに対する分子Ｘのアフィニティーは、溶液中に存在する分子Ｘの半分の結合部位を占めるのに必要とされるＹの濃度である解離定数（K_d）により表される。K_dが小さければ、相互作用のアフィニティーがより強いかまたはより高度であり、該部位を占めるのに必要とされるリガンド濃度がより低度であることを示す。

【０１０６】

本発明で用いられる「ヒト化抗体」または「抗体」という用語は、完全分子のほか、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ'）２、およびＦｖなど、エピトープ決定基に結合可能なそのフラグメントを包含する。これらの抗体フラグメントは、ヒトＣ５ａＲに選択的に結合する一部の能力を保持し、その例としては、それだけに限らないが、以下：

（１）Ｆａｂ：抗体分子の１価の抗原結合フラグメントを含有するこのフラグメントは、酵素パパインにより全抗体を消化して、完全な軽鎖および１本の重鎖の一部をもたらすことにより産生することができる；

（２）Ｆａｂ’：抗体分子のこのフラグメントは、ペプシンにより全抗体を処理した後で還元反応を行い、完全な軽鎖および重鎖の一部をもたらすことにより得ることができる；抗体分子当たり２つのＦａｂ’フラグメントが得られる；

（３）$(Fab')_2$：後続の還元反応なしに酵素ペプシンで全抗体を処理することにより得ることができる抗体フラグメント；Ｆ（ａｂ）２は、２つのジスルフィド結合により一体に保持される２つのＦａｂ’フラグメントの二量体である；

（４）Ｆｖ：２本の鎖として発現される軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含有する、遺伝子改変されたフラグメントとして定義される；

（５）単鎖抗体（「ＳＣＡ」）：適切なポリペプチドリンカーにより、遺伝子融合された単鎖分子として連結された軽鎖可変領域、重鎖可変領域を含有する遺伝子改変分子として定義される；このような単鎖抗体は、多価特異的の場合もそうでない場合もあるダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディなどの多量体の形態（例えば、ＷＯ９４／０７９２１およびＷＯ９８／４４００１を参照されたい）であり得る；ならびに

（６）単一ドメイン抗体：軽鎖を欠く重鎖可変ドメインであることが典型的である；

が挙げられる。

【０１０７】

ヒト化抗体フラグメントには、個別の重鎖、軽鎖、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｃ、重鎖を欠く軽鎖可変ドメイン、軽鎖を欠く重鎖可変ドメイン、およびＦｖが含まれる。フラグメントは、組換えＤＮＡ法により産生され、または完全免疫グロブリンの酵素的分離または化学的分離により産生される。

【０１０８】

本発明の「ヒト化抗体」または抗体はまた、ヘテロコンジュゲート抗体でもあり得る。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合により接合された２つの抗体からなる。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞を免疫系細胞の標的とするため（ＵＳ４，６７６，９８０）、およびＨＩＶ感染の治療用（ＷＯ９１／００３６０；ＷＯ９２／２００３７３；ＥＰ５８６５０５）に提起されている。該抗体は、架橋形成剤を伴う反応を含めた、タンパク質合成化学反応において知られている方法を用いて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで調製し得ることが意図されている。

【０１０９】

例えば、関節炎など、本明細書に記載の障害の治療における抗体の有効性を増強するために、エフェクター機能の点で本発明の抗体を改変することが望ましい場合がある。例えば、（１つまたは複数の）システイン残基をＦｃ領域内に導入して、これにより、この領域内における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能とすることができる。こうして生成されたホモ二量体のヒト化抗体は、内部化能力を改善し、かつ／または補体媒介性細胞死滅作用および抗体依存性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）を増大させることができる（Ｃａｒｏｎら

、１９９２；Ｓｈｏｐｅｓ、１９９２）。活性を増強したホモ二量体の抗体はまた、Ｗｏｌｆｆら（１９９３）に記載のヘテロ二機能性架橋剤を用いても調製することができる。代替的に、二重Ｆｃ領域を有するように抗体を改変し、これにより、補体による溶解およびＡＤＣＣ能を増強させることもできる（Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎら、１９８９）。

【０１１０】

本明細書で用いられる「非枯渇型抗体」とは、その標的に結合するが、標的細胞の溶解を実行する免疫系のエフェクター機能は動員しない抗体を指す。免疫系のエフェクター機能は、補体カスケードの第１成分であるＣ１ｑおよび／または受容体（ＦｃＲ）とのＦｃドメインの相互作用に依存する。Ｃ１ｑとの複数のＦｃドメインの相互作用により補体依存性細胞傷害作用（ＣＤＣ）が誘発され、最終的にはこの結果として、膜攻撃複合体（ＭＡＣ）の形成を介して標的細胞の溶解がもたらされ得る。加えて、顆粒球、マクロファージ、およびＮＫ細胞などの免疫系細胞は、ＦｃＲを介して、標的細胞に結合したｍＡｂと相互作用し得る。標的細胞の溶解は、抗体依存性細胞媒介性傷害作用（ＡＤＣＣ）または食作用を介して誘発される。非枯渇型抗体には、例えば、１価フォーマット（例えば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、ナノボディ、およびｄＡｂ）、２価フォーマット（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびダイアボディ）、および多価フォーマット（例えば、トリアボディおよびペンタボディ）を含めた、Ｆｃドメインなしの抗体フラグメントが含まれる。加えて、非枯渇型抗体には、薬物動態に影響を与えることなくエフェクター機能を除去するように改変された抗体が含まれ、例えば、Ｃ１ｑおよびＦｃＲとの相互作用において主要な役割を果たすＦｃドメイン内のアミノ酸残基ならば改変することもできようし、ＣＨ２ドメイン内のＮが連結されたグリコシル化部位ならば除去することもできよう。当業者が理解するとおり、非枯渇型抗体を改変する可能性は、該抗体を産生するのに用いられる定常領域と関連する。ＩｇＧ３定常領域がＩｇＧ１定常領域よりも枯渇型抗体を産生する可能性が高く、ＩｇＧ１定常領域がＩｇＧ２定常領域よりも枯渇型抗体を産生する可能性が高いのに対し、ＩｇＧ４定常領域は一般に、その抗体が非枯渇型であることを意味する。当業者はまた、定常領域に対して改変を行えば、枯渇型抗体を非枯渇型抗体へと転換することもでき、この逆も可能であることを理解するであろう。

【０１１１】

本明細書で用いられる「非活性化型抗体」とは、細胞表面受容体に結合し、内因性リガンドの作用を無化または遮断する抗体を指す。

【０１１２】

本発明のヒト化抗体は、人的な介入により産生される。したがって、これらは、自然発生することが期待されない。にもかかわらず、好ましい実施形態において、本発明の抗体鎖または免疫グロブリン鎖は、「実質的に精製」されているかまたは「精製」されている。本発明者らによれば、「実質的に精製」されているかまたは「精製」されているとは、１つまたは複数の脂質、核酸、他のポリペプチド、またはその天然状態ではそれが関連する他の夾雑分子から抗体が分離されていることを意味する。実質的に精製されているポリペプチドとは、天然ではそれが関連する他の成分を少なくとも６０％含まず、より好ましくは少なくとも７５％含まず、またより好ましくは少なくとも９０％含まないことが好ましい。別の実施形態において、「実質的に精製」されているかまたは「精製」されているとは、該分子が、該組成物中において、それが属する分子クラスに関して見出される主要な分子種であることを意味する（すなわち、それが、該組成物中における分子の種類の少なくとも約５０％を占め、該組成物中における分子種、例えば、ペプチドの少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％以上を占めることが典型的である）。

【０１１３】

抗体鎖または免疫グロブリン鎖の関連における「組換え」という用語は、細胞または無細胞発現系により、その天然状態と比較して変化した量または変化した速度で産生される場合の抗体鎖または免疫グロブリン鎖を指す。一実施形態において、細胞は、天然では抗体鎖または免疫グロブリン鎖を産生しない細胞である。しかし、細胞は、産生されるポリ

ペプチド量の変化、好ましくは増大を引き起こす非内因性遺伝子を含む細胞であり得る。本発明の組換えによる抗体鎖または免疫グロブリン鎖には、その中でそれが産生されるトランスジェニック（組換え）細胞または無細胞発現系の他の成分と分離されていないポリペプチドが含まれ、このような細胞または無細胞系内において産生される抗体鎖または免疫グロブリン鎖は、その後、少なくとも一部の他の成分から精製される。

【０１１４】

ポリペプチド（免疫グロブリン鎖）の％同一性は、ギャップ創出ペナルティ＝５、およびギャップ伸長ペナルティ＝０．３とするＧＡＰ（ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、１９７０）解析（ＧＣＧプログラム）により決定される。クエリー配列は少なくとも５０アミノ酸の長さであり、ＧＡＰ解析では、少なくとも５０アミノ酸の領域にわたり２つの配列が整列される。クエリー配列が少なくとも１００アミノ酸の長さであり、ＧＡＰ解析では、少なくとも１００アミノ酸の領域にわたり２つの配列が整列されることがさらにより好ましい。２つの配列がそれらの全長にわたり整列されることが最も好ましい。

【０１１５】

規定された免疫グロブリン鎖に関しては、上記に示された数値よりも高値の％同一性の数値が好ましい実施形態に包含されると理解される。したがって、適切な場合、％同一性の最小値に照らすと、免疫グロブリン鎖は、命名された関連の配列番号と少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、さらにより好ましくは少なくとも９９．９％同一のアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【０１１６】

別の実施形態では、命名された配列番号に１つの残基を付加するか、命名された配列番号から１つの残基を欠失させるか、命名された配列番号と比較して１つの残基を付加して１つの残基を欠失させるか、命名された配列番号に２つの残基を付加するか、命名された配列番号から２つの残基を欠失させるか、命名された配列番号から１つの残基を変化させるか、命名された配列番号から２つの残基を変化させるか、命名された配列番号から１つの残基を変化させて１つの残基を欠失させるか、もしくは命名された配列番号から１つの残基を変化させてこれに１つの残基を付加するか、またはこれらの任意の組合せを実施する。

【０１１７】

好ましい実施形態において、アライメント内にはギャップが存在しない。より具体的に述べると、アルゴリズムは、アミノ酸の連続するつながりの中にギャップを創出して、最適な（％同一性が最大の）アライメントを得る必要がない。

【０１１８】

本発明の抗体鎖および／または免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列突然変異体は、本発明の核酸内に適切なヌクレオチド変化を導入することによっても調製することができ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける所望のポリペプチドの合成によっても調製することができる。このような突然変異体は、例えば、該アミノ酸配列内において、残基の欠失、挿入、または置換を包含する。最終的なポリペプチド産物が所望の特徴を有する場合は、欠失、挿入、および置換の組合せを行って最終構築物に到達することができる。

【０１１９】

突然変異（改変）ポリペプチドは、当技術分野で知られている任意の技法を用いて調製することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの突然変異誘発にかけることができる。このようなｉｎ　ｖｉｔｒｏの突然変異誘発法には、適切なベクター内へのポリヌクレオチドのサブクローニング、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＸＬ－１レッド（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）などの「突然変異誘発」株内へのベクターの形質転

換、および形質転換された細菌の増殖による適切な数の生成が含まれる。突然変異／改変ＤＮＡは、本明細書に記載の技法を用いて容易にスクリーニングし、これらが受容体結合活性および／または受容体阻害活性を有するかどうかを判定することができる。

【０１２０】

アミノ酸配列の突然変異体を設計する場合、突然変異部位の位置および突然変異の性質は、改変される（１つまたは複数の）特徴に依存する。突然変異される部位は、例えば、（１）まず保存的アミノ酸の選択により、次いで、達成された結果に応じてより根本的な選択により置換すること、（２）標的残基を欠失させること、または（３）位置を特定した部位に隣接する形で他の残基を挿入することにより、個別にまたは連鎖的に改変することができる。

【０１２１】

アミノ酸配列の欠失は一般に、約１～１５残基、より好ましくは約１～１０残基、また典型的には約１～５の連続残基の範囲にわたる。

【０１２２】

置換突然変異体では、抗体鎖および／または免疫グロブリン鎖分子中における少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、その代わりに異なる残基が挿入される。置換的突然変異誘発にとって最大の対象部位には、抗原結合に重要であると同定される部位が含まれる。これらの部位、とりわけ、ヒト抗体鎖および／または免疫グロブリン鎖の少なくとも３カ所の他の同一保存部位の配列内に収まる部位は、比較的に保存的な形で置換することが好ましい。このような保存的置換は、「例示的な置換」の表題の下に、表１に示される。置換の具体例は、図６および１０に示され、この場合、所与の部位におけるアミノ酸は、他のヒト化鎖内の同じ部位に存在する別のアミノ酸により置換することができる。

【０１２３】

【表１】

表1:例示的な置換

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

【０１２４】

さらに、所望の場合、非天然アミノ酸または化学的なアミノ酸類似体を、本発明の抗体鎖および／または免疫グロブリン鎖内への置換または付加として導入することができる。

このようなアミノ酸としては、それだけに限らないが、一般的なアミノ酸のＤ－異性体、２，４－ジアミノブチル酸、α－アミノイソブチル酸、４－アミノブチル酸、２－アミノブチル酸、６－アミノヘキサン酸、２－アミノイソブチル酸、３－アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β－アラニン、フルオロ－アミノ酸；β－メチルアミノ酸、Ｃα－メチルアミノ酸、Ｎα－メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸；およびアミノ酸類似体全般が挙げられる。

【０１２５】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチドの産生および回収、ならびに該ポリペプチドの化学合成を含めた各種の方法により産生することができる。一実施形態において、本発明の単離ポリペプチドは、該ポリペプチドを産生するのに有効な条件下で該ポリペプチドを発現可能な細胞を培養し、該ポリペプチドを回収することにより産生される。培養に好ましい細胞は、本発明の組換え細胞である。有効な培養条件としては、それだけに限らないが、有効な培地、バイオリアクター、ポリペプチド産生を可能とする温度条件、ｐＨ条件、および酸素条件が挙げられる。有効な培地とは、そこにおいて細胞を培養して本発明のポリペプチドを産生する任意の培地を指す。このような培地は、同化可能な炭素供給源、窒素供給源、およびリン酸供給源、ならびに適切な塩、鉱物、金属、およびビタミンなど他の栄養素を有する水性培地を含むことが典型的である。本発明の細胞は、従来の発酵型バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロ滴定ディッシュ、およびペトリプレートにおいて培養することができる。培養は、組換え細胞に適切な温度、ｐＨ、および酸素含量で実行することができる。このような培養条件は、当業者の専門技術内にある。

【０１２６】

ポリヌクレオチドおよびその発現

本発明者らによれば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、あるいはセンス方向もしくはアンチセンス方向またはこれら両方の組合せにおける、１本鎖または２本鎖によるこれらの組合せ、ｄｓＲＮＡ、あるいはその他の形を含めた「単離ポリヌクレオチド」とは、その天然状態においてそれが会合するかまたは連結されるポリヌクレオチド配列とは少なくとも部分的に分離されるポリヌクレオチドを意味する。単離ポリヌクレオチドは、これらが天然において会合する他の成分を少なくとも６０％含まないことが好ましく、少なくとも７５％含まないことが好ましく、少なくとも９０％含まないことが最も好ましい。さらに、本明細書において、「ポリヌクレオチド」という用語は、「核酸」および「遺伝物質」という用語と互換的に用いられる。

【０１２７】

ポリヌクレオチドの関連における「外因的な」という用語は、細胞または無細胞発現系内において、その天然状態と比較して変化した量で存在する場合のポリヌクレオチドを指す。一実施形態において、細胞は、天然では該ポリヌクレオチドを含まない細胞である。しかし、細胞は、結果としてコードされるポリペプチドの産生量が変化する、好ましくは増加する非外因性ポリヌクレオチドを含む細胞であり得る。本発明の外因性ポリヌクレオチドには、その中にそれが存在するトランスジェニック（組換え）細胞、または無細胞発現系の他の成分と分離されていないポリヌクレオチドが含まれ、このような細胞または無細胞発現系内において産生されるポリヌクレオチドは、その後、少なくとも一部の他の成分から精製される。外因性ポリヌクレオチド（核酸）は、天然で存在するヌクレオチドの連続的なつながりの場合もあり、接合されて単一のポリヌクレオチドを形成する、異なる供給源（天然および／または合成）に由来する２つ以上のヌクレオチドの連続的なつながりを含む場合もある。このようなキメラポリヌクレオチドは、対象細胞内におけるオープンリーディングフレームの転写を駆動するのに適するプロモーターに作動可能に連結される、本発明のポリペプチドをコードする少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含む。

【０１２８】
本発明は、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号４８、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、および配列番号３９の１つもしくは複数をコードするポリヌクレオチド、および／または配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号４８、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、および配列番号３９の１つもしくは複数をコードするポリヌクレオチドと少なくとも６７％同一のポリヌクレオチドに関する。このようなポリヌクレオチドの例としては、それだけに限らないが、配列番号５２～５７のいずれか１つにおいて示される配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。
【０１２９】
ポリヌクレオチドの％同一性は、ギャップ創出ペナルティ＝５、およびギャップ伸長ペナルティ＝０．３とするＧＡＰ（ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、１９７０）解析（ＧＣＧプログラム）により決定される。別段の言及がない限り、クエリー配列は少なくとも４５ヌクレオチドの長さであり、ＧＡＰ解析では、少なくとも４５ヌクレオチドの領域にわたり２つの配列が整列される。クエリー配列が少なくとも１００ヌクレオチドの長さであり、ＧＡＰ解析では、少なくとも１００ヌクレオチドの領域にわたり２つの配列が整列されることが好ましい。２つの配列がそれらの全長にわたり整列されることが最も好ましい。
【０１３０】
規定されたポリヌクレオチドに関しては、上記に示された数値よりも高値の％同一性の数値が、好ましい実施形態に包含されることが理解される。したがって、適切な場合、％同一性の最小値に照らすと、本発明のポリヌクレオチドは、命名された関連の配列番号と少なくとも９１％、より好ましくは少なくとも９２％、より好ましくは少なくとも９３％、より好ましくは少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、さらにより好ましくは少なくとも９９．９％同一の配列を含むことが好ましい。
【０１３１】
本発明はまた、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号４８、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、および配列番号３９の１つまたは複数をコードするポリヌクレオチドに対して、厳密な条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにも関する。本明細書で用いられる「厳密なハイブリダイゼーション条件」または「厳密な条件」などの用語は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの長さによるハイブリダイゼーション温度の変化を含めた、当技術分野が精通するパラメーターを指す。核酸ハイブリダイゼーションのパラメーターは、このような方法を一括する参考文献であるＳａｍｂｒｏｏｋら（前出）；およびＡｕｓｕｂｅｌら（前出）において見出すことができる。例えば、本明細書で用いられる厳密なハイブリダイゼーション条件とは、ハイブリダイゼーション緩衝液（３．５倍濃度ＳＳＣ、０．０２％フィコール、０．０２％ポリビニルピロリドン、０．０２％ウシ血清アルブミン、２．５ｍＭ　NaH_2PO_4（ｐＨ７）、０．５％ＳＤＳ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ）中における６５℃でのハイブリダイゼーション、および各洗浄ステップを約３０分間とする、６５℃の０．２倍濃度ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中における２回の洗浄を指すことができる。
【０１３２】
本発明の抗体鎖および免疫グロブリン鎖は、組換え発現により産生されることが典型的である。場合によって定常領域に連結される軽鎖可変量異域および重鎖可変領域をコードする核酸は、発現ベクター内に挿入される。軽鎖および重鎖は、同じ発現ベクター内でクローニングすることもでき、異なる発現ベクター内でクローニングすることもできる。免疫グロブリン鎖をコードするＤＮＡセグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を

確保する（１つまたは複数の）発現ベクター内における制御配列に作動可能に連結される。発現制御配列としては、それだけに限らないが、プロモーター（例えば、天然会合プロモーターまたは異種プロモーター）、シグナル配列、エンハンサーエレメント、および転写終結配列が挙げられる。発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換するかまたはトランスフェクションすることが可能なベクター内における真核生物のプロモーター系であることが好ましい。ベクターが適切な宿主内に組み込まれると、該宿主は、ヌクレオチド配列の高レベルの発現、ならびに抗体鎖および／または免疫グロブリン鎖の回収および精製に適する条件下で維持される。

【０１３３】

これらの発現ベクターは、エピソームとして、または宿主染色体ＤＮＡの不可欠な部分として宿主細胞内で複製可能であることが典型的である。一般に、発現ベクターは、所望のＤＮＡ配列により形質転換された細胞の検出を可能とする選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、ネオマイシン耐性、Ｇ４１８耐性、ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）、ＡＤＡ（アデノシンデアミナーゼ）、ＧＳ（グルタミンシンセターゼ））（例えば、Ｕ．Ｓ．４，７０４，３６２を参照されたい）を含有する。

【０１３４】

大腸菌は、本発明のポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ配列）をクローニングするのに特に有用な１つの原核宿主である。使用に適する他の微生物宿主には、枯草菌（Bacillus subtilus）などの桿菌、およびサルモネラ属（Salmonella）、セラチア属（Serratia）などの腸内細菌科（Enterobacteriaceae）、および各シュードモナス属（Pseudomonas）菌種が含まれる。これらの原核宿主ではまた、該宿主細胞に適合する発現制御配列（例えば、複製起点）を含有することが典型的な発現ベクターも作製することができる。加えて、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、ベーターラクタマーゼプロモーター系、Ｔ７プロモーター、またはファージラムダに由来するプロモーター系など、任意の数の各種のよく知られたプロモーターも存在する。プロモーターは、場合によってオペレーター配列により発現を制御し、リボソーム結合部位配列などを有し、転写および翻訳を開始および終結することが典型的である。

【０１３５】

酵母など他の微生物もまた、発現に有用である。サッカロミセス属（Saccharomyces）は、好ましい酵母宿主であり、所望に応じて発現制御配列（例えば、プロモーター）、複製起点、終結配列などを有する適切なベクターを伴う。典型的なプロモーターには、３－ホスホグリセレートキナーゼおよび他の糖分解酵素が含まれる。誘導可能な酵母プロモーターには、特に、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシトクロムＣ、ならびにマルトースおよびガラクトースの使用の一因となる酵素が含まれる。発現に有用な酵母の別の例は、メタノール資化酵母（Pichia pastoris）である。

【０１３６】

微生物に加えて、哺乳動物の組織細胞培養物もまた、本発明の抗体鎖および／または免疫グロブリン鎖を発現および産生するのに用いることができる（例えば、免疫グロブリンまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド）（Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ、「Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ」、ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎ．Ｙ．、Ｎ．Ｙ．（１９８７）を参照されたい）。異種タンパク質（例えば、完全免疫グロブリン）を分泌することが可能な多数の適切な宿主細胞株が当技術分野では開発されており、これには、ＣＨＯ細胞株、各種のＣｏｓ細胞株、ＮＳＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＰｅｒＣ６細胞、ＨｅＬａ細胞、好ましくは骨髄腫細胞株、または形質転換されたＢ細胞もしくはハイブリドーマが含まれるので、真核細胞が実際には好ましい。細胞は非ヒト細胞であることが好ましい。これらの細胞の発現ベクターには、複製起点、プロモーター、およびエンハンサー（Ｑｕｅｅｎら、１９８６）などの発現制御配列、ならびにリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列など、必要なプロセシング情報部位が含まれ得る。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、ＳＶ

４０、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルスなどに由来するプロモーターである（Ｃｏら、１９９２を参照されたい）。

【０１３７】

代替的に、抗体をコードする配列は、トランスジェニック動物のゲノム内への導入およびトランスジェニック動物のミルク中におけるその後の発現のためのトランス遺伝子内に組み込むことができる（例えば、Ｕ．Ｓ．５，７４１，９５７；Ｕ．Ｓ．５，３０４，４８９；およびＵ．Ｓ．５，８４９，９９２を参照されたい）。適切なトランス遺伝子には、カゼインまたはベータラクトグロブリンなど、哺乳動物の腺特異的遺伝子に由来するプロモーターおよびエンハンサーと作動可能に連結される軽鎖および／または重鎖のコード配列が含まれる。

【０１３８】

対象のポリヌクレオチド配列（例えば、重鎖および軽鎖のコード配列ならびに発現制御配列）を含有するベクターは、細胞宿主の種類に応じて変化する、よく知られた方法により宿主細胞内に導入することができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムによるトランスフェクションが一般に用いられる一方、他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理、電気穿孔、リポフェクション、微粒子銃、またはウイルスベースのトランスフェクションを用いることができる（全般的に、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前出を参照されたい）。哺乳動物細胞を形質転換するのに用いられる他の方法には、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、電気穿孔、およびマイクロインジェクションの使用が含まれる。トランスジェニック動物を産生する場合、トランス遺伝子は、受精した卵細胞内にマイクロインジェクトすることもでき、胚性幹細胞のゲノム内に組み込んで、このような細胞の核を除核された卵細胞内に導入することもできる。

【０１３９】

重鎖および軽鎖を個別の発現ベクターでクローニングする場合、該ベクターは、完全免疫グロブリンを発現および構築するように共トランスフェクトされる。発現したら、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ＨＰＬＣ精製、ゲル電気泳動などを含めた、当技術分野の標準的な手順に従い、本発明の全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を精製することができる（全般的に、Ｓｃｏｐｅｓ、「Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ」（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎ．Ｙ．（１９８２））を参照されたい）。

【０１４０】

コンジュゲート

本発明の抗体に直接的または間接的に結合する治療薬にコンジュゲートする該抗体を含むコンジュゲート（免疫コンジュゲート）もまた提供される。治療薬の例としては、それだけに限らないが、細胞毒素、放射性同位体（例えば、ヨウ素１３１、イットリウム９０、またはインジウム１１１）、免疫調節薬、抗血管新生薬、抗新血管形成薬、および／または他の血管形成薬、毒素、抗増殖薬、アポトーシス促進薬、化学療法薬、および治療用核酸が挙げられる。

【０１４１】

細胞毒素には、細胞に対して有害な（例えば、これらを死滅させる）任意の薬剤が含まれる。当技術分野でよく知られたこれらのクラスの薬剤、およびこれらの作用機序の説明については、Ｇｏｏｄｍａｎら、「Ｇｏｏｄｍａｎ　ａｎｄ　Ｇｉｌｍａｎ'ｓ　Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」、第８版、Ｍａｃｍｉｌｌａｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．、１９９０を参照されたい。抗体免疫毒素の調製に関連するさらなる技法は、例えば、Ｖｉｔｅｔｔａ　（１９９３）；およびＵＳ５，１９４，５９４において示されている。

【０１４２】

本発明の免疫コンジュゲートを形成するのに適する治療薬には、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノル

ビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン；代謝拮抗剤（メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、５－フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビンなど）；アルキル化剤（メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、プロカルバジン、マイトマイシンＣ、シスプラチンおよびカルボプラチンなど他の白金誘導体など）；抗生剤（ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ダウノルビシン（旧称ダウノマイシン）、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（ＡＭＣ）など）；ジフテリア毒素および関連分子（ジフテリアＡ鎖およびその活性フラグメントならびにハイブリッド分子など）；リシン毒素（リシンＡ鎖毒素または脱グリコシル化したリシンＡ鎖毒素など）、コレラ毒素、志賀様毒素（ＳＬＴ－Ｉ、ＳＬＴ－ＩＩ、ＳＬＴ－ＩＩＶ）、ＬＴ毒素、Ｃ３毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆ボーマン－バークプロテアーゼ阻害薬、緑膿菌外毒素、アロリン、サポリン、モデクシン、ゲラニン、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファサルシン、シナアブラギリ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolacca americana）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ツルレイシ（Momordica charantia）による阻害薬、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィキナリス（Sapaonaria officinalis）による阻害薬、ゲロニン毒素、マイトゲリン毒素、レストリクトシン毒素、フェノマイシン毒素、およびエノマイシン毒素が含まれる。

【０１４３】

適切な血管新生阻害薬（抗血管新生薬）の例としては、それだけに限らないが、ウロキナーゼ阻害薬；マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬（マリマスタット、ネオバスタット、ＢＡＹ　１２－９５６６、ＡＧ　３３４０、ＢＭＳ－２７５２９１、および類似の薬剤など）；内皮細胞の遊走および増殖に対する阻害薬（ＴＮＰ－４７０、スクアラミン、２－メトキシエストラジオール、コンブレタスタチン、エンドスタチン、アンジオスタチン、ペニシラミン、ＳＣＨ６６３３６（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ　Ｃｏｒｐ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＮＪ）、Ｒ１１５７７７（Ｊａｎｓｓｅｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ，Ｉｎｃ、Ｔｉｔｕｓｖｉｌｌｅ、ＮＪ）、および類似の薬剤など）；血管新生成長因子に対するアンタゴニスト（ＺＤ６４７４、ＳＵ６６６８、血管新生物質および／またはこれらの受容体（ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、およびアンジオポエチン－１など）に対する抗体、サリドマイド、サリドマイド類似体（ＣＣ－５０１３など）、Ｓｕｇｅｎ　５４１６、ＳＵ５４０２、抗血管新生リボザイム（アンジオザイムなど）、インターフェロンα（インターフェロンα２ａなど）、スラミン、および類似の薬剤など）；ＶＥＧＦ－Ｒキナーゼの阻害薬および他の抗血管新生チロシンキナーゼ阻害薬（ＳＵ０１１２４８など）；内皮特異的インテグリン／生存シグナル伝達に対する阻害薬（ビタキシンおよび類似の薬剤など）；銅アンタゴニスト／キレート化剤（テトラチオモリブデート、カプトプリル、および類似の薬剤など）；カルボキシアミドートリアゾール（ＣＡＩ）、ＡＢＴ－６２７、ＣＭ１０１、インターロイキン１２（ＩＬ－１２）、ＩＭ８６２、ＰＮＵ１４５１５６Ｅのほか；血管新生を阻害するヌクレオチド分子（アンチセンスＶＥＧＦ－ｃＤＮＡ、アンジオスタチンをコードするｃＤＮＡ、ｐ５３をコードするｃＤＮＡ、および欠損のあるＶＥＧＦ受容体－２をコードするｃＤＮＡなど）；ならびに類似の薬剤が挙げられる。血管新生、新血管形成、および／または他の血管形成に対する阻害薬の他の例は、抗血管新生ヘパリン誘導体および関連分子（例えば、ヘパリナーゼＩＩＩ）、テモゾロミド、ＮＫ４、マクロファージ遊走阻害因子（ＭＩＦ）、シクロオキシゲナーゼ－２阻害薬、低酸素症誘導因子１に対する阻害薬、抗血管新生大豆イソフラボン、オリチプラズ、フマギリンおよびその類似体、ソマトスタチン類似体、ペントサンポリスルフェート、テコガランナトリ

ウム、ダルテパリン、ツムスタチン、トロンボスポンジン、ＮＭ－３、コンブレスタチン、カンスタチン、アバスタチン、他の関連標的に対する抗体（抗アルファ－ｖ／ベータ－３インテグリンおよび抗キニノスタチンｍＡｂなど）、ならびに類似の薬剤である。

【０１４４】

各種の放射性核種が放射性コンジュゲート抗体の産生に使用可能であり、その例としては、それだけに限らないが、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{90}Ｙ、および^{186}Ｒｅが挙げられる。

【０１４５】

それだけに限らないが、４－（４’アセチルフェノキシ）ブタン酸（ＡｃＢｕｔ）、３－アセチルフェニル酢酸（ＡｃＰａｃ）、４－メルカプト－４－メチル－ペンタン酸（Ａｍｉｄｅ）、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二機能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬなど）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレートなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス－アジド化合物（ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、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）－エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トリエン２，６－ジイソシアネートなど）、およびビス－活性フッ素化合物（１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンなど）、ならびにこれらの誘導体など、各種の二機能性タンパク質結合剤を用いて、抗体および治療薬のコンジュゲートが作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Ｖｉｔｅｔｔａら（１９８７）により記載されるとおりに調製することができる。炭素１４で標識された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ペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体に対する放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的なキレート化剤である（ＷＯ９４／１１０２６）。

【０１４６】

別の実施形態において、抗体は、Ｃ５ａ発現細胞の予めの標的化において用いられる「受容体」（ストレプトアビジンなど）にコンジュゲートすることができ、この場合、抗体－受容体コンジュゲートを患者に投与した後で、除去剤を用いて未結合のコンジュゲートを循環から除去し、次いで、治療薬（例えば、放射性ヌクレオチド）にコンジュゲートする「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。

【０１４７】

一実施形態では、本発明の抗体を用いて、遺伝物質を送達することができる。遺伝物質を当技術分野で知られている任意の技術で抗体にコンジュゲートすることができる。例としては、それだけに限らないが、ビオチン－アビジン間の相互作用、ジスルフィド架橋の形成、アミン結合（例えば、Ｈｅｎｄｒｉｃｋｓｏｎら、１９９５を参照されたい）、チオール結合（例えば、Ｎｉｅｍｅｙｅｒら、２００３を参照されたい）、またはアルデヒド－ヒドラジン間の相互作用（例えば、Ｋｏｚｌｏｖら、２００４を参照されたい）の使用が挙げられる。当技術分野で知られている他の結合剤には、ｍ－マレイミドベンゾイルＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルまたは関連化合物、１－エチル－３－（３－ジエチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）などのカルボジイミド、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、およびグルタルアルデヒド架橋剤が含まれる。

【０１４８】

シグナル伝達アッセイ

Ｃ５ａＲに対する、アゴニストまたはＣ５ａなどのリガンドの結合は、このＧタンパク質共役受容体によるシグナル伝達、およびＧタンパク質の活性のほか、他の細胞内シグナル伝達分子の刺激を結果としてもたらす可能性がある。本発明の抗体の阻害活性は、適切なアッセイにおいてリガンドを用い、リガンドにより誘導される該活性を阻害する抗体の能力を評価して決定することができる。

【０１４９】

ＧＴＰからＧＤＰへの加水分解、または細胞内（細胞質）遊離カルシウム濃度の急速か

つ一過性の上昇の誘導など、受容体の結合により誘発されるその後のシグナル伝達イベントなどのＧタンパク質活性は、当技術分野で知られている方法または他の適切な方法（例えば、Ｎｅｏｔｅら、１９９３；Ｖａｎ　Ｒｉｐｅｒら、１９９３；およびＤａｈｉｎｄｅｎら、１９９４を参照されたい）によりアッセイすることができる。

【０１５０】

ハイブリッドのＧタンパク質共役受容体を用いる、ＵＳ５，２８４，７４６に記載の機能アッセイを用いて、受容体に結合し、Ｇタンパク質を活性化するリガンドの能力をモニタリングすることができる。

【０１５１】

このようなアッセイは、評価される抗体の存在下において実施することができ、知られている方法および／または本明細書に記載の方法を用いて、該リガンドにより誘導される活性を阻害する抗体の能力が決定される。

【０１５２】

走化性および細胞刺激アッセイ

本発明の抗体がＣ５ａＲに対するリガンドの結合を遮断し、かつ／または該受容体に対するリガンドの結合と関連する機能を阻害する能力を評価するには、走化性アッセイもまた用いることができる。これらのアッセイは、化合物（化学誘引物質）により誘導されるｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおける細胞の機能的遊走に基づく。走化性は、例えば、９６ウェルの走化性プレートを用いるか、または走化性を評価するのに当技術分野で認知される他の方法を用いるアッセイにおいて、任意の適切な手段により評価することができる。例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける経内皮走化性アッセイの使用は、Ｓｐｒｉｎｇｅｒら（ＷＯ９４／２０１４２）；およびＢｅｒｍａｎら（１９８８）により説明されている。内皮を隔てたコラーゲンゲル内への遊走もまた説明されている（Ｋａｖａｎａｕｇｈら、１９９１）。走化性アッセイでは、マウスＬ１．２プレＢ細胞または走化性が可能な他の適切な宿主細胞の安定的な形質転換体を用いることができる。

【０１５３】

一般に、走化性アッセイでは、障壁（例えば、内皮、フィルター）内へまたは障壁を介して、障壁の第１の表面から向い側の第２の表面へと、化合物レベルの上昇に向かって方向づけられた適切な細胞（白血球（例えば、リンパ球、好酸球、好塩基球、好中球）など）の移動または遊走がモニタリングされる。フィルター内へまたはフィルターを介して、フィルターの第１の表面から向い側のフィルターの第２の表面へと、化合物レベルの上昇に向かって方向づけられた適切な細胞の移動または遊走がモニタリングされるように、膜またはフィルターが好都合な障壁を提供する。一部のアッセイにおいて、膜は、ＩＣＡＭ－１、フィブロネクチン、またはコラーゲンなど、付着を促進する物質により被覆される。このようなアッセイにより、白血球の「帰巣」についてのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける近似が示される。

【０１５４】

例えば、第１のチャンバーから、微小孔性の膜内へまたはこれを介して、化学誘引物質および試験対象の抗体を含有し、該膜により該第１のチャンバーから分断される、第２のチャンバー内への、適切な容器（手段を含有する）内における細胞の遊走に対する阻害を検出または測定することができる。例えば、ニトロセルロース、ポリカルボネートを含めた、化合物に応答する特異的な遊走をモニタリングするのに適する小孔サイズを有する適切な膜が選択される。例えば、約３～８ミクロン、また好ましくは約５～８ミクロンの小孔サイズを用いることができる。小孔サイズは、フィルター上において、または適切な小孔サイズの範囲内において一様であり得る。

【０１５５】

遊走および遊走の阻害を評価するため、フィルター内への遊走の距離、フィルターを横切り、フィルターの第２の表面に対する付着を保つ細胞の数、および／または第２のチャンバー内に蓄積する細胞の数を、標準的な技法（例えば、顕微鏡およびフローサイトメトリー）を用いて決定することができる。一実施形態では、細胞を、検出可能な標識（例え

ば、放射性同位体、蛍光標識、抗原標識、またはエピトープ標識）により標識し、適切な方法を用いて（例えば、放射能、蛍光、イムノアッセイを検出することにより）膜に付着する標識および／または第２のチャンバー内に存在する標識の存在を決定することにより、抗体の存在下または不在下における遊走を評価することができる。適切な対照と比べて（例えば、抗体の不在下において決定されるバックグラウンドの遊走と比較して、第２の化合物（すなわち、基準化合物）により誘導される遊走の程度と比較して、抗体により誘導されるトランスフェクトされない細胞の遊走と比較して）、抗体アンタゴニストにより誘導される遊走の程度を決定することができる。一実施形態において、特にＴ細胞、単球、またはＣ５ａＲを発現する細胞の場合、経内皮遊走をモニタリングすることができる。この実施形態では、内皮細胞層を介する経内皮遊走が評価される。細胞層を調製するには、場合によって、内皮細胞の付着を促進するように、コラーゲン、フィブロネクチン、または他の細胞外マトリックスタンパク質などの物質により被覆した微小孔性のフィルターまたは膜上において内皮細胞を培養することができる。内皮細胞は、コンフルエントの単層が形成されるまで培養することが好ましい。単層の形成には、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｒｐ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．）など、例えば、静脈内皮細胞、動脈内皮細胞、または毛細血管内皮細胞を含めた各種の哺乳動物内皮細胞が入手可能である。特定の哺乳動物受容体に応答する走化性をアッセイするためには、同じ哺乳動物の内皮細胞が好ましいが、種または属の異なる哺乳動物に由来する内皮細胞もまた用いることができる。

【０１５６】

Ｃ５ａシグナル伝達に対する抗体による阻害薬についての試験に用いられる一実施形態では、遊走およびＣ５ａＲの発現が可能な細胞を含む組成物を第１のチャンバー内に入れることができる。第１のチャンバー内における細胞の走化性を誘導することが可能な（化学誘引物質機能を有する）１つまたは複数のリガンドまたはプロモーターを含む組成物を第２のチャンバー内に入れる。第１のチャンバー内に細胞を入れる少し前、または細胞と同時に、試験対象の抗体を含む組成物を、好ましくは第１のチャンバーに入れることが好ましい。抗体は、受容体に結合し、リガンドまたはプロモーターによる、Ｃ５ａＲを発現する細胞の走化性の誘導を阻害することが可能である。このアッセイにおいて、抗体は、受容体機能の阻害薬（例えば、刺激機能の阻害薬）である。抗体の存在下においてリガンドまたはプロモーターにより誘導される遊走の程度の低減は、阻害活性を示す。別個の結合試験を実施すれば、阻害が受容体に対する抗体の結合の結果であるのか、または異なる機構を介して発生するのかを判定することができるであろう。

【０１５７】

組織内における化合物（例えば、ケモカインまたは抗体）の注射に応答する、組織に対する白血球の浸潤をモニタリングするｉｎ ｖｉｖｏアッセイが、以下（「炎症モデル」を参照されたい）に記載される。これらのｉｎ ｖｉｖｏにおける帰巣モデルでは、炎症部位への移出および走化性により、リガンドまたはプロモーターに応答する細胞の能力が測定され、この移出を遮断する抗体またはそのフラグメントの能力が評価される。

【０１５８】

記載の方法に加えて、受容体を含有する適切な宿主細胞を用いて、活性受容体により誘導される細胞応答をモニタリングすることにより、Ｃ５ａＲの刺激機能に対する抗体の効果を評価することができる。

【０１５９】

本明細書では走化性アッセイについての他の例も記載されており、例えば、実施例４を参照されたい。

【０１６０】

炎症モデル

治療薬としてのｉｎ ｖｉｖｏにおける抗体の効果を評価するのに用い得る、炎症のｉｎ ｖｉｖｏモデルが使用可能である。例えば、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、またはアカゲザルなどの適切な動物内へのケモカインおよびＣ５ａＲ反応性抗体の皮内注

射時における白血球の浸潤をモニタリングすることができる（例えば、Ｖａｎ　Ｄａｍｍｅら、１９９２；Ｚａｃｈａｒｉａｅら、１９９０；Ｊｏｓｅら、１９９４を参照されたい）。

【０１６１】

一実施形態では、白血球（例えば、好酸球、顆粒球）の浸潤について、皮膚生検を組織学的に評価する。別の実施形態では、走化性および溢出が可能な標識された細胞（例えば、Ｃ５ａＲを発現する、安定的にトランスフェクトされた細胞）を動物に投与する。標識された細胞を試験動物に投与する前、これと同時、またはこの後において、評価される抗体を投与することができる。阻害薬の不在下における浸潤の程度と比較した、抗体の存在下における浸潤の程度の低下は、阻害を示す。

【０１６２】

使用

本発明の抗体は、研究への適用、診断的適用、および治療的適用を含めた各種の適用において有用である。

【０１６３】

Ｃ５ａＲは、白血球の輸送において重要な役割を果たす。Ｃ５ａＲは、好中球、好酸球、マスト細胞、マクロファージ、樹状細胞、単球、およびミクログリアを含めた自然免疫系細胞の化学誘引物質受容体であり、このため、抗Ｃ５ａＲ抗体を用いて、白血球遊走、特に、灌流傷害および脳卒中など、好中球による組織傷害、またはアテローム性動脈硬化など、単球を介する障害と関連する白血球遊走を阻害（低減または阻止）することができる。

【０１６４】

本明細書に記載の抗体は、（ａ）受容体に対する結合（例えば、リガンド、阻害剤の）、（ｂ）受容体のシグナル伝達機能、および／または（ｃ）刺激機能を阻害（低減または阻止であり得る）する阻害薬として作用し得る。受容体機能の阻害薬として作用する抗体は、直接的または間接的に（例えば、立体構造変化を引き起こすことにより）リガンド結合を遮断し得る。例えば、抗体は、リガンドの結合を阻害することにより受容体機能を阻害する場合もあり、脱感作（リガンドの結合に対する阻害を伴う場合であれそうでない場合であれ）により受容体機能を阻害する場合もある。

【０１６５】

一態様において、本発明は、対象における障害を治療または予防する方法を提供する。本明細書で用いられる「障害」とは、正常な機能の破壊またはこれに対する干渉である。

【０１６６】

ある実施形態において、障害とは、免疫病理学的障害である。

【０１６７】

免疫病理学とは、免疫学的原因を有する疾患の研究であり、免疫学的疾患とは、抗原に対する抗体の反応により引き起こされる任意の状態である。したがって、「免疫学的障害」とは、抗原に対する抗体の反応から生じる障害と定義することができ、これには、自己免疫疾患および感覚過敏反応（例えば、Ｉ型：アナフィラキシー、蕁麻疹、食物アレルギー、喘息；ＩＩ型：自己免疫性溶血性貧血、血液透析反応；ＩＩＩ型：血清病、壊死性血管炎、糸球体腎炎、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス；ＩＶ型：接触皮膚炎、移植拒絶）が含まれる。

【０１６８】

免疫系が自己反応性リンパ球を発生時において除去できず、その後の調節の破綻により、自己反応性Ｔ細胞クローンまたは自己反応性Ｂ細胞クローンが活性化して、自己抗原に対する体液性反応または細胞媒介性反応が生じ、これにより、細胞および臓器に対する重篤な損傷が引き起こされる場合に、自己免疫疾患は生じる。

【０１６９】

別の実施形態において、障害は、炎症性疾患である。

【０１７０】

炎症は、刺激または傷害に対する身体組織の防護反応であり、急性の場合もあり、慢性の場合もある。したがって、炎症性障害には、サイトカイン放出、ヒスタミン放出、酸化的バースト、食作用、他の顆粒酵素の放出、および走化性が生じる好中球、単球、マスト細胞、好塩基球、好酸球、マクロファージを伴う疾患が含まれる。感覚過敏反応（免疫病理学的障害の下に上記で定義された）は、補体の活性化、および好中球、マスト細胞、好塩基球など、各種の白血球の動員／浸潤を伴うことが多いため、これらもまた炎症性疾患（急性または慢性）と考えることができる。

【０１７１】

したがって、本発明を用いて治療または予防し得るヒトまたは他の動物種の障害としては、それだけに限らないが、

ｉ）虚血／再灌流傷害、再灌流傷害、脳卒中、成人呼吸逼迫症候群（ＡＲＤＳ）、喘息、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アテローム性動脈硬化、関節リウマチ、乾癬、移植拒絶、皮膚または臓器に対する白血球の浸潤を伴う癌、水泡性類天疱瘡、抗リン脂質抗体症候群（ＡＰＳ）など、白血球の遊走および／または白血球の活性化を伴う障害；

ｉｉ）全身炎症反応症候群（ＳＩＲＳ）、敗血症性ショック、内毒素性ショック、アナフィラキシー性ショック、アナフィラキシー、薬剤アレルギー、感覚過敏反応、急性肺傷害などの急性炎症；

ｉｉｉ）乾癬、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、喘息などの慢性炎症；

ｉｖ）全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、関節リウマチ（ＲＡ）、多発性硬化症（ＭＳ）、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、強皮症、糸球体腎炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）、グッドパスチャー症候群、乾癬性関節炎、水泡性類天疱瘡、重症筋無力症、グレーブス病、Ｉ型／若年発症型／インスリン依存型糖尿病、自己免疫性貧血（例えば、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血）（これにはｉ）と重複する例が含まれる）などの自己免疫疾患；

ｖ）ｉ）またはｉｉ）で対象とされない障害のほか、間質性炎症性疾患、脊椎関節症、脊椎炎、血管炎（例えば、壊死性血管炎、皮膚性血管炎、感覚過敏性血管炎、アレルギー性血管炎）、皮膚筋炎、皮膚炎（例えば、アレルギー性接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、湿疹）、アレルギー性鼻炎を含めた炎症性疾患；

ｖｉ）移植拒絶（移植、例えば、同種移植、異種移植の後における）、移植対宿主病（ＧＶＨＤ）など、ｉ）～ｉｉｉ）で対象とされない障害を含めた免疫病理学的障害；

ｖｉｉ）加齢黄斑変性、敗血症、膜性増殖性糸球体腎炎、デンスデポジット病、およびアルツハイマー病を含めた、上記で言及されない他の種類の障害

が挙げられる。

【０１７２】

治療有効量の抗体を投与することが典型的である。「治療有効量」という表現は、対象における治療または他の治療的効果を促進、誘導、および／または増強するのに十分な量を指す。実施例節に記載の「治療有効量」の例は、１０ｍｇ／ｋｇである。

【０１７３】

別の実施形態では、本発明の各種の抗体を用いて、例えば、好中球、単球、および／または受容体遺伝子をトランスフェクトした細胞上におけるＣ５ａＲを検出するか、または受容体の発現を測定することができる。したがって、これらはまた、診断または研究を目的とする細胞分類（例えば、フローサイトメトリー、蛍光活性化による細胞分類）などの適用においても有用である。

【０１７４】

本発明の抗Ｃ５ａＲ抗体は、特に、診断的適用のために、Ｃ５ａＲの存在または不在の検出において価値を有する。典型的には、診断的アッセイは、Ｃ５ａＲに対する抗体またはそのフラグメントの結合から生じる複合体の形成の検出を伴う。診断的目的の場合、抗体または抗原結合フラグメントは、標識される場合もあり、未標識の場合もある。抗体またはフラグメントは、直接的に標識することができる。それだけに限らないが、放射性核

種、蛍光物質、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、およびリガンド（例えば、ビオチン、ヘプテン）が含まれる各種の標識を用いることができる。当業者には、多数の適切なイムノアッセイが知られている（例えば、ＵＳ３，８１７，８２７；同３，８５０，７５２；同３，９０１，６５４；および同４，０９８，８７６を参照されたい）。本発明の診断法では、組織試料の免疫組織化学もまた用いることができる。未標識の場合、抗体またはフラグメントは、例えば、凝集アッセイにおけるとおり、適切な手段を用いて検出することができる。未標識の抗体またはフラグメントはまた、第１の抗体（例えば、未標識の免疫グロブリンに特異的な抗イディオタイプ抗体または他の抗体）または他の適切な試薬（例えば、標識されたプロテインＡ）と反応性の標識された抗体（例えば、第２の抗体）など、抗体を検出するのに用い得る別の（すなわち、１つまたは複数の）適切な試薬との組合せでも用いることができる。

【０１７５】

造影剤については、用い得る任意の適切な薬剤としては、それだけに限らないが、ＭＲＩ剤、ＣＴ造影剤、光学造影剤、超音波造影剤、ｐａｒａＣＥＳＴ造影剤、およびこれらの組合せが挙げられる。ある実施形態において、該薬剤は、プロトンベースのＭＲＩ、またはスカンジウム、チタニウム、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、モリブデン、ルテニウム、セリウム、インジウム、プラセオジミウム、ネオジミウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、およびイッテルビウムからなる群から選択される常磁性金属キレートを含むｐａｒａＣＥＳＴ剤である。さらなる実施形態において、該薬剤は、ヨウ素化油ナノ粒子または封入型固体金属粒子を含むＣＴ造影剤であり得る。本発明に有用な造影剤のさらなる例は、ＰＦＯＢまたは他のフッ素ベースのＭＲＩ剤など、ハロカーボンベースのナノ粒子である。

【０１７６】

生物学的試料中におけるＣ５ａＲタンパク質の存在を検出するのに用いられるキットもまた調製することができる。このようなキットは、Ｃ５ａＲに結合する本発明の抗体のほか、該抗体またはフラグメントとＣ５ａＲとの間における複合体の存在を検出するのに適する１つまたは複数の補助試薬も包含し得る。本発明の抗体組成物は、単独の、または他のエピトープに特異的なさらなる抗体と組み合わせた凍結乾燥形態で提供することができる。標識される場合もあり未標識の場合もある抗体は、付属成分（例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、および炭酸緩衝液などの緩衝液、安定化剤、賦形剤、殺生物剤、および／または不活性タンパク質、例えば、ウシ血清アルブミン）を伴うキット内に包含され得る。例えば、付属成分との凍結乾燥混合物として抗体を提供することもでき、付属成分を別個に提供して使用者が混合することもできる。一般に、これらの付属物質は、活性抗体量に基づく約５％未満の重量で存在し、通常、抗体濃度に基づく重量による少なくとも約０．００１％の総量で存在する。該抗体に結合可能な第２の抗体を用いる場合、このような抗体はキット内、例えば、別個のバイアルまたは容器内において提供することができる。存在する場合、第２の抗体は、標識されることが典型的であり、本明細書に記載の抗体製剤と類似の形で処方することができる。

【０１７７】

組成物および投与方式

投与される本発明の抗体の製剤は、選択される投与経路および組成物の性質（例えば、溶液、エマルジョン、カプセル）によって異なる。投与される本発明の抗体を含む適切な医薬組成物は、生理学的に許容される担体中において調製することができる。抗体の混合物もまた用いることができる。溶液またはエマルジョンの場合、適切な担体には、例えば、水溶液、アルコール／水溶液、生理食塩液および緩衝媒体を含めたエマルジョンまたは懸濁液が含まれる。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または固定油が含まれ得る。水、緩衝水、緩衝生理食塩液、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、デキストロース溶液、およびグリシンを含めた各種の

適切な水性担体が当業者に知られている。静脈内媒体には、各種の添加剤、防腐剤、または流体、栄養素もしくは電解質補給剤が含まれ得る（全般的に、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ」、第１６版、Ｍａｃｋ編、１９８０を参照されたい）。組成物は、場合によって、ｐＨ調整剤およびｐＨ緩衝剤、ならびに毒性調整剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および乳酸ナトリウムなど、生理学的状態を近似するのに必要とされる薬学的に許容される補助物質を含有し得る。

【０１７８】

本発明の抗体は、当技術分野で知られている凍結乾燥法および再構成法により、凍結乾燥させて保管し、使用前に適切な担体中で再構成することができる。選択された媒体中における（１つまたは複数の）有効成分の最適濃度は、当業者によく知られた手順により経験的に決定することができ、これは、所望される最終的な医薬製剤に依存する。吸入の場合、抗体またはフラグメントは、溶解させ、投与に適する分注器（例えば、噴霧器（atomizer、nebulizer）、または高圧エアゾール分注器）内に充填することができる。

【０１７９】

治療される疾患または状態に応じて、必ずしもそれだけに限らないが、経口投与、食餌投与、局所投与、非経口投与（例えば、静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、皮下注射）、吸入投与（例えば、気管支内投与、眼内投与、鼻腔内投与、または経口吸入、鼻腔内滴下）を含めた各種の投与経路が可能である。他の適切な投与法にはまた、充電式デバイスまたは生体分解性デバイスおよび徐放ポリマーデバイスも含まれる。

【０１８０】

本発明の医薬組成物はまた、他の薬剤との組合せ療法の一部としても投与することができる。このような他の療法／薬剤は、当業者によく知られている。一実施形態において、障害は、関節リウマチであり、他の治療薬は、それだけに限らないが、アザチオプリン、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、シクロスポリン、Ｄ－ペニシラミン、金塩（金チオリンゴ酸ナトリウム、アウラノフィン）、レフルノミド、メトトレキサート、ミノサイクリン、スルファサラジンおよびシクロホスファミドおよびグルココルチコステロイドを含めたＡＴＣコードＭ０１Ｃクラスの抗リウマチ薬、およびＡＴＣコードＬ０４クラスの免疫抑制薬から選択される。別の実施形態において、障害は、全身性エリテマトーデスであり、他の治療薬は、それだけに限らないが、アザチオプリン、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、シクロスポリン、Ｄ－ペニシラミン、金塩（金チオリンゴ酸ナトリウム、アウラノフィン）、レフルノミド、メトトレキサート、ミノサイクリン、スルファサラジンおよびシクロホスファミド、グルココルチコステロイド、マイコフェノール酸またはマイコフェノレート、およびタクロリムスを含めたＡＴＣコードＭ０１Ｃクラスの抗リウマチ薬、およびＡＴＣコードＬ０４クラスの免疫抑制薬から選択される。別の例において、本発明の抗体はまた、他の抗体と組み合わせて（例えば、それだけに限らないが、ＣＣＲ２およびＣＣＲ３を含めたケモカイン受容体に結合する抗体と組み合わせて）、または抗ＴＮＦ薬、または他の抗炎症薬、または予防的もしくは治療的処置において用いられる、市販のガンマグロブリン製品および免疫グロブリン製品など、既存の血漿製品と組み合わせても用いることができる。本発明の抗体は、抗生剤および／または抗微生物薬と共に施される、個別投与の組成物として用いることができる。

【０１８１】

本発明の抗体を投与するための用量範囲は、免疫病理学的疾患の症状を改善するか、または感染症の可能性もしくは免疫系の過剰刺激を軽減する所望の効果をもたらすのに十分な高用量である。用量は、過粘稠度症候群、肺浮腫、うっ血性心不全などの有害な副作用を引き起こすほどの高用量ではないものとする。一般に、用量は、患者における年齢、状態、性別、および疾患の程度により異なり、当業者により決定され得る。用量は、合併症がある場合、個々の医師により調整され得る。用量は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約３００ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約０．２ｍｇ／ｋｇ～約２００ｍｇ／ｋｇ、またより好ましくは約０．５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇで変化し得る。用量の投与は、毎日、毎週、もしく

は隔週、または必要と判定される他の任意の頻度のほか、毎日複数回でもあり得、慢性疾患の場合、投与は、何カ月間（またはさらに何年間）にもわたり継続され得る。

【０１８２】

本発明の抗体は、該抗体をコードする配列を含む核酸分子を投与することにより、対象内に導入し得ることを当業者は理解するであろう。核酸分子は、ＤＮＡまたはＲＮＡの形態の場合もあり、ＤＮＡおよびＲＮＡの両方を含むキメラ分子の場合もある。抗体をコードする（１つまたは複数の）ヌクレオチド配列は、該薬剤をコードする配列が発現制御エレメントと作動可能に連結される発現ベクター内にクローニングすることができる。発現制御エレメントは当技術分野においてよく知られており、これには例えば、プロモーター、エンハンサー、ならびに適切な開始コドンおよび終始コドンが含まれる。

【０１８３】

ｉｎ　ｖｉｖｏの標的細胞内に抗体をコードする核酸を導入するには、各種の方法を用いることができる。例えば、裸の核酸を標的部位に注射することもでき、これをリポソーム内に封入することもでき、ウイルスベクターを介してこれを導入することもできる。

【０１８４】

ＴＳＰ－１をコードする核酸をｉｎ　ｖｉｖｏの非分裂細胞または分裂細胞内へと安定的に遺伝子導入するには、単独の、または例えば、カチオンリポソーム内に封入した核酸分子の直接的な注射を用いることができる（Ｕｌｍｅｒら、１９９３）。加えて、粒子照射法を用いて、ｉｎ　ｖｉｖｏの各種の組織内に核酸を導入することもできる（Ｗｉｌｌｉａｍｓら、１９９１）。

【０１８５】

抗体をコードする核酸分子をｉｎ　ｖｉｖｏにおける特定の細胞型内へと遺伝子導入するには、ウイルスベクターが有用である。ウイルスは、特定の細胞型内において感染および増殖し得る特殊な感染性作用物質である。特定の細胞型に感染するこの特異性は、選択されたｉｎ　ｖｉｖｏにおける細胞を抗体の標的とするのにとりわけ適する。ウイルスベクターの選択は、標的とされる細胞型に部分的に依存する。

【０１８６】

当技術分野では、特定の細胞型を標的とし得る特殊なウイルスベクターがよく知られている。このようなベクターには、例えば、一般的プロモーターまたは組織特異的プロモーターを有する組換えアデノ関連ウイルスベクターが含まれる（ＵＳ５，３５４，６７８）。組換えアデノ関連ウイルスベクターは、該組換えウイルスを、増殖しない休眠細胞のクロマチン内にも安定的に組み込み得るというさらなる利点を有する（Ｌｅｂｋｏｗｓｋｉら、１９８８）。

【０１８７】

組織特異的なプロモーターまたはエンハンサーをベクター内に組み込むことにより、コードされる抗体を発現する細胞型をさらに制御するようにウイルスベクターを構築することができる（Ｄａｉら、１９９２）。

【０１８８】

レトロウイルスベクターもまた、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて抗体をコードする核酸分子を送達する方法に適する。このようなベクターは、感染性粒子として機能する可能性もあり、初回１回だけの感染ラウンドを経過する非感染性粒子として機能する可能性もある。

【０１８９】

架橋形成分子を介して核酸分子と非共有結合的に複合体化する組織特異的なリガンドまたは抗体を用いて、抗体をコードする核酸分子を組織特異的な形で細胞内に送達するには、受容体を介するＤＮＡ送達法もまた用いることができる（Ｃｕｒｉｅｌら、１９９２；ＷｕおよびＷｕ、１９８７）。

【０１９０】

対象内において抗体を発現させる遺伝子導入はまた、例えば、ｅｘ　ｖｉｖｏにおける自己細胞のトランスフェクションによっても実施することができる。血液細胞は、当技術分野でよく知られた方法による操作および対象内への再導入に容易に使用可能であるため

、このようなｅｘ　ｖｉｖｏにおけるトランスフェクションに適する細胞にはこれらの細胞が含まれる。

【０１９１】

ｅｘ　ｖｉｖｏにおける細胞のトランスフェクションを介する遺伝子導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿、ジエチルアミノエチルデキストラン、電気穿孔、リポフェクション、またウイルス感染を含めた各種の方法により実施することができる。このような方法は、当技術分野においてよく知られている（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇｓ　Ｈａｒｂｏｕｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）を参照されたい）。細胞は、トランスフェクトされると、治療される対象内に再移植（ｔｒａｎｓｐｌａｎｔまたはｇｒａｆｔ）される。体内に導入された細胞は、抗体を産生することが可能であり、これが循環内に入り、疾患または状態の部位において血小板の凝集を阻害し得る。

【実施例１】

【０１９２】

ヒト化プロセス

ＣＤＲおよびフレームワークの残基を規定する

抗体のＣＤＲおよびフレームワーク領域は、通常、Ｋａｂａｔ、ＣｈｏｔｈｉａまたはＩＭＧＴ（ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ　ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ（登録商標）ｈｔｔｐ：／／ｉｍｇｔ．ｃｉｎｅｓ．ｆｒ）などの種々の番号付けスキームに従って定義される。Ｋａｂａｔの定義は、配列可変性に基づき、最も一般に使用されるものである。しかし、Ｋａｂａｔにより規定されるような所与の抗体に関するＣＤＲは、他の番号付けシステムによって規定されるＣＤＲと必ずしも同一ではない。２つの番号付けシステムによって規定されたＣＤＲは重複してもよく、一方が他方のいずれかの側に数残基伸びてもよい。

【０１９３】

本発明者らは、ＫａｂａｔおよびＩＭＧＴの番号付けシステムの組合せを使用して、可変（Ｖ）ドメイン中のＣＤＲおよびフレームワーク領域を規定した。本発明者らは、抗原結合ポケットの構造を保存するために、ヒトフレームワーク中に移植されたマウスＣＤＲ配列の範囲を最大化することを望んだ。そこで、Ｃ５ａＲ抗体のＣＤＲは、ＫａｂａｔおよびＩＭＧＴの両方の番号付けシステムによってＣＤＲとして分類されたすべての残基を含んだ。残りの配列は、Ｖドメインフレームワークを含んだ。

【０１９４】

適切なヒト抗体フレームワーク配列を選択する

マウスＣＤＲを移植する適切なヒト抗体フレームワーク配列を選択するために、本発明者らは、多数のストラテジーを使用した：

ｉ）配列データベースのＢｌａｓｔ検索により、マウスＣ５ａＲ抗体に対して最高の相同性を有するヒトＩｇ　Ｖ領域の軽鎖および重鎖の配列を同定した。最も相同性が高い配列をアラインさせ、軽鎖および重鎖についてコンセンサスフレームワーク配列を作製した。

ｉｉ）マウスＣ５ａＲ抗体の重鎖または軽鎖に対して高い相同性を有する既知のヒト抗体を同定し、Ｖ領域フレームワーク（または改変バージョン）を使用して、マウスＣ５ａＲ抗体のＣＤＲを移植した。

ｉｉｉ）マウスＣ５ａＲ抗体に類似するフレームワーク配列を利用する他の成功したヒト化抗体を同定し、マウスＣＤＲをこれらのフレームワークに移植した。

【０１９５】

配列データベースから相同な抗体を選択する

マウスＣ５ａＲ抗体、７Ｆ３可変領域アミノ酸配列（重鎖および軽鎖の両方、配列番号１および２を参照のこと）を、ＳＷＩＳＳＰＲＯＴおよびＧｅｎｂａｎｋデータベース中のヒト免疫グロブリンのＢｌａｓｔｐ検索においてクエリー配列として個々に使用した。

【０１９６】
マウス７Ｆ３可変領域ＤＮＡ配列（重鎖および軽鎖の両方をコードする、配列番号３および４を参照のこと）を、ヒト免疫グロブリン遺伝子のＩＭＧＴデータベースのＢｌａｓｔ検索においてクエリー配列として個々に使用した。
【０１９７】
クエリー配列に対して最高の相同性を有する配列のリストを、各検索から作製した（表２および３）。
【０１９８】
【表２】

表2:マウスC5aR mAb可変軽鎖に対して相同なヒト配列

クエリー	データベース	配列ID	説明	スコア
マウス7F3 Vk のアミノ酸	SWSS_PROT	KV2F HUMAN	Ig κ鎖V-II: RPMI6410	181.0
		KV2D HUMAN	Ig κ鎖V-II: TEW	181.0
		KV2E HUMAN	Ig κ鎖V-II: GM607	176.0
		KV2B HUMAN	Ig κ鎖V-II: FR	173.0
		KV2A HUMAN	Ig κ鎖V-II: CUM	169.0
		KV2C HUMAN	Ig κ鎖V-II: MIL	166.0
		KV4C HUMAN	Ig κ鎖V-IV: B17	150.0
		KV4A HUMAN	Ig κ鎖V-IV: LEN	150.0
		KV4B HUMAN	Ig κ鎖V-IV: JI	148.0
		KV3D HUMAN	Ig κ鎖V-III: TI	138.0
マウス7F3 Vk DNA	IMGTヒトIg V遺伝子	U416644	IGKV2D-29*02	993
		M31952	IGKV2D-29*01	984
		X63396	IGKV2-29*01	984
		U41645	IGKV2-29*02	975
		X12691	IGKV2D-28*02	975

【０１９９】
コンセンサスフレームワーク配列－軽鎖７Ｆ３
７Ｆ３軽鎖ＣＤＲを移植するための軽鎖ヒトフレームワークコンセンサス配列を、表２中の以下の配列をアラインさせることによってＣｌｕｓｔａｌＷを用いて生成した：ＫＶ２Ｆ＿ＨＵＭＡＮ、ＫＶ２Ｄ＿ＨＵＭＡＮ、ＫＶ２Ｅ＿ＨＵＭＡＮ、ＫＶ２Ｂ＿ＨＵＭＡＮ、ＫＶ２Ａ＿ＨＵＭＡＮおよびＤＮＡ配列Ｘ１２６９１、Ｕ４１６４５、Ｕ４１６４４、Ｍ３１９５２のアミノ酸翻訳。このアラインメントおよびコンセンサス配列を図１中に示す。このヒトコンセンサスフレームワークは、マウスＣ５ａＲ抗体７Ｆ３軽鎖フレームワーク配列に対して８６％同一であった。
【０２００】

【表３】

表3:マウスC5aR mAb可変重鎖に対して相同なヒト配列

クエリー	データベース	配列ID	説明	スコア
マウス7F3 Vhアミノ酸(V遺伝子領域)	SWSS_PROT	HV1C HUMAN	Ig重鎖V-I: ND	142.0
		HV1B HUMAN	Ig重鎖V-I: HG3	138.0
		HV1G HUMAN	Ig重鎖V-I: V35	134.0
		HV3J HUMAN	Ig重鎖V-III: HIL	130.0
		HV1A HUMAN	Ig重鎖V-I: EU	127.0
		HV3G HUMAN	Ig重鎖V-III: CAM	123.0
		HV3K HUMAN	Ig重鎖V-III: KOL	122.0
		HV3H HUMAN	Ig重鎖V-III: GA	122.0
		HV1H HUMAN	Ig重鎖V-I: DOT	120.0
		HV1F HUMAN	Ig重鎖V-I: MOT	120.0
マウス7F3 Vhアミノ酸(J遺伝子領域)	SWISS-PROT	HV3K HUMAN	Ig重鎖V-III: KOL	29.0
		HV2I HUMAN	Ig重鎖V-II: ARH-77	28.2
		HV1C HUMAN	Ig重鎖V-I: ND	28.2
		HV3T HUMAN	Ig重鎖V-III: GAL	27.8
		HV3H HUMAN	Ig重鎖V-III: GA	27.8
マウス7F3 Vh DNA(V遺伝子領域)	IMGTヒトIg V遺伝子	Z12305	IGHV1-f*01	777
		M99642	IGHV1-24*01	768
		L06612	IGHV1-46*03	750
		J00240	IGHV1-46*02	750
		X92343	IGHV1-46*01	750

【０２０１】

コンセンサスフレームワーク配列－重鎖７Ｆ３

７Ｆ３重鎖ＣＤＲを移植するためのコンセンサスヒトフレームワーク配列を、以下のように作製した：

ａ）Ｖ領域アミノ酸配列ＨＶ１Ｃ＿ＨＵＭＡＮ、ＨＶ１Ｂ＿ＨＵＭＡＮ、ＨＶ１Ｇ＿ＨＵＭＡＮおよびＨＶ１Ａ＿ＨＵＭＡＮならびにＶ遺伝子配列Ｘ９２３４３、Ｘ６２１０９、Ｍ９９６４１、Ｍ９９６４２およびＺ１２３０５のアミノ酸翻訳を、ＣＬＵＳＴＡＬＷを使用してアラインさせ、コンセンサスＶ領域フレームワーク配列を生成した。

ｂ）Ｊ領域アミノ酸配列ＨＶ３Ｋ＿ＨＵＭＡＮ、ＨＶ２Ｉ＿ＨＵＭＡＮ、ＨＶ１Ｃ＿ＨＵＭＡＮ、ＨＶ３Ｈ＿ＨＵＭＡＮおよびＨＶ３Ｔ＿ＨＵＭＡＮを、ＣＬＵＳＴＡＬＷを使用してアラインさせ、コンセンサスＪ領域フレームワーク配列を生成した。

【０２０２】

これらのアラインメントおよびコンセンサス配列を図２に示す。

【０２０３】

相同なヒト化抗体を選択する

他の適切なフレームワーク配列を、マウス抗体配列と最も近く一致する成功したヒト化抗体に関する文献を検索することによって選択した。

【０２０４】

２つの軽鎖フレームワーク配列を、７Ｆ３軽鎖ＣＤＲを移植するために同定した：

・Ｃａｌｄａｓら（２００３）に記載されたＫＶ２Ｆベースの配列

・Ｎｉｓｉｈａｒａら（２００１）に記載されたＨｕＶＬ－１９ベースの配列

【０２０５】

７Ｆ３重鎖ＣＤＲを移植するために同定された重鎖フレームワーク配列は以下のとおりであった：

・　Ｃａｌｄａｓら（２０００）に記載されたＨＧ３ベースの配列

・　Ｎｉｓｉｈａｒａら（２００１）に記載されたＳＧＩ－ＶＨベースの配列

【０２０６】
フレームワーク配列へのＣＤＲの移植ならびにヒト化軽鎖配列および重鎖配列の作製
ヒト化７Ｆ３軽鎖
３つのバージョンのヒト化７Ｆ３軽鎖可変領域を作製した。
【０２０７】
第１のヒト化７Ｆ３軽鎖可変領域は、図１からコンセンサスヒトフレームワーク配列を取得し、この配列をマウス７Ｆ３フレームワーク配列と比較し、ヒトフレームワーク中の選択されたアミノ酸をマウス残基に逆変化させ、次いでマウス７Ｆ３軽鎖ＣＤＲに移植することによって設計した（図３）。マウス配列に逆変化させるために選択したヒトフレームワーク中の残基は以下のとおりであった：＃２でＩｌｅからＶａｌ、＃１５でＰｒｏからＬｅｕおよび＃９２でＴｙｒからＰｈｅ。最初の２つの変化は、マウスにおいて見出された残基が、マウス７Ｆ３に対して最も相同性が高いヒト配列（すなわち、ＫＶ２Ｆ＿ＨＵＭＡＮ）中のアミノ酸と一致したために行った。３番目の変化は、ＣＤＲ３に近いこと、および抗体結合領域の構造への変化を最小化する必要性に起因して、行った。マウス７Ｆ３軽鎖ＣＤＲを、改変されたコンセンサスフレームワーク配列中に移植して、配列ｈ７Ｖｋ（図３）（配列番号３１）を作製した。
【０２０８】
第２のヒト化７Ｆ３軽鎖可変領域は、マウス７Ｆ３軽鎖ＣＤＲをヒト化ＨｕＶＬ－１９フレームワーク配列、ＲＮＯＫ２０３ＶＬ、上記（図４）に移植することによって作製した。これにより、配列ｈ７ａＶｋ（図４）（配列番号３２）が得られた。
【０２０９】
第３のヒト化７Ｆ３軽鎖可変領域は、マウス７Ｆ３軽鎖ＣＤＲをＫＶ２Ｆ由来のフレームワーク配列ＶＬＣＤ１８－Ｑ、上記（図５）に移植することによって作製した。ＫＶ２Ｆ＿ＨＵＭＡＮフレームワーク配列（図１および配列番号５を参照のこと）と比較して、２つのアミノ酸を、マウス７Ｆ３配列に逆変化させた：＃５１ではＡｒｇからＬｅｕに変化して、２番目の荷電残基が除去された。このとき、マウスにおいてはただ１つの変異が存在し、＃１０９でＶａｌからＬｅｕであった。さらなる１つの差異は、嵩高い側鎖を除去する、残基＃１０５でのＧｌｎからＧｌｙへの変化である。これにより、配列ｈ７ｂＶｋ（図５）（配列番号３３）が得られた。
【０２１０】
作製された３つのヒト化７Ｆ３　Ｖｋ配列の比較を図６に示す。これらの配列は、フレームワーク領域中の２～５の位置でコンセンサス配列ｈ７Ｆ３　ＶｋＣｏｎｓから変化しており、これは、これらすべてが互いに９３％同一であることを意味する。以下に示すデータは、特定の軽鎖を含むヒト化７Ｆ３抗体が、他のものよりも好ましいことを示している。特に、ＣＤＲループＬ１とＬ２との間の残基が重要であり、この領域中での特定の変化は有害な影響を有し得る（例えば、残基＃４１でのＣｙｓ残基の導入）。さらなる荷電残基の導入などの他の変化は、相対的な影響をほとんど有さなかった。これらの変化を含む抗体の特性に対して有害でない他の変化が、ヒト化７Ｆ３　Ｖｋ配列に対してなされ得る。
【０２１１】
ヒト化７Ｆ３重鎖
３つのバージョンのヒト化７Ｆ３重鎖可変領域を作製した。
【０２１２】
第１のヒト化７Ｆ３重鎖可変領域は、図２からコンセンサスヒトフレームワーク配列を取得し、この配列をマウス７Ｆ３フレームワーク配列と比較し、ヒトフレームワーク中の選択されたアミノ酸を変化させ、次いでマウス７Ｆ３重鎖ＣＤＲに移植することによって設計した（図７）。ヒトコンセンサスフレームワーク中の変更させた残基は以下のとおりであった：＃２０でＩｌｅに、＃４３でＬｙｓに（荷電残基を保持するため）、＃７２でＡｌａに（荷電残基を除去するため）、＃９１でＳｅｒに、および＃９５でＰｈｅに。これらの残基はマウスフレームワークと同じであったが、少なくとも１つのヒトＩｇ配列中

にも見出された。さらに、Ｆ３中の比較的あいまいな領域を、この時点でＨＶ１Ａｖ配列を選択することによって解消し、こうして残基＃７０でＩｌｅを、＃７４でＧｌｕを組み込んだ。マウス７Ｆ３重鎖ＣＤＲを改変されたコンセンサスフレームワーク配列中に移植することにより、配列ｈ７Ｖｈ（図７）（配列番号３４）を作製した。

【０２１３】

第２のヒト化７Ｆ３重鎖可変領域は、マウス７Ｆ３重鎖ＣＤＲをＳＧＩ－ＶＨ由来のフレームワーク配列、上記（図８）に移植することによって作製した。ＳＧＩ－ＶＨフレームワーク中の６つの位置で、ヒト残基をマウス７Ｆ３残基に変化させた。これらの変化は、残基＃３８（ＡｒｇからＬｙｓ）、＃４８（ＶａｌからＩｌｅ）、＃６７（ＡｒｇからＬｙｓ）、＃６８（ＶａｌからＡｌａ）、＃７２（ＬｅｕからＡｌａ）および＃７７（ＡｓｎからＳｅｒ）で行った。これらの残基がＣＤＲのＨ１またはＨ２に密に近接しており、結合ポケットの形成に重要であると考えられたために、これらの変化を行った。例えば、配列ＲＮＯＫ２０３ＶＨを作製するためのＳＧＩ－ＶＨ中のこれらの位置での逆変異は、ヒト化抗ＦａｓＬ抗体の中和活性を改善することが示されている（Ｎｉｓｉｈａｒａら、２００１）。これにより、配列ｈ７ａＶｈ（図８）（配列番号３５）が得られた。

【０２１４】

第３のヒト化７Ｆ３重鎖可変領域は、マウス７Ｆ３軽鎖ＣＤＲをＨＧ３由来のフレームワーク配列、上記（図９）に移植することによって作製した。ＨＧ３フレームワーク中の１つの位置、残基＃７１（Ａｒｇ）を、マウス７Ｆ３残基（Ａｌａ）に逆変異させて、正に荷電した残基を除去した。これにより、配列ｈ７ｂＶｈ（図９）（配列番号３６）が得られた。

【０２１５】

作製された３つのヒト化７Ｆ３　Ｖｈ配列の比較を図１０に示す。これらの配列は、フレームワーク領域中の１～８の位置でコンセンサス配列ｈ７Ｆ３ＶｈＣｏｎｓから変化しており、これは、これらすべてが互いに９０％同一であることを意味する。配列間のいくつかの重要な差異には、残基＃４３でのＬｙｓ対Ｇｌｎおよび＃７４でのＧｌｕ対Ｔｈｒが含まれる。しかし、以下に示すデータは、３つの重鎖のいずれかを含むヒト化７Ｆ３抗体が、ヒトＣ５ａＲへのＣ５ａの結合を遮断するのに有効であることを示している。従って、Ｖｈ配列間の差異は重要でないと思われ、このような改変配列を含む抗体の特性に有害でない他の変化が、ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ配列になされ得る。それにもかかわらず、ヒト化７Ｆ３　Ｖｈ配列になされた特定の置換は抗体の特性を改善し得る可能性があり、他の置換は有害である可能性がある。

【０２１６】

分子モデリング

背景

抗体結合部位のモデリングは、タンパク質相同性モデリング（多数の抗体構造が既知のデータベースとして機能し得る）とａｂ　ｉｎｉｔｉｏモデリング（相同性法を適用するにはあまりに可変すぎる抗体の部分のために使用すべきもの）との組合せである。可変フラグメント（Ｆｖ）フレームワーク領域（ＦＷ）の大多数は、種々の抗体間で構造が十分保存されている。特にβ鎖で生じるバリエーションを考慮した後、このフレームワークは、モデリングするＦｖに配列が最も近い既知の構造の選択によって、モデリングできる。

【０２１７】

抗体中のほとんどの配列および構造の可変性は、抗原に結合する超可変領域（ＣＤＲ）に制限される。これら６つのループ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｈ１、Ｈ２およびＨ３）は抗体表面に位置し、これらのＣＤＲのモデリングは最大の困難となっている。Ｈ３以外のすべてのＣＤＲは、通常、２～６の構造的（カノニカル）クラスのうち１つに入る（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、１９８７；Ｃｈｏｔｈｉａら、１９８９）。カノニカルクラスのメンバーは、すべてほぼ同じ骨格コンフォメーションを有する。つまり、未知のＣＤＲをモデリングするためには、配列を試験し、適切なカノニカルクラスを割り当て、最も配列が相同な既知のＣＤＲを使用する。Ｈ３ループは、構造間でコンフォメーションがかなり

異なるため、モデリングがより困難である。

【０２１８】

現在の抗体モデリング方法は通常、相同性アプローチをとっている（例えば、Ｐｕｌｉｔｏら、１９９６；Ｅｉｇｅｎｂｒｏｔら、１９９３；Ｂａｒｒｙら、１９９４を参照のこと）。ＷＡＭ（Ｗｅｂ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｍｏｄｅｌｌｉｎｇ、ｈｔｔｐ：／／ａｎｔｉｂｏｄｙ．ｂａｔｈ．ａｃ．ｕｋを参照のこと）が使用するアルゴリズムは、既知の抗体構造のデータベースから選択された、モデリングする配列に対して最も配列が相同なフレームワークおよびカノニカルＣＤＲループを使用する。

【０２１９】

ノンカノニカルループには、異なる方法が使用される。これはＭａｒｔｉｎら（１９８９）のＣＡＭＡＬ（Ｃｏｍｂｉｎｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｍｏｄｅｌｌｉｎｇ　Ａｌｇｏｒｉｔｈｍ）であり、データベース／コンフォメーション検索の組合せからなる。

【０２２０】

モデル作製

ＷＡＭを使用して、マウス７Ｆ３　Ｆｖ領域（重鎖および軽鎖の両方を有する）のモデルならびにヒト化７Ｆ３　Ｆｖ領域のモデルを作製した。

【０２２１】

本発明者らは、ヒト化７Ｆ３の重鎖および軽鎖のそれぞれについていくつかの配列変異体を作製していたので、ヒト化Ｆｖ領域の多数のモデルを作成した（それぞれ、１つのＶ領域軽鎖およびＶ領域重鎖を含む）。各ヒト化Ｆｖモデルをマウス７Ｆ３　Ｆｖ構造と比較し、ＣＤＲの構造をＤｅｅｐＶｉｅｗ／ＳＷＩＳＳ－ＰｄｂＶｉｅｗｅｒを使用して詳細に比較した。２つの構造間の差異を強調した。例えば、ｈ７Ｖｋ－ｈ７Ｖｈ構造を７Ｆ３　Ｆｖ構造と比較したとき、７Ｆ３　Ｖｋへのｈ７Ｖｋ軽鎖の一致は非常に良好であり、ほぼ同一であったが、重鎖ＣＤＲ　Ｈ２およびＨ３は密にアラインしなかった。対照的に、ｈ７ａＶｋ－ｈ７ａＶｈ配列を含む別のモデルにおいて、７Ｆ３　Ｖｈとの重鎖アラインメントはｈ７Ｖｈとよりも良好であったが、軽鎖アラインメントはＣＤＲがかなり異なっていた。この分析から、ｈ７Ｖｋとｈ７ａＶｈとの組合せは、７Ｆ３に最も類似した抗体を生じ得ると推測された。ｈ７ｂＶｋ－ｈ７ｂＶｈ配列を含む抗体の分析により、ＣＤＲ　Ｌｌ、Ｈ１、Ｈ２およびＨ３が、他のｈ７Ｆ３重鎖および軽鎖と比較して、等価な７Ｆ３のＣＤＲとは、構造的により異なっていることが明らかとなった。これは、ｈ７ｂＶｋまたはｈ７ｂＶｈ配列を含む抗体が、これらの配列を含まない７Ｆ３またはヒト化７Ｆ３抗体ほど有効ではない可能性があることを示唆している。これを考慮すると、ｈ７ｂＶｈ配列を含む１つの抗体が７Ｆ３に対する優れた活性を有していることが示されたことは、驚くべき予測できないことであった（例えば、実施例５、図１７を参照のこと）。

【０２２２】

次のステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで試験するために、上記ヒト化７Ｆ３重鎖および軽鎖の配列を抗体へと変換することであった。

【実施例２】

【０２２３】

ヒト化抗体の発現および産生

抗体可変領域遺伝子を、定常領域遺伝子を含むベクター中にクローニングする

重鎖および軽鎖の可変アミノ酸配列を、上記のように設計した。これらのドメインを含む抗体を産生するために、各可変領域をコードするＤＮＡ配列を合成した（Ｇｅｎｅｓｃｒｉｐｔ　Ｃｏｒｐ．）。ベクターｐＵＣ１８中へのクローニングを容易にするために、ＥｃｏＲ１部位およびＨｉｎｄＩＩＩ部位を５’末端または３’末端に付加した。さらに、軽鎖可変遺伝子は、各末端に独自のＢｓｍＢ１制限部位を有していた。重鎖遺伝子は５’末端にＢｓｍＢ１部位を有し、３’末端にＮｈｅ１部位を有していた。

【０２２４】

全長抗体遺伝子を構築するために、分泌シグナルおよび定常領域をコードするベクター中に可変領域遺伝子をサブクローニングした。軽鎖については、このベクターは、２つの

独自のＢｓｍＢ１部位によって分離された、分泌シグナル配列およびヒト定常κ（Ｃκ）領域遺伝子を含んでいた。重鎖ベクターは、ＢｓｍＢ１部位およびＮｈｅ１部位によって分離された、分泌シグナルおよびヒト定常γ（Ｃγ）領域遺伝子を含んでいた。重鎖ベクターは、γ１（Ｃγ$_1$）、γ２（Ｃγ$_2$）、γ３（Ｃγ$_3$）、γ４（Ｃγ$_4$）、γ４$_{PE}$変異体（Ｃγ４$_{PE}$）またはγ４$_P$変異体（Ｃγ４$_P$）遺伝子のいずれかを含んでいた。

【０２２５】

クローニングプロセスは、標準的方法によるプラスミドＤＮＡの調製、製造業者（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏｌａｂｓおよびＰｒｏｍｅｇａ）が推奨するＢｓｍＢ１（軽鎖ベクターおよびＶｋ領域遺伝子）またはＢｓｍＢ１およびＮｈｅｌ（重鎖ベクターおよびＶｈ領域遺伝子）によるプラスミドＤＮＡの消化、アガロースゲル電気泳動によるＤＮＡフラグメントの分離、ゲル抽出キット（ＪｅｔＱｕｉｃｋ、Ｇｅｎｏｍｅｄ）を使用したゲルからのＤＮＡフラグメントの回収、ベクターフラグメントへの可変遺伝子フラグメントのライゲーション（Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ、Ｐｒｏｍｅｇａ）、コンピテントＥ．ｃｏｌｉ細胞（ＴＯＰ１０、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中へのＤＮＡの形質転換を含んでいた。形質転換細胞由来のプラスミドＤＮＡを、制限消化によって分析し、プラスミド中の抗体配列を配列決定して、正しいリーディングフレームでサブクローニングされた可変領域を確認した。

【０２２６】

抗体遺伝子を発現ベクター中にサブクローニングする

全長抗体遺伝子が正確な配列を有していることを確認した後で、それを発現ベクター中にサブクローニングした。使用できる発現ベクターの例には、ｐｃＤＮＡ、ｐＬＥＮＴＩ、ｐＴ－ＲＥＸ、ｐＡｄ、ｐＲＥＰまたはｐＣＥＰ哺乳動物発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐＴｒｉＥｘｌまたはｐＢａｃベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ）、ＺＡＰおよびｐＣＭＶ発現ベクター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ＧＳ発現系ベクター（例えば、ｐＥＥ１２．４およびｐＥＥ６．４（Ｌｏｎｚａ））、ｐＣＭＶ５　ｃｕｍａｔｅ発現系ベクター（Ｑｂｉｏｇｅｎｅ）、ＵＣＯＥ発現系プラスミド（ＭＬ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）またはＭＡＲｔｅｃｈ発現プラスミド（Ｓｅｌｅｘｉｓ）のいずれかが挙げられる。この場合、重鎖遺伝子（５’末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位を有し、３’末端にＥｃｏＲ１部位を有する）を、マウスＤＨＦＲ遺伝子を含むｐｃＤＮＡ３由来ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中のＣＭＶプロモーターの下流のＨｉｎｄＩＩＩ－ＥｃｏＲ１部位および／またはＧＳ発現ベクター（Ｌｏｎｚａ）中にサブクローニングした。軽鎖遺伝子（５’末端にＳｐｅ１部位を有し、３’末端にＥｃｏＲ１部位を有する）を、ｐＴｒａｃｅｒ－ＣＭＶ／ＢＳＤ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のＮｈｅ１－ＥｃｏＲ１部位中にサブクローニングした。５’末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位を有し、３’末端にＥｃｏＲＩ部位を有する軽鎖遺伝子も、ＧＳ発現ベクター（Ｌｏｎｚａ）のＨｉｎｄＩＩＩ－ＥｃｏＲＩ部位中にサブクローニングした。ある場合には、重鎖発現カセット（プロモーター、軽鎖コード配列およびポリアデニル化シグナル）を軽鎖ベクター中にサブクローニングして、重鎖および軽鎖の両方を発現する単一のベクターを作製した。

【０２２７】

哺乳動物細胞においてヒト化抗体を発現させる

ヒト化抗体を発現させるために、重鎖および軽鎖のベクターを、リポフェクタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してＣＨＯ細胞中に共トランスフェクトした。あるいは、ベクターＤＮＡは、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、直接インジェクション、遺伝子銃または当業者に公知の別の方法によってトランスフェクトできる。あるいは、ベクターＤＮＡは、任意の多数の細胞株（例えば、ＣＨＯＫ１ＳＶ、ＨＥＫ２９３、ＰｅｒＣ６またはＮＳ０）中にトランスフェクトできる。ある場合には、重鎖および軽鎖の両方をコードする単一のベクターを、エレクトロポレーションにより、またはリポフェクタミンを使用して、細胞中にトランスフェクトした。

【０２２８】

形質転換の一日前に、４×１０^{5}のＣＨＯ　ｄｈｆｒ$^-$細胞（ＡＴＣＣ）を、１５ｍｌ

の非選択的培地（ヌクレオシドを含むα－ＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２ｍＭのＬ－グルタミン、１０％ＦＢＳ）中でＴ１７５フラスコ中に播種し、５％CO_2中３７℃でインキュベートした。トランスフェクションの直前に、８００μｌの増殖培地中のプラスミドＤＮＡ（１５μｇ）を、８００μｌの増殖培地中の１００μｌのリポフェクタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に添加し、室温で２０分間インキュベートした。細胞単層をＰＢＳでリンスし、ＤＮＡ／リポフェクタミン混合物を、５ｍｌの増殖培地を含むフラスコに添加した。５％CO_2中３７℃で１６時間インキュベートした後、もう１０ｍｌの培地を添加した。一日後、細胞をＰＢＳで洗浄し、１５ｍｌの選択培地（ヌクレオシドを含まないα－ＭＥＭおよび５％透析ＦＢＳ）を添加した。２日後、１ウェル当たり約２～５細胞の平均密度で、接着細胞を９６ウェルの組織培養プレート中に再プレートした。さらに２～３週間の増殖の後、ヒトＩｇＧ特異的ＥＬＩＳＡを使用して抗体産生を測定した。抗体を発現する細胞を、産生のためにＴ－フラスコ中に増殖させた。培養培地を回収し、以下に記載するように抗体を精製した。ＧＳ系発現ベクターをＣＨＯＫ１ＳＶ細胞中にトランスフェクトし、抗体分泌細胞株を単離して、製造業者（Ｌｏｎｚａ）の推奨するとおりに産生のために増殖させた。

【０２２９】

ヒト化抗体の精製

トランスフェクトされた細胞は、増殖培地中に抗体を分泌する。抗体を、プロテインＡまたはプロテインＧアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはヒトＩｇＧ特異的ＥＬＩＳＡによって同定した、抗体を含む画分をプールした。ヒトＩｇＧ特異的ＥＬＩＳＡを使用して、回収された抗体の量およびその濃度を決定した。抗体純度を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって概算した。

【０２３０】

産生しアッセイしたヒト化抗体のリスト

表４は、産生された種々の抗体を列挙し、抗体中に存在する重鎖および軽鎖の配列を示す。

【０２３１】

【表４】

表4:産生されたヒト化抗体

抗体	軽鎖		重鎖	
hAb	可変(V)	定常	可変(V)	定常
A	7Vk	hCκ-R	7Vh	hCγ4
B	7aVk	hCκ-R	7Vh	hCγ4
C	7bVk	hCκ-R	7Vh	hCγ4
D	7Vk	hCκ-R	7Vh	$hC\gamma4_{PE}$
E	7aVk	hCκ-R	7Vh	$hC\gamma4_{PE}$
F	7bVk	hCκ-R	7Vh	$hC\gamma4_{PE}$
G	7Vk	hCκ-R	7aVh	$hC\gamma4_{PE}$
H	7aVk	hCκ-R	7aVh	$hC\gamma4_{PE}$
I	7bVk	hCκ-R	7aVh	$hC\gamma4_{PE}$
J	7Vk	hCκ-R	7bVh	$hC\gamma4_{PE}$
K	7aVk	hCκ-R	7bVh	$hC\gamma4_{PE}$
L	7bVk	hCκ-R	7bVh	$hC\gamma4_{PE}$
M	7Vk	hCκ-R	7aVh	hCγ4
N	7Vk	hCκ-R	7aVh	hCγ1
O	7bVk	hCκ-R	7Vh	hCγ1
P	7Vk	hCκ	7bVh	hCγ1
Q	7Vk	hCκ	7bVh	$hC\gamma4_{P}$
R	7Vk	hCκ	7aVh	$hC\gamma4_{P}$
S	7Vk	hCκ	7bVh	$hC\gamma4_{PE}$
T	7Vk	hCκ	7aVh	$hC\gamma4_{PE}$
U	7Vk	hCκ	7aVh	hCγ1
V	7Vk	hCκ	7aVh	$hC\gamma4_{P}$

【実施例３】

【０２３２】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を用いた結合研究

ヒトＣ５ａ受容体（ｈＣ５ａＲ）に対するヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の結合動態を特徴付けるために、２つのタイプの結合研究を本実施例に記載する。第１の結合研究は、競合的リガンド結合アッセイにおいてヒトＣ５ａＲに対する抗体およびＣ５ａの結合を比較した。第２の結合研究は、ヒトＣ５ａＲを発現する細胞における飽和結合を含んだ。

【０２３３】

Ａ．ヒト化抗Ｃ５ａＲは、Ｃ５ａＲへのＣ５ａ結合を置換する－競合的リガンド結合アッセイ

ｈＣ５ａＲ遺伝子をトランスフェクトしたＬ１．２細胞またはヒト好中球への^{125}Ｉ標識Ｃ５ａの結合を阻害するヒト化Ａｂの能力を、以下に記載するとおり試験した。組換えヒトＣ５ａは、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から取得した。２２００Ｃｉ／ｍＭの比活性を有する^{125}Ｉ－Ｂｏｌｔｏｎ－Ｈｕｎｔｅｒ標識した補体Ｃ５ａは、ＮＥＮ－Ｄｕｐｏｎｔ（Ｂｏｓｔｏｎ、ＭＡ）から購入した。簡潔に述べると、Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲ安定トランスフェクタントを数日間増殖させ、その後実験を５ｍＭ酪酸で一晩処理して、結合アッセイ前にｈＣ５ａＲ発現を刺激した。ヒト好中球を、健康なボランティアから採取した静脈血から精製した。好中球は、パーコール密度遠心分離によって他の白血球から分離し、その後赤血球溶解ステップを行った。両方の細胞型をＰＢＳで１回洗浄し、結合緩衝液（５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．５、１ｍＭ　$CaCl_2$、５ｍＭ　$MgCl_2$、０．５％　ＢＳＡ）中に1×10^7／ｍｌの濃度で再懸濁した。４０μｌ（4×10^5細胞）のアリコートを、９６ウェルのマイクロタ

イタープレート中に分配し、その後非放射性競合物（抗体またはヒトＣ５ａ）を添加した。細胞および非放射性競合物を室温で１５分間インキュベートし、その後、放射能標識したＣ５ａを０．４ｎＭの最終濃度になるよう添加した。最終反応体積は１２０μｌであった。室温で６０分間のインキュベーション後、０．１５ＭのＮａＣｌを含む結合緩衝液１５０μｌで、細胞を３回洗浄した。次いで、細胞ペレットを、ＴｏｐＣｏｕｎｔ　Ｓｃｉｎｔｉｌｌａｔｉｏｎ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｐａｃｋａｒｄ）で計数した。試料を、各々６～８の濃度で、３連でアッセイした。各抗体は、少なくとも３回の別々のアッセイで試験した。各試料中の計数を、バックグラウンドの差し引き後、非放射性競合物を添加していないウェルで観察された最大^{125}Ｉ－Ｃ５ａ結合の百分率として表した。

【０２３４】

ヒト好中球およびＬ１．２／ｈＣ５ａＲトランスフェクタントにおける、マウス抗体７Ｆ３と比較した各ヒト化抗体についてのこの分析の結果（置換曲線）を、それぞれ図１１および１２に示す。表５は、各抗体についてのＥＣ$_{50}$値を示す。これらの値は、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して、データを１部位での競合に関する非線形方程式にフィッティングさせて得た。データは、すべてのヒト化抗体が受容体から放射能標識Ｃ５ａを置換するのに等しく有効であるわけではないことを示している。ヒト化抗体ＯおよびＮは、ヒト好中球ではマウス７Ｆ３と同様に有効であったが、抗体Ｃ、Ｊ、Ｍ、Ｎ、ＯおよびＱは、Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲトランスフェクタントでは７Ｆ３と有意に異ならなかった。

【０２３５】

【表５】

表5:図11および12に示した各抗体についてのEC$_{50}$値

抗体または リガンド	EC50 (ヒト好中球) nM	95% CI	EC50 (L1.2/hC5aR トランスフェクタント) nM	95% CI
ヒト C5a	0.5	0.37-0.88		
m7F3	0.54	0.39-0.75	0.51	0.35-0.75
A	nd		2.78	1.81-4.27
C	2.48	1.49-4.12	0.90	0.56-1.47
F	2.55	1.51-4.31	1.26	0.88-1.80
G	3.52	1.95-6.35	1.53	0.92-2.52
J	4.11	2.14-7.91	0.93	0.63-1.31
M	4.05	2.53-6.49	0.95	0.60-1.48
N	0.65	0.45-0.94	1.03	0.56-1.90
O	0.48	0.32-0.70	0.68	0.39-1.17
Q	3.50	2.42-5.05	0.86	0.52-1.46
S	2.69	1.46-4.96	nd	

【０２３６】

Ｂ．精製されたヒト好中球に対する抗Ｃ５ａＲ抗体の飽和結合

上記のように単離したヒト好中球を、ｄＰＢＳ中に再懸濁し、１×１０^{5}細胞（２５μｌ中）を、９６ウェルプレートのウェル中に分配した。等体積（２５μｌ）の２×抗体（ＰＢＳ中に希釈）を、各ウェルに添加した。２倍連続希釈を使用した最終抗体濃度は、４０～０ｕｇ／ｍｌ（未標識のｈＡｂ－Ｑ、ｈＡｂ－Ｊおよび７Ｆ３を使用）の範囲であった。細胞と抗体とを、４℃で２０分間インキュベートした。インキュベーション後、１００μｌ　ＰＢＳ＋１％　ＢＣＳを各ウェルに添加し、プレートを２，０００ｒｐｍで３分間遠心分離した。細胞を、ＰＢＳ＋１％　ＢＣＳ中で３回洗浄し、ＰＢＳ中に１／３００希釈した抗ヒトＩｇＧ－ＦＩＴＣ（Ｓｉｇｍａ　Ｆ１６４１）または抗マウスＩｇＧ－ＦＩＴＣ（Ｊａｃｋｓｏｎ　１９５－１１５－００３）中に再懸濁し、氷上で２０分間イン

キュベートした。細胞を上記のように１回洗浄し、フローサイトメトリーによる分析のためにＰＢＳ＋１％　ＦＣＳ中に再懸濁した。ＦＳＣ対ＳＳＣ散乱を使用して好中球を同定し、各試料について中央値蛍光強度（ＭＦＩ）を決定した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（ｖ４．０）ソフトウェアを用いてデータ（ＭＦＩ－バックグラウンド対$\log_{10}$［抗体濃度］）をシグモイド用量反応（傾き変動）（すなわち、４パラメーターのロジスティック方程式）にフィッティングさせることによって、EC_{50}値を決定した。B_{max}およびK_Dを、１部位結合双曲線方程式にデータをフィッティングさせることによって決定した。

【０２３７】

図１３は、２つの飽和結合グラフを示し、ｘ軸は$\log_{10}$（EC_{50}を計算するため）および線形（B_{max}およびK_Dを計算するため）スケールである。データは、４℃でのヒト好中球へのヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ＮおよびＱの結合のK_DおよびEC_{50}値が、７Ｆ３よりも約２～３倍高かったことを示している。ヒト化抗体についてのK_DおよびEC_{50}は類似しており、それぞれ約２０～２５ｎＭ（約３ｕｇ／ｍｌ）であるが、７Ｆ３についてのK_DおよびEC_{50}は、このアッセイの条件下で約８～１０ｎＭの範囲であった。

【実施例４】

【０２３８】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ中のエピトープＥＥＹＦＰＰ（配列番号３８）に結合する。

方法

キメラ受容体に対する抗体結合

マウスおよびヒトのＣ５ａＲのセグメントを含む一連のキメラ受容体を構築して、抗体が結合するＣ５ａ受容体の領域を同定した。これらの受容体は、標準的な分子技術を使用して作製した（Ｌｅｅら、２００６）。種々のキメラ受容体をコードする各組換えベクター（ＤＭＥＭ中希釈で５μｇ）を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、5×10^5のマウスＬ１．２細胞中にトランスフェクトした。細胞を、１０％ウシ胎児血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ）を含むＤＭＥＭまたはＲＰＭＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で増殖させた。２４時間または４８時間の後、細胞を１，５００ｒｐｍで５分間遠心分離することによって回収し、ＦＡＣＳ緩衝液（２％ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水）中に再懸濁した。ｈＡｂ－Ｑでの染色のために、0.5×10^5のトランスフェクト細胞を、１ウェル当たり５０μｌの体積中５μｇ／ｍｌまたは１０μｇ／ｍｌの抗体と共に、４℃で２０分間インキュベートした。細胞を上記のとおりペレット化し、１５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液で３回洗浄し、その後、１：２００または１：３００希釈したＦＩＴＣコンジュゲート化抗ヒトＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ、Ｆ１６４１）５０μｌを添加した。この混合物を４℃で２０分間インキュベートし、その後細胞をペレット化し、ＦＡＣＳ緩衝液で３回洗浄し、最後に１５０～２００μｌのＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁した。試料はＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で分析した。

【０２３９】

第２細胞外ループ由来のペプチドへの抗体結合

ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ（第３細胞外ドメイン）にわたる、各々次のペプチドから１残基ずつずれた２２個の重複するペプチド（１２マー）のセットを合成した（Ｍｉｍｏｔｏｐｅｓ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ）。各ペプチドは、そのＮ末端にビオチン基および４アミノ酸リンカー（ＳＧＳＧ）を付けて作製した。合成した１つのペプチド２３番は、ｈＣ５ａＲの第２細胞外ループの全長（配列番号３７由来の残基１７３～２０５）に相当する３３マーであり、これもＮ末端にビオチン－ＳＧＳＧを有していた。この実験で使用したペプチドは、Ｌｅｅら（２００６）に記載されている。

【０２４０】

この実験は、３８４ウェルのストレプトアビジン被覆プレートにペプチドを結合させ、

次いでこのペプチドと共に抗体をインキュベートし、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）にコンジュゲート化した抗マウスＩｇＧを用いて、結合した抗体を検出することによって以下のように実施した。各ペプチドを２００μｌの６０％　ＤＭＳＯ中に溶解させて、１０ｍｇ／ｍｌの濃度にした。ペプチドを、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０／アジド溶液（ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０中０．１％ｗ／ｖのアジ化ナトリウム）でさらに１：１０００希釈して、１０μｇ／ｍｌの作業濃度にした。

【０２４１】

３８４ウェルのストレプトアビジン被覆プレート（Ｎｕｎｃ）を、１ウェル当たり２０μｌのブロッキング緩衝液（ＰＢＳ中１％ｗ／ｖのＢＳＡ）でブロッキングした。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０緩衝液（ＰＢＳ中０．１％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ２０）で４回洗浄した。２０μｌの希釈ペプチド溶液をウェルに移し、プレートを室温で１時間インキュベートした。プレートを（上記のように）４回洗浄した後、２０μｌの抗体（０．５、１、１．２５、２．５または５μｇ／ｍｌ）をウェルに添加し、プレートを２０℃で１時間インキュベートした。このプレートを上記のように４回洗浄し、次いで２０μｌのＨＲＰコンジュゲート化抗マウスＩｇＧ（ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中に１：５０００希釈）を各ウェルに添加した。室温で１時間インキュベートした後、このプレートを（上記のように）３回洗浄し、次いでＰＢＳで２回洗浄して微量のＴｗｅｅｎを除去した。ペルオキシダーゼの存在を、新たに調製したＴＭＢ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ試薬（ＢＤ　Ｏｐｔ　ＥＩＡ）を各ウェルに２０μｌ添加し、室温で２０分間インキュベートすることによって検出した。最後に、プレートを６５０ｎｍ／４５０ｎｍで読み取った。

【０２４２】

第２細胞外ループ内の必須アミノ酸の同定：アラニンスキャニング変異ペプチド。

エピトープＥＥＹＦＰＰ（配列番号３７由来の残基１７９～１８４）（配列番号３８）中の必須結合残基をさらに規定するために、ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ配列ＶＲＥＥＹＦＰＰＫＶＬＣ（配列番号３７由来の残基１７７～１８８）（配列番号５８）を含み、結合モチーフ中の種々の位置がアラニン置換された、一連の短いペプチド（１２マー）を、そのＮ末端にビオチン基および４アミノ酸リンカー（ＳＧＳＧ）を付けて、上記のように合成した（Ｌｅｅら、２００６）。ペプチドＡ１はＡｌａ置換を有さず、ペプチドＡ１４はペプチドＡ１のスクランブル化バージョンであった。ペプチドＡ２～１３は、１２から１までの各アミノ酸位置に、それぞれ１つのアラニン置換を含んだ。ＥＬＩＳＡプレート上を被覆したペプチドへの抗体の結合を、上記のように実施した。

【０２４３】

Ｎ末端ペプチド（ＰＥＰ１）ＥＬＩＳＡ

３８４ウェルのＭａｘｉＳｏｒｐプレート（Ｎｕｎｃ）を、ＰＢＳ／０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－２０中１～１５μｇ／ｍｌの濃度の、ヒトＣ５ａＲの残基９～２９に対応するペプチド（ＰＥＰ１）で３７℃で１．５時間被覆し、次いで３回洗浄した。このプレートを、１ウェル当たり２０μｌのブロッキング緩衝液（ＰＢＳ中１％ｗ／ｖのＢＳＡ）で４℃で一晩ブロッキングした。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ緩衝液（ＰＢＳ中０．０５％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ－２０）で３回洗浄した。２０μｌの抗体（最終濃度５μｇ／ｍｌ）を各ウェルに添加し、プレートを３７℃で２時間インキュベートした。プレートを上記のように３回洗浄し、次いで２０μｌのＨＲＰコンジュゲート化抗ヒトＩｇＧκ（ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０中１：８０００希釈）またはＨＲＰコンジュゲート化抗マウスＩｇＧ（１：７５００希釈）を各ウェルに添加した。室温で２時間インキュベートした後、プレートを（上記のように）４回洗浄した。ペルオキシダーゼの存在を、新たに調製したＴＭＢ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ試薬（ＢＤ　Ｏｐｔ　ＥＩＡ）を各ウェルに２０μｌ添加し、室温で２０分間インキュベートすることによって検出した。最後に、１ウェル当たり２０μｌの１Ｍ　H_2SO_4で反応を停止させた後、プレートリーダーでプレートを４５０ｎｍ（参照６２０ｎｍ）で読み取った。

【０２４４】

結果

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体が、親抗体７Ｆ３と同じヒトＣ５ａＲ中の結合部位を認識したことを確認するために、４つの実験を実施した。第一に、ｈＡｂ－Ｑを使用して、種々のキメラヒト／マウスＣ５ａＲを発現する細胞を染色した。第二に、ｈＡｂ－ＪおよびＱを、ｈＣ５ａＲの第２細胞外ループを含む重複する一連のペプチド（１２マー）と共にインキュベートした。第三に、ｈＡｂ－ＪおよびＱを、各位置にＡｌａ置換を有するヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ由来の１２アミノ酸モチーフを含む一連の変異体ペプチドと共にインキュベートした。第四に、ｈＡｂ－ＪおよびＱを、ヒトＣ５ａＲのＮ末端細胞外ドメイン由来の残基９～２９を含むペプチドと共にインキュベートした。

【０２４５】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループを含むキメラ受容体に結合する。

各細胞外ドメイン中にヒトまたはマウスのいずれかのＣ５ａＲ配列を含む一連のキメラ受容体：Ｎ末端ドメイン、ならびに第１、第２および第３の細胞外ループ（ＥＣＬ）を、上記のように構築した。各細胞外ドメインならびに膜貫通セグメントおよび細胞内セグメントの由来を表６中に詳述した。各構築物中の細胞外ドメインの由来は、４文字コードで規定した：例えば、ｍＨＨＨは、マウスＣ５ａＲのＮ末端およびヒトＣ５ａＲの第１、第２および第３のＥＣＬを有するキメラ受容体を規定する。

【０２４６】

【表６】

表6:キメラ受容体構築物:hAb-Qによる染色

ECドメインコード*	キメラ受容体残基	配列の由来	hAb-Qによる染色
1. HHHH	1-350	ヒトC5aR[a] 1-350	+++
	351-360	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
2. mHHH	1-39	マウスC5aR[b] 1-39	+++
	40-350	ヒトC5aR[a] 40-350	
	351-360	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
3. mmHH	1-111	マウスC5aR[b] 1-111	+++
	112-350	ヒトC5aR[a] 112-350	
	351-360	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
4. mmmH	1-206	マウスC5aR[b] 1-206	-
	207-351	ヒトC5aR[a] 206-350	
	352-361	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
5. mmmm	1-351	マウスC5aR[b] 1-351	-
	352-361	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
6. HmHH	1-92	ヒトC5aR[a] 1-92	+++
	93-111	マウスC5aR[b] 93-111	
	112-350	ヒトC5aR[a] 112-350	
	351-360	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
7. HHmH	1-172	ヒトC5aR[a] 1-172	-
	173-206	マウスC5aR[b] 173-206	
	207-351	ヒトC5aR[a] 206-350	
	352-361	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
8. HHHm	1-262	ヒトC5aR[a] 1-262	+++
	263-282	マウスC5aR[b] 264-283	
	283-350	ヒトC5aR[a] 283-350	
	351-360	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
9. Hmmm	1-92	ヒトC5aR[a] 1-92	-
	93-283	マウスC5aR[b] 93-283	
	284-351	ヒトC5aR[a] 283-350	
	352-361	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
10. mHmm	1-90	マウスC5aR[b] 1-90	-
	91-111	ヒトC5aR[a] 91-111	
	112-351	マウスC5aR[b] 112-351	
	352-361	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	
11. mmHm	1-111	マウスC5aR[b] 1-111	+++
	112-262	ヒトC5aR[a] 112-262	
	263-350	マウスC5aR[b] 264-351	
	351-360	GTETSQVAPA (ウシロドプシンタグ)	

*キメラ受容体は、その細胞外(EC)ドメインによって指定される:HHHHはヒトC5aRであり、Hmmmは、ヒトC5aRのN末端ならびにマウスC5aRの第1、第2および第3の細胞外ループを有するキメラを指定する、など。

a:ヒトC5aR:配列番号37

b:マウスC5aR:GenPeptアクセッション番号NP_031603

【０２４７】

親抗Ｃ５ａＲ　ｍＡｂ　７Ｆ３は、キメラＣ５ａＲを発現する細胞を染色するパターン

を示し、これは、この抗体がヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ（第３の細胞外ドメイン）中のエピトープを認識することを示唆する。ＣＤＲ移植によってマウスｍＡｂ　７Ｆ３から誘発され、したがって同じ抗原結合部位を含むはずのヒト化抗体ｈＡｂ－Ｑが、７Ｆ３と同じ染色パターンを有することを確認するために、異なるキメラヒト／マウスＣ５ａＲを発現する一過性トランスフェクトされた細胞をｈＡｂ－Ｑで染色し、フローサイトメトリーによって分析した。ポジティブに染色されたキメラ受容体を表６中に示す。ｈＡｂ－Ｑによる染色のパターンは、７Ｆ３で観察されたパターンと同一であった。二次抗体（抗ｈＩｇＧ－ＦＩＴＣ）単独では染色は見られなかった。キメラ受容体１、２、３、６、８および１１をｈＡｂ－Ｑで染色したところ、この抗体がヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ中のエピトープを認識することが示された。

【０２４８】

第２細胞外ループ由来のペプチドへの抗体結合

第２細胞外ループ中のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体が結合するエピトープをさらに規定するために、それぞれ次のペプチドから１残基ずつずれた、ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループにわたる２２の重複するペプチド（１２マー）のセットを合成した。これらのペプチドに対する抗体の結合を、ペプチドＥＬＩＳＡによって分析した。

【０２４９】

７Ｆ３によるペプチド結合パターンは、ヒト化７Ｆ３抗体ｈＡｂ－ＱおよびｈＡｂ－Ｊによるパターンと類似していた。これらのヒト化抗体は、ペプチド４および５ならびにペプチド２３に、最も強く結合した（図１４Ａおよび１４Ｂ）。ペプチド２３は、ヒトＣ５ａＲの完全な第２細胞外ループである（配列番号３７の残基１７３～２０５）。ペプチド１～３および６～７に対してはより弱い結合が見られた。対照的に、７Ｆ３はペプチド１～７に強く結合した。ペプチド１～７は、共通の要素：６アミノ酸モチーフ：ＥＥＹＦＰＰを含んでいる。これらの抗体は、このモチーフを欠くペプチド１３～２２にも結合せず、このモチーフの短縮バージョンを含むペプチド８～１２にも結合しなかった。これらの抗Ｃ５ａＲ抗体は、ヒトＣ５ａ受容体の第２細胞外ループ上の線状エピトープ（ＥＥＹＦＰＰ；配列番号３７由来の残基１７９～１８４）を認識して結合する。これらのヒト化抗体は、一方の末端または他方の末端の近くにＥＥＹＦＰＰモチーフを含むペプチドには結合しないが、このモチーフが中央に位置するペプチドには結合する。

【０２５０】

第２細胞外ループのＥＥＹＦＰＰモチーフ内の必須結合残基

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体が結合するエピトープＥＥＹＦＰＰ中の必須結合残基をさらに規定するために、ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループ配列ＶＲＥＥＹＦＰＰＫＶＬＣ（配列番号３７由来の残基１７７～１８８）を含み、結合モチーフ中の種々の位置がアラニン置換された、一連の短いペプチド（１２マー）を合成した。これらのペプチドに対する抗体の結合を、ペプチドＥＬＩＳＡによって分析した。

【０２５１】

この実験では、マウス抗Ｃ５ａＲ　ｍＡｂ　７Ｆ３の結合に必須なアミノ酸は、エピトープ$E_1E_2Y_3F_4P_5P_6$中のY_3およびF_4であることが見出された（Ｌｅｅら、２００６）。７Ｆ３と同様に、ヒト化抗体ｈＡｂ－ＪおよびＱ（それぞれ、図１４ＣおよびＤ）は、位置Y_3またはF_4にＡｌａ置換を有するペプチドには結合しなかった。さらに、E_1、E_2およびP_5での置換は、ｈＡｂ－ＪおよびＱによる結合を低下させた。

【０２５２】

リード抗体ｈＡｂ－Ｑは、Ｎ末端の９～２９ペプチド（ＰＥＰ１）に結合しない。

本実施例は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体が、Ｃ５ａＲの第２細胞外ループ中のエピトープに結合することを示す。さらに、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、ヒトのＮ末端ドメインおよびマウスの第２細胞外ループを含むキメラマウス／ヒトＣ５ａＲ構築物＃７および＃９に結合しなかった（表６を参照のこと）。

【０２５３】

抗Ｃ５ａＲ抗体がヒトＣ５ａＲのＮ末端ドメイン由来の線状ペプチドに結合しなかった

ことを確認するために、配列ＰＤＹＧＨＹＤＤＫＤＴＬＤＬＮＴＰＶＤＫＴ（配列番号３７由来の残基９～２９）（配列番号５９）を有するペプチドＰＥＰ１を合成し、このペプチドに対する抗体の結合をペプチドＥＬＩＳＡによって分析した。

【０２５４】

初期の研究により、抗Ｃ５ａＲｍＡｂの７Ｆ３、１２Ｄ４および６Ｃ１２が、トランスフェクタント上のヒトＣ５ａＲに結合するＰＥＰ１と競合せず、これらのｍＡｂがＥＬＩＳＡプレート上を被覆したＰＥＰ１に結合しなかったことも実証している（ＷＯ　０３／０６２２７８）。図１５は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－ＪおよびＱ（５μｇ／ｍｌ）が、３つの異なる濃度（それぞれ、１／１００、１／５００および１／１０００、すなわち、１０μｇ／ｍｌ、２μｇ／ｍｌおよび１μｇ／ｍｌ）でＥＬＩＳＡプレートに結合したＰＥＰ１に結合しなかったことを示す。しかし、ヒトＣ５ａＲのＮ末端ペプチド１～３１に対して惹起された抗Ｃ５ａＲ（ＣＤ８８）ｍＡｂ　Ｓ５／１（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ、カタログ番号ＭＣＡ１２８３）は、予測どおり、５μｇ／ｍｌでＰＥＰ１に結合した。

【実施例５】

【０２５５】

ヒトＣ５ａＲを発現する細胞の遊走を遮断する

Ａ．ヒト化抗体は、ヒト好中球の遊走を遮断する

ヒト好中球を、室温で４０分間のデキストラン沈降ステップを介して、白血球画分を最初に得ることによって、末梢血から単離した。次いで、室温で２５００ｒｐｍで１５分間の密度勾配遠心のために、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上に細胞を重ねた。残留赤血球の低浸透圧溶解後、好中球を、走化性緩衝液（４９％　ＲＰＭＩ　１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、４９％　Ｍｅｄｉｕｍ　１９９（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２％透析ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））中に再懸濁した。抗Ｃ５ａＲ抗体を、５μｇ／ｍｌの濃度で好中球（１×１０^{7}／ｍｌ）に添加した。陰性対照（Ａｂ添加なしだが、１×ＰＢＳを添加した）を含めた。

【０２５６】

次いで、細胞を、３．０μｍの空隙率のポリカーボネート膜を有する２４ウェルの組織培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．）中のインサートの上部チャンバ中にロードし、室温で１０分間インキュベートした。次いで、このインサートを、０．１～１００ｎＭの濃度でヒト好中球化学誘引物質の組換えヒトＣ５ａ（Ｓｉｇｍａ）を含む下部チャンバ上に配置した。最大の好中球遊走は、１～１０ｎＭのＣ５ａが下部チャンバ中に存在するときに生じた。次いで、好中球を３７℃で３０分間インキュベートした。膜を通って下部チャンバ中に遊走する好中球の数を、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって定量した。相対細胞計数は、３０秒間の一定期間にわたって事象を獲得することによって得た。この方法は、再現性が高いことが見出されており、生きた細胞をゲートし、残骸を排除することが可能であった。

【０２５７】

図１６中に示される結果は、ヒト化抗体が、陰性（抗体なし）対照と比較して、Ｃ５ａに対するヒト好中球の遊走を阻害したことを示している。５μｇ／ｍｌの濃度のマウス抗体７Ｆ３で、９７％のヒト好中球遊走が遮断された。ヒト化抗体ＧおよびＪがそれぞれ、５μｇ／ｍｌで８４％および８２％の遊走を遮断した一方で、抗体ＣおよびＫはあまり有効ではなく、それぞれ、７５％および５５％の好中球遊走を遮断しただけであった。

【０２５８】

Ｂ．ヒトＣ５ａＲを発現する細胞の、Ｃ５ａによって誘発される遊走は、用量依存的な様式でヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体によってｉｎ　ｖｉｔｒｏで阻止される。

方法

ヒト好中球遊走

ヒト静脈血を、抗凝固剤としてＥＤＴＡを含むチューブ（ＢＤ　Ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ　＃３６６４５７）中に、健康なボランティアから収集した。好中球は、パーコール密度

遠心分離によって他の血液から精製し、その後赤血球溶解ステップを行った（Ｌｅｅら、２００６）。精製した好中球は、１，２００ｒｐｍで５分間遠心分離し、走化性緩衝液（４９％ ＲＰＭＩ １６４０、４９％ Ｍｅｄｉｕｍ １９９、２％透析ＦＢＳ；ＧＩＢＣＯ）中に、走化性緩衝液１ｍｌ当たり２×１０^{7}細胞で再懸濁した。２００μｌの総体積中の抗体（走化性緩衝液中に希釈、最終濃度０．００３～１０μｇ／ｍｌ）および細胞（２×１０^{6}細胞／ウェル）を、５％CO_2中で３７℃で約２０分間インキュベートした。次いで、これを２×１００μｌ試料に分割し、２４ウェルのトランスウェルプレート（ＨＴＳ Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ、３．０ミクロンの孔径、Ｃｏｒｎｉｎｇ）の上部チャンバ中の２つのウェルに添加した。Ｃ５ａ（最終濃度０～１００ｎＭ）を含む走化性緩衝液（合計６００μｌ）を、下部チャンバ中に配置した。プレートを５％CO_2中で３７℃で約１時間インキュベートして、細胞を遊走させた。対照ウェルは、抗体なしの細胞またはＣ５ａなしの緩衝液を含んだ。このアッセイの標準曲線を、以下に記載するように、ＣｙＱＵＡＮＴ色素を含む９６ウェルプレートで設定した。

【０２５９】

Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲトランスフェクタント細胞遊走

ＲＰＭＩ １６４０、１０％ ＦＢＳ、０．５ｍｇ／ｍｌ Ｇ４１８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で増殖する、５ｍＭ酪酸で一晩刺激したＬ１．２／ｈＣ５ａＲ細胞を、１，２００ｒｐｍで５分間遠心分離し、走化性緩衝液（４９％ ＲＰＭＩ １６４０、４９％ Ｍｅｄｉｕｍ １９９、２％透析ＦＢＳ；Ｇｉｂｃｏ）中で洗浄し、次いで再度遠心分離し、最後に、走化性緩衝液１ｍｌ当たり２×１０^{6}細胞で再懸濁した。２００μｌの総体積中の、細胞（１×１０^{5}細胞／ウェル）と混合した抗体（走化性緩衝液中に希釈、最終濃度０．００５～５μｇ／ｍｌ）を、９６ウェルプレートに添加し、５％CO_2中で３７℃で約２０分間インキュベートした。これを２×１００μｌ試料に分割し、９６ウェルのトランスウェルプレート（ＨＴＳ Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ－９６ Ｓｙｓｔｅｍ、５．０ミクロンの孔径；Ｃｏｒｎｉｎｇ）の上部チャンバ中の２つのウェルに添加した。最終濃度０．１～１００ｎＭの組換えヒトＣ５ａ（Ｓｉｇｍａ）を含む走化性緩衝液（合計１５０μｌ）を、下部チャンバ中に配置した。プレートを５％CO_2中で３７℃で約１時間インキュベートして、細胞を遊走させた。対照ウェルは、抗体なしの細胞またはＣ５ａなしの緩衝液を含んだ。走化性緩衝液中のｈＣ５ａＲ／Ｌ１．２細胞の連続希釈を調製して、ＣｙＱＵＡＮＴ（登録商標）検出アッセイのための標準曲線を作成した。固定数の細胞（１ウェル当たり０、１５０、４５０、１３５０、４０５０、１２１５０）を含む緩衝液（１５０μｌ）を、下部チャンバ中の２つのウェルの各々に直接添加し、その後１時間のインキュベーションステップを行った。

【０２６０】

ＣｙＱＵＡＮＴ（登録商標）色素を用いる定量

インキュベーション後、トランスウェルの下部チャンバ中の緩衝液＋遊走細胞を、９６ウェルの平底プレート（Ｎｕｎｃ）に移し、２００×ｇ（約１，５００ｒｐｍ）で５分間遠心分離した。細胞ペレットを１５０μｌのＰＢＳで洗浄し、ＣｙＱＵＡＮＴ蛍光を遮断する微量のフェノールレッドを除去した。第２の遠心分離ステップ後、上清を注意深く除去し、プレートを－８０℃で一晩凍結して、細胞を溶解させた。このプレートを室温で解凍し、溶解緩衝液中に希釈したＣｙＱＵＡＮＴ ＧＲ色素（ＣｙＱＵＡＮＴ（登録商標）Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）２００μｌ中に希釈し、各ウェルに添加した。

【０２６１】

Ｌ１．２／ｈＣ５ａＲ細胞を使用するアッセイについて、最初に標準曲線を上記のようにトランスウェルプレートで確立し、細胞を９６ウェルプレートに移して、ＣｙＱＵＡＮＴ色素で標識した。好中球を使用するアッセイについて、標準曲線を、ＣｙＱＵＡＮＴ色素を含む９６ウェルプレートで、以下のように直接設定した：１×１０^{6}の好中球を含むペレットを、－８０℃で一晩凍結させ、次いで解凍し、１ｍｌのＣｙＱＵＡＮＴ色素中に再懸濁し、次いで２００μｌ中２×１０^{5}の細胞を、２００μｌのＣｙＱＵＡＮＴ色素を

含む９６ウェルプレート中の２つのウェルの各々に添加し、２つのうち１つを連続希釈して、１００，０００から約４８．８細胞／ウェルの範囲で標準曲線（２連）を確立した。

【０２６２】

このプレートを、アルミホイル（光から保護するため）に包んで室温で２～５分間インキュベートし、次いでＦｌｕｏｒｉｍｅｔｅｒ（ＦＬＵＯｓｔａｒ　Ｇａｌａｘｙ、ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中に配置し、最大励起（Ａ１）を４８５ｎｍに設定し、最大放射（Ｂ１）を５２０ｎｍに設定して読み取った。蛍光強度を記録し、ＦＬＵＯｓｔａｒ　Ｃｏｎｔｒｏｌソフトウェアを用いてデータを処理した。標準曲線を使用して蛍光強度を細胞数に変換し、線形回帰または非線形４パラメーターｌｏｇ方程式（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ｖ４．０）のいずれかを使用して、データを分析した。

【０２６３】

結果

一定の濃度範囲にわたり、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球およびｈＣ５ａＲ／Ｌ１．２細胞トランスフェクタントの遊走を遮断するヒト化７Ｆ３抗体の能力を調査した。

【０２６４】

４人の異なる健康なボランティアドナー由来の好中球を、種々の濃度の抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑまたは７Ｆ３もしくはアイソタイプ対照抗体と共にプレインキュベートし、その後トランスウェルアッセイにおいて１０ｎＭ　Ｃ５ａに曝露させた。試料は２連で実行した。回帰分析を使用して標準曲線からバックグラウンド蛍光を差し引いた後に、遊走細胞の数を計算した。各実験について、標準曲線フィットした方程式r^2の値は、＞０．９９であった。

【０２６５】

抗Ｃ５ａＲ抗体は、用量依存的な関係を示した。１０μｇ／ｍｌの濃度のｈＡｂ－Ｑおよび７Ｆ３の両方は、１０ｎＭ　Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球の遊走を完全に遮断した。抗体濃度が低下するにつれて、遊走細胞の数は増加した。０．１μｇ／ｍｌ未満の濃度でのｈＡｂ－Ｑまたは７Ｆ３と好中球とのプレインキュベーションは、遊走の防止に有効ではなかった。アイソタイプ対照抗体は、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球の走化性を遮断しなかった。図１７は、ｈＡｂ－Ｑおよび７Ｆ３について示された最良のフィットの非線形回帰直線を用いてプロットした、４回の実験からの平均データを示す。ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、７Ｆ３よりも、約６分の１から８分の１の低いIC_{50}で、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球の遊走の遮断においてより有効であった。

【０２６６】

ヒトＣ５ａＲを発現するトランスフェクト細胞も、種々の濃度の抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑ、ｈＡｂ－Ｊまたは７Ｆ３もしくはアイソタイプ対照抗体とのプレインキュベーション後、遊走アッセイに供した。図１８は、ｈＣ５ａＲ／Ｌ１．２トランスフェクタント遊走が、５μｇ／ｍｌで、ヒト化抗Ｃ５Ｒ抗体ＪおよびＱ、ならびに７Ｆ３によって完全に阻害されたことを示している。シグモイダル用量反応方程式（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｓｉｍソフトウェア）を用い非線形回帰を使用するデータの分析により、７Ｆ３、ＪおよびＱについてそれぞれ０．５、０．６および０．７μｇ／ｍｌのIC_{50}値が得られ、これは、これらの抗体が、Ｃ５ａによって誘発されるｈＣ５ａＲＪＬ１．２細胞の遊走を中和することに、各々非常に有効であったことを示唆している。

【０２６７】

Ｃ．ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、低レベルの受容体占有率で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでヒト好中球遊走を有効に遮断する。

上記より、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体が、Ｃ５ａによって誘発される、ヒトＣ５ａＲを発現する細胞の遊走（走化性）を阻害したことが示された。この阻害をさらに特徴付けるために、ヒト好中球遊走をｉｎ　ｖｉｔｒｏで阻害するのに必要な、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体によるＣ５ａ受容体占有率のレベルを、以下のように決定した。

【０２６８】

方法

ｈＡｂ－ＱのＦＩＴＣ標識

フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）を、共有結合によってｈＡｂ－Ｑにコンジュゲート化した。簡潔に述べると、約２．２ｍｇのｈＡｂ－Ｑを、「反応緩衝液」（１６０ｍＭ　Na_2CO_3、３４０ｍＭ　$NaHCO_3$、ｐＨ９．５）中に交換し、回収された１．８ｍｇを、ＤＭＳＯ中に溶解させた１４４μｇのＦＩＴＣ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、カタログ番号Ｆ１９０６）に添加した。反応を、暗中で室温（約２１℃）で１時間実施した。非コンジュゲート化ＦＩＴＣを、「保存緩衝液」（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ８．２）で予め平衡化したＰＤ－１０カラムを使用して除去し、これで溶出した。コンジュゲート化ｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣを、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ　ＹＭ－３０スピンフィルター（Ａｍｉｃｏｎ、カタログ番号４２０８）を使用して５．７ｍｇ／ｍｌの最終濃度を達成するまで濃縮し、暗中で４℃で保存した。

【０２６９】

ヒト好中球上のＣ５ａＲに対するｈＡｂ－Ｑの結合

赤血球溶解ステップがない以外は上記と同様に調製したヒト好中球を、１，２００ｒｐｍで５分間遠心分離し、走化性緩衝液（４９％　ＲＰＭＩ　１６４０、４９％　Ｍｅｄｉｕｍ　１９９、２％透析ＦＢＳ；Ｇｉｂｃｏ）１ｍｌ中2×10^7細胞で再懸濁した。抗体ｈＡｂ－Ｑを、必要な最終濃度×２になるまで、走化性緩衝液中に希釈した。０．００２、０．００６、０．０２、０．０６、０．２、０．６、２、６、２０、６０、２００および６００ｕｇ／ｍｌの濃度を準備した。等体積の細胞（１２５μ１）および抗体（１２５μｌ）を混合し、３７℃で１０分間インキュベートして、ｈＡｂ－ＱをＣ５ａＲに結合させた。

【０２７０】

ヒト好中球走化性アッセイ

簡潔に述べると、好中球およびｈＡｂ－Ｑのインキュベーション後、2×10^6細胞および０～１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑを含む各混合物の１００μｌアリコートを、２４ウェルのトランスウェルプレート（６．５ｍｍインサート、３．０ミクロンのポリカーボネート膜；Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｃｏｓｔａｒ、カタログ番号３４１５）の上部チャンバ中に（２連で）配置した。組換えヒトＣ５ａ（最終濃度０、０．１、１、１０または１００ｎＭ）を含む走化性緩衝液（合計６００μｌ）を、下部チャンバ中に配置した。プレートを５％CO_2中で３７℃で３０分間インキュベートして、細胞を遊走させた。対照ウェルは、抗体なしの細胞またはＣ５ａなしの緩衝液を含んだ。インキュベーション後、下部チャンバ中の細胞数を、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）でのフローサイトメトリーによって計数した。

【０２７１】

結合したｈＡｂ－Ｑの測定

ヒト好中球上の結合したｈＡｂ－Ｑの量を、以下の２つの試料で計算した：走化性前の細胞＋抗体混合物の試料（試料Ａ）および走化性後のトランスウェルプレートの下部チャンバ由来の細胞の試料（試料ＢＬ）。これは、遊走した細胞の受容体占有率に差異があるかどうか、または受容体占有率が走化性の開始と終了との間で変化したかどうかを決定するためであった。結合したｈＡｂ－Ｑは、抗ｈＩｇＧ－ＦＩＴＣと共に細胞をインキュベートすることによって検出した。あるアッセイでは、結合した抗体の量は、第３の試料（走化性後のトランスウェルプレートの上部チャンバ由来の細胞＋抗体混合物の試料（試料ＢＵ））において測定した。

【０２７２】

試料Ａ（遊走前の細胞＋抗体１０μｌ）を、９６ウェルのＵ字底プレートのウェルに（２連で）添加し、卓上遠心機（Ｂｅｃｋｍａｎｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ａｌｌｅｇｒａ　Ｘ－１５Ｒ）において、室温で１，２００ｒｐｍで２分間遠心分離した。細胞ペレットを２００μｌ　ＰＢＳで２回洗浄し、その後、５０μｌの抗ｈＩｇＧ－ＦＩＴＣ（ｄＰＢＳ中に１／３００希釈）中に再懸濁し、室温で３０分間インキュベートした。試料を２，０００ｒｐｍで２分間遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットを１５０μｌ　ＦＡＣＳ緩衝

液（ＰＢＳ、１％　ＢＣＳ）中に再懸濁して、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって分析した。

【０２７３】

試料ＢＬ（遊走後のトランスウェルプレートの下部チャンバ由来の細胞２００μｌ）および試料ＢＵ（遊走後のトランスウェルプレートの上部チャンバ由来の細胞＋抗体混合物５０μｌ）を、９６ウェルのＵ字底プレートのウェルに（２連で）添加し、試料Ａについて記載したのと同様に処理した。

【０２７４】

未結合のＣ５ａ受容体の測定

ヒト好中球上の未結合の受容体の量を、以下の２つの試料で計算した：走化性前の細胞＋抗体混合物の試料（試料Ｃ）および走化性後のトランスウェルプレートの下部チャンバ由来の細胞の試料（試料Ｄ）。未結合の受容体は、ＦＩＴＣ標識したｈＡｂ－Ｑ（ｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣ）と共に細胞をインキュベートすることによって検出した。

【０２７５】

試料Ｃ（遊走前の細胞＋抗体１０μｌ）を、９６ウェルのＵ字底プレートのウェルに（２連で）添加し、室温で２，０００ｒｐｍで２分間遠心分離した。細胞ペレットを２００μｌ　ＰＢＳで２回洗浄し、その後、５０μｌのｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣ（１００μｇ／ｍｌ、ｄＰＢＳ中に希釈）中に再懸濁し、室温で３０分間インキュベートした。試料を２，０００ｒｐｍで２分間遠心分離し、上清を除去し、細胞ペレットをＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、１％ＢＣＳ）中に再懸濁して、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって分析した。

【０２７６】

試料Ｄ（遊走後のトランスウェルプレートの下部チャンバ由来の細胞の試料２００μ１）を、９６ウェルのＵ字底プレートのウェル中に（２連で）配置し、試料Ｃについて記載したのと同様に処理した。

【０２７７】

好中球Ｃ５ａ受容体占有率のフローサイトメトリー分析

ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーターを、チャネルＦＬ－１について確立した補償パラメーターを用いて設定した。試料を獲得し、死細胞および残骸を排除した。好中球は、ＦＳＣおよびＳＳＣに基づいて同定した。結合したｈＡｂ－Ｑ（抗ｈＩｇＧ－ＦＩＴＣ）または未結合のＣ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣ）の量を、試料中の好中球のＦＩＴＣ（ＦＬ－１）平均蛍光強度（ＭＦＩ）を決定することによって決定した。

【０２７８】

結合したｈＡｂ－Ｑの割合は、以下の等式に従って、（ｈＡｂ－Ｑなしの試料のＭＦＩである非特異的バックグラウンド（ＮＳＢ）の差し引き後に）３００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑと共にインキュベートした試料のＭＦＩの百分率として、試料ＡおよびＢの各々のＭＦＩを決定することによって定量した：

％占有された受容体＝［ＭＦＩ（試料）－ＭＦＩ（ＮＳＢ）］／［最大ＭＦＩ（３００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ試料）－ＭＦＩ（ＮＳＢ）］×１００

【０２７９】

未結合のＣ５ａ受容体の割合は、以下の等式に従って、（３００μｇ／ｍｌの未標識ｈＡｂ－Ｑと共にインキュベートした試料のＭＦＩである非特異的バックグラウンド（ＮＳＢ）の差し引き後に）ｈＡｂ－Ｑなしでインキュベートした試料の最大ＭＦＩの百分率として、試料ＣおよびＤの各々のＭＦＩを決定することによって定量した：

％未結合の受容体＝［ＭＦＩ（試料）－ＭＦＩ（ＮＳＢ）］／［最大ＭＦＩ（未標識ｈＡｂ－Ｑなしの試料）－ＭＦＩ（ＮＳＢ）］×１００

【０２８０】

結果

４つの実験を実施した。簡潔に述べると、健康なボランティアの静脈血から単離した精製好中球を、０．００１～１００μｇ／ｍｌの範囲の濃度のｈＡｂ－Ｑと共に１０分間プ

レインキュベートした。小アリコートのこの混合物を採取して、抗体結合受容体の量（％受容体占有率）を決定し、残りをトランスウェルプレートの上部チャンバ中に配置した。Ｃ５ａ（１０ｎＭ）を下部チャンバ中に配置した。３０分間のインキュベーション後、下部チャンバ中に遊走した細胞の数を、ＦＡＣＳを使用して決定した。ＦＩＴＣ標識した抗ｈＩｇＧおよびフローサイトメトリーを使用して、遊走終了時の下部チャンバおよび上部チャンバの両方における好中球上の結合抗体の量もまた決定した。１つの実験では、未結合の受容体（結合した抗体なし）のレベルを、遊走の前および後に、ＦＩＴＣ標識したｈＡｂ－Ｑと共に好中球をインキュベートすることによって決定した。

【０２８１】

好中球の遊走は、ｈＡｂ－Ｑによって遮断された

図１９は、４つの実験の組み合わせたデータから作成した、ｈＡｂ－Ｑ濃度対遊走細胞の総数のプロットを示す。ｈＡｂ－Ｑ濃度と遊走との間には、用量反応関係が存在した。０．１μｇ／ｍｌ以上の濃度で、ｈＡｂ－Ｑは、１０ｎＭのＣ５ａによって誘発されるヒト好中球の遊走を完全に遮断した。抗体濃度が低下するにつれて、遊走細胞の数は増加した。この結果は、上記の結果（図１７）と類似していた。

【０２８２】

受容体占有率は、抗体濃度の増加と共に増加した

４つの実験からの受容体占有率データを組み合わせた。走化性前および走化性後の下部トランスウェルチャンバ試料中の、各ｈＡｂ－Ｑ濃度での、好中球上の結合した抗体（占有された受容体）の平均量を、図２０にグラフで示す。走化性前の試料と下部トランスウェルチャンバからの走化性後の試料との間の、占有された受容体のレベルにおける差異（それぞれ、ＥＣ$_{50}$値０．３および１．１μｇ／ｍｌ）。所与のいずれのｈＡｂ－Ｑ濃度でも、走化性前よりも走化性後において、細胞に結合した抗体が少なかった。この差異は、優先的に遊走した細胞が、遊走しなかった細胞よりも、平均して、受容体を遮断するｈＡｂ－Ｑが少なかったことにおそらく起因した。この差異の別の説明は、予め混合された細胞＋抗体溶液（１００μｌ）が、下部チャンバ中の６００μｌの緩衝液を含むトランスウェルプレート中に配置したとき、本質的に約７分の１に希釈されていたことであろう。抗体がトランスウェルの３μｍの膜を自由に横切ることができる場合、希釈されて、結合反応の平衡は変化するであろう。

【０２８３】

未標識ｈＡｂ－Ｑ結合後の未結合の受容体の量を、１つの実験において測定した。このデータも、図２０中にグラフで示す。走化性前の試料および走化性後の試料の両方において、結合した受容体と未結合の受容体との間には、半比例の関係が観察された。

【０２８４】

受容体占有率と走化性阻害との間の関係

図１９に示す好中球の遊走データを、抗体なしの試料における１０ｎＭのＣ５ａに対して遊走する細胞の平均数の百分率として遊走細胞の数を表現することによって、変換した。次いでこの百分率を１００％から差し引いて、遊走の百分率阻害を得た。このように、抗体なし試料における遊走細胞の数は０％阻害となり、遊走細胞０は１００％阻害となった。次いでこのデータを、非線形回帰（シグモイダル用量応答（傾き変動）方程式）を使用するＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて分析した。次いで、この分析後に得られた曲線を、図２０由来の受容体占有率データと共にプロットして、図２１を作成した。

【０２８５】

図２１は、受容体占有率の増加が、好中球遊走阻害の増加と相関することを示している。遊走の阻害に関するＥＣ$_{50}$値は０．０３μｇ／ｍｌであり、受容体占有率に関するＥＣ$_{50}$値は、走化性前の試料については０．３μｇ／ｍｌであり、下部トランスウェルチャンバからの走化性後の試料については１．１μｇ／ｍｌであった。このデータは、非常に低い受容体占有率が、遊走の有意な遮断と関連していたことを示唆している。１０％の受容体だけが０．０３μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑで結合した抗体を有していたが、この用量は遊走の５０％の低下を引き起こした。受容体占有率が約１５～４５％の場合、０．３μ

ｇ／ｍｌの濃度で、遊走は完全に遮断された。結論として、ｈＡｂ－Ｑは、低レベルの受容体占有率では、Ｃ５ａが媒介するヒト好中球の遊走をｉｎ　ｖｉｔｒｏで遮断するのに非常に有効であった。

【実施例６】

【０２８６】

ヒト化抗体は、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球からのカルシウムイオン放出を遮断する。

カルシウム動員は、Ｃ５ａが好中球の表面上のその受容体Ｃ５ａＲに結合した後に生じる最初の事象の１つである。Ｃ５ａ結合は、内部貯蔵から放出されるサイトゾル遊離Ca^{2+}における即座の上昇（数秒以内）を引き起こし、その後、細胞外媒体からの流入に起因するより持続性の効果（数分にわたる）が生じる。遊離Ca^{2+}の一過的な増加は、Ｃ５ａＲへのＣ５ａ結合後に好中球で観察される種々の生物学的応答のこのセカンドメッセンジャーとして機能する。

【０２８７】

Ｃ５ａによって誘発されるCa^{2+}放出の遮断においてヒト化７Ｆ３抗体が有効であるかどうかを決定するために、「カルシウム流入」アッセイを以下のように実施した。簡潔に述べると、ヒト好中球を健康なボランティアから単離し、上記のように精製した。各試料について、1×10^{6}の好中球が必要であった。この好中球を遠心分離し、ＰＢＳで洗浄し、次いで、Ｃｅｌｌ　Ｄｙｅ（２５０μＭのスルフィンピラゾンおよび１．７μＭのＦｌｕｏ３－ＡＭ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、カタログ番号３４３２４２）またはＦｌｕｏ４－ＡＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む、Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＭＧＢ［５ｍＭ　ＫＣｌ、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、３００μＭ　$MgSO_4$、１ｍＭ　$MgCl_2$、２２０μＭ　KH_2PO_4、１．１ｍＭ　$NaHPO_4$、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、５．５ｍＭグルコース］）中に1×10^{7}細胞／ｍｌで再懸濁し、暗中で室温で４０分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＭＧＢ＋２５０μＭスルフィンピラゾンで洗浄して、過剰の色素を除去し、再度遠心分離し、Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＭＧＢ＋２５０μＭスルフィンピラゾン中に2×10^{6}細胞／ｍｌで再懸濁した。細胞（０．５ｍｌ）を、各試料につき１つのチューブで非滅菌ガラスＦＡＣＳチューブ中にアリコート化し、１時間以内に使用した。種々の試薬（Ｃ５ａ、イオノマイシン、抗体）を、Ｉｎｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＭＧＢ（ＨＥＰＥＳおよびグルコースを含まないＣｏｍｐｌｅｔｅ　ＭＧＢ）中に、最終濃度×１０で調製した。ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を設定し、好中球を、ｘ軸方向への散乱、ｙ軸側への散乱を使用してゲートした。ｙ軸のＦＬ－１（ＦＩＴＣ）チャネルを使用して、好中球応答をチェックした。試料の蛍光を継続的に測定し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔファイルでデータを保存した。種々の対照試験を他の試料の前に実施した（処理なしの細胞を使用して、ベースライン蛍光を確立した）。Ｃ５ａを細胞に添加して（１０ｎＭの組換えヒトＣ５ａ（Ｓｉｇｍａ）５０μｌ：最終濃度１ｎＭ）、応答を試験した。抗体プレ処理なしのとき、細胞は、機能的であればｈＣ５ａに対して直ぐに応答したが、応答が得られなかった場合には、細胞は不適切であった。イオノマイシン（チューブ中、０．１～１μｇ／ｍｌの最終濃度）を使用して、細胞が色素を保持していたかどうかを決定した。

【０２８８】

Ｃ５ａによって誘発されるCa^{2+}放出の遮断においてヒト化７Ｆ３抗体が有効であるかどうかを決定するために、色素を保持させた好中球を、抗Ｃ５ａＲ抗体（チューブ中０．１～５０μｇ／ｍｌの最終濃度）と共に１０～２５分間プレインキュベートした。次いで、細胞＋抗体をフローサイトメーターにかけて、１ｎＭのｈＣ５ａ（最終濃度）の添加前のベースライン読み取りを得た。ｈＣ５ａが蛍光においてスパイクを生じなかった場合、イオノマイシン（Ｓｉｇｍａ、０．１～１μｇ／ｍｌの最終濃度）を添加して、細胞が応答できること（生存）をチェックした。

【０２８９】

Ｃ５ａによって誘発されるCa^{2+}放出を遮断する元のマウス抗ヒトＣ５ａＲ　ｍＡｂ

７Ｆ３の能力を調査した。１０μｇ／ｍｌの濃度の７Ｆ３は、Ｃ５ａによって誘発されるＣａ$^{2+}$流動を完全に遮断し、１μｇ／ｍｌでは部分的に有効であったが、より低い濃度（０．０１μｇ／ｍｌおよび０．１μｇ／ｍｌ）は、Ｃａ$^{2+}$放出を遮断しなかった。１０μｇ／ｍｌの７Ｆ３と共にインキュベートした細胞は、１μｇ／ｍｌのイオノマイシンをＣ５ａの約３０秒後に添加したとき、平均蛍光強度（ＭＦＩ）の増加によって明らかなように、Ｃａ$^{2+}$をなお放出できた（データ示さず）。

【０２９０】

ヒト化７Ｆ３抗体（Ｆ、Ｇ、Ｊ、Ｍ、ＮおよびＯ）を、１０μｇ／ｍｌの濃度で、１ｎＭのＣ５ａを添加する約１０分前に好中球と共にインキュベートした場合、ヒト好中球におけるＣ５ａによって誘発されるカルシウム放出を中和するそれらの能力について試験した。抗体ＮおよびＯはＣａ$^{2+}$流動を完全に遮断したが、抗体Ｆ、Ｇ、ＪおよびＭは、抗体と共にプレインキュベートしていない対照細胞と比較して、より低い観察された蛍光値によって示唆されるように、Ｃａ$^{2+}$放出を部分的に遮断した。抗体ＮまたはＯとプレインキュベートした細胞にイオノマイシンを添加した場合、ＭＦＩは即座に増加し、これは、遮断抗体の存在下で好中球がなおもＣａ$^{2+}$放出可能なままであったことを実証している（データ示さず）。

【０２９１】

抗体Ｇ、Ｊ、Ｍ、ＮおよびＱについての用量応答関係を、Ｃ５ａの添加前に種々の濃度の抗体と共にヒト好中球をプレインキュベートし、Ｃａ$^{2+}$放出を測定することによって試験した。３０μｇ／ｍｌの濃度の抗体Ｇは、Ｃ５ａによって誘発されるＣａ$^{2+}$放出を完全に遮断したが、より低い濃度（０．１、１、１０μｇ／ｍｌ）は有効ではなかった。これらの結果は、抗体Ｍと同じであった。どちらの場合も、３０μｇ／ｍｌの抗体で処理した細胞は、１μｇ／ｍｌのイオノマイシンをＣ５ａの約９０秒後に添加したときに示されるように、なおもＣａ$^{2+}$放出可能であった。抗体Ｊは、３０μｇ／ｍｌおよび１０μｇ／ｍｌの濃度で完全な遮断を示したが、以前の実験では、１０μｇ／ｍｌの抗体Ｊは、Ｃａ$^{2+}$流動の遮断において部分的に有効なだけであった。抗体Ｎは最も有効な抗体であり、２つの別個の実験において１０μｇ／ｍｌおよび１μｇ／ｍｌで、Ｃ５ａによって誘発されるＣａ$^{2+}$放出を完全に遮断した。すべての場合において、Ｃ５ａがＣａ$^{2+}$流動を引き起こすことができなかった場合、１μｇ／ｍｌのイオノマイシンを添加し、ＭＦＩにおける大きい増加を生じさせた。これは、これらの細胞がなおも応答可能であったことを示している。抗体Ｑを用いると、Ｃ５ａによって誘発されるヒト好中球からのＣａ$^{2+}$放出は、１ｎＭのＣ５ａの添加の際の蛍光におけるピークの欠如によって示されるように、５μｇ／ｍｌまたは５０μｇ／ｍｌの抗体Ｑと共に細胞をプレインキュベートしたときに防止された。これらの試料へのイオノマイシンの添加の短時間後に、蛍光における通常の増加が発生し、このことは、好中球がなおも応答可能であったことを示唆している。０．５μｇ／ｍｌの抗体Ｑとのプレインキュベーションは有効ではなく、蛍光における大きな増加が、１ｎＭのＣ５ａを試料に添加した後に観察され、これは、１ｎＭのＣ５ａのみ（抗体の添加なし）で細胞を処理したときに観察された効果と類似していた。これらの結果を表７にまとめる。

【０２９２】

【表７】

表7:C5aによって誘発されるCa^{2+}放出の遮断において有効な各抗体の濃度を示す、カルシウム流動アッセイ結果。

抗体	C5aによって誘発されるCa^{2+}流動の遮断において有効なAbの濃度	試験はしたがCa^{2+}流動の遮断において有効でないAbの濃度
F^	-	10μg/ml
G	30μg/ml	0.1,1 & 10μg/ml
J	10# & 30μg/ml	0.1 & 1μg/ml
M	30μg/ml	1 & 10μg/ml
N	1 & 10μg/ml	0.01 & .01μg/ml
O^	10μg/ml	-
Q	5 & 50μg/ml	0.5μg/ml
7F3	1# & 10μg/ml	0.01 & 0.1μg/ml

この濃度は、1つの実験において部分的に中和しているが、別の実験では完全に中和している。
^ 単一のAb濃度のみを試験した。

【０２９３】

表７は、最も有効な遮断ヒト化７Ｆ３抗体が、抗体ＮおよびＱであったことを示している。興味深いことに、抗体Ｎはアイソタイプ ＩｇＧ１であり、好中球上のＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）への結合に起因して、アイソタイプＩｇＧ４を有する抗体よりも、有効であり得る。ヒトＩｇＧ１は、ｈＩｇＧ４よりも、ＦｃγＲに対するアフィニティーが高い。抗体ＮまたはＯによるＦｃγＲの結合が、Ｃ５ａによって媒介されるＣａ$^{2+}$放出の中和に寄与するかどうかを決定するために、Ｆｌｕｏ３－ＡＭを予め保持させたヒト好中球を、抗体ＮもしくはＯ単独、または抗体Ｎ＋５０μｌのＦｃブロック［好中球が単離されたのと同じ血液試料から調製したヒト血清］、または抗体Ｏ＋Ｆｃブロック、またはＦｃブロック単独と共に、１０分間プレインキュベートした。Ｃ５ａ（および必要に応じてイオノマイシン）に応答した細胞内Ｃａ$^{2+}$レベルへの変化を、フローサイトメーターで測定した。ＦｃブロックＯの存在下でも非存在下でも、Ｃ５ａによって誘発されるＣａ$^{2+}$流動を中和する抗体Ｎの能力にも抗体Ｏの能力にも差異は存在しなかった。これらの細胞は、イオノマイシン添加の効果によって示されるように、Ｃａ$^{2+}$放出がなおも可能であった。好中球をＦｃブロック単独と共にプレインキュベートすることでは、Ｃ５ａによって誘発されるＣａ$^{2+}$放出は阻止されなかった。これらのデータは、抗体ＮおよびＯが、ＦｃγＲとの相互作用を介してではなく、Ｃ５ａＲへの結合およびＣ５ａシグナル伝達の遮断を介して、保護効果を発揮していることを示唆する。

【実施例７】

【０２９４】

好中球活性化に対するヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の影響

Ａ．ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体はｉｎ　ｖｉｔｒｏでヒト好中球のＣ５ａによって誘発される活性化を阻止する

Ｃ５ａは、表面抗原ＣＤ１１ｂ（ＭＡＣ－１インテグリンのα鎖、走化性および内皮との相互作用を媒介する）の上方制御、および接着性分子ＣＤ６２Ｌ（Ｌ－セレクチン）の消失を誘導する、ヒト好中球の強力な活性剤である。Ｃ５ａ媒介性好中球活性化を阻止するヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の能力は、全血活性化アッセイ中で調べた。

【０２９５】

方法

健常なヒトボランティア（２ドナー）由来の血液を、抗凝血剤クエン酸デキストロース（ＡＣＤ）を含有する試験管に回収し、H_2ＤＣＦＤＡ（最終５０μＭ）を含有するウェルに加えて室温（２３℃）で１０分間置き、次に０．３～３００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ

、０．３〜３００μｇ／ｍｌのＩｇＧ４アイソタイプ対照、またはｄＰＢＳのみを加えた。試料は室温（２３℃）で２０分間インキュベートした。Ｃ５ａ（１００ｎＭ最終）、ＰＭＡ（０．２〜４００ｎｇ／ｍｌ）、またはｄＰＢＳをそれぞれの試料に加え、室温（２３℃）で２０分間再度インキュベートした。抗ＣＤ１１ｂおよび抗ＣＤ６２Ｌ抗体（１／４００最終）をすべての試料に加え１５分間置いた。赤血球はＲＢＣ溶解バッファーを使用して除去し、白血球はｄＰＢＳ＋１％ＦＣＳ中に懸濁させた。

【０２９６】

好中球におけるＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現レベルは以下のように測定した。ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（ＢＤ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を、チャネルＦＬ−２およびＦＬ−４に関して確立された補償パラメーターでセットアップした。試料を入手して死細胞および残骸は除外した。好中球は高いＦＳＣおよびＳＳＣを有するとして同定し、これらの細胞のＰＥ（ＦＬ−２）およびＡＰＣ（ＦＬ−４）平均蛍光強度（ＭＦＩ）を測定した。

【０２９７】

ＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現レベル（ＭＦＩ）は以下の式を使用して最大発現率として報告した：

最大発現率＝［（試料−最小発現）／（最大発現−最小発現）］×１００

【０２９８】

注釈。最大発現はＣＤ１１ｂに関して無抗体（ｄＰＢＳのみ）＋１００ｎＭのＣ５ａ試料、および（ＣＤ６２Ｌは活性化好中球において低減するので）ＣＤ６２Ｌに関して無抗体（ｄＰＢＳ）＋０ｎＭのＣ５ａ（ｄＰＢＳ）試料であった。

【０２９９】

ＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌ発現のＣ５ａ媒介性変化のｈＡｂ−Ｑ中和に関するＩＣ$_{50}$値は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（ｖ４．０）ソフトウェアを使用して計算した。データは非線形回帰を使用してそれぞれの実験のＳ字状用量応答（変数勾配）式および２つの実験の平均に適合させた。

【０３００】

結果

Ｃ５ａによって誘発される好中球活性化に対するｈＡｂ−Ｑの阻害効果を、２ドナーを使用して全血アッセイにおいて評価した。Ｃ５ａで活性化した試料中では、ＣＤ１１ｂの発現はｈＡｂ−Ｑの不在下で増大した。しかしながら、このＣＤ１１ｂ発現の増大は、ｈＡｂ−Ｑが存在した場合、ＩＣ５０値約１０．７μｇ／ｍｌで用量応答式に妨げられた（図２２）。アイソタイプ対照抗体は、１００μｇ／ｍｌ超でさえＣＤ１１ｂ発現のＣ５ａによって誘発される上方制御を妨げなかった（データ示さず）。

【０３０１】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ−Ｑは、約５．４μｇ／ｍｌのＩＣ５０値で用量依存式にＣＤ６２ＬのＣ５ａによって誘発された消失も妨げた（図２３）。アイソタイプ対照抗体は、１００μｇ／ｍｌ超でさえＣＤ６２ＬのＣ５ａによって誘発された消失を妨げなかった（データ示さず）。

【０３０２】

Ｂ．ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで溶液中のヒト好中球を活性化しなかった

好中球のＣ５ａによって誘発される活性を中和するヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の能力は前に記載した。以下の実験では、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体をＣ５ａの不在下で精製ヒト好中球と共にインキュベートし、これは細胞表面マーカー、ＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現を変えなかった。これらの実験は、抗Ｃ５ａＲ抗体は、溶液中の細胞自体は活性化しないことを実証した。

【０３０３】

方法

ヒト好中球活性化アッセイおよびＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現の測定

ヒト末梢静脈全血を、一連の実験中でヒト化抗ｈＣ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑ、ｈＡｂ－ＪまたはｈＡｂ－Ｇと共にｅｘ　ｖｉｖｏでインキュベートした。好中球活性化は、以下に記載するようにＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現レベルを決定することにより測定した。ＣＤ６２Ｌレベルの低下またはＣＤ１１ｂレベルの増大は、好中球活性化の指標である。

【０３０４】

実験１

簡単に述べると、健常ドナー由来のヘパリン化ヒト全血を、１、１０、または１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－ＪまたはｈＡｂ－Ｑ、１０μＭのｆＭＬＰ（ホルミルＭｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅペプチド）、またはｄＰＢＳのみのいずれかに加えた。試料は、１／１００の最終希釈で抗ＣＤ１１ｂ－ＰＥおよび抗ＣＤ６２Ｌ－ＡＰＣ抗体を加える前に、５％CO_2中で３７℃において１時間インキュベートした。赤血球はＲＢＣ溶解バッファーを使用して除去し、白血球はｄＰＢＳ＋１％ＦＣＳ中に再懸濁させた。

【０３０５】

ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（ＢＤ）を、チャネルＦＬ－２およびＦＬ－４に関して確定した補償パラメーターでセットアップした。試料を入手して死細胞および残骸は除外した。好中球は高いＦＳＣおよびＳＳＣを有するとして同定した。ＦＬ－２（ＣＤ１１ｂ－ＰＥ）およびＦＬ－４（ＣＤ６２Ｌ－ＡＰＣ）チャネル中のこれらの細胞の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を計算した。ＣＤ１１ｂ（ＰＥ）およびＣＤ６２Ｌ（ＡＰＣ）のレベルをそれぞれの試料に関して決定し、ｄＰＢＳ対照に対する発現倍数として報告した。

【０３０６】

実験２

４健常ボランティア由来のヘパリン化血液を、０．１、１、１０または１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｇ、ｈＡｂ－Ｊ、１０ｎＭまたは１００ｎＭのヒトＣ５ａまたはｄＰＢＳのみのいずれかを含有する試験管に加えた。３７℃で２０分置いた後、６％デキストラン（最終濃度１％）をそれぞれの試験管に加え、３０分間放置して赤血球を沈殿させた。上部の白血球が豊富な血漿層を９６ウェルプレートに移し、そこで細胞を冷却ｄＰＢＳ中で洗浄した。遠心分離後、上清を除去し、細胞は抗ＣＤ１１ｂ－ＰＥ（１／５０）および抗ＣＤ６２Ｌ－ＡＰＣ（１／５０）を含有するｄＰＢＳ中に再懸濁し、次いで氷上で３０分間インキュベートした。細胞は再度洗浄し、ｄＰＢＳ＋１％ＦＣＳ中に再懸濁した。好中球におけるＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現レベルは前に記載したように測定した。

【０３０７】

実験３

健常なヒトボランティア（２ドナー）由来の血液を、抗凝血剤クエン酸デキストロース（ＡＣＤ）を含有する試験管に回収し、Ｃ５ａを試料に加えなかったこと以外、実施例７Ａ中で前に記載したように処理した。好中球におけるＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌのレベルは、実施例７Ａ中で前に記載したようにＦＡＣＳによって測定した。

【０３０８】

結果

ヒト好中球におけるＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を用いた全血アッセイ中で変わらなかった。

第一の実験では、ヒト全血を１、１０、または１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－ＱまたはｈＡｂ－Ｊ、１０μＭのｆＭＬＰ、またはｄＰＢＳと共に３７℃で１時間インキュベートし、ＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現はフローサイトメトリーによって測定した。１～１００μｇ／ｍｌの任意の濃度においてｈＡｂ－ＱまたはｈＡｂ－Ｊを含有する試料中では、ＣＤ１１ｂ発現の増大またはＣＤ６２Ｌ発現の低下はなかった（図２４Ａおよび２４Ｂ）。対照的に、顆粒球を活性化することが知られているペプチドｆＭＬＰは、ＣＤ１１ｂ発現の多大な増大およびＣＤ６２Ｌの消失をもたらした。

【０３０９】

第二の実験では、４ドナー由来のヒト全血を、０．１～１００μｇ／ｍｌのヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－ＧまたはｈＡｂ－Ｊ、１０～１００ｎＭのヒトＣ５ａ、またはｄＰＢＳと共に３７℃で２０分間インキュベートした。処理後のｄＰＢＳ対照における発現と比較した好中球におけるＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現は、それぞれ図２５Ａおよび２５Ｂ中に示す。試験した試料のいずれにおいても、好中球ＣＤ１１ｂのｈＡｂ－ＧもしくはｈＡｂ－Ｊ誘発性上方制御またはＣＤ６２Ｌの発現の消失はなかった。対照的に、１０ｎＭおよび１００ｎＭのＣ５ａは、それぞれｄＰＢＳと比較してＣＤ１１ｂ発現の２．５および３．０倍の増大をもたらし、一方ＣＤ６２Ｌの発現はそれぞれｄＰＢＳ対照中で０．３３および０．１４のレベルに低下した。ｆＭＬＰと同様に、Ｃ５ａは顆粒球を活性化することが知られている。

【０３１０】

第三の実験では、２健常ボランティア由来の全血を０．３～３００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑまたはアイソタイプ対照抗体に加え、次いで１００ｎＭのＣ５ａまたはｄＰＢＳをそれぞれの試料に加えた。好中球ＣＤ１１ｂおよびＣＤ６２Ｌの発現はフローサイトメトリーによって測定し、結果は図２６ａおよび２６ｂ中に示す。ＣＤ１１ｂの発現レベルは、ＰＢＳ中にｈＡｂ－Ｑまたはアイソタイプ対照抗体を含有する試料中で変化せず（増大せず）、３００μｇ／ｍｌまでの任意の抗体濃度で活性化がなかったことを示す（図２６ａ）。しかしながら、アイソタイプ対照抗体を含有する試料に１００ｎＭのＣ５ａを加えたとき、１００ｎＭのＣ５ａを含有し抗体を含有しない試料中で測定してＣＤ１１ｂの発現は最大レベルに増大した。ＣＤ６２Ｌの発現はＣ５ａを含まない試料中でその最大レベル（活性化なし）であった。３００μｇ／ｍｌまでの濃度でのｈＡｂ－Ｑまたはアイソタイプ対照抗体の添加はＣＤ６２Ｌ発現のレベルを下げなかった、すなわち、好中球を活性化しなかった（図２６ｂ）。対照的に、アイソタイプ対照抗体および１００ｎＭのＣ５ａを含有する試料はＣＤ６２Ｌ発現を消失し、最大に活性化された。

【０３１１】

要約すると、これらの結果は、ｅｘ　ｖｉｖｏでのヒト全血のインキュベーション後のＣＤ６２ＬおよびＣＤ１１ｂの発現レベルによって示されるように、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体はヒト好中球を活性化しないことを実証する。

【０３１２】

Ｃ．ｈＡｂ－Ｑは、固形支持体と結合するとｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてヒト好中球を活性化しない

スーパーオキシドは、生成された好中球を活性化して病原体と闘う活性酸素種の１つである。しかしながら、スーパーオキシドは正常組織に対して悪影響を有する可能性もある。抗Ｃ５ａＲ抗体がそれ自体で好中球によるスーパーオキシドの生成を刺激することができる可能性を調べた。以下に記載する実験は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑがヒト好中球を刺激してスーパーオキシドを生成することはないが、ヒト好中球がＣ５ａによって刺激されるとき、その生成に対抗することができることを示す。

【０３１３】

方法

単離ヒト好中球によるｉｎ　ｖｉｔｒｏでのスーパーオキシド生成の測定

スーパーオキシド（O_2^-）は、好中球が炎症性メディエータ、例えばＣ５ａによって活性化されるときＮＡＤＰＨオキシダーゼによって生成される第一の酸素含有物質である。いくつかのO_2^-は細胞外に分泌される。膜不透過性であるシトクロムＣ（Fe^{3+}）は、スーパーオキシドによって、５５０ｎｍで分光光度法によって検出することができるシトクロムＣ（Fe^{2+}）に還元される。本試験では、９６ウェルプレートを使用して、Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ^2（Ｍａｙｏ　ａｎｄ　Ｃｕｒｎｕｔｔｅ、１９９０）を使用して分光光度法によりシトクロムＣの減少を決定した。

【０３１４】

ヒト好中球の調製

ヒト好中球を前の実施例５Ｂ中で前に記載したように精製した。９６ウェルマイクロタ

イタープレートは、ヒトフィブリノゲン（１ｍｇ／ｍｌ）で一晩コーティングした。それぞれのウェルに、５０μｌのＲＭ（ＨＢＳＳ（カタログ番号１４１７５Ｇｉｂｃｏ）および０．４ｍＭの$MgSO_4$、０．５ｍＭの$MgCl_2$、０．５ｍＭの$CaCl_2$および２０ｍＭのＨＥＰＥＳからなる反応混合物、および７．４でのｐＨセット）中の１００μｌのシトクロムＣ（１５０μＭ）および２００，０００の好中球を加えた。プレートは３７℃でＷａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ^2（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）中に挿入し、非刺激性O_2^-生成は４分間毎分測定した。次に抗体を１５μｌのＲＭ中に加え、ウェルは１０分間２分毎に測定した。最後にＣ５ａを加え、プレートは３０分間２分毎に測定し、次に６０分間１０分毎に測定した。１．５時間後に測定した値を結果として使用した。４つのウェルをそれぞれの群に使用した。

【０３１５】

結果

２～６の健常ドナー由来の好中球をこの試験中で使用した。図２７は、３７℃で１．５時間のインキュベーション後のスーパーオキシドの生成を示す。反応混合物（ＲＭ）は対照として使用した（６ドナー）。炎症性メディエータＣ５ａは確かなO_2^-生成を誘導し（６ドナー）、これは抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑによって対抗された（５ドナー）。この試験では、高濃度の抗体を使用してどんな刺激効果も見落とさないことを確実にした。１０００μｇ／ｍｌ（４ドナー）、２５０μｇ／ｍｌ（３ドナー）および１００μｇ／ｍｌ（２ドナー）でのｈＡｂ－Ｑ、ならびに、ネズミ抗体Ａ－ＴＮＰのヒト化型である、対照、無関係なIgG_4抗体ＨｚＡＴＮＰ（２ドナー）は、刺激効果がなかったことは明らかである。

【０３１６】

要約すると、前に記載した結果は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑはヒト好中球を刺激せず、フリーラジカルO_2^-を生成しなかったことを実証する。対照的に、それはＣ５ａによって誘発された生成に対抗することができた。

【実施例８】

【０３１７】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、ｅｘ　ｖｉｖｏヒト全血アッセイ中で白血球細胞を枯渇させない

ｈＡｂ－ＱがＣ５ａＲを発現する他のヒト細胞、特に血中の好中球および単球を死滅または枯渇することができたかどうか決定するために、いくつかのｅｘ　ｖｉｖｏ全血枯渇アッセイを実施した。全血枯渇試験は、補体または抗体媒介性死滅機構（ＣＤＣ、ＡＤＣＣ）を不活性化しない、抗凝血剤、レピルジン（Ｒｅｆｌｕｄａｎ（登録商標））を使用した。レピルジンは非常に特異的な直接的トロンビン阻害剤である。それはヒルから抽出した抗凝血剤ヒルジンの組換え類似体である。

【０３１８】

方法

血液採取

末梢静脈血を、５０または５００μｇ／ｍｌのレピルジン（Ｒｅｆｌｕｄａｎ（登録商標）、Ｐｈａｒｍｉｏｎ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、オーストラリア）の最終濃度を含有する滅菌１５ｍｌのポリプロピレンチューブ中に健常なボランティアから採取した。

【０３１９】

抗体のインキュベーション

抗凝固処理血液のアリコート（５０μｌ）を９６ウェルプレートに分配し、１００μｇ／ｍｌの最終濃度でｄＰＢＳに希釈した２５μｌの抗体と共に５％CO_2中で３７℃において３．５時間２連でインキュベートした。対照試料は５０μｌの血液および２５μｌのｄＰＢＳを含んでいた。抗ｈＣＤ６６ｂ－ＦＩＴＣ（１／１００最終）、抗ｈＣＤ１９－ＡＰＣ（１／３００最終）および抗ｈＣＤ１４－ＰＥ（１／３００最終）を含む染色カクテル（２５μｌ）をそれぞれの試料に加え、５％CO_2中で３７℃において３０分間イン

キュベーションを続けた。次いで、キャリブレーションビーズ（５０μｌ、９８０ビーズ／μｌ；Ｆｌｏｗ－Ｃｏｕｎｔ　Ｆｌｕｏｒｏｓｐｈｅｒｅｓ；Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、ＵＳＡ；カタログ番号７５４７０５３）をそれぞれの試料に加えた。１００μｌの１×ＦＡＣＳ溶解溶液（１０×ＦＡＣＳ溶解溶液；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；カタログ番号３４９２０２）を加えることにより赤血球を溶かした。全試料を１．５ｍｌの試験管に移し、さらなる５００μｌの１×ＦＡＣＳ溶解溶液を加えた。試験管は３分間４，０００ｒｐｍで遠心分離にかけ、上清は除去した。細胞およびビーズは１５０μｌのＦＡＣＳバッファー（ｄＰＢＳ＋１％ＢＣＳ）中に再懸濁した。

【０３２０】

ＦＡＣＳ分析

細胞はＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）フローサイトメーターで分析した。前方散乱光および側方散乱光を使用してすべての細胞を含めたが、残骸は除外した。ゲートを設定して、ＣＤ６６ｂ－ＦＩＴＣ（ＦＬ－１）陽性細胞（好中球）、ＣＤ１９－ＡＰＣ（ＦＬ－４）陽性細胞（Ｂリンパ球）またはＣＤ１４－ＰＥ（ＦＬ－２）陽性細胞（単球）を計数した。５０００ビーズ当たりの細胞数を決定した。

【０３２１】

血液１ミリリットル当たりのそれぞれの細胞型の合計数は以下のように計算した：

細胞数／ｍｌ＝５０００ビーズ中の細胞数×（５０×９８０）／５０００×１０００／５０

【０３２２】

枯渇率は以下のように計算した：

枯渇率＝１００×（１－（細胞数／抗体処理試料１ｍｌ／（細胞数／ＰＢＳ処理試料１ｍｌ））

【０３２３】

結果

レピルジンを含有する滅菌試験管中に回収した３人の異なる健常ボランティア由来の全末梢静脈血を使用して、３つの別個の実験を実施した。血液は、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブ（陽性対照抗ＣＤ２０抗体）、ｈＩｇＧ４（陰性アイソタイプ対照抗体）またはＰＢＳ（バッファー対照、細胞枯渇の程度を測定するためのベースライン）と共にインキュベートした。インキュベーションの最後に、ＣＤ６６ｂ、ＣＤ１４およびＣＤ１９に対する標識抗体のカクテルを使用して細胞を染色し、顆粒球（好中球：ＣＤ６６ｂ＋ｖｅ）、単球（ＣＤ６６ｂ－ｖｅ、ＣＤ１４＋ｖｅ）およびＢ細胞（ＣＤ１９＋ｖｅ）を同定した。それぞれの細胞型の絶対数を決定するために、既知の濃度を有する一定体積のキャリブレーションビーズをそれぞれの試料に加えた。したがって、それぞれの試料中の好中球（顆粒球）、単球およびＢ細胞の絶対数（１ｍｌ当たりの細胞数として）、および、ＰＢＳとインキュベートした試料中の細胞の合計数の割合として、発現した抗体を用いた治療後のそれぞれの細胞型の相対的枯渇を決定することができた。

【０３２４】

３つの実験からのデータは平均し、結果は図２８および２９中に表す。図２８は、３セットのデータから計算した細胞の平均数（±標準偏差）を示す。図２９は、ＰＢＳ処理試料中の細胞数と比較した、それぞれの細胞型の平均枯渇率（±ｓｄ）を示す。データは、ｈＡｂ－Ｑとの４時間のインキュベーション後に顆粒球または単球の枯渇がなかったことを示す。対照的に、リツキシマブは（ＣＤ２０、リツキシマブの標的を発現する）Ｂ細胞の約７０％の枯渇を引き起こしたが、ＣＤ２０を発現しない単球または好中球、細胞型の数は減らさなかった。

【実施例９】

【０３２５】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑは、補体媒介性溶解によってＣ５ａＲ発現細胞を死滅しない

Ｃ５ａＲ発現細胞（好中球、単球など）を死滅しないヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を開発する

ことは望まれていた。いくつかの機構によって、抗体は標的抗原を発現する細胞の死滅を開始することができる。ｈＡｂ－Ｑは、補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）および抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ＡＤＣＣ）を回避／低減するためのＩｇＧ４アイソタイプとして生成した。補体媒介性死滅は、抗原－抗体複合体が補体タンパク質、Ｃ１ｑと結合すると、抗体のＦｃドメインを介して誘導されて、一連のタンパク質分解事象の活性化を開始させ、Ｃ５ａの放出および標的細胞を溶かす膜攻撃複合体の形成をもたらす。

【０３２６】

ｈＡｂ－ＱがＣＤＣ活性を誘導しなかったことを実証するために、以下の実験を実施した。

【０３２７】

方法

高レベルのＣ５ａＲを発現するＲａｍｏｓ　Ｅ２クローンの作製

ＣＤ２０発現ヒトＢリンパ球細胞系（Ｂｕｒｋｉｔｔのリンパ腫由来）、Ｒａｍｏｓを、製造者のプロトコルに従いリポフェクタミンＴＭＬＴＸ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ヒトＣ５ａＲ発現プラスミド（ｐｃＤＮＡ３．１－Ｃ５ａＲ；４μｇのＤＮＡ／３×１０^{6}個の細胞）で安定的にトランスフェクトした。トランスフェクションの４０時間後に、Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ（Ｇ４１８硫酸塩、Ｇｉｂｃｏ）を２ｍｇ／ｍｌで増殖培地に加えた。細胞（非クローン）を選択培地中で約３週間増殖させ、このときトランスフェクトしたＣ５ａＲの発現および割合を、抗Ｃ５ａＲ抗体を使用してフローサイトメトリーによって確認した。約３０～４０の陽性クローン／プレートをもたらす密度で、細胞を３８４ウェルプレートに移した。単クローンコロニーを選択し、増殖用に９６ウェルプレートに移した。十分な増殖後、それぞれのクローンにおけるＣ５ａＲの発現は、抗Ｃ５ａＲ抗体を使用してフローサイトメトリーによって決定した。最高発現クローン、Ｅ２を選択し増殖させた。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞はＲＰＭＩ、１０％のＦＣＳ、２ｍｇ／ｍｌのＧ４１８中に維持した。

【０３２８】

ウサギ補体を用いたＣＤＣのアッセイ

標的細胞（Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞）は、抗体または培地単独（ＲＰＭＩ＋１０％熱不活性化ＢＣＳ）と共に５％CO_2中で３７℃において３０分間インキュベートした。インキュベーション後、ＲＰＭＩに希釈したウサギ補体（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）を１％ｖ／ｖの最終濃度で試料に加えた。５％CO_2中で３７℃においてさらに２時間、試料をインキュベートした。

【０３２９】

Ｔｏ－Ｐｒｏ－３陽性として定義した非生存標的細胞をフローサイトメトリーにより測定し、全標的細胞の割合として表す前に、蛍光性生死判別色素、Ｔｏ－Ｐｒｏ－３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）をそれぞれの試料に加えた。

【０３３０】

それぞれの試料の特異的ＣＤＣは、対応する試料の「標的および補体」（Ｂ）から非生存「標的のみ」の平均率（Ａ）を引くことによって計算した。次いで「標的および補体」の「培地のみ」試料（Ｃ）をそれぞれの試料から引いて、特異的ＣＤＣの最終値を得た：

特異的ＣＤＣ（溶解率）＝（Ｂ－Ａ）－Ｃ

【０３３１】

前の式は以下のように表すこともできる：

特異的ＣＤＣ（溶解率）＝（Ｔ＋ＣＳ－Ｔ＋ＣＭＯ）－（ＴＯＳ－ＴＯＭＯ）。

上式で：Ｔ＋ＣＳは抗体を含む標的＋補体試料中の非生存細胞の平均率であり、

Ｔ＋ＣＭＯは標的＋補体培地のみ（抗体含まず）中の非生存細胞の平均率であり、

ＴＯＳは抗体を含む標的のみ試料中の非生存細胞の平均率であり、

ＴＯＭＯは標的のみ培地のみ（抗体含まず）中の非生存細胞の平均率である。

【０３３２】

ヒト血清を用いたＣＤＣアッセイ

ヒト血清を使用するＡＤＣＣアッセイを、実施例１０中で以下に記載したように実施した。抗体のＣＤＣ活性は、ヒト血清を含有する「標的のみ＋抗体」試料（Ｂ）から非生存「標的のみ／培地のみ」試料の平均率（Ａ）を引くことによって決定した。次いで、熱不活性化ウシ血清反応中の非生存「標的のみ＋抗体」試料（Ｃ）－「標的のみ／培地のみ」試料（Ｄ）の割合を引いて、特異的ＣＤＣの最終値を得た：

特異的ＣＤＣ（溶解率）＝（Ｂ－Ａ）－（Ｃ－Ｄ）

【０３３３】

結果

Ｒａｍｏｓ　Ｅ２標的細胞を使用したｈＡｂ－ＱのＣＤＣアッセイ

補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）を誘導するｈＡｂ－Ｑの可能性を、ウサギ補体の存在下で抗体とヒト好中球をインキュベートすることによって最初に調べた。このアッセイ中好中球の特異的死滅（０．５％未満の細胞死）はほとんどなかった（データ示さず）。

【０３３４】

高レベルのヒトＣ５ａＲおよびＣＤ２０を発現するＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞系の開発後、ｈＡｂ－ＱがＣＤＣを誘導することができたかどうかという問題を再検討した。標的としてＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞を使用した２連の実験を実施した。第一連は１％ウサギ補体を使用し、リツキシマブは陽性対照として働いた。第二連は、１０％ヒト血清とインキュベートした試料中の細胞死と、熱不活性化ウシ血清とインキュベートした試料中の細胞死を比較した。

【０３３５】

抗体ｈＡｂ－Ｑは、１％ウサギ血清の存在下でＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞のＣＤＣを誘導しなかった

３つのアッセイを実施した。第一のアッセイは、１０μｇ／ｍｌの最終濃度の抗体ｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブ（Ｒｏｃｈｅ）およびｈＩｇＧ４アイソタイプ対照（Ｓｉｇｍａ）と、Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞および１％ウサギ補体をインキュベートすることを含んでいた。第二および第三のアッセイは１００μｇ／ｍｌで抗体を用いて実施し、過剰な陽性対照、ウサギポリクローナル抗Ｃ５ａＲ（ＵＳ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を含んでいた。

【０３３６】

第一の実験では、１０μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブおよびｈＩｇＧ４とインキュベートした試料中の特異的ＣＤＣのレベルは、それぞれ０％、９６％および０％であった。第二および第三の実験では、１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブおよびｈＩｇＧ４とのインキュベーション後の平均特異的ＣＤＣは、それぞれ１．５％、９８％および１％であった。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２と２０μｇ／ｍｌのポリクローナルおよび１％ウサギ補体のインキュベーションは、８２％の特異的ＣＤＣをもたらした（図３０）。リツキシマブはＣＤＣによりＣＤ２０を発現する細胞を死滅することが報告されている。ポリクローナル抗体も、補体活性化およびＣＤＣの有効な誘導剤である。これらの陽性対照はＣＤＣアッセイが働いていたことを示し、ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－ＱはＣＤＣにより細胞を死滅しなかったことを実証する。

【０３３７】

抗体ｈＡｂ－Ｑは、１０％ヒト血清の存在下でＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞のＣＤＣを誘導しなかった

ヒト血液から単離したエフェクター細胞（ＰＢＭＣ）を使用して、一連のＡＤＣＣアッセイを実施して（以下の実施例１０参照）、ヒト化抗Ｃ５ａＲまたは対照抗体とインキュベートしたＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞を標的化した。一組の対照反応を並行して実施し、熱不活性化ウシ血清またはＰＢＭＣをもたらした同じドナー由来の１０％ヒト血清の存在下で、Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞（「標的のみ」）および抗体のインキュベーションを含んでいた。

【０３３８】

ヒト血清を含有した対照反応は、それらはウサギ補体ではなくヒト血清以外、前に記載したＣＤＣアッセイに類似するので、ＣＤＣアッセイを表すと考えた。しかしながら、１

つの違いは、ヒト血清なしでインキュベートした標的＋抗体試料が存在しないことであった。したがって、ヒト血清を使用したアッセイ中では、特異的ＣＤＣは、ヒト血清とインキュベートした標的＋抗体試料中の「非生存標的細胞の割合」から、熱不活性化ウシ血清とインキュベートした標的＋抗体試料中の「非生存標的細胞の割合」を引くことによって計算した。

【０３３９】

ヒト血清を使用した７つのアッセイを実施した。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞を、３時間１０％熱不活性化ウシ血清または１０％ヒト血清の存在下において１、１０または１００μｇ／ｍｌでｈＡｂ－Ｑ、リツキシマブまたはｈＩｇＧ４アイソタイプ対照抗体とインキュベートした。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞に、インキュベーション前に色素ＰＫＨ－２６およびインキュベーション後に生死判別色素ＴｏＰｒｏ３を充填して、非生存細胞と生存細胞を区別することができた。特異的ＣＤＣは前に記載したように計算し、培地のみのバックグラウンドをアッセイ中でそれぞれの試料から引いた。ヒト血清を用いたそれぞれの処理に関する非生存標的（Ｒａｍｏｓ　Ｅ２）細胞の平均率、熱不活性化ウシ血清試料中で観察した非特異性が低い死は特異的ＣＤＣと一致し、結果は図３１中に示す。

【０３４０】

図３１は、ｈＡｂ－Ｑを含有する試料中では、非常に低レベルの特異的ＣＤＣが存在し（約１～２％）、用量間で差はなかったことを示す。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２溶解のレベルは、ｈＡｂ－Ｑを含有する熱不活性化ウシ血清とヒト血清試料の両方と類似していた。特異的ＣＤＣの類似していたレベル（約０～４％）は、アイソタイプ対照抗体とインキュベートした試料中で観察した。重要なことに、ｈＡｂ－ＱおよびｈＩｇＧ４アイソタイプ抗体とインキュベートした試料中で観察した溶解の平均量の間で、統計上有意な差はなかった（ｐ＞０．０５）。このデータは、ｈＡｂ－ＱはＣＤＣを特異的に媒介しないことを示唆する。対照的に、リツキシマブを含有する試料中の特異的ＣＤＣは用量依存性であり、１μｇ／ｍｌのリツキシマブでの７２％から１００μｇ／ｍｌのリツキシマブでの９１％の範囲であった。ヒト血清の存在下においてリツキシマブで観察した高レベルの死滅は、アッセイが働いていたことを示し、したがって、ｈＡｂ－ＱはＣＤＣを媒介しないと結論付ける。ｈＡｂ－ＱがＣＤＣを媒介した場合、Ｒａｍｏｓ　Ｅ２クローンが類似した高レベルのＣＤ２０およびｈＣ５ａＲを発現することを考慮して、リツキシマブに対する類似したレベルの死滅を予想することができた。

【実施例１０】

【０３４１】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体によって誘導される抗体依存性細胞障害は、重鎖アイソタイプに依存する

Ｃ５ａＲ発現細胞（好中球、単球など）を死滅しないヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体を開発することは望まれていた。いくつかの機構によって、抗体は標的抗原を発現する細胞の死滅を開始することができる。いくつかのヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体（例えば、ｈＡｂ－Ｑ、ｈＡｂ－Ｊ、ｈＡｂ－Ｇ）はＩｇＧ$_4$アイソタイプで生成し、補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）および抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ＡＤＣＣ）を回避／低減した。他のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体（例えば、ｈＡｂ－Ｎ、ｈＡｂ－Ｏ）は、Ｃ１ｑおよびＦｃｙＲと結合し、したがってＣＤＣおよびＡＤＣＣを誘導する可能性が高いことが知られているＩｇＧ１アイソタイプで生成した。抗体のＦｃドメインが抗原、例えば「標的細胞」上の受容体と結合し、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、単球、好中球および好酸球を含めた、細胞障害能を有する細胞（「エフェクター細胞」）上のＦｃ受容体と架橋すると、ＡＤＣＣが媒介される。

【０３４２】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体によって誘導されたＡＤＣＣ活性のレベルの決定するために、以下の実験を実施した。

【０３４３】

方法

ＡＤＣＣアッセイプロトコル

簡単に述べると、エフェクター細胞成分は、ＦｉｃｏｌｌまたはＰｅｒｃｏｌｌ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のいずれかの密度勾配分離を使用して健常ドナーから末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を単離することによって調製した。５％CO_2中に３７℃で１００ｎｇ／ｍｌの組換えヒトＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を含有する培地中で一晩インキュベートした、残存する、非接着細胞（ＮＫ細胞を含有する）を含むフラスコに接着させることによって（１時間、３７℃、５％CO_2）、ＰＢＭＣ集団から次いで単球を枯渇させた。翌日、標的細胞（ｈＣ５ａＲを発現するＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞－前を参照）を蛍光細胞膜色素、ＰＫＨ２６（Ｓｉｇｍａ）で染色し、５×10^4個細胞／試料を、５％CO_2中で３７℃において３０分間抗体または培地のみとインキュベートした。インキュベーション後、５０：１の比でエフェクター細胞、または培地のみのいずれかを標的細胞に加え、試料を５％CO_2中で３７℃においてさらに３時間インキュベートした。Ｔｏ－Ｐｒｏ－３陽性として定義した非生存標的細胞をフローサイトメトリーにより測定し、全標的細胞（ＰＨＫ－２６陽性細胞）の割合として表す前に、蛍光性生死判別色素、Ｔｏ－Ｐｒｏ－３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）をそれぞれの試料に加えた。培地は、ＰＢＭＣ「エフェクター」細胞を単離した同じドナー由来の１０％ヒト血清、または１０％熱不活性化ウシ血清のいずれかを含有していた。

【０３４４】

それぞれの試料の特異的ＡＤＣＣは、対応する試料の「標的およびエフェクター」（Ｂ）から非生存「標的のみ」の平均率（Ａ）を引くことによって計算した。次いで「標的およびエフェクター」の「培地のみ」試料（Ｃ）をそれぞれの試料から引いて、特異的ＡＤＣＣの最終値を得た：

特異的ＡＤＣＣ（溶解率）＝（Ｂ－Ａ）－Ｃ

【０３４５】

前の式は以下のように表すこともできる：

特異的ＡＤＣＣ（溶解率）＝（Ｔ＋ＥＳ－Ｔ＋ＥＭＯ）－（ＴＯＳ－ＴＯＭＯ）。

上式で：Ｔ＋ＥＳは抗体を含む標的＋エフェクター試料中の非生存細胞の平均率であり、

Ｔ＋ＥＭＯは標的＋エフェクター培地のみ（抗体含まず）中の非生存細胞の平均率であり、

ＴＯＳは抗体を含む標的のみ試料中の非生存細胞の平均率であり、

ＴＯＭＯは標的のみ培地のみ（抗体含まず）中の非生存細胞の平均率である。

【０３４６】

結果

ＡＤＣＣ機構によって細胞死滅を誘導するヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑの能力を、標的としてＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞を使用して一連のアッセイ中で調べた。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞はＣＤ２０とＣ５ａＲの両方を発現し、ＣＤ２０を標的化しＡＤＣＣによって死滅するリツキシマブは陽性対照として使用することができる。Ｒａｍｏｓ　Ｅ２におけるＣ５ａＲの発現はヒト好中球における発現より約７倍高かった。細胞表面上で発現される標的受容体のレベルは、抗体によって誘導されるＡＤＣＣおよびＣＤＣの程度に影響を与える可能性があることが報告されている（Ｐｒｅｉｔｈｅｎｅｒら、２００６；ｖａｎ　Ｍｅｅｒｔｅｎら、２００６；Ｌｏｗｅｎｓｔｅｉｎら、２００６）。

【０３４７】

エフェクター細胞は健常ボランティアの静脈血から精製したヒトＰＢＭＣであり、次いで単核を枯渇させ、ＩＬ－２と共に一晩インキュベートしてＮＫ細胞を刺激（「初回抗原刺激」）した。このステップは、エフェクターの細胞障害性を最大にするのに必要であることが分かった。

【０３４８】

標的細胞は色素ＰＫＨ－２６で標識し、したがってそれらは、フローサイトメトリー中にエフェクター細胞と区別することができた。それぞれの標的＋抗体試料用に、２本の試

験管をセットアップした（それぞれ２連）。１つは標的細胞および培地を含有しており、もう１つは５０：１の比でエフェクターおよび標的を含有していた。５０：１の最適なエフェクター：標的比は、アッセイ開発中に、最大の死滅をもたらすことが示されている。すべてのインキュベーションステップ後に試料に色素Ｔｏ－Ｐｒｏ－３（ＴＰ３）を加え、フローサイトメトリーにより分析することによって生存能力を測定した。標的細胞の枯渇は、バックグラウンド（無抗体試料）の控除後の全標的細胞（ＰＫＨ＋ｖｅ）の割合としての、非生存標的細胞（ＴＰ３＋ｖｅ／ＰＫＨ＋ｖｅ）の数であった。

【０３４９】

標的細胞としてＲａｍｏｓ　Ｅ２を使用してｈＡｂ－ＱおよびｈＡｂ－Ｎによって誘導されたＡＤＣＣ活性の比較

第一系列の実験では、Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞のＡＤＣＣを誘導するヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑ（重鎖アイソタイプｈＩｇＧ４）およびｈＡｂ－Ｎ（ｈＩｇＧ１）の能力を、リツキシマブ（ｈＩｇＧ１）およびアイソタイプ対照抗体（ｈＩｇＧ４）によって誘導されたＡＤＣＣと比較した。ヒトＩｇＧ１はｈＩｇＧ４よりＦｃγＲに対する高いアフィニティーを有し、より効率良くＡＤＣＣを誘導すると予想される。

【０３５０】

標的細胞は、１０％熱不活性化ウシ胎児血清（ＦＣＳ）の存在下で、１００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑ、ｈＡｂ－Ｎ、リツキシマブ（Ｒｏｃｈｅ）、ｈＩｇＧ４抗体（Ｓｉｇｍａ）または培地（ＲＰＭＩ）のみと共にインキュベートした。３０分後、ＩＬ－２刺激ＰＢＭＣ（５０：１（Ｅ：Ｔ）の比で）または培地のみのいずれかを標的細胞に加え、インキュベーションは３時間続けた。フローサイトメトリーによって測定した非生存細胞の数はＡＤＣＣ活性の指標であった。培地のみのバックグラウンドおよび標的のみのバックグラウンドをそれぞれの試料から引いて、特異的ＡＤＣＣ活性を決定した。３つの同一の実験を実施した。結果（３つの実験からの結合データ±ｓｄ）は図３２中に示す。

【０３５１】

ＩｇＧ１抗体、リツキシマブと抗Ｃ５ａＲｈＡｂ－Ｎの両方が、Ｒａｍｏｓ　Ｅ２細胞の（６５％を超える）高レベルの死滅を媒介する際に有効であった。対照的に、ｈＡｂ－Ｑ（ＩｇＧ４）およびアイソタイプ対照ｈＩｇＧ４によって媒介された特異的ＡＤＣＣのレベルは著しく低く、ＰＢＭＣおよびｈＡｂ－Ｑとのインキュベーション後わずか２３％のＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞が非生存状態であった。アイソタイプ対照抗体とインキュベートしたＲａｍｏｓ　Ｅ２細胞の死はなかった。これらの結果は、抗体のアイソタイプはＡＤＣＣ活性の重要な決定因子であること、および抗体依存性の細胞死滅が望ましくない場合、ｈＩｇＧ４アイソタイプのヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体がｉｎ　ｖｉｖｏ治療に好ましい可能性があることを示唆する。

【０３５２】

標的としてＲａｍｏｓ　Ｅ２Ｃ細胞を用いてｈＡｂ－Ｑにより媒介されたＡＤＣＣ活性に対する血清の影響の比較

別の系のＡＤＣＣアッセイを前述のように実施し、一組の試料はＰＢＭＣエフェクター細胞のドナーから単離した１０％ヒト血清を含有する培地中でインキュベートし、および同組の試料は１０％熱不活性化ウシ血清を含有していた。血清の熱不活性化は補体活性を損ねるように設計する。したがって、ヒト血清とインキュベートした試料中でＣＤＣ活性を観察することができると予想した。ＣＤＣのレベルは「標的のみ」試料から決定した。実際、リツキシマブを含有する「標的のみ」試料中では、非生存（ＴＰ３＋ｖｅ）細胞の数は通常９０％を超えた。したがって、ヒト血清を含有する試料中でリツキシマブによって誘導された特異的ＡＤＣＣ活性は決定することができなかった。しかしながら、１０％熱不活性化ウシ血清および１００μｇ／ｍｌのリツキシマブを含有する並行試料中では、平均６０％の標的（Ｒａｍｏｓ　Ｅ２）細胞がエフェクター細胞によって特異的に死滅された。これは図３２中に表す結果と類似しており、エフェクター細胞およびＡＤＣＣアッセイが働いていたことを示した。

【０３５３】

さらに、図３１中で前に示したように、ヒト化抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）およびｈＩｇＧ４アイソタイプ対照抗体は、このアッセイ中でＣＤＣ活性を誘導しなかった。したがって、ｈＡｂ－Ｑおよびアイソタイプ対照抗体による特異的ＡＤＣＣは、ヒト血清を含有する試料に関して前に記載したように計算することができた。結果は図３３中に示す。１～１００μｇ／ｍｌの任意の濃度で、ｈＡｂ－Ｑ、アイソタイプ対照も、ＡＤＣＣによる有意な細胞死は引き起こさなかった。ｈＡｂ－Ｑに関して、この結果は、熱不活性化ウシ血清を含有する試料において観察したＡＤＣＣ活性と対照をなす（図３２）。

【実施例１１】

【０３５４】

マウスの試験

ＫＲＮトランスジェニックマウス系は、Ｃ５７ＢＬ／６バックグラウンドで自己抗原グルコース－６－リン酸イソメラーゼ（ＧＰＩ）を認識するＴ細胞受容体を含有する。これらのマウスをＮＯＤマウスと交配すると、トランス遺伝子陽性Ｆ１子孫（Ｋ／ＢｘＮ）は、ＧＰＩに対する循環抗体によって媒介される自己免疫様疾患を自然に発症する（Ｋｏｕｓｋｏｆｆら、１９９６）。関節炎Ｋ／ＢｘＮマウス由来の血清は他の系統に移すことができ、そこで自己抗原免疫複合体は、別の補体経路、次にＣ５ａＲ－およびＦｃガンマＲＩＩＩ媒介性細胞活性化および前炎症性サイトカインの生成を活性化する（Ｊｉら、２００２）。好中球、マスト細胞およびマクロファージは、このモデル中の病状の発症において重要な役割を果たす（Ｗｉｐｋｅ ａｎｄ Ａｌｌｅｎ、２００１；Ｌｅｅら、２００２；Ｓｏｌｏｍｏｎら、２００５）。観察した炎症性の表現型は、関節破壊を伴う慢性進行性疾患の状態を含めたヒト関節リウマチの指標の多くの特徴をなす（Ｋｙｂｕｒｚ ａｎｄ Ｃｏｒｒ、２００３）。

【０３５５】

Ａ．炎症性関節炎のマウスモデル中のＣ５ａＲ逆炎症に対するヒト化抗体

方法

動物

約６～１２週齢のＣ５７ＢＬ／６バックグラウンドのヒトＣ５ａＲノックイントランスジェニックマウス（Ｌｅｅら、２００６）は、Ｇａｒｖａｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、シドニーでの繁殖コロニーから入手した。雄のマウスが実験に好ましかったが、雌のマウスも使用した。

【０３５６】

Ｋ／ＢｘＮ血清の調製

実験用の血清を生成するために、ＫＲＮの雄をＮＯＤの雌と交配させた。炎症関節を発症したＫＲＮトランス遺伝子を有するＦ１子孫は屠殺し、血液は心穿刺によって回収した。血清は３７℃で２時間のインキュベーション後に単離し、４０００ｒｐｍで１０分間遠心分離にかけた。多数のマウスからの血清をプールし、再度アリコートにし－８０℃で保存した。

【０３５７】

実験関節炎の誘導および測定

第０日および第２日に１００～１５０μｌの血清を腹腔内注射することによって、レシピエントマウスにおいて実験関節炎を誘導した。疾患の進行は、カリパスを使用して足首の太さの変化を測定し、臨床値を決定することによって毎日モニタリングした。毎日の足首の太さは、それぞれの後足からの２つの読み取り値を平均することによって決定した。臨床値は、４足に関する値：０、正常関節、１、足首の軽度／適度な腫れおよび／または１本の腫れた指、２、腫れた足首または２本以上の指の腫れ、３、足の全側面に沿った重度の腫れまたは全５本の指の腫れを合計することによりそれぞれのマウスに関して計算した。マウスをモニタリングした調査員は、それぞれのマウスに与えた治療に対して盲検とした。

【０３５８】

治療

精製抗Ｃ５ａＲまたはアイソタイプ対照抗体（１～１０ｍｇ／ｋｇ、ＰＢＳ中）を、第５日に腹腔内注射した（療法治療レジメ）。いくつかの実験では、対照群にはアイソタイプ対照抗体ではなくＰＢＳを与えた。

【０３５９】

統計分析

Ｋ／ＢｘＮモデル中の独立した対照群と治療群の間の差の統計的有意性を、マンホイットニー検定を使用して、またはクラスカルワリス検定およびダンの多重比較検定と共に実施した事後解析を使用して決定した。

【０３６０】

結果

Ｋ／ＢｘＮモデルにおいて確定した炎症を逆行させるヒト化７Ｆ３抗体の能力を調べ、それらの結果は以下に報告する。表８は、このモデルにおいて試験した抗体、および投与した用量を列挙する。関節炎をＫ／ＢｘＮ血清注射によって誘導した後、すべての抗体を第５日に腹腔内注射によって「治療的に」投与した。

【０３６１】

【表８】

表8:試験した抗体および投与した用量。

抗体	試験した用量	群の大きさ	結果の図
G	10mg/kg	6	34
M	10mg/kg	6	34
N	10mg/kg	6	34
J	1mg/kg	4	35
J	3mg/kg	5	35
J	10mg/kg	5	35
C	3mg/kg	5	35
C	10mg/kg	4	35

【０３６２】

図３４および３５中に表す結果は、炎症性関節炎の誘導後第５日に１０ｍｇ／ｋｇで腹腔内投与したとき、ヒト化抗体が炎症の臨床兆候の逆行において有効であったことを示す。低用量の抗体ＪおよびＣは１０ｍｇ／ｋｇの用量ほど有効ではなかったが、対照群（ＰＢＳまたはヒトＩｇＧ４－無関係なヒト抗原に対するアイソタイプ対照抗体を与えたマウス）中で見られたように、大抵の場合、炎症の任意のさらなる増大を阻止することができた。

【０３６３】

Ｂ．ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、関節リウマチのマウスモデル中の関節炎症の兆候および症状を低減する：抗体用量、抗体血清濃度、受容体専有と有効性の間の関係

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の治療的投与の前に、マウスにおいて実験関節炎を誘導した。抗体用量、血清中抗体濃度、抗体によるＣ５ａＲ専有のレベルとマウス中の関節炎症に対する影響の間の関係を調べた。

【０３６４】

方法

動物

８～１６週齢（平均約１２）のＣ５７ＢＬ／６バックグラウンドの雄および雌のヒトＣ５ａＲノックイントランスジェニックマウス（Ｌｅｅら、２００６）を、Ｇａｒｖａｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、シドニーまたはＡｎｉｍａｌ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ Ｃｅｎｔｒｅ、パースでの繁殖コロニーから入手した。

【０３６５】

Ｋ／ＢｘＮ血清の調製

この試験中のすべてのマウスに、前に記載したように調製したＫ／ＢｘＮ血清の同じバッチを注射した。

【０３６６】
ｈＡｂ－ＱのＦＩＴＣ標識
フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）を、以下のようにｈＡｂ－Ｑ抗体と共有結合させた。簡単に述べると、約１．５ｍｇのｈＡｂ－Ｑを「反応バッファー」（１６０ｍＭのNa_2CO_3、３４０ｍＭの$NaHCO_3$、ｐＨ９．５）中に交換し、抗体１ｍｇ当たりＤＭＳＯに溶かした１２０μｇのＦＩＴＣ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）に加えた。反応は室温（２３℃）において１時間、暗所で実施した。非結合ＦＩＴＣは、予め平衡状態にし「保存バッファー」（１０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８．２）で溶出したＰＤ－１０カラムを使用して除去した。結合ｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣは濃縮して、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ（ＹＭ－３０）スピンフィルターを使用して１．０３６ｍｇ／ｍｌの最終濃度を得て、暗所で４℃において保存した。

【０３６７】
実験関節炎の誘導および測定
前に記載したように第０日および第２日に１５０μｌのＫ／ＢｘＮ血清を腹腔内注射することによって、レシピエントマウスにおいて実験関節炎を誘導した。第５日に、第０日からの足サイズの変化（ｍｍ単位）と臨床値を掛けることによって、「ＲＡ値」をそれぞれのマウスに関して計算した。０．５を超えるＲＡ値を有していたマウスのみを試験の治療段階に進めた。炎症性関節炎は、雄の約９０％および雌マウスの５０％において発症した。

【０３６８】
試験設計－概観および群の大きさ
この試験は、抗Ｃ５ａＲ抗体を用いた治療の開始前後の、様々な時間でのＫ／ＢｘＮ疾患モデルにおける炎症、ｉｎ　ｖｉｖｏでの受容体専有、および血清抗体濃度を測定するために設計した。このモデルにおける疾患の過程は約３週間以内で一般に消散する。炎症の兆候および症状は、Ｋ／ＢｘＮマウス由来の血清を用いた免疫処置の１日または２日以内に明らかである。炎症は第１０～１４日辺りがピークであり、その後ゆっくりと低下する。

【０３６９】
これらの状況を考慮して、以下のスケジュールを分析に採用した：
●炎症：足サイズおよび臨床値は、第０日（最初の血清注射前）、第２日（第二回目の血清注射前）、第５日（治療開始前）、次いで第６日、第７日、第８日、第９日、第１０日、第１１日、第１２日、第１４日および第１６日に測定した。炎症は群当たり少なくとも１０匹のマウスで決定した。

【０３７０】
●血清抗体濃度：血液は第５日（治療後３０分および１２時間）、第６日（治療後２４時間）、第７日（４８時間）、第８日（７２時間）、第９日（９６時間）、第１０日（１２０時間）、第１１日（１４４時間）、第１２日（１６８時間）、第１４日（１９２時間）および第１６日（２６４時間）に試料採取した。血清は第５．５日（治療後１２時間）、第６日、第８日、第１０日、第１２日および第１６日に心穿刺によって回収した血液から、および第５日（治療後３０分）および第７日、第９日、第１１日および第１４日に出血させた尾静脈から調製した。２～４匹のマウスの群はそれぞれの治療に関して毎回血液を得たが、それぞれのマウスは３回を超えて出血させなかった。約１００μｌの血液を１．５ｍｌの試験管（抗凝血剤含まず）中に回収し、３７℃で３０分間インキュベートして凝固を促進し、次に１３，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離にかけた。血清は新たな試験管（マウス試料当たり２本）中に分配し、ＥＬＩＳＡを使用して抗体濃度を決定する前に－８０℃で保存した。

【０３７１】
●受容体飽和：マウス（群当たりｎ＝４）を第５．５日（治療後１２時間）、第６日、第８日、第１０日、第１２日および第１６日に屠殺し、心穿刺によって血液を回収した。白血球をＦＩＴＣ標識ｈＡｂ－Ｑで染色して遊離Ｃ５ａ受容体の量を決定し、またはＦＩ

ＴＣ標識抗ヒトＩｇＧで染色してＰＢＳ対照と比較した結合ｈＡｂ－Ｑの量を決定した。細胞はＣＤ１１ｂおよびＬｙ６Ｇで同時染色して好中球と単核を区別した。さらなる詳細に関しては以下を参照。

【０３７２】

治療

この試験に入れるために選択したマウスはランダムに５群に分けて、第５日に５つの治療の１つを施した：

１．ＰＢＳ、腹腔内

２．ｈｕＩｇＧ対照抗体、腹腔内、@８ｍｇ／ｋｇ

３．ｈＡｂ－Ｑ、腹腔内、@１ｍｇ／ｋｇ

４．ｈＡｂ－Ｑ、腹腔内、@３ｍｇ／ｋｇ

５．ｈＡｂ－Ｑ、腹腔内、@１０ｍｇ／ｋｇ

【０３７３】

注射する合計体積がマウス当たり約１００μｌであるように、抗体をＰＢＳ中に溶かした。マウスをモニタリングした調査員は、それぞれのマウスに施した治療に対して盲検とした。受容体専有試験用にＰＢＳを施した動物を確認したこと以外、データ回収および分析後まで治療群は明らかではなかった。

【０３７４】

群１（ＰＢＳ対照）は抗体で治療せず、これを使用して受容体飽和、活性化およびＰＫ分析のベースラインを設定した。群２は、無関係なヒトＩｇＧ抗体で治療した陰性対照群であった。群３～５には抗Ｃ５ａＲ治療を与えた。

【０３７５】

統計分析

独立した対照群と治療群の間の差の統計的有意性を、前に記載したように決定した。

【０３７６】

結合ｈＡｂ－Ｑの測定

それぞれの試験試料用にｈＡｂ－Ｑ（２００μｇ／ｍｌ、［最終］）またはｄＰＢＳのいずれかを含有するようにプレートをセットアップした。それぞれのマウス由来の２５μｌのヘパリン化血液をｈＡｂ－ＱとｄＰＢＳの両方を含有するウェルに加え、３７℃で１．５時間インキュベートした。細胞はｄＰＢＳで３回洗浄して非結合ｈＡｂ－Ｑを除去し、室温で４５分、抗ｈＩｇＧ－ＦＩＴＣ（１／５０）、抗Ｌｙ－６Ｇ－ＰＥおよび抗ＣＤ１１ｂ－ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５抗体（１／４００）を含有するｄＰＢＳ中に再懸濁した。赤血球はＢＤ　ＦＡＣＳ溶解溶液（ＢＤ、３４９２０２）を加えることによって除去した。試料プレートは２，０００ｒｐｍで３分間遠心分離にかけ、上清は除去し、フローサイトメトリー（ＢＤ　ＦＡＣＳＣａｎｔｏ）による分析用にＢＤ　ＦＡＣＳ溶解溶液中に細胞を再び再懸濁した。

【０３７７】

「遊離」Ｃ５ａ受容体の測定

ｈＡｂ－Ｑ（２００μｇ／ｍｌ、［最終］）、最大遊離Ｃ５ａＲ用）またはｄＰＢＳ（最大遊離Ｃ５ａＲおよびすべての試験試料用）のいずれかを含有するようにプレートをセットアップした。それぞれのマウス由来の２５μｌのヘパリン化血液を対応するウェルに加えた（すなわち、ｄＰＢＳのみを注射したマウス由来の血液を＋ｈＡｂ－ＱとｄＰＢＳの両方を含有するウェルに加えた（最小および最大遊離Ｃ５ａＲ用））。すべての他の試験用血液試料はｄＰＢＳのみを含有するウェルに加え、３７℃で１．５時間インキュベートした。細胞はｄＰＢＳで３回洗浄して過剰なｈＡｂ－Ｑを除去し、３７℃で４５分、２５μｇ／ｍｌでｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣ、抗Ｌｙ－６Ｇ－ＰＥおよび抗ＣＤ１１ｂ－ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５抗体（１／４００）を含有するｄＰＢＳ中に再懸濁した。赤血球はＢＤ　ＦＡＣＳ溶解溶液（ＢＤ、３４９２０２）を加えることによって除去した。試料プレートは２，０００ｒｐｍで３分間遠心分離にかけ、上清は除去し、フローサイトメトリー（ＢＤ　ＦＡＣＳＣａｎｔｏ）による分析用にＢＤ　ＦＡＣＳ溶解溶液中に細胞を再び再懸

濁した。

【０３７８】

好中球Ｃ５ａ受容体飽和のフローサイトメトリー分析

ＢＤ　ＦＡＣＳＣａｎｔｏフローサイトメーターを、チャネルＦＬ－１、ＦＬ－２およびＦＬ－３に関して確定した補償パラメーターでセットアップした。試料を入手して死細胞および残骸は除外した。好中球はＬｙ－６Ｇ－ＰＥ高、ＣＤ１１ｂ－ＰｅｒＣＰ／Ｃ５．５低－高として同定した。単球はＬｙ－６Ｇ－ＰＥ陰性、ＣＤ１１ｂ－ＰｅｒＣＰ／Ｃ５．５高として同定した。結合ｈＡｂ－Ｑ（α－ＩｇＧ－ＦＩＴＣ）および遊離Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣ）のレベルは、それぞれの試料に関するＦＩＴＣ（ＦＬ－１）平均蛍光強度（ＭＦＩ）を測定することによって決定した。

【０３７９】

結合ｈＡｂ－Ｑの割合を、以下の等式に従い、（ＰＢＳ次いでＦＩＴＣ抗ｈＩｇＧとインキュベートしたＰＢＳ治療マウス試料から計算したバックグラウンドの控除後）２００μｇ／ｍｌのｈＡｂ－Ｑとインキュベートした同じ試料に関するＭＦＩの割合として、ｄＰＢＳ中でインキュベートしたそれぞれの試料のＭＦＩを決定することによって定量化した：

［［ＭＦＩ（試料＋ｄＰＢＳ）－ＭＦＩ（バックグラウンド、すなわちＰＢＳ対照マウス＋ｄＰＢＳ）］／［Ｍａｘ＿ＭＦＩ（試料＋冷却ｈＡｂ－Ｑ）－ＭＦＩ（バックグラウンド）］］×１００

【０３８０】

遊離Ｃ５ａ受容体の割合を、最大遊離受容体試料、すなわちｄＰＢＳのみを投与したマウスの割合として、ｄＰＢＳ中でインキュベートしたそれぞれの試料のＭＦＩを決定することによって定量化した。最小遊離Ｃ５ａＲ、すなわち過剰なｈＡｂ－Ｑとｅｘ　ｖｉｖｏでインキュベートした試料はこの計算中では使用しなかったが、比較目的で使用した。

【０３８１】

抗体血清濃度の測定

ｈＡｂ－Ｑの血清濃度は、マウス血清中のｈＡｂ－Ｑを検出することが実証されたＥＬＩＳＡ法を使用してＧＬＰに従いアッセイした。定量化の下限（ＬＬＯＱ）は４ｎｇ／ｍｌであった。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ消失試験用に、マウスアッセイをヒトＥＤＴＡ血漿中でのｈＡｂ－Ｑの検出用に定性化した。アッセイを血漿に施したとき、ＬＬＯＱは１０ｎｇ／ｍｌであった。

【０３８２】

結果

数匹の２００ｈＣ５ａＲＫＯ／ＫＩマウスを、２日間隔で（第０日と第２日）Ｋ／ＢｘＮマウス由来の血清を用いて２回免疫処置して、レシピエントマウスの足における膨張した関節および指として現れる炎症性関節炎を誘導した。第５日までに、約７０％のマウス（約８５％の雄および約６０％の雌）が、足および関節のある程度の膨張および発赤を発症した。０．５を超える「ＲＡ値」を有するマウスを、群当たり１１～１２マウスの５つの治療群にランダムに選別した。それぞれの群には、５つの治療－１、３および１０ｍｇ／ｋｇの用量でのＰＢＳに溶かしたｈＡｂ－Ｑ、８ｍｇ／ｋｇの用量でのＰＢＳに溶かした対照抗体（無関係な抗原に対するヒトＩｇＧ）およびＰＢＳのみの１つを施した。次の１１日間、マウスを定期的にモニタリングし、臨床値を割り当て、足サイズ（足首の太さ）を測定した。受容体占有率および抗体血清濃度を決定するために、第５．５日、第６日、第７日、第８日、第９日、第１０日、第１２日、第１４日および第１６日に、血液試料は尾静脈から、または心穿刺によって回収した。

【０３８３】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体は、用量依存式に炎症性関節炎のＫ／ＢｘＮモデルにおいて炎症を逆行させる

それぞれの治療群に関する第０日からの平均臨床値および足サイズの変化を図３６中に示す。このデータは、ｈＡｂ－Ｑはｉｎ　ｖｉｖｏで炎症の兆候および症状を低減する際

に有効であったことを示す。用量応答の関係を観察し、１０ｍｇ／ｋｇの用量は３および１ｍｇ／ｋｇの用量より明らかに有効であった。２つの対照群を比較すると、１０ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑは投与後１週間炎症および臨床値を低減および制御し、３ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑは約５日間炎症の任意のさらなる増大を阻止したが、既存の炎症を低減することはできず、かつ１ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑは有効ではなかった。最後の３～５日の行程中、１０ｍｇ／ｋｇと３ｍｇ／ｋｇの群の両方において炎症値の上昇の傾向があった。ｈＡｂ－Ｑの１つの用量のみを第５日に与えた。以下に示すように、炎症の低減または安定（さらなる増大なし）は、高い受容体飽和度および血清抗体濃度と関係があった。これらが低下すると、炎症は回復した。

【０３８４】

ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体によるＣ５ａ受容体占有率のレベルおよび程度は用量依存性である

受容体占有率を２つの異なる方法で測定した。白血球はｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣで染色して「遊離」受容体の量を決定し、または抗ｈＩｇＧ－ＦＩＴＣで染色してｉｎ　ｖｉｖｏで結合したｈＡｂ－Ｑ（「占有」受容体）の量を決定し、ＣＤ１１ｂとＬｙ６Ｇで同時染色して好中球と単球を区別した。好中球上でＣ５ａＲと結合した抗体の量と遊離（空）受容体の量の間には、反比例関係があるはずである。結合抗体を計算したとき、マウス毎の受容体数の変動を補正した。遊離受容体を決定したとき、これは実施しなかった。結果は図３７および３８中に示す。

【０３８５】

図３７は、投与した抗体用量と好中球中の結合抗Ｃ５ａＲ抗体の間の関係を示す。最高用量、１０ｍｇ／ｋｇで、結合抗体は投与（第１０日）後約１２０時間まで飽和レベルの状態であり、次いで２６４時間（第１６日）までに約２０％の占有率に低下した。３ｍｇ／ｋｇでは、結合抗体は約２４時間飽和レベルであり、次いで７２時間までに５０％、１２０時間までに１５％に低下した。１ｍｇ／ｋｇの用量は抗体の飽和結合をもたらすのに十分ではなく、受容体占有率は投与後２４時間でわずか７５％であった。７２時間までに、好中球と結合したｈＡｂ－Ｑはほとんど存在しなかった。同様の結果を単球において観察した（示さず）。

【０３８６】

図３８は、「遊離」受容体のレベルが「占有」受容体（図３７中に示した結合抗体）の割合と逆相関していたことを示す。投与後１週間まで、１０ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑで治療したマウス中の好中球上には非常に少ない遊離受容体が存在した。３ｍｇ／ｋｇの群中では、７２時間後まで遊離受容体はほとんど存在せず、かつ１ｍｇ／ｋｇの群中では、遊離受容体は投与後２４時間後劇的に増大した。同様の結果を単球において観察した（示さず）。

【０３８７】

血清中のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体濃度のレベルおよび程度は用量依存性である

動物の血清中のヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体の濃度を、投与後３０分と１１日の間の間隔で決定した。結果は図３９中に示す。投与後、血清中のｈＡｂ－Ｑの濃度は急激に増大した。測定した最大濃度には投与後３０分と１２時間の間で到達し、用量依存性であった。１ｍｇ／ｋｇの抗体の投与後、血清中の濃度は３０分後１．９μｇ／ｍｌでピークに達し、１２時間１．５μｇ／ｍｌを超えた状態であり、次いで第７日（投与後４８時間）に０．１μｇ／ｍｌ未満に低下した。３ｍｇ／ｋｇの群中のピークの血清抗体濃度は、投与後１２時間で１３．３μｇ／ｍｌであった。抗体のレベルは２日間高い状態であり（５μｇ／ｍｌを超えた）、次いで第９日まで（投与後９６時間）に０．１μｇ／ｍｌ未満に急激に低下した。１０ｍｇ／ｋｇの群中の血清抗体濃度は、投与後１２時間において６９．５μｇ／ｍｌでピークに達し、次の７日間で５．５μｇ／ｍｌに、次いで第１４日までに０．１μｇ／ｍｌ未満に徐々に低下した。

【０３８８】

炎症の低減、または安定化は、高い受容体占有率および高い血清抗体濃度と相関関係が

ある

前述の図３６ａ（臨床値）、３７（ｈＡｂ－Ｑにより占有されたｈＣ５ａＲの割合）および３９（血清中のｈＡｂ－Ｑ濃度）からのデータを図４０、４１および４２中で組み合わせて、抗体用量、受容体占有率および血清抗体濃度の間の関係を実証した。

【０３８９】

Ｋ／ＢｘＮ血清の注射によりマウスにおいて実験的関節炎を誘導すると、関節および足の膨張および発赤の増大があり、前に記載した「関節炎の指標」を使用して、これを定量化する（臨床値として表す）。ヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体ｈＡｂ－Ｑを「治療的」、すなわち第０日および第２日にＫ／ＢｘＮ血清を与えたマウス中で炎症が発症した後第５日に投与したとき、高用量（１０ｍｇ／ｋｇ）を与えたマウス群中で炎症の重度の持続的な低減があった。図４０は、この群中の炎症のレベル（臨床値）は、受容体占有率が高くなった（４０％超）のと同時に第５日および第１２日の間に低下したこと、および（５μｇ／ｍｌを超えた）高レベルのｈＡｂ－Ｑを血清中で測定したことを示す。３ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑを投与したマウスは、次の４日間で再度増大する傾向が始まる前に、次の３日間で炎症のわずかな低下を記録した。図４１は、３ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑを与えたマウス中で、同時に血清抗体濃度が５μｇ／ｍｌを超え、受容体占有率は５０％以上であったことを示す。第８日後、血清抗体濃度と受容体占有率の両方が急激に低下し、これは再度増大する傾向が始まった周期的炎症に対応した。マウスに１ｍｇ／ｋｇのｈＡｂ－Ｑ、低用量を投与すると、臨床値によって証明されたように（図４２）、絶えず増大するレベルの炎症の約１日の一時停止があった。同時に、血清中の抗体レベルは、注射直後の１．８μｇ／ｍｌのピークから、および１２時間後の１．５μｇ／ｍｌに急激に低下した。Ｃ５ａＲの占有率は、急激に低下する前の１日のみ５０％を超える状態であった。

【０３９０】

総合すると、これらのデータは、高い受容体占有率は血清中の高い抗体濃度に依存し、かつ組織切片中で観察し足サイズおよび臨床値の低減によって測定した関節内の白血球の減少は、高レベルの受容体占有率（少ない「遊離」受容体）に依存するという提言を支持する。遊離受容体なしでは、Ｃ５ａはＣ５ａＲと結合して、白血球の活性化および血液から炎症部位への白血球の遊走、ならびに組織中での補体活性化を引き起こすことはできない。

【０３９１】

Ｃ．Ｋ／ＢｘＮマウスモデルにおけるｈＡｂ－ＱのＰＫ／ＰＤ関係

この実施例では、本発明者らは、抗Ｃ５ａＲｍＡｂの薬物動態、標的受容体占有率、および炎症性関節炎のＫ／ＢｘＮマウスモデルにおける影響の間の定量的関係を記載する、考えられる薬物動態／薬力学（ＰＫ／ＰＤ）モデルを与える。モデリングに関するデータは、２つの試験、薬理学的試験（前で実施例１１Ｂ中に記載した）および毒性試験から作成した。このモデルはデータを解釈するための方法を構成して濃度応答の関係を調べ、かつこれを使用してヒト中で安全な開始用量の選択を支援することができる。

【０３９２】

方法

薬理学的試験

薬理学的試験法の完全な詳細は実施例１１Ｂ中で前に与える。簡単に述べると、この試験の目的は、第一にヒト化抗Ｃ５ａＲ抗体、ｈＡｂ－Ｑを用いた療法治療が、Ｋ／ＢｘＮモデルにおいて炎症性関節炎の兆候および症状を逆行させる際に有効であったかどうか決定すること、および第二に、用量と抗炎症効果、受容体占有率のレベル（遊離ｈＣ５ａＲおよび結合ｈＡｂ－Ｑとして測定）、好中球活性化状態および循環血清中抗体濃度を関連付けることであった。炎症は群当たり少なくとも１０匹のマウスにおいて決定した。受容体飽和試験は、ＰＢＳを与えた対照群が２匹のマウスを含んでいたこと以外、群当たり４匹のマウスで行った。投与群（１、３、１０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内、および対照動物）。

【０３９３】

毒性試験

ｈＣ５ａＲトランスジェニックマウスへのｈＡｂ－Ｑの皮下および静脈内（ボーラス）投与による毒性試験、用量は隔日で投与した。トキシコキネティックデータは、４つのｈＡｂ－Ｑ用量群（５、５０、５００ｍｇ／ｋｇ、静脈内、および１００ｍｇ／ｋｇ皮下（ｓ．ｃ．））のそれぞれにおいて、１８～２１匹の雄および１８～２１匹の雌から得た。

【０３９４】

薬物動態

ｈＡｂ－Ｑの血清濃度は前に記載したようにアッセイした。

【０３９５】

受容体占有率

ｈＡｂ－Ｑモノクローナル抗体の投与による好中球および単球におけるｈＣ５ａＲとの結合を、前に記載したように決定した。薬理学的試験用に、占有率は、

【０３９６】

【数１】

$$\text{占有率} = \%\text{結合率} = 100\% \frac{\mathrm{MFI}_{\text{結合}} - \mathrm{MFI}_{\text{結合前}}}{\mathrm{MFI}_{\text{最大結合}} - \mathrm{MFI}_{\text{結合前}}}$$

として計算した。

【０３９７】

結合前の値を引いた。これらはバックグラウンドＭＦＩを与えると考えたからである。

【０３９８】

モデルの開発

一次条件付き評価（ＦＯＣＥ）を用いたＮＯＮＭＥＭ　ＶＩ（非線形混合効果モデリングソフトウェア）をモデリングに使用し、Ｓ－ＰＬＵＳ（登録商標）８．０（Ｉｎｓｉｇｔｈｆｕｌ）はグラフィックスおよびデータ処理に使用した。中間モデル間の区別の評価は、目的関数値および標準的なグラフィック評価法に基づいた。目的関数値の点で、この値の変化は（枝分かれモデルに関して）カイ二乗分布であると考え、モデルを拡大するための基準を定義し適宜に使用した。

【０３９９】

結果

占有率に関するＰＫ／ＰＤの関係

トランスジェニックマウスにおける毒性試験からのトキシコキネティックスと薬理学的試験からのＰＫ／ＰＤデータを統合して、薬物動態と占有率の間の関係を評価した。これらのデータは、図４３中に例示したように、標的媒介性であるワンコンパートメントＰＫモデルによって十分記載することができた。それぞれの投与群に関するＰＫおよび占有率モデルの適合性は図４４中に示し、一方パラメーター値は表９中に与える。毒性試験中では低い用量レベルではなく、５００ｍｇ／ｋｇの群に関して高いクリアランスを推定したことにも留意されたい。これは他の試験と一致し、ＦｃＲＮ受容体の飽和のため高い用量に関して高いクリアランスを観察する（Ｈａｎｓｅｎ　ａｎｄ　Ｂａｌｔｈａｓａｒ、２００２）。

【０４００】

【表９】

表9:毒性試験および薬理学的試験におけるトランスジェニック中のhAb-Qに関する薬物動態パラメーター

	単位	薬理学的試験	毒性試験
V_1	mL/kg	74.3	74.3
CL	mL/時間/kg	0.182	1.37-2.52*
ka.sc	1/時間	-	0.0935
ka.ip	1/時間	4.26	-
F.sc	1	-	0.438
F.ip	1	0.411	-
Kd	ng/mL	175	175
Koff	1/時間	0.1	0.1
Bmax.Targ	μg/kg	196	196
Turnover	時間	14.2	14.2

*毒性試験中のKO/KI hC5aRマウスから、500mg/kgの群で高いクリアランスを発見した。V_1=中心体積、CL=クリアランス、ka.sc/ka.ipはs.c.またはi.p.投与に関する吸収速度定数である。F.sc/F.ipはs.c.またはi.p.投与に関する生物学的利用能である。Kd=特異的結合に対するアフィニティー。koff=オフレート定数。Bmax.Targ=hAb-Qに関する最大標的結合能。代謝回転=標的を再生し結合抗体を除去するのに要する時間。(koffは0.1 1/時間に固定した)。

【０４０１】

炎症に対する影響に関するＰＫ／ＰＤの関係

ＰＫ／ＰＤモデルを開発して、トランスジェニックマウスを使用した薬理学的試験（Ｋ／ＢｘＮモデル）における炎症攻撃後の、薬物動態と足サイズの変化の間の関係を記載した。Ｋ／ＢｘＮモデルの自然経過は、実験的関節炎の誘導による足サイズの漸増、および炎症減弱時の正常な足サイズへの約１２日後のそれに続く段階的な回復である。図４５中に例示したＰＫ／ＰＤモデルは、誘導される炎症の阻害によるｈＡｂ－Ｑの影響を記載する。最大阻害の割合は、占有率ＰＫ／ＰＤモデルから得た占有率のレベルに設定した。図４６中に見られるように、測定した足サイズとモデル化した足サイズの間の妥当な一致はこの手法によって得ることができ、これは好中球Ｃ５ａ受容体の占有率と炎症に対する影響の間の非常に密接な関係を示す。

【０４０２】

ＫＯ／ＫＩ ｈＣ５ａＲマウス（ｎ≧１０／時間地点／群）に第０日に実験的関節炎の誘導を施し、第５日に１、３、１０または０ｍｇ／ｋｇの抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）を注射した。約１２日後、足サイズは減少し始め、このとき炎症により誘導された増大は減弱した。同様に、１００％に近い占有率で、炎症により誘導された増大は阻害され、１０ｍｇ／ｋｇの群に関しては、足サイズのわずかな減少が見られた。このモデルでは、これらのプロセスは関連があり、いずれも正常な足サイズへの自然な回復によって記載される。

【０４０３】

このモデルは、ｈＡｂ－Ｑの影響の大部分は、循環好中球における受容体の完全な占有をもたらす濃度で得られることを予測した。１ｍｇ／ｋｇでは、占有は投与後１～２日のみ高く、その後足サイズは再度増大し始めた、図４６を参照。同様に、足サイズは再度増大し始めた後に、３ｍｇ／ｋｇは約７２時間の高い占有をもたらした。１０ｍｇ／ｋｇでは、ほぼ同じ期間の足部炎症の阻害をもたらす約１０日間の占有を得る。

【０４０４】

示した考えられるモデルを使用して、本発明者らは、占有が５０％を超えたとき、足サイズの増大は阻害され、および占有が５０％未満に低下したとき、例えば３ｍｇ／ｋｇの群において第８日後に、足サイズの炎症により誘導された増大が再び始まったことを観察する。このモデルは５０％阻害および５０％占有と関係があるので、この十分な適合によ

って、１）占有と炎症に対する影響は密接に関係があること、および２）５０％におけるピークの占有は炎症に対して最小の影響を与えると予想されることを定量的に確認した。

【０４０５】

結論

このモデルは、モノクローナル抗体濃度、占有、および炎症に対する影響の間の密接な関係を実証し、観察値と予測値の間の十分な一致を発見した。このデータ中の最も重要な特色、１）さらなる臨床開発を動機付けるマウスの足に対する明らかに有益な影響、２）長期の治療効果のための高用量レベルの要件をもたらし得る、標的媒介性によって記載された高飽和性除去成分、および３）低用量で高ピークの占有をもたらし得る、おそらく二価結合と関係がある、ｉｎ　ｖｉｖｏでの受容体との比較的強い結合は、このモデルによって記載された。

【０４０６】

初回ヒト試験における安全な開始用量を選択するためのすべての関連前臨床データに基づいて、ヒトシミュレーションモデルを構築するために使用するパッケージの一部として、このモデルを使用した。

【実施例１２】

【０４０７】

ヒトデータを用いたＰＫ／ＰＤモデルのアップデート

ｈＡｂ－Ｑを用いた進行中の臨床試験からのデータを使用して、薬物動態およびＣ５ａＲ占有率データを使用して、実施例１１中に記載した前臨床ＰＫ／ＰＤモデルを実証およびアップデートした。このモデルのシミュレーションを使用して、高用量レベルでのＰＫ／ＰＤに関する本発明の予想を記載する。このモデルは、将来の試験における用量レベルおよびレジメン選択に関する早期意志決定のための、データを解釈するための方法を構成する。

【０４０８】

方法

臨床データ

ＮＮ８２０９－１９４０は、それぞれ８および７用量レベルでの、平行した単回静脈内および皮下投与のランダム化、二重盲検、プラセボ対照、用量増大試験である。対象は抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）の単回静脈内または皮下投与にランダム化する。対象は３：１の比にランダム化し、３対象にはそれぞれの用量レベルおよび投与経路で活性治療を割り当て、１対象にはプラセボ治療を割り当てた。抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）は、予定用量レベルで、前の用量レベルから３または３．３倍の実際の用量の増大で投与する。本発明の用量レベルは、ＰＫ／ＰＤモデル最新版において、静脈内用量レベル：０．００３、０．０１、０．０３、０．１、０．２、０．６ｍｇ／ｋｇ；皮下用量レベル：０．０１、０．０３、０．１、０．３ｍｇ／ｋｇを含んでいた。

【０４０９】

モデリング、懸案試験履行中に含まれなかったデータは、予定用量レベル：２および７ｍｇ／ｋｇ静脈内、ならびに１および３ｍｇ／ｋｇ皮下を含む。

【０４１０】

サンプリングスケジュール

抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）の測定用のＰＫサンプリングは、０時間での投与前（投与前最大６０分）、および薬剤投与後５分（静脈内投与後のみ）、１５分（静脈内投与後のみ）、および３０分、および１、２、４、６、８、１２、２４および４８時間および３、７、１４、２１、２８、４２、５６、および７０日に予定する。時間地点は、０分での注射または注入の開始を指す。静脈内投与にランダム化した対象に関しては、注入時間は１５分であり、したがって１５分の時間地点は注入の最後を指す。

【０４１１】

好中球および単球におけるＣ５ａＲ専有に関するサンプリングは、０時間での投与前（投与前最大６０分）、および薬剤投与後４、２４、および４８時間および３、７、１４、

２１、４２、および７０日に予定する。

【０４１２】

占有率の計算

ｈＡｂＱモノクローナル抗体の投与による好中球および単球におけるｈＣ５ａＲとの結合は、３つの異なる方法を使用して決定した。ＦＡＣＳによる分析後、これらの測定のそれぞれは補正平均蛍光強度（ＭＥＦ）をもたらす。３つの方法は、１）ｉｎ　ｖｉｖｏで結合したｈＡｂＱを有する専有受容体を評価するためにＦＩＴＣ標識抗ヒトＩｇG_4二次抗体を使用する直接法（$MEF_{結合}$）、２）ｉｎ　ｖｉｖｏでのｈＡｂ－Ｑ投与、次にｅｘ　ｖｉｖｏでのｈＡｂ－Ｑ－ＦＩＴＣの添加の結果として遊離ｈＣ５ａ受容体を測定する間接法（$MEF_{遊離}$）、および３）全受容体数の測定、全受容体を充填するためのｅｘ　ｖｉｖｏでの過剰なｈＡｂ－Ｑとのインキュベーション、および次いで抗ヒト二次抗体の添加である（$MEF_{最大結合}$）。占有率はその後以下のように導いた：

【０４１３】

【数２】

$$\%結合率 = 100\% \frac{MEF_{結合} - MEF_{結合、バックグラウンド}}{MEF_{最大結合} - MEF_{結合、バックグラウンド}}$$

$$\%遊離率 = 100\% \frac{MEF_{遊離} - MEF_{遊離、バックグラウンド}}{MEF_{遊離前} - MEF_{遊離、バックグラウンド}}$$

$$占有率 = 100\% \frac{\%結合率}{\%遊離率 + \%結合率}$$

【０４１４】

モデルの開発

一次条件付き評価（ＦＯＣＥ）を用いたＮＯＮＭＥＭ　ＶＩをモデリングに使用し、かつＳ－ＰＬＵＳ（登録商標）８．０をグラフィックスおよびデータ処理に使用した。中間モデル間の区別の評価は、目的関数値および標準的なグラフィック評価法に基づいた。目的関数値の点で、この値の変化は（枝分かれモデルに関して）カイ二乗分布であると考え、モデルを拡大するための基準を定義し適宜に使用した。

【０４１５】

最新モデルはデータから推定した。しかしながら、本発明のデータはすべてのパラメーターの確実な推定に不十分である可能性がある。この場合、いくつかのパラメーターは典型的なＩｇＧパラメーターのパラメーター値に固定した。

【０４１６】

結果

ヒトＰＫおよび占有率に関する本発明の最新モデルは図４７中に記載する。モデル予測は一般に、実験中でこれまで観察した薬物動態および占有率と非常によく一致したことが分かった。抗Ｃ５ａＲ（ｈＡｂ－Ｑ）投与後のＰＫ／ＰＤのこれらのモデル予測は、静脈内投与に関しては図４８中、および皮下投与に関しては図４９中に与える。これらの予測は、データの蓄積に応じて変わる可能性があることに留意されたい。

【０４１７】

このモデルは非常に非線形であり、線形薬物動態より予測は困難となる。本発明のデータに基づくと、ごくわずかな情報が高用量レベルでの排出半減期に貢献し、特に高用量レベルの予測に関しては、ある程度の不確かさを考慮に入れなければならないことが示唆された。皮下投与に関しては、利用可能な薬物動態データは依然として定量化の下限に近く、これは主に占有率のデータが生物学的利用能の推定に貢献することを意味する。

【０４１８】

結論

全体として、観察および予想ＰＫと占有率の間の十分な一致を見出した。前臨床データ

から予想した主な特色は臨床データにおいても観察した。これらの特色は、標的、および低濃度での比較的高い占有率による可能性が高い、除去される高飽和成分を含む。

【０４１９】

多数の変形および／または変更形態を、広義に記載するように本発明の精神または範囲から逸脱せずに、具体的な実施形態中に示したように本発明に施すことができることは、当業者によって理解されよう。したがって、本発明の実施形態は、すべての点で制限的ではなく例示的であるとして考えられる。

【０４２０】

本出願は、その全容が参照によって本明細書に組み込まれる、２００８年２月２０日に出願されたＵＳ６１／０６６，５３９からの優先権を主張するものである。

【０４２１】

前に論じたすべての刊行物は、それらの全容が本明細書に組み込まれる。

【０４２２】

本明細書中に含まれている文献、作用、物質、デバイス、物品などのいずれの論述も、単に本発明の状況を示す目的である。これらの物体のいずれかまたはすべてが従来技術のベースの一部を形成し、または本発明が関係する分野の共通の一般知識であったことを、当然のこととして解釈すべきではない。それは本出願のそれぞれの特許請求の優先日前に存在したからである。

（参考文献）

【配列表フリーテキスト】

【０４２３】

配列番号１：７Ｆ３可変軽鎖タンパク質配列。
配列番号２：７Ｆ３可変重鎖タンパク質配列。
配列番号３：７Ｆ３可変軽鎖コード配列。
配列番号４：７Ｆ３可変重鎖コード配列。
配列番号５：ＫＶ２Ｆ＿ヒトのヒト軽鎖可変領域。
配列番号６：ＫＶ２Ｅ＿ヒトのヒト軽鎖可変領域。
配列番号７：ＫＶ２Ｄ＿ヒトのヒト軽鎖可変領域。
配列番号８：ＫＶ２Ｂ＿ヒトのヒト軽鎖可変領域。
配列番号９：ＫＶ２Ａ＿ヒトのヒト軽鎖可変領域。
配列番号１０：Ｘ１２６９１のヒト軽鎖可変領域。
配列番号１１：Ｕ４１６４５のヒト軽鎖可変領域。
配列番号１２：Ｕ４１６４４のヒト軽鎖可変領域。
配列番号１３：Ｍ３１９５２のヒト軽鎖可変領域。
配列番号１４：図１に示されるヒト軽鎖可変配列のｈＶｋＦＷ　Ｃｏｎｓコンセンサス配列。
配列番号１５：Ｈｖ１Ａｖ＿ヒトのヒト重鎖可変領域。
配列番号１６：Ｈｖ１Ｂｖ＿ヒトのヒト重鎖可変領域。
配列番号１７：Ｈｖ１Ｃｖ＿ヒトのヒト重鎖可変領域。
配列番号１８：Ｈｖ１Ｇｖ＿ヒトのヒト重鎖可変領域。
配列番号１９：Ｍ９９６４１．ａａのヒト重鎖可変領域。
配列番号２０：Ｍ９９６４２．ａａのヒト重鎖可変領域。
配列番号２１：Ｘ６２１０９．ａａのヒト重鎖可変領域。
配列番号２２：Ｘ９２３４３．ａａのヒト重鎖可変領域。
配列番号２３：Ｚ１２３０５．ａａのヒト重鎖可変領域。
配列番号２４：図２Ａに示されるヒト重鎖可変（Ｖ）領域配列のｈＶｈｖＦＷ　Ｃｏｎｓコンセンサス配列。
配列番号２５：Ｈｖ１Ｃｊ＿ヒトのヒト重鎖連結領域。
配列番号２６：Ｈｖ２Ｉｊ＿ヒトのヒト重鎖連結領域。
配列番号２７：Ｈｖ３Ｈｊ＿ヒトのヒト重鎖連結領域。

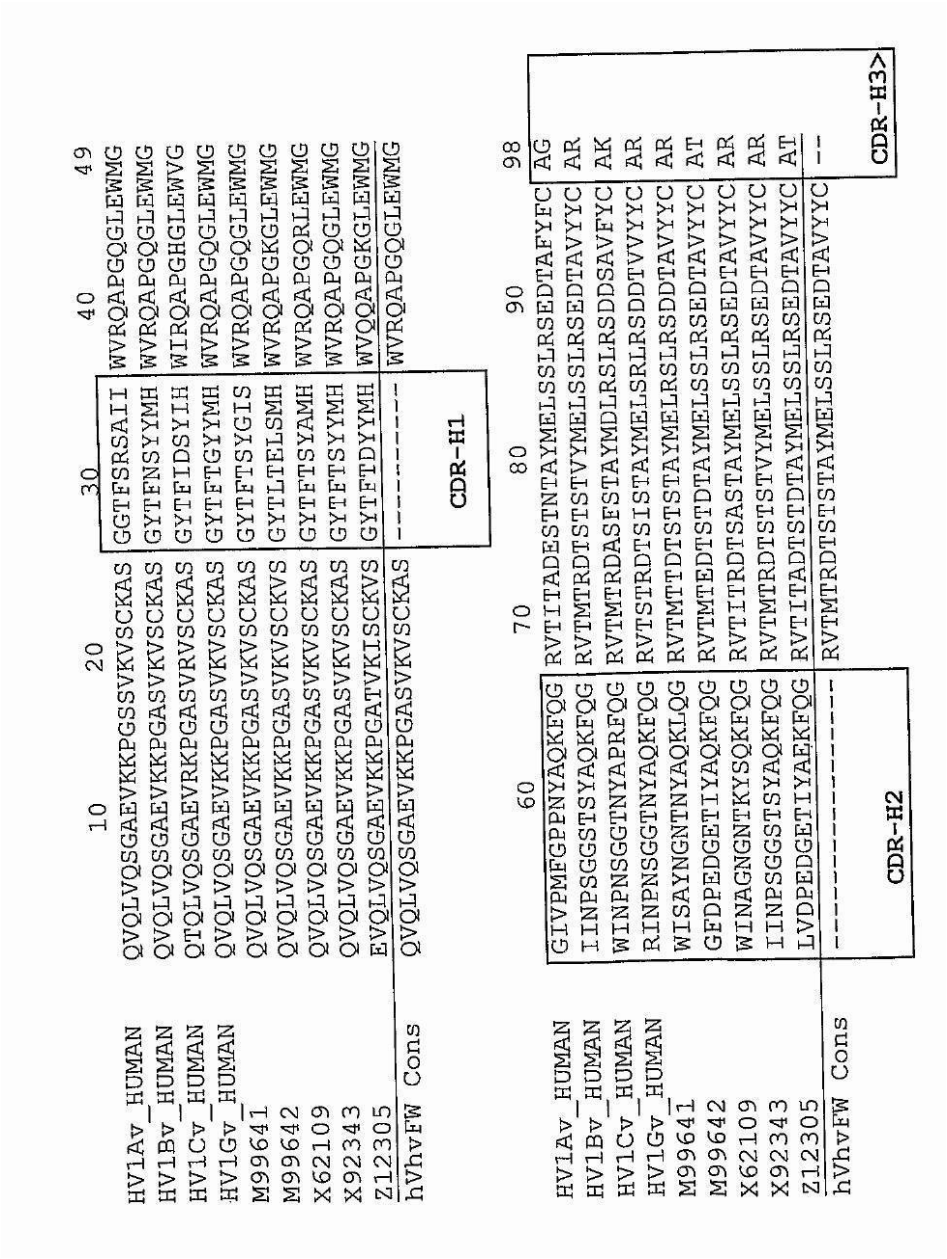
配列番号２８：Ｈｖ３Ｋｊ＿ヒトのヒト重鎖連結領域。
配列番号２９：Ｈｖ３Ｔｊ＿ヒトのヒト重鎖連結領域。
配列番号３０：図２Ｂに示されるヒト重鎖連結（Ｊ）領域配列のｈＶｈｊＦＷ　Ｃｏｎｓコンセンサス配列。
配列番号３１：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域軽鎖ｈ７Ｖｋアミノ酸配列。
配列番号３２：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域軽鎖ｈ７ａＶｋアミノ酸配列。
配列番号３３：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域軽鎖ｈ７ｂＶｋアミノ酸配列。
配列番号３４：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域重鎖ｈ７Ｖｈアミノ酸配列。
配列番号３５：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域重鎖ｈ７ａＶｈアミノ酸配列。
配列番号３６：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域重鎖ｈ７ｂＶｈアミノ酸配列。
配列番号３７：ヒトＣ５ａＲ。
配列番号３８：ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループにあるエピトープ。
配列番号３９：図１０に示される本発明のヒト化７Ｆ３重鎖可変領域ｈ７Ｆ３ＶｈＣｏｎｓコンセンサス配列。
配列番号４０：ヒト軽鎖定常領域ｈＣκ－Ｒ。
配列番号４１：ヒト軽鎖定常領域ｈＣκ。
配列番号４２：ヒト重鎖定常領域ｈＣγ４。
配列番号４３：ヒト重鎖定常領域ｈＣγ４$_{PE}$。
配列番号４４：ヒト重鎖定常領域ｈＣγ１。
配列番号４５：ヒト重鎖定常領域ｈＣγ４$_{P}$。
配列番号４６：ヒト化ＲＮＯＫ２０３ＶＬ配列。
配列番号４７：ＫＶ２Ｆ－ＨＵＭＡＮ由来ＶＬＣＤ１８－Ｑ配列。
配列番号４８：図６に示される本発明のヒト化７Ｆ３軽鎖可変領域のｈ７Ｆ３　ＶｋＣｏｎｓコンセンサス配列。
配列番号４９：ｈＶｈＦＷ　Ｃｏｎｓコンセンサスヒト重鎖ＶＪフレームワーク配列
配列番号５０：ヒトＳＧＩ－ＶＨ配列。
配列番号５１：ヒト生殖系列ＨＧ３配列。
配列番号５２：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域軽鎖ｈ７Ｖｋアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。
配列番号５３：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域軽鎖ｈ７ａＶｋアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。
配列番号５４：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域軽鎖ｈ７ｂＶｋアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。
配列番号５５：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域重鎖ｈ７Ｖｈアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。
配列番号５６：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域重鎖ｈ７ａＶｈアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。
配列番号５７：ヒト化７Ｆ３　Ｖ領域重鎖ｈ７ｂＶｈアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。
配列番号５８：ヒトＣ５ａＲの第２細胞外ループの断片。
配列番号５９：ヒトＣ５ａＲのＮ末端細胞外ドメインの断片。

【図１】

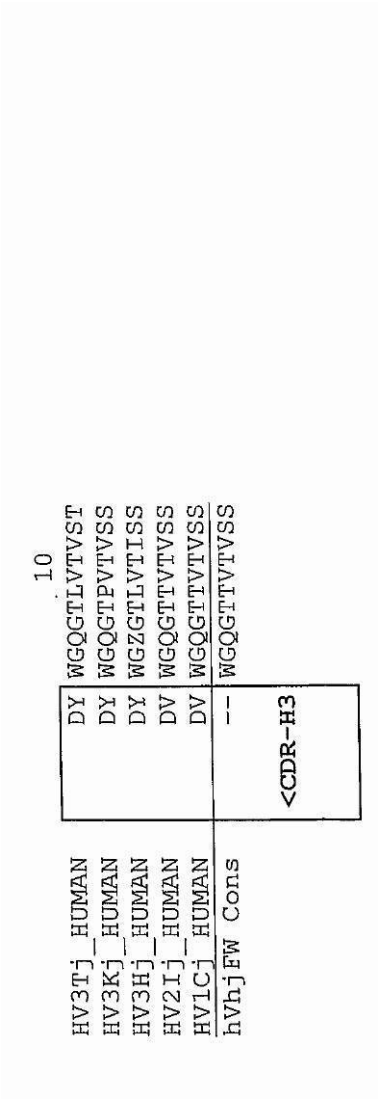
```
                    10        20        30        40        50        60
KV2F_human   DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC RSSQSLVYS-DGNTYLN WFQQRPGQSPRRLIY KVSNRDS
KV2E_human   DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLHS-NGYNYLD WYLQKPQQSPQLLIY LGSNRAS
KV2D_human   DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLHS-DGFDYLN WYLQKPGQSPZLLIY ALSNRAS
KV2B_human   DVVMTQSPLFLPVTLGEPASIQC RSSQSLVYR-BGBTYLB WYLQKPGQSPELLIY LSSYRDS
KV2A_human   DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLDSGDGNTYLN WYLQKAGQSPQLLIY TLSYRAS
X12691       DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLHS-NGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIY LGSNRAS
U41644       DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHS-DGKTYLY WYLQKPGQSPQLLIY EVSNRFS
U41645       DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHS-DGKTYLY WYLQKPGQSPQLLIY EVSSRFS
M31952       DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHS-DGKTYLY WYLQKPGQPPQLLIY EVSNRFS
hVkFW Cons   DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC ---------------- WYLQKPGQSPQLLIY -------
                                          CDR-L1                        CDR-L2

                    70        80        90       100       112
KV2F_human   GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGTHWSWT FGQGTKVEIK
KV2E_human   GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGLQTPQT FGQGTKVEIK
KV2D_human   GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MZALQAPIT FGQGTRLEIK
KV2B_human   GVPDRFSDSGSGTDFTLKITRVQAEDVGVYYC MQATZSPYT FGQGTKLZIK
KV2A_human   GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVQAEDVGVYYC MQRLEIPYT FGQGTKLEIR
X12691       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQALQTP
U41644       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSIQLP
U41645       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGIHLP
M31952       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSIQLP
hVkFW Cons   GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC --------- FGQGTKLEIK
                                                CDR-L3
```

【図２Ａ】


10 20 30 40 49
HV1Av_HUMAN QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSRSAII WVRQAPGQGLEWMG
HV1Bv_HUMAN QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFNSYYMH WVRQAPGQGLEWMG
HV1Cv_HUMAN QTQLVQSGAEVRKPGASVRVSCKAS GYTFIDSYIH WIRQAPGHGLEWVG
HV1Gv_HUMAN QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMH WVRQAPGQGLEWMG
M99641 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYGIS WVRQAPGKGLEWMG
M99642 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS GYTLTELSMH WVRQAPGQRLEWMG
X62109 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYAMH WVRQAPGQGLEWMG
X92343 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG
Z12305 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVS GYTFTDYYMH WVQQAPGKGLEWMG
hVhvFW Cons QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS ---------- WVRQAPGQGLEWMG
CDR-H1
60 70 80 90 98
HV1Av_HUMAN GIVPMFGPPNYAQKFQG RVTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFC AG
HV1Bv_HUMAN IINPSGGSTSYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC AR
HV1Cv_HUMAN WINPNSGGTNYAPRFQG RVTMTRDASFSTAYMDLRSLRSDDSAVFYC AK
HV1Gv_HUMAN RINPNSGGTNYAQKFQG RVTSTRDTSISTAYMELSRLRSDDTVVYYC AR
M99641 WISAYNGNTNYAQKLQG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC AR
M99642 GFDPEDGETIYAQKFQG RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYC AT
X62109 WINAGNGNTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC AR
X92343 IINPSGGSTSYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC AR
Z12305 LVDPEDGETIYAEKFQG RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYC AT
hVhvFW Cons ---------- RVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC --
CDR-H2
CDR-H3>

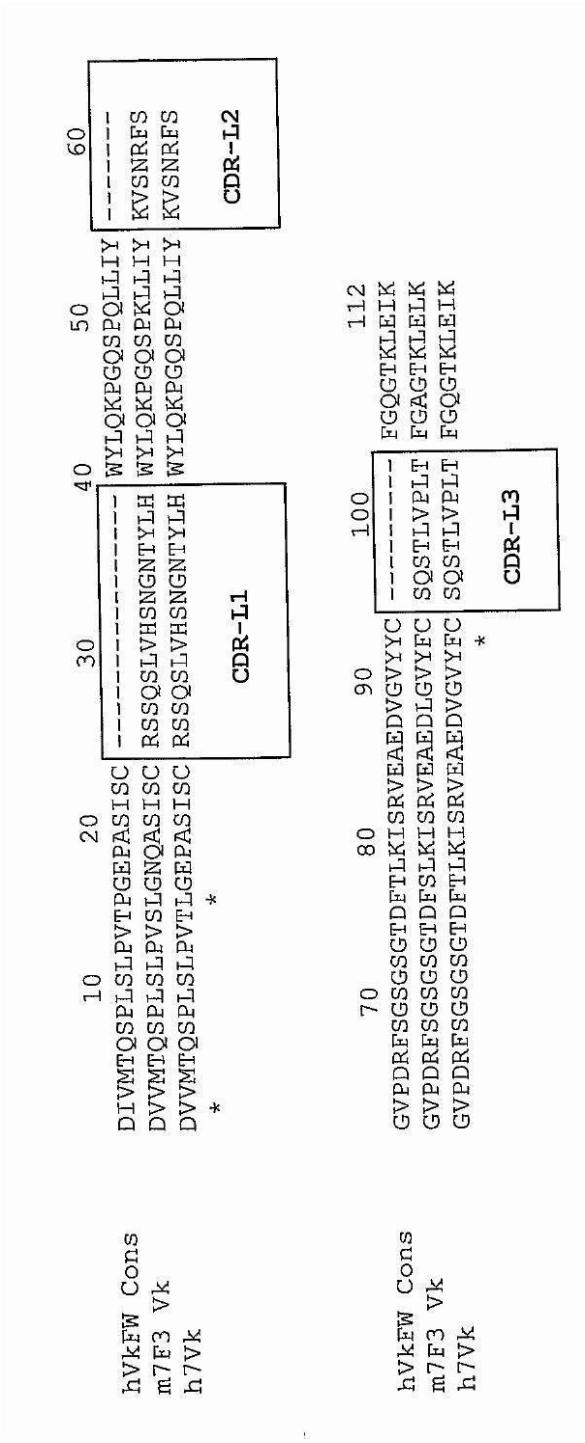
【図２Ｂ】



		10
HV3Tj_HUMAN	DY	WGQGTLVTVST
HV3Kj_HUMAN	DY	WGQGTPVTVSS
HV3Hj_HUMAN	DY	WGZGTLVTISS
HV2Ij_HUMAN	DV	WGQGTVVTVSS
HV1Cj_HUMAN	DV	WGQGTVVTVSS
hVhjFW Cons	--	WGQGTVVTVSS

<CDR-H3

【図３】

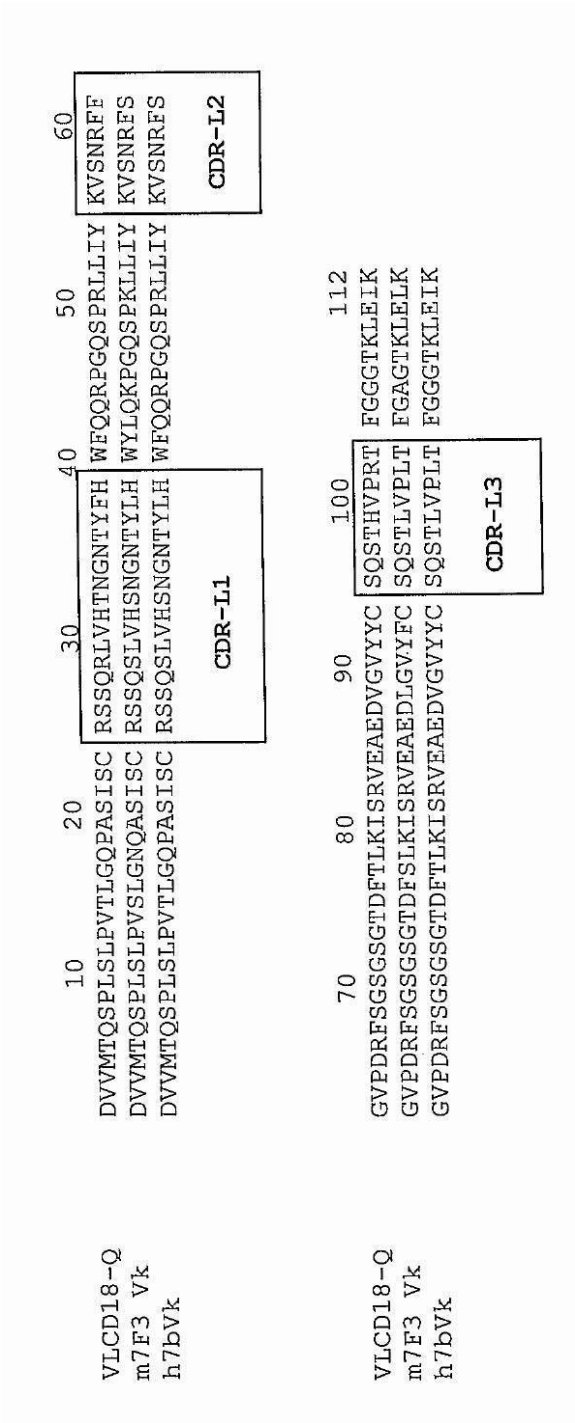

10 20 30 40 50 60
hVkFW Cons DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC ---------- WYLQKPGQSPQLLIY -------
m7F3 Vk DVVMTQSPLSLPVSLGNQASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS
h7Vk DVVMTQSPLSLPVTLGEPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFS
CDR-L1
CDR-L2
70 80 90 100 112
hVkFW Cons GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC ---------- FGQGTKLEIK
m7F3 Vk GVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEAEDLGVYFC SQSTLVPLT FGAGTKLELK
h7Vk GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSTLVPLT FGQGTKLEIK
CDR-L3

【図４】

```
                    10        20        30        40        50        60
RNOK203VL   DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISC KSTKSLLNSDGFTYLG WCLQKPGQSPQLLIY LVSNRFS
m7F3 Vk     DVVMTQSPLSLPVSLGNQASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS
h7aVk       DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WCLQKPGQSPQLLIY KVSNRFS
                                    CDR-L1                           CDR-L2

                    70        80        90       100       112
RNOK203VL   GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQSNYLPLT FGQGTKLEIK
m7F3 Vk     GVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEAEDLGVYFC SQSTLVPLT FGAGTKLELK
h7aVk       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC SQSTLVPLT FGQGTKLEIK
                                             CDR-L3
```

【図５】

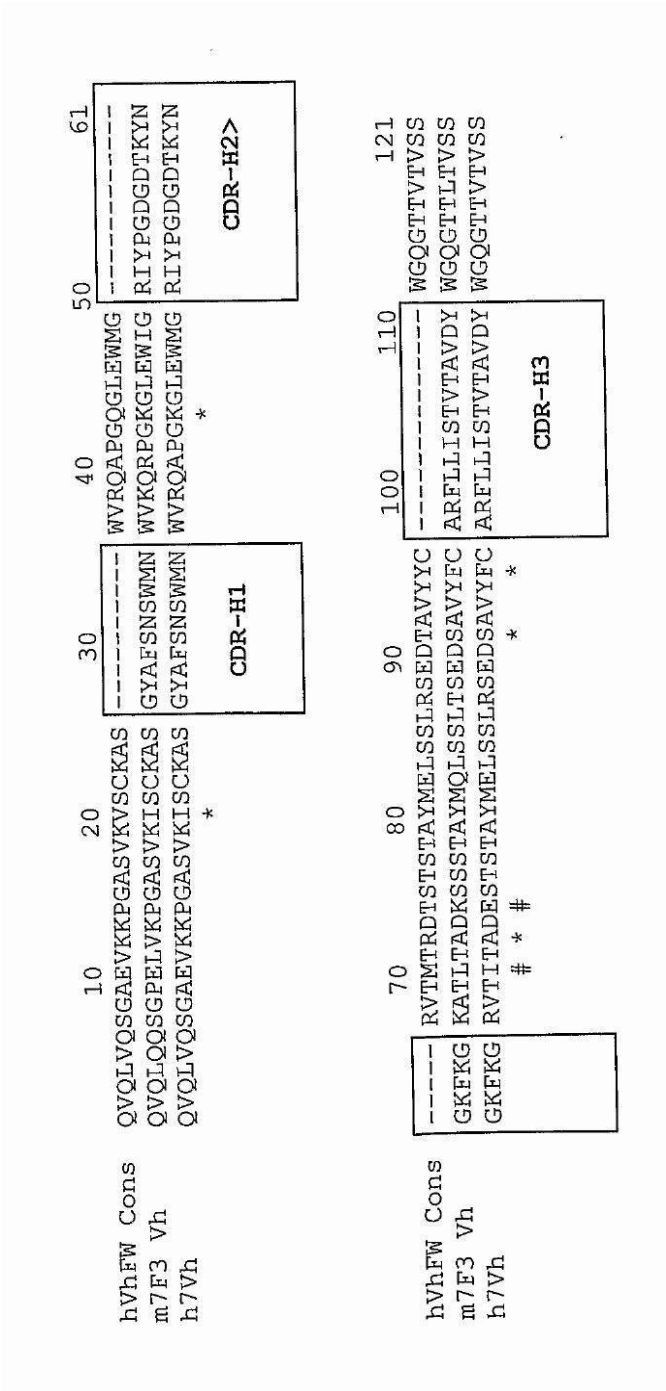

10 20 30 40 50 60
VLCD18-Q DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC RSSQRLVHTNGNTYFH WFQQRPGQSPRLLIY KVSNRFF
m7F3 Vk DVVMTQSPLSLPVSLGNQASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS
h7bVk DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WFQQRPGQSPRLLIY KVSNRFS
CDR-L1
CDR-L2
70 80 90 100 112
VLCD18-Q GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC SQSTHVPRT FGGGTKLEIK
m7F3 Vk GVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEAEDLGVYFC SQSTLVPLT FGAGTKLELK
h7bVk GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC SQSTLVPLT FGGGTKLEIK
CDR-L3

【図6】

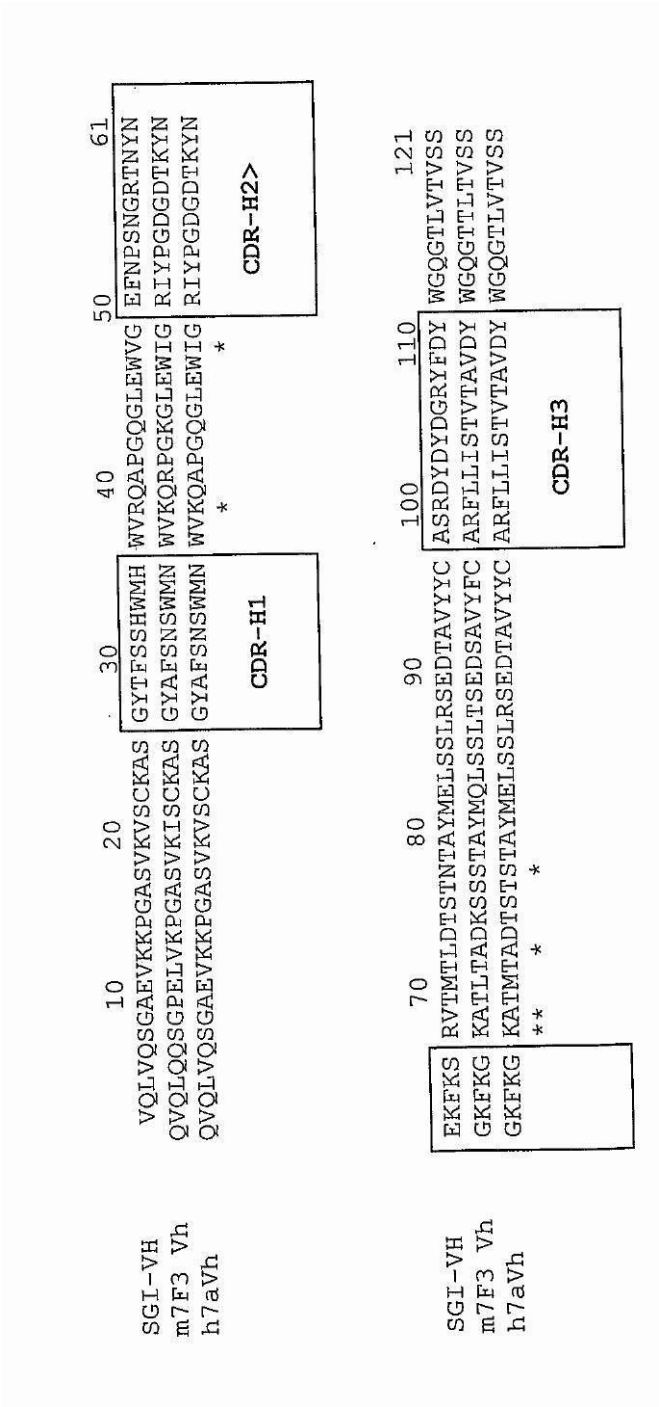
```
                    10        20        30        40        50        60
m7F3 Vk     DVVMTQSPLSLPVSLGNQASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS
h7Vk        DVVMTQSPLSLPVTLGEPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFS
h7aVk       DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WCLQKPGQSPQLLIY KVSNRFS
h7bVk       DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WFQQRPGQSPRLLIY KVSNRFS
h7F3VkCons  DVVMTQsPLSLPVTLGqPASISC RSSQSLVHSNGNTYLH WxlQkPGQSPqLLIY KVSNRFS
                                    CDR-L1                            CDR-L2

                    70        80        90       100       112
m7F3 Vk     GVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEAEDLGVYFC SQSTLVPLT FGAGTKLELK
h7Vk        GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSTLVPLT FGQGTKLEIK
h7aVk       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC SQSTLVPLT FGQGTKLEIK
h7bVk       GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC SQSTLVPLT FGGGTKLEIK
h7F3VkCons  GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYyC SQSTLVPLT FGqGTKLEIK
                                             CDR-L3
```

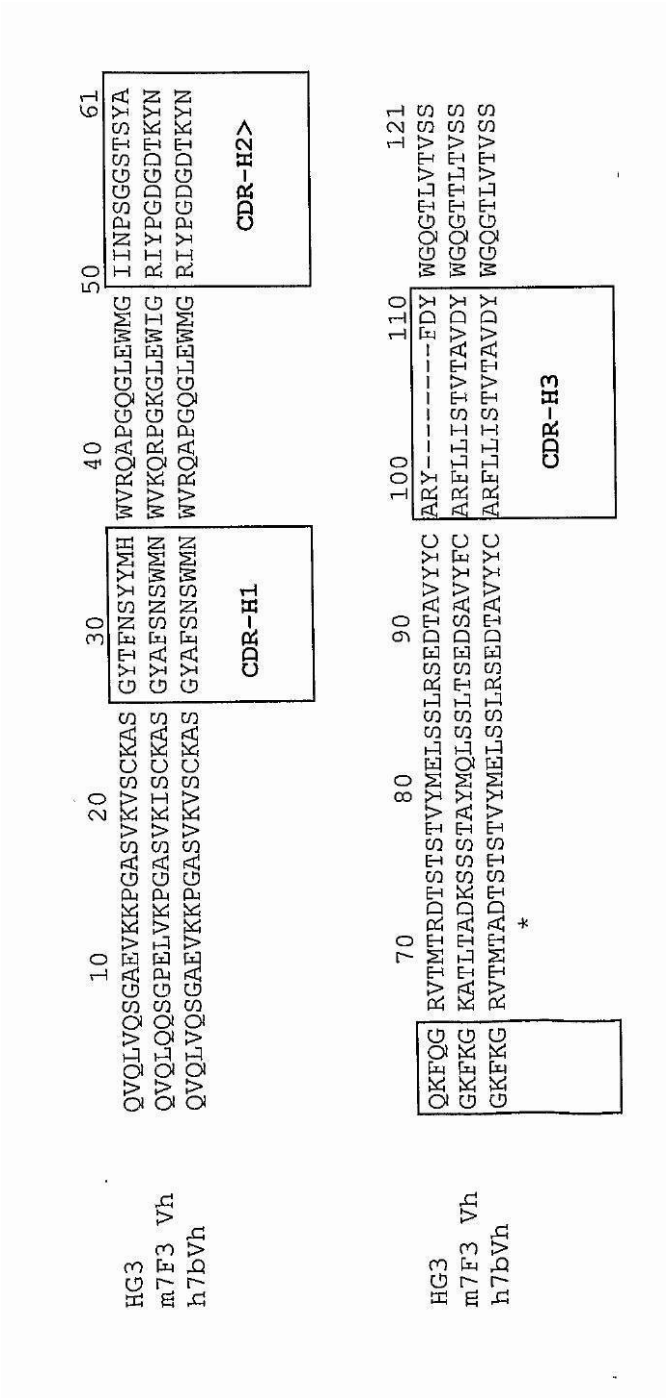
【図７】


hVhFW Cons
m7F3 Vh
h7Vh
10 20 30 40 50 61
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS ---------- WVRQAPGQGLEWMG ---------- CDR-H2>
QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYAFSNSWMN WVKQRPGKGLEWIG RIYPGDGDTKYN
QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYAFSNSWMN WVRQAPGKGLEWMG RIYPGDGDTKYN
* CDR-H1 *
hVhFW Cons
m7F3 Vh
h7Vh
70 80 90 100 110 121
----- RVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ---------- WGQGTTVTVSS
GKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC ARFLLISTVTAVDY WGQGTTLTVSS
GKFKG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDSAVYFC ARFLLISTVTAVDY WGQGTTVTVSS
* # * * CDR-H3

【図８】


10 20 30 40 50 61
SGI-VH VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFSSHWMH WVRQAPGQGLEWVG EFNPSNGRTNYN
m7F3 Vh QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYAFSNSWMN WVKQRPGKGLEWIG RIYPGDGDTKYN
h7aVh QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFSNSWMN WVKQAPGQGLEWIG RIYPGDGDTKYN
CDR-H1
CDR-H2>
70 80 90 100 110 121
SGI-VH EKFKS RVTMTLDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYC ASRDYDYDGRYFDY WGQGTLVTVSS
m7F3 Vh GKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC ARFLLISTVTAVDY WGQGTTLTVSS
h7aVh GKFKG KATMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARFLLISTVTAVDY WGQGTLVTVSS
CDR-H3

【図９】

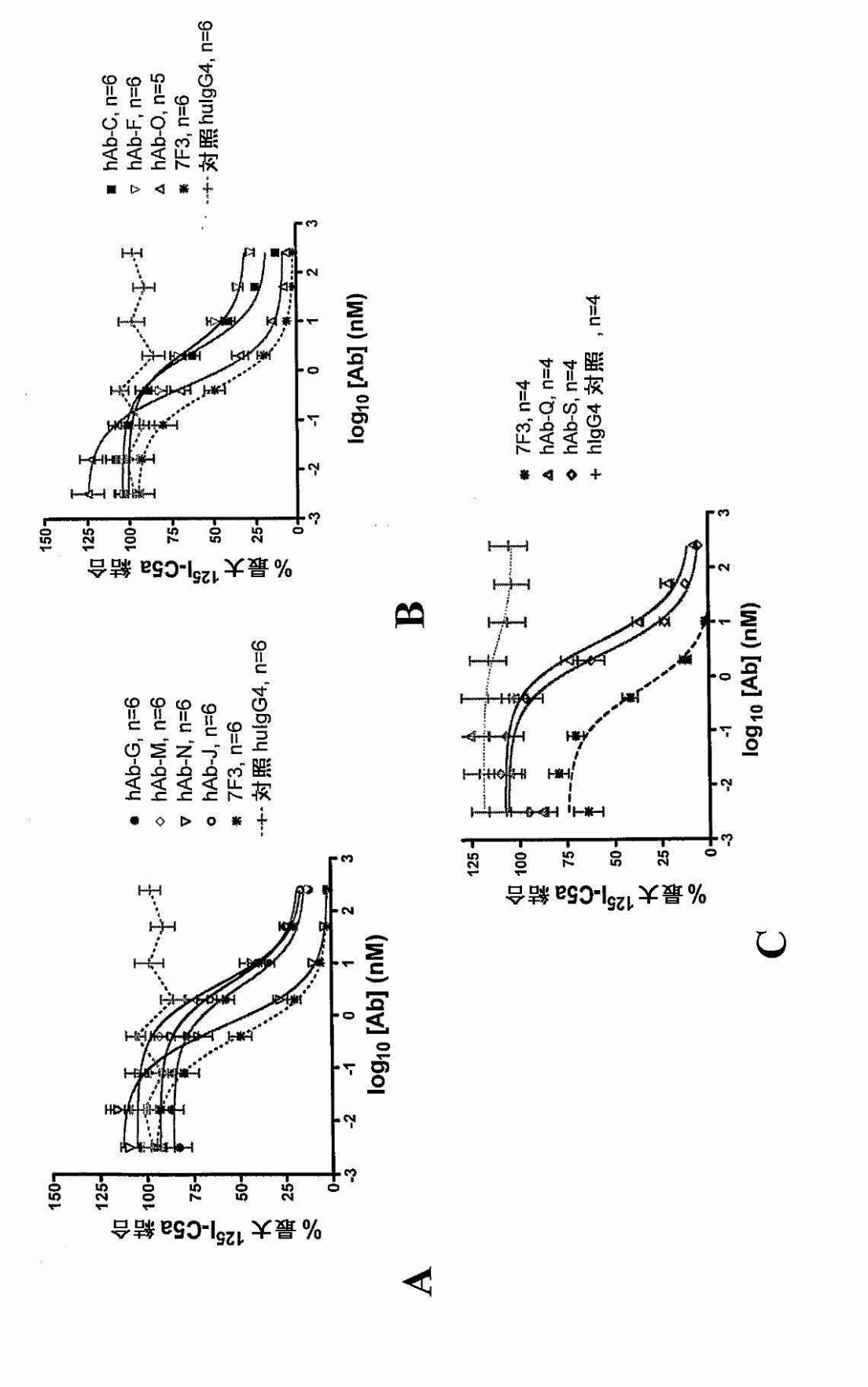

10 20 30 40 50 61
HG3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFNSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTSYA
m7F3 Vh QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYAFSNSWMN WVKQRPGKGLEWIG RIYPGDGDTKYN
h7bVh QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFSNSWMN WVRQAPGQGLEWMG RIYPGDGDTKYN
CDR-H1
CDR-H2>
70 80 90 100 110 121
HG3 QKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ARY--------FDY WGQGTLVTVSS
m7F3 Vh GKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC ARFLLISTVTAVDY WGQGTTLTVSS
h7bVh GKFKG RVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ARFLLISTVTAVDY WGQGTLVTVSS
*
CDR-H3

【図10】

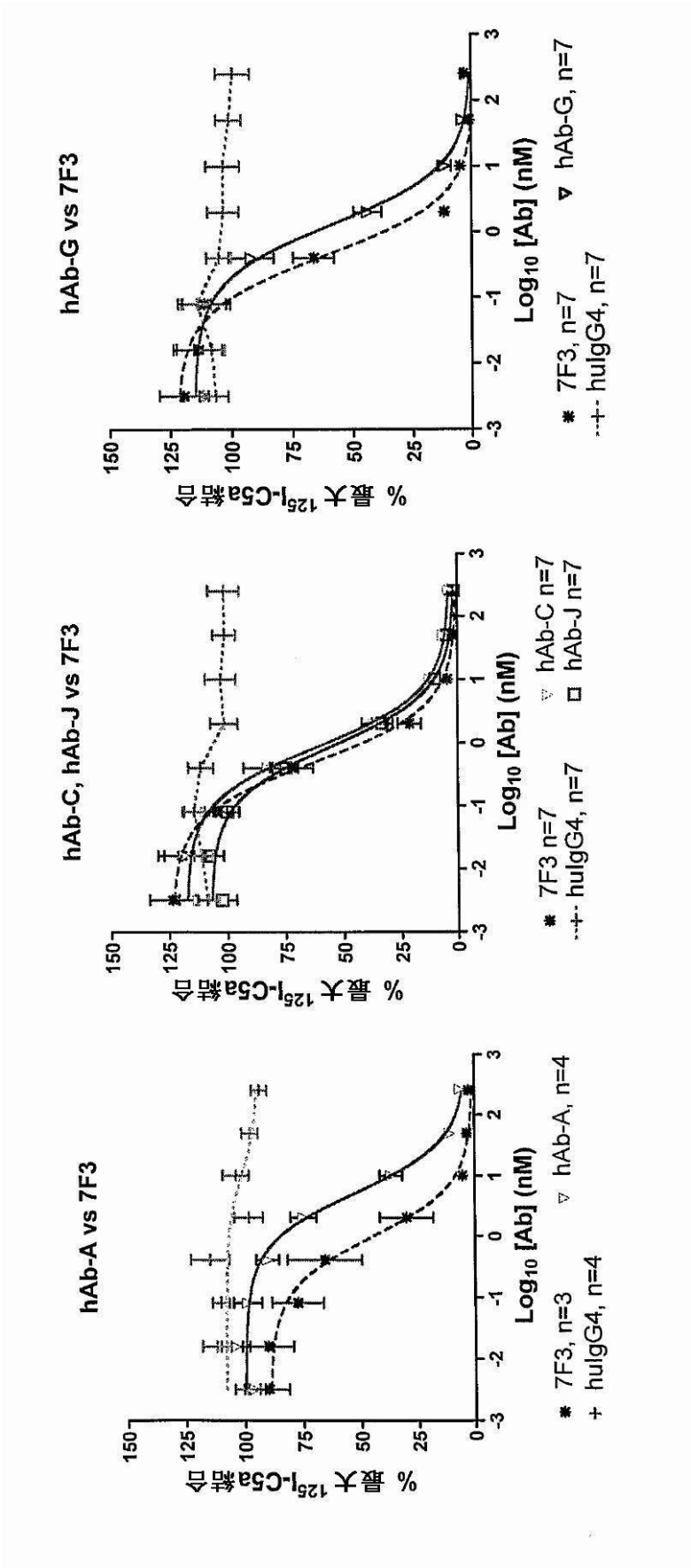
```
                10        20        30        40        50        61
m7F3 Vh     QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYAFSNSWMN WVKQRPGKGLEWIG RIYPGDGDTKYN
h7Vh        QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYAFSNSWMN WVRQAPGKGLEWMG RIYPGDGDTKYN
h7aVh       QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFSNSWMN WVKQAPGQGLEWIG RIYPGDGDTKYN
h7bVh       QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFSNSWMN WVRQAPGQGLEWMG RIYPGDGDTKYN
h7F3VhCons  QVQLVQSGAEVKKPGASVKvSCKAS GYAFSNSWMN WVrQAPGqGLEWmG RIYPGDGDTKYN
                                       CDR-H1                    CDR-H2>

                70        80        90        100       110       121
m7F3 Vh     GKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC ARFLLISTVTAVDY WGQGTTLTVSS
h7Vh        GKFKG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDSAVYFC ARFLLISTVTAVDY WGQGTTVTVSS
h7aVh       GKFKG KATMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARFLLISTVTAVDY WGQGTLVTVSS
h7bVh       GKFKG RVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ARFLLISTVTAVDY WGQGTLVTVSS
h7F3VhCons  GKFKG rvTmTADtSTSTaYMELSSLRSEDtAVYyC ARFLLISTVTAVDY WGQGTlVTVSS
                                                  CDR-H3
```

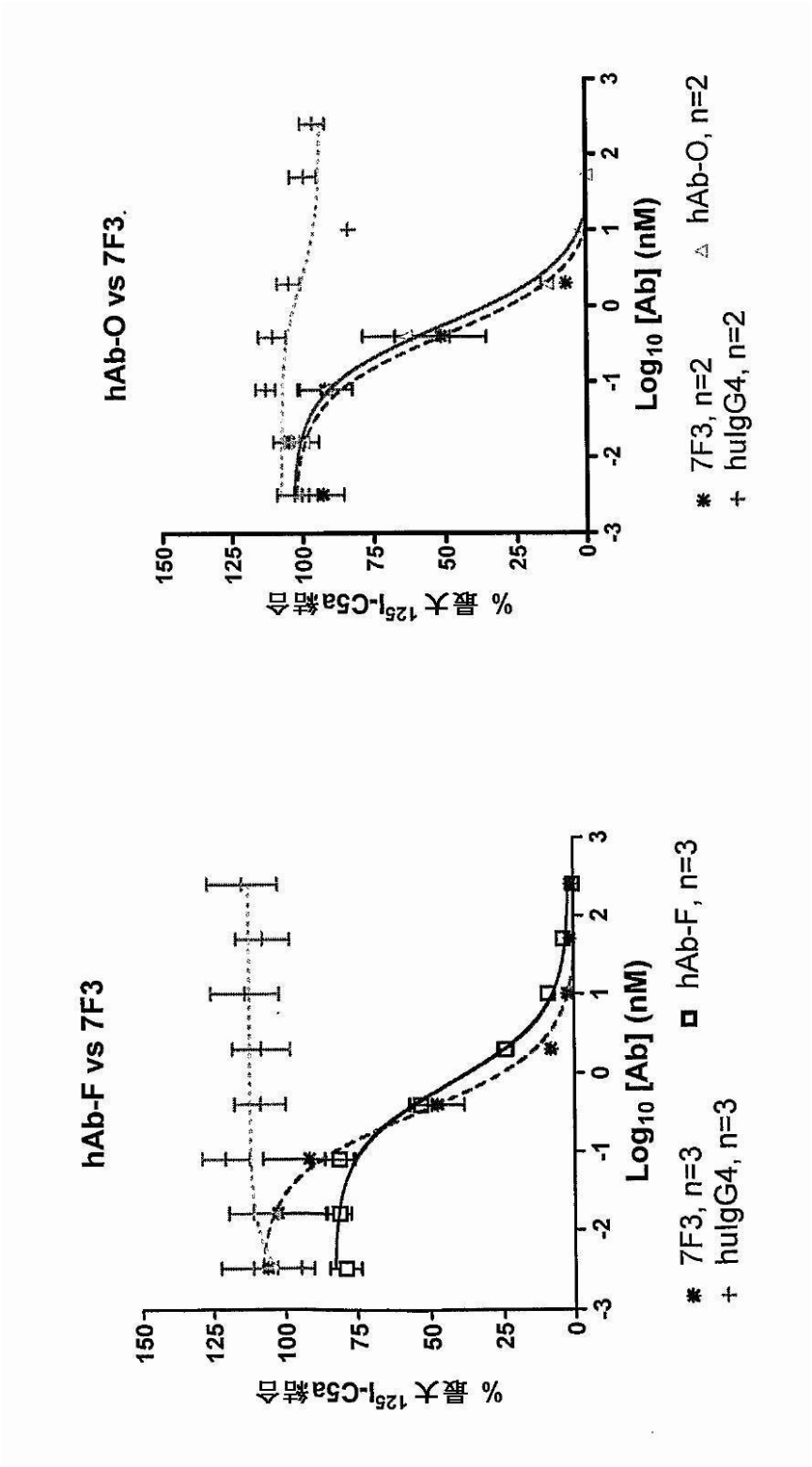
【図１１】


A
% 最大 125I-C5a 結合
log10 [Ab] (nM)
hAb-G, n=6
hAb-M, n=6
hAb-N, n=6
hAb-J, n=6
7F3, n=6
対照 hulgG4, n=6
B
% 最大 125I-C5a 結合
log10 [Ab] (nM)
hAb-C, n=6
hAb-F, n=6
hAb-O, n=5
7F3, n=6
対照 hulgG4, n=6
C
% 最大 125I-C5a 結合
log10 [Ab] (nM)
7F3, n=4
hAb-Q, n=4
hAb-S, n=4
hIgG4 対照 , n=4

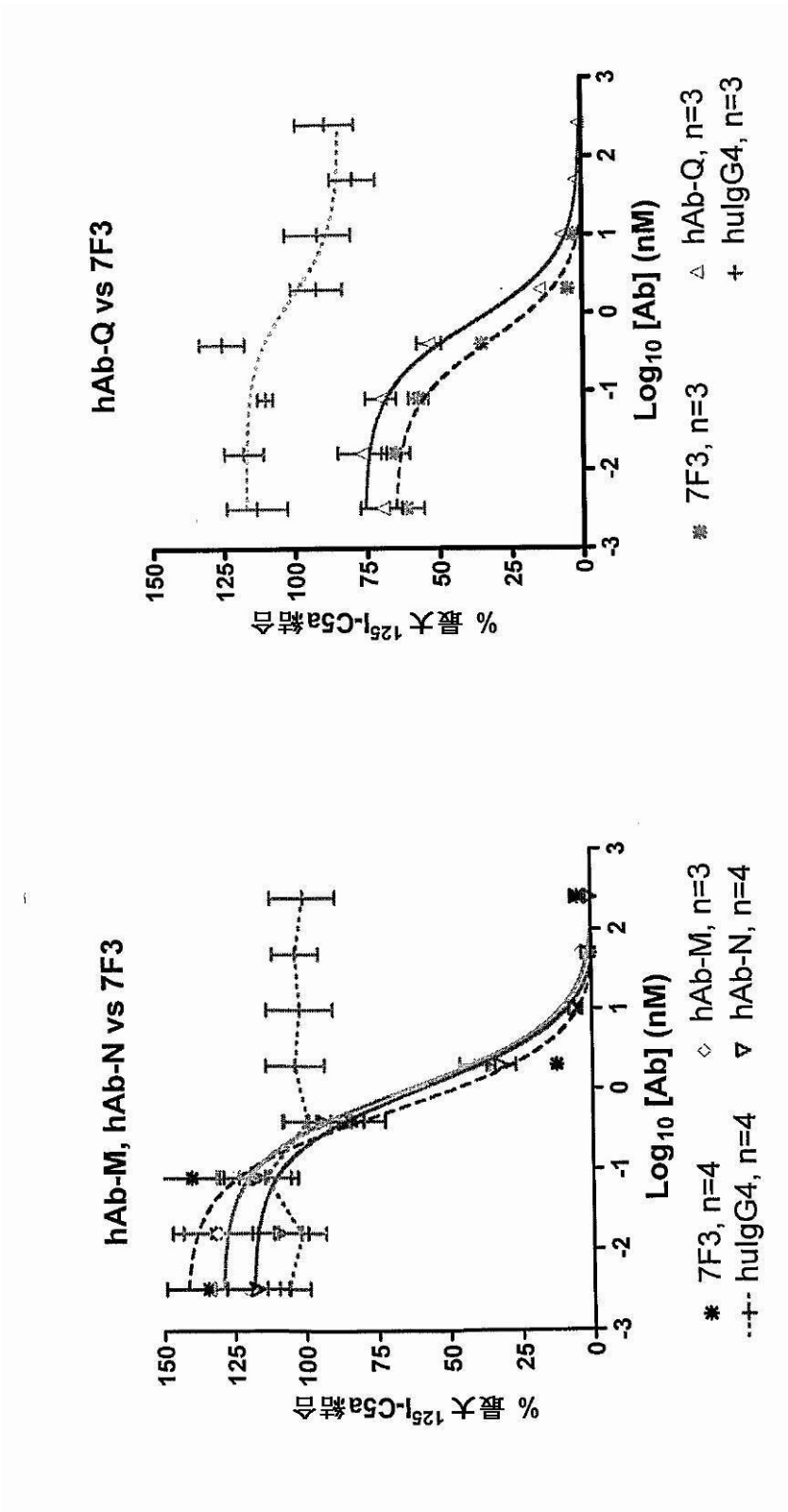
【図１２Ａ】


hAb-A vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
Log10 [Ab] (nM)
7F3, n=3
hAb-A, n=4
huIgG4, n=4
hAb-C, hAb-J vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
Log10 [Ab] (nM)
7F3 n=7
hAb-C n=7
huIgG4, n=7
hAb-J n=7
hAb-G vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
Log10 [Ab] (nM)
7F3, n=7
hAb-G, n=7
huIgG4, n=7

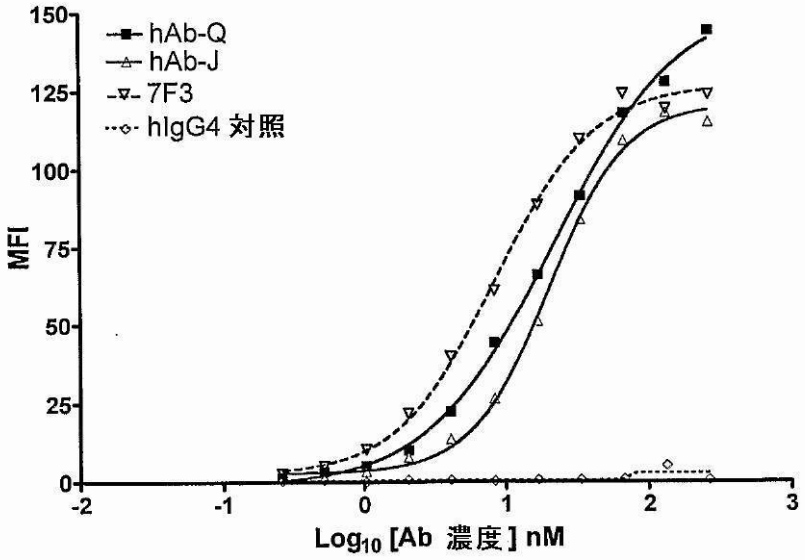
【図１２Ｂ】


hAb-F vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
150
125
100
75
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log10 [Ab] (nM)
7F3, n=3
hAb-F, n=3
hulgG4, n=3
hAb-O vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
150
125
100
75
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log10 [Ab] (nM)
7F3, n=2
hAb-O, n=2
hulgG4, n=2

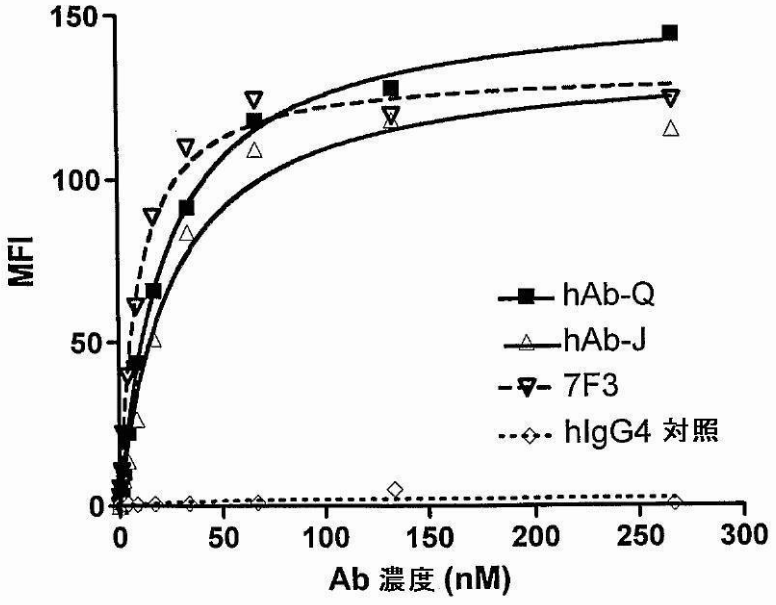
【図１２Ｃ】


hAb-M, hAb-N vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
150
125
100
75
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log10 [Ab] (nM)
7F3, n=4
hAb-M, n=3
hulgG4, n=4
hAb-N, n=4
hAb-Q vs 7F3
% 最大 125I-C5a結合
Log10 [Ab] (nM)
7F3, n=3
hAb-Q, n=3
hulgG4, n=3

【図１３】

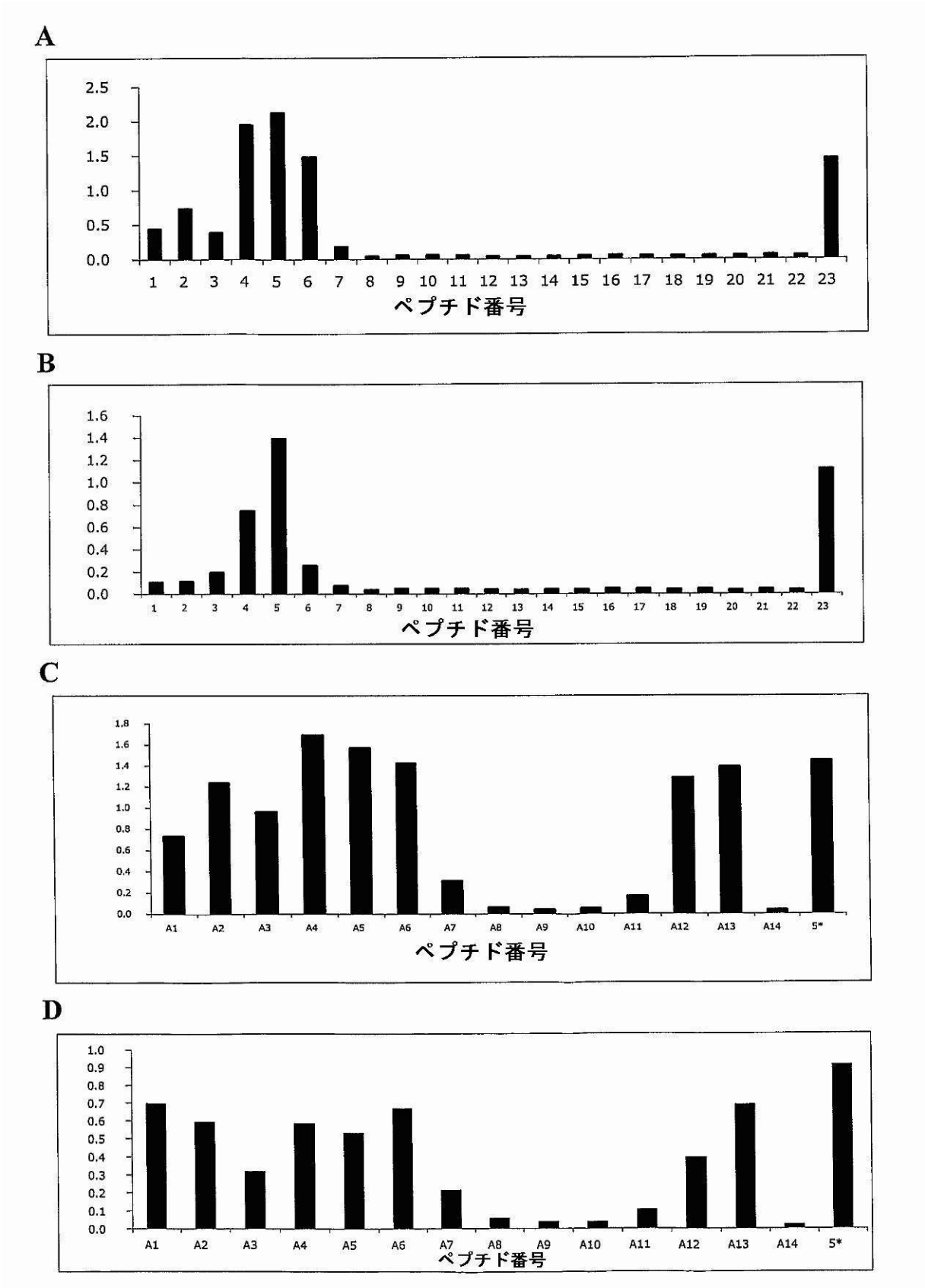


	hAb-Q	hAb-J	7F3
EC50	21.60	20.06	8.511

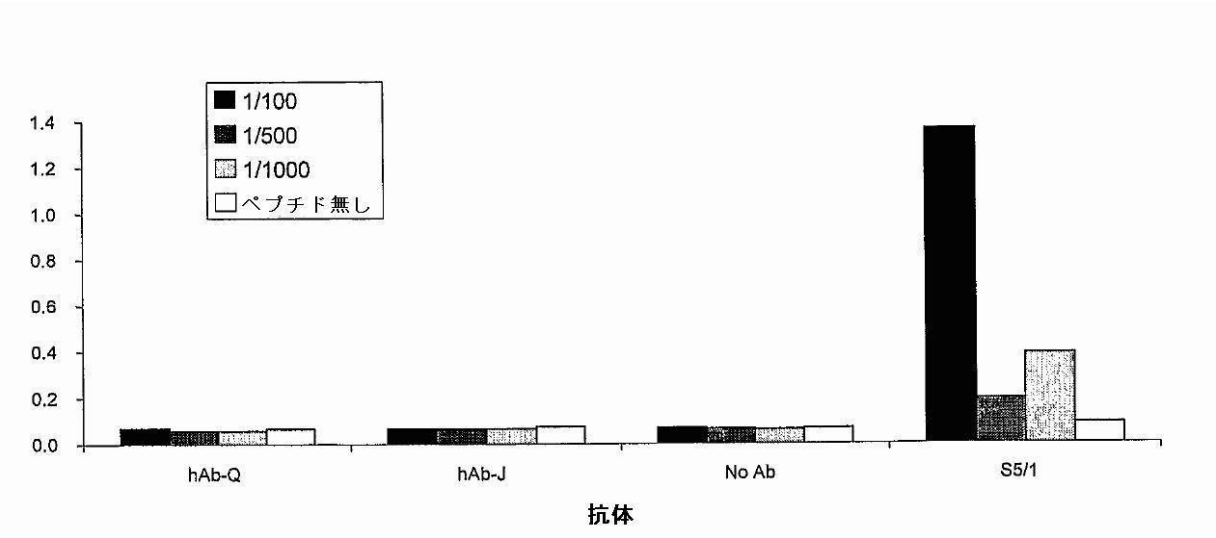


	hAb-Q	hAb-J	7F3
BMAX	154.2	136.9	133.2
KD	22.57	25.41	9.197

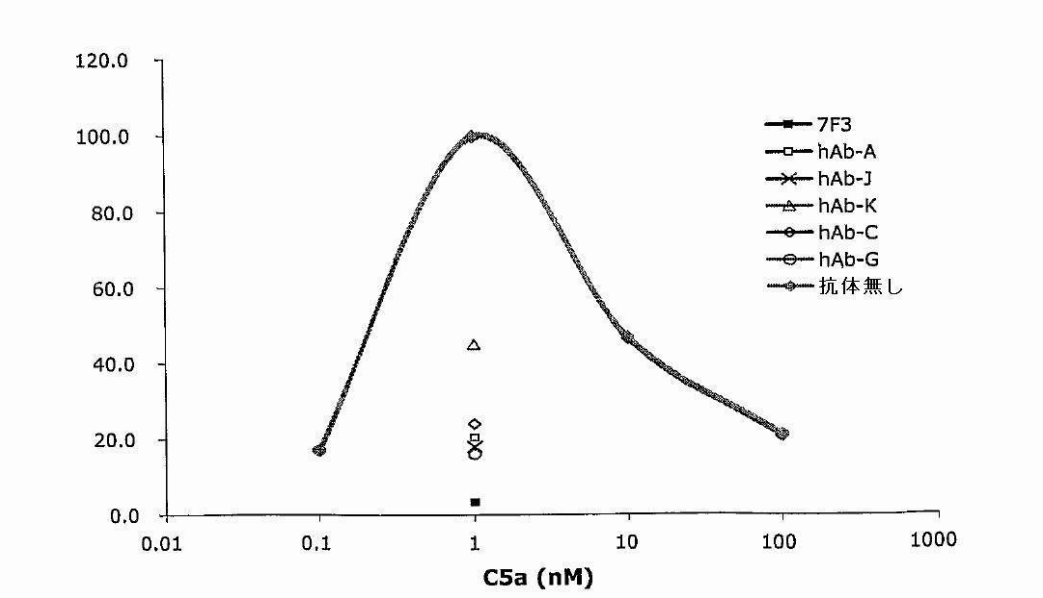
【図１４】


A
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
ペプチド番号
B
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
ペプチド番号
C
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 5*
ペプチド番号
D
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 5*
ペプチド番号

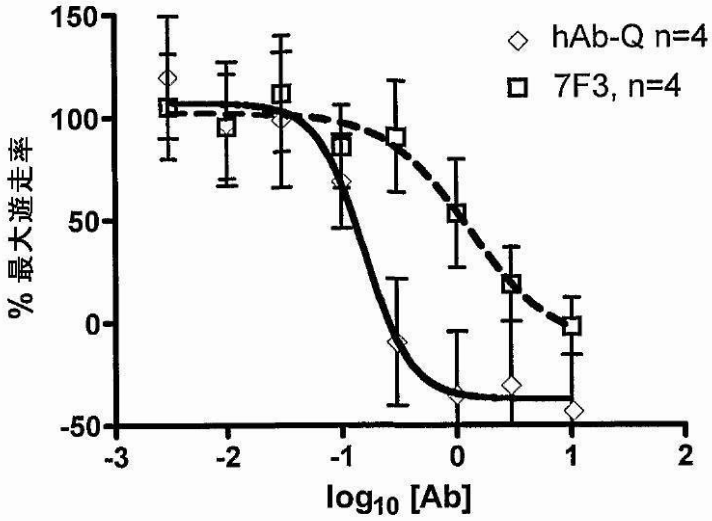
【図１５】


1/100
1/500
1/1000
ペプチド無し
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
hAb-Q
hAb-J
No Ab
S5/1
抗体

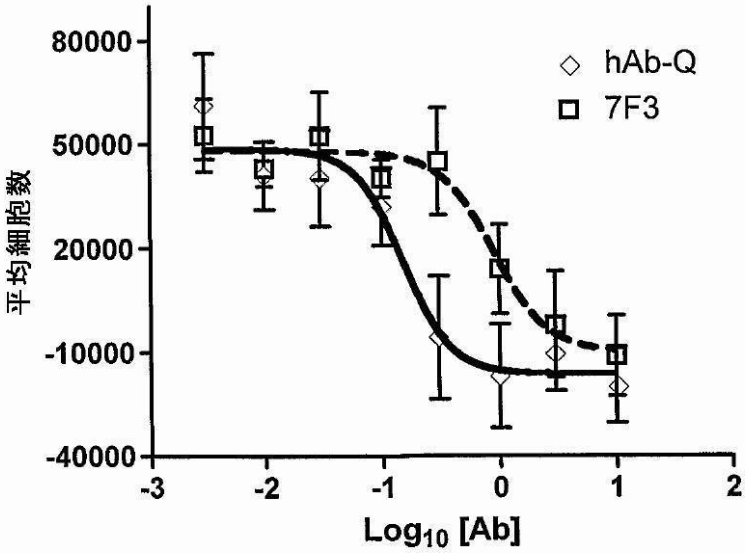
【図１６】


120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
C5a (nM)
7F3
hAb-A
hAb-J
hAb-K
hAb-C
hAb-G
抗体無し

【図１７】

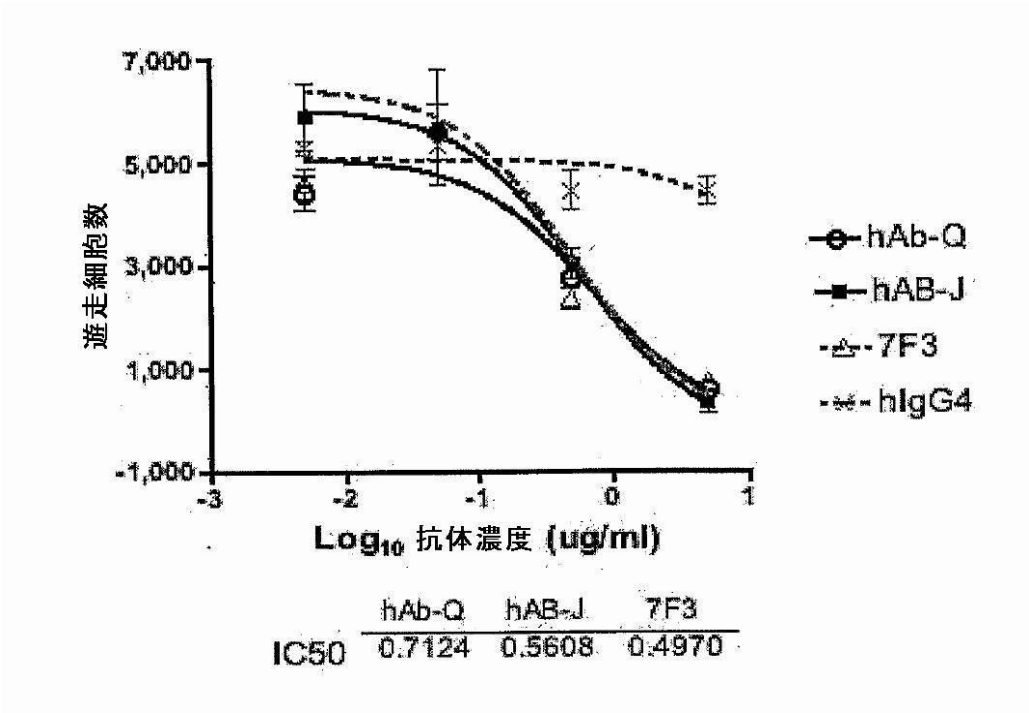


	hAb-Q, n=4	7F3, n=4
EC50	0.1564	1.291

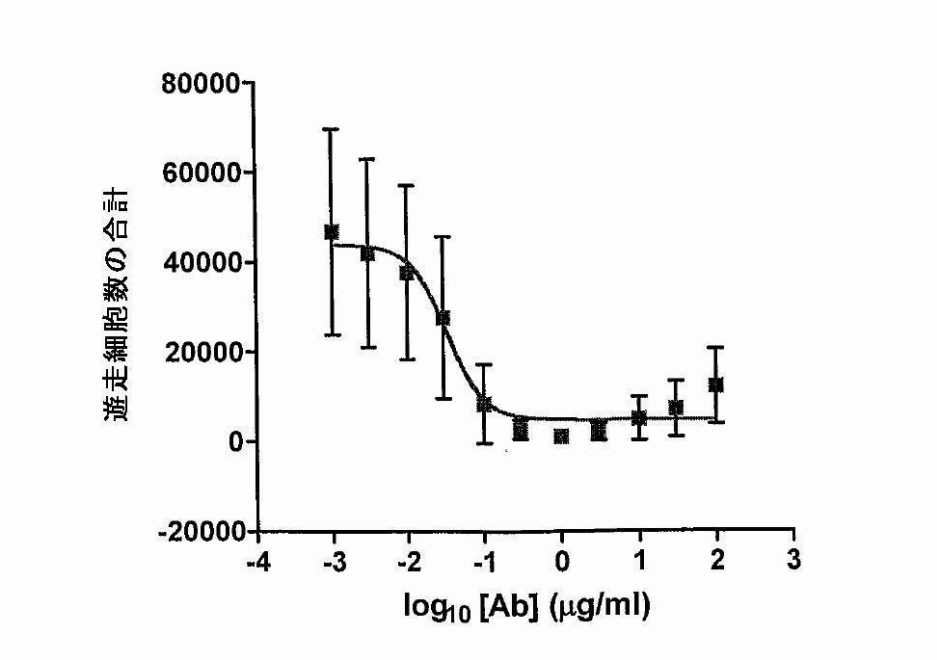


	hAb-Q	7F3
EC50	0.1514	0.8951

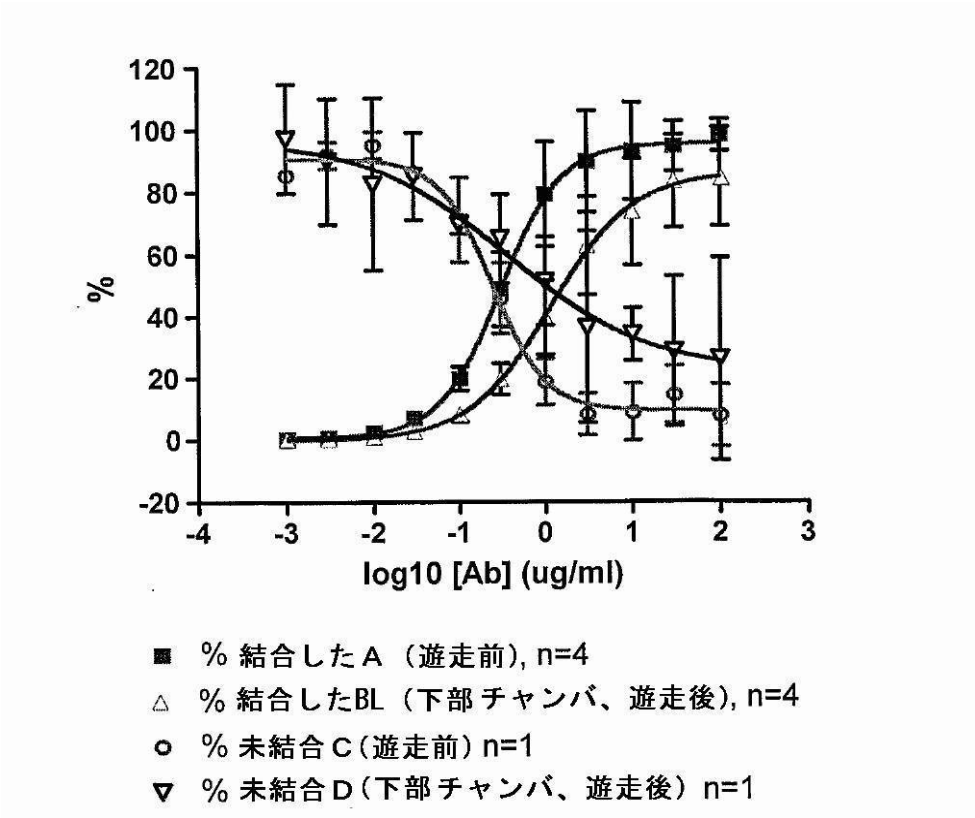
【図１８】


7,000
5,000
3,000
1,000
-1,000
遊走細胞数
-3
-2
-1
0
1
Log10 抗体濃度 (ug/ml)
hAb-Q
hAB-J
7F3
hIgG4
hAb-Q hAB-J 7F3
IC50 0.7124 0.5608 0.4970

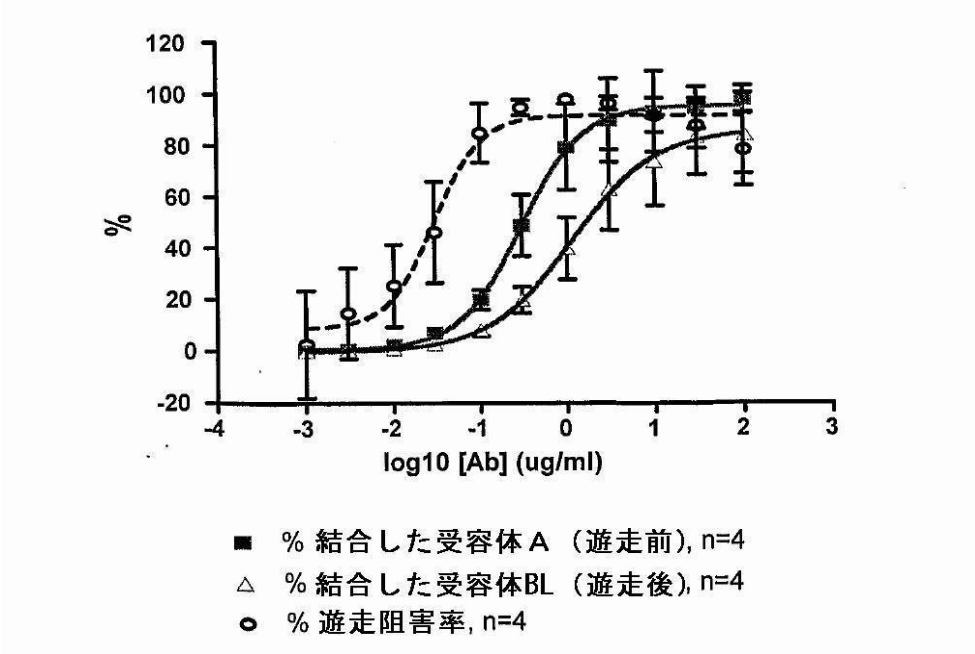
【図１９】


80000
60000
40000
20000
0
-20000
遊走細胞数の合計
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
log10 [Ab] (μg/ml)

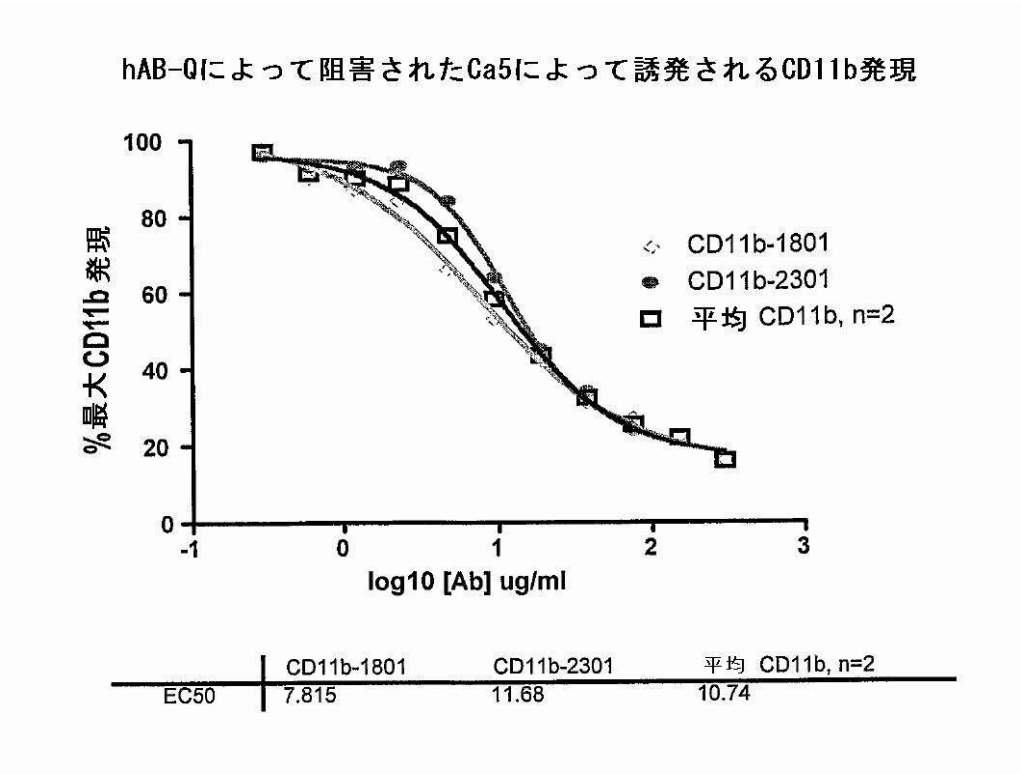
【図２０】


120
100
80
60
40
20
0
-20
%
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
log10 [Ab] (ug/ml)
■ % 結合したＡ（遊走前), n=4
△ % 結合したBL（下部チャンバ、遊走後), n=4
○ % 未結合Ｃ(遊走前) n=1
▽ % 未結合Ｄ(下部チャンバ、遊走後) n=1

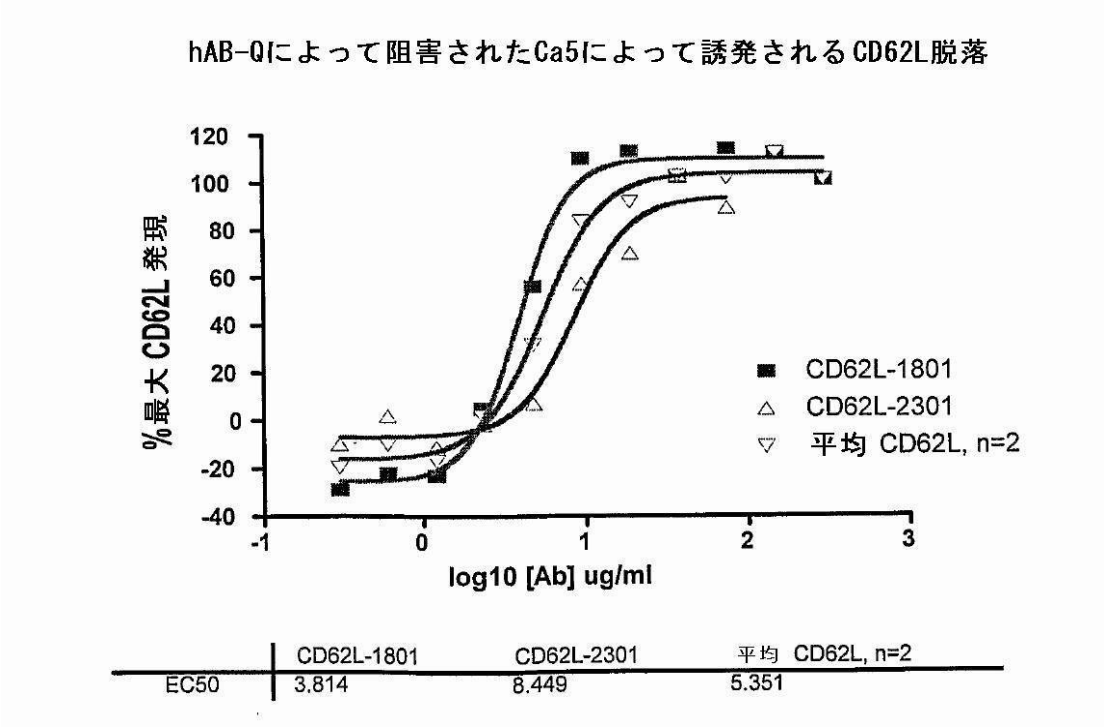
【図２１】


120
100
80
60
40
20
0
-20
%
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
log10 [Ab] (ug/ml)
■ % 結合した受容体Ａ（遊走前), n=4
△ % 結合した受容体BL（遊走後), n=4
○ % 遊走阻害率, n=4

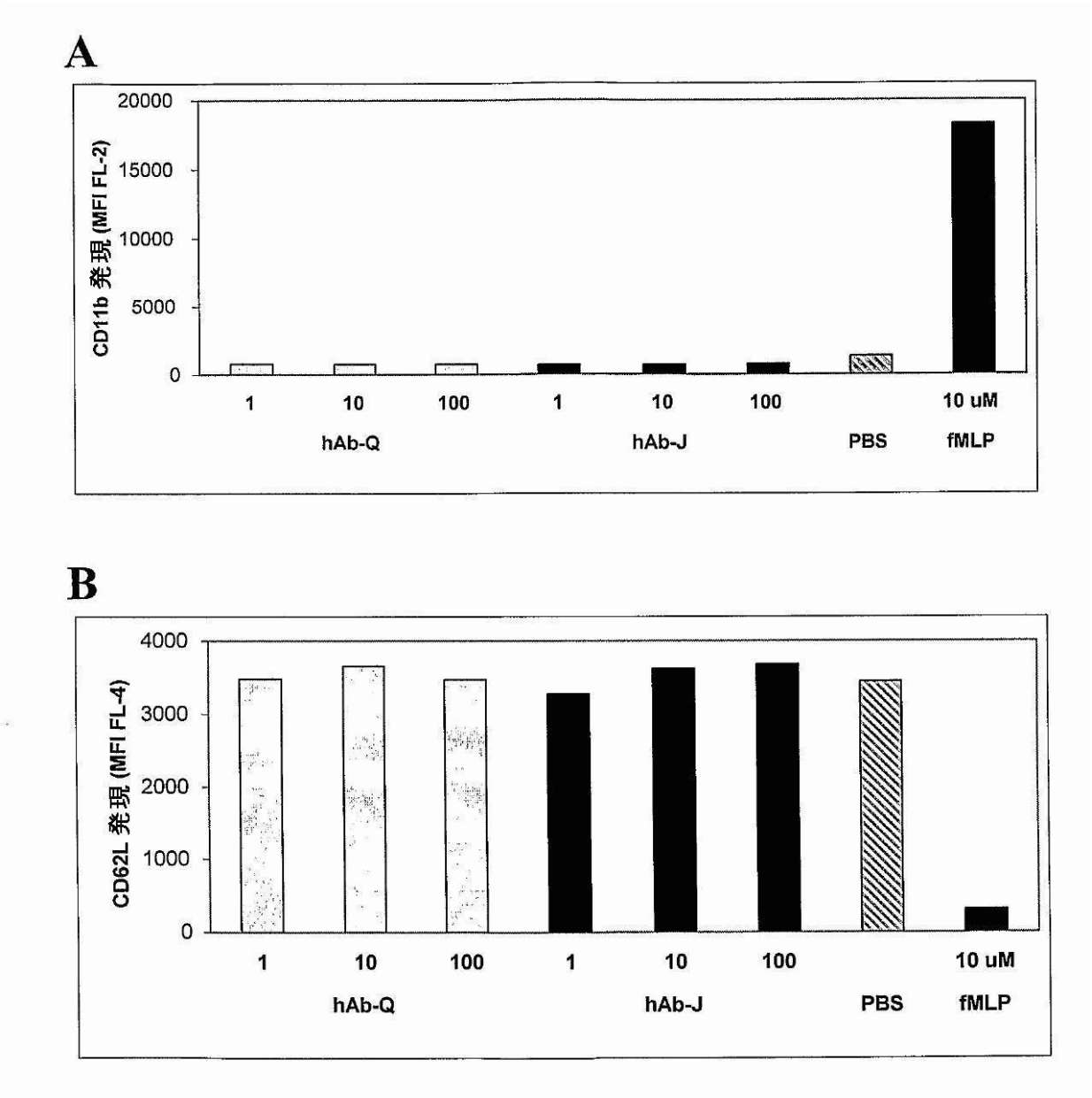
【図２２】


hAB-Qによって阻害されたCa5によって誘発されるCD11b発現
%最大CD11b発現
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
log10 [Ab] ug/ml
CD11b-1801
CD11b-2301
平均 CD11b, n=2
CD11b-1801 CD11b-2301 平均 CD11b, n=2
EC50 7.815 11.68 10.74

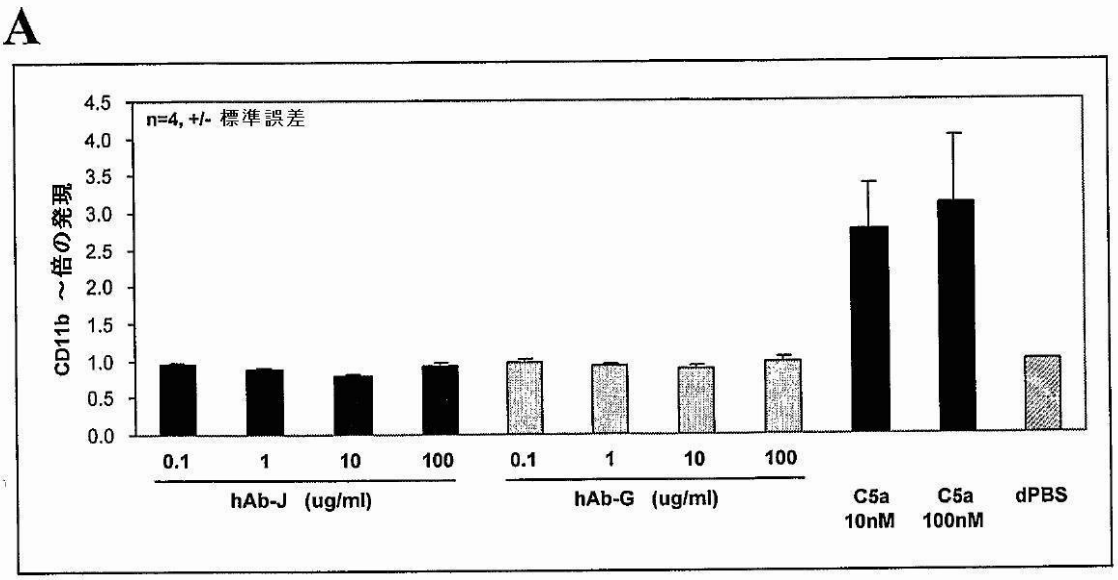
【図２３】

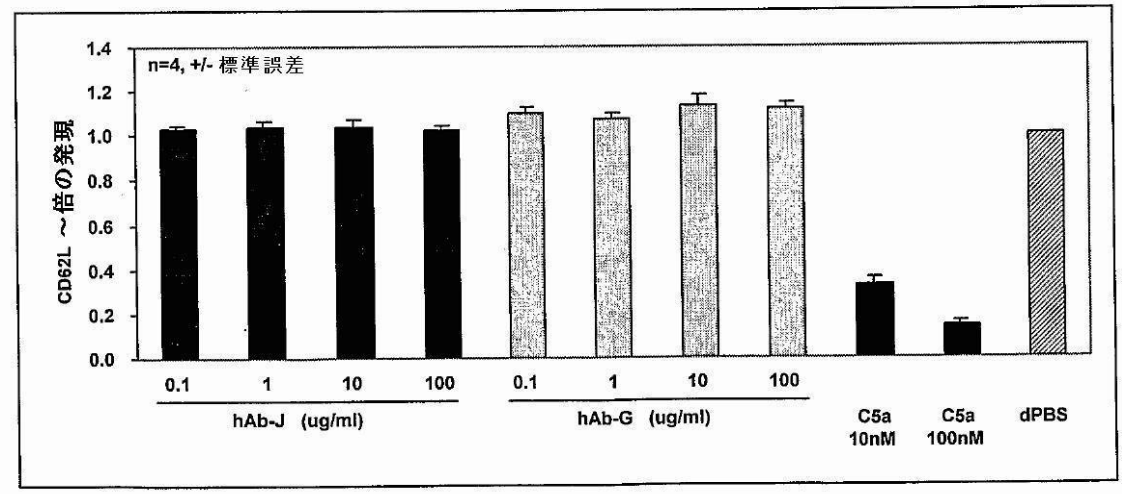

hAB-Qによって阻害されたCa5によって誘発されるCD62L脱落
%最大CD62L発現
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-1
0
1
2
3
log10 [Ab] ug/ml
CD62L-1801
CD62L-2301
平均 CD62L, n=2
CD62L-1801 CD62L-2301 平均 CD62L, n=2
EC50 3.814 8.449 5.351

【図２４】

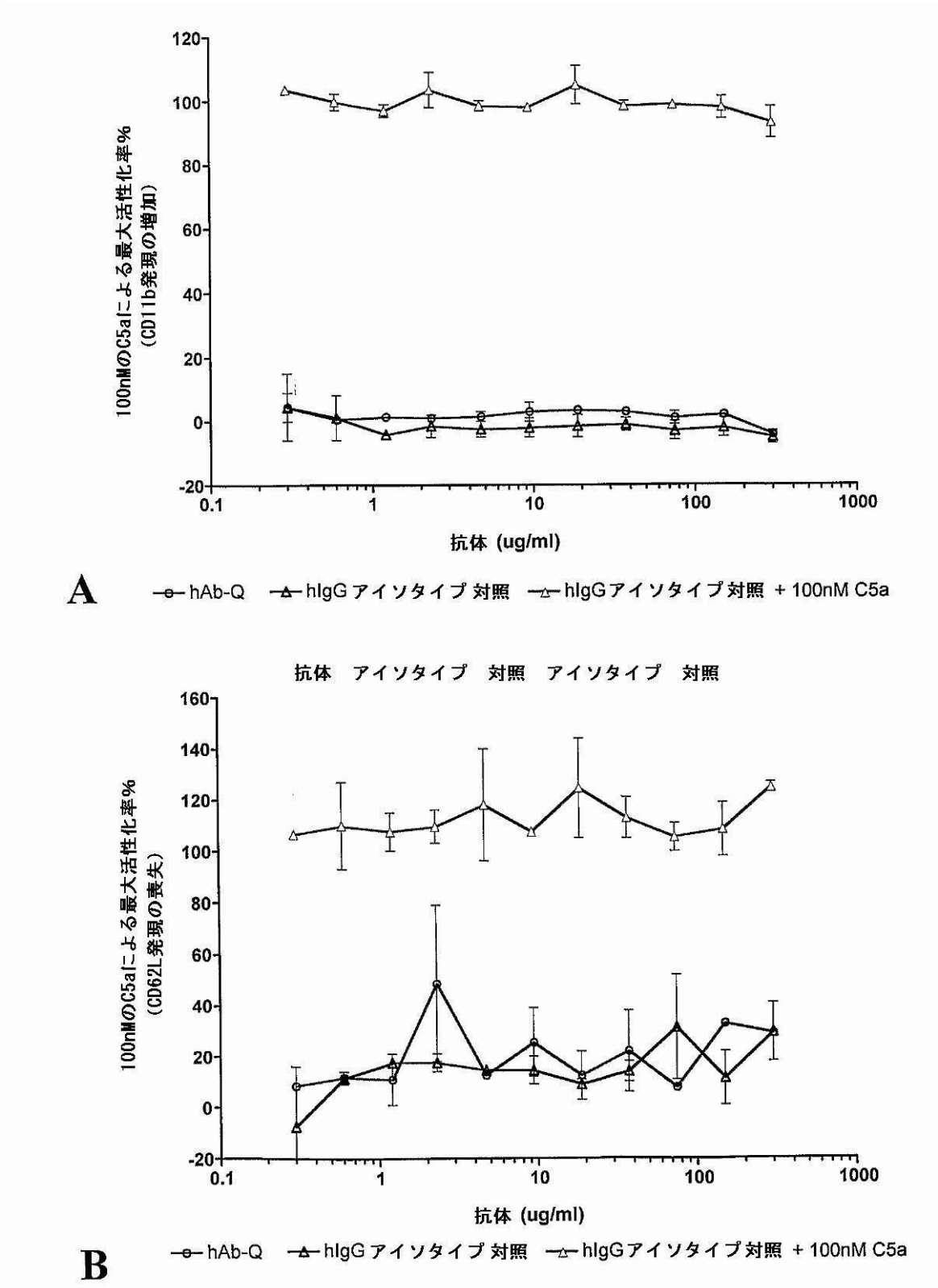

A
CD11b 発現 (MFI FL-2)
20000
15000
10000
5000
0
1
10
100
1
10
100
10 uM
hAb-Q
hAb-J
PBS
fMLP
B
CD62L 発現 (MFI FL-4)
4000
3000
2000
1000
0
1
10
100
1
10
100
10 uM
hAb-Q
hAb-J
PBS
fMLP

【図２５】

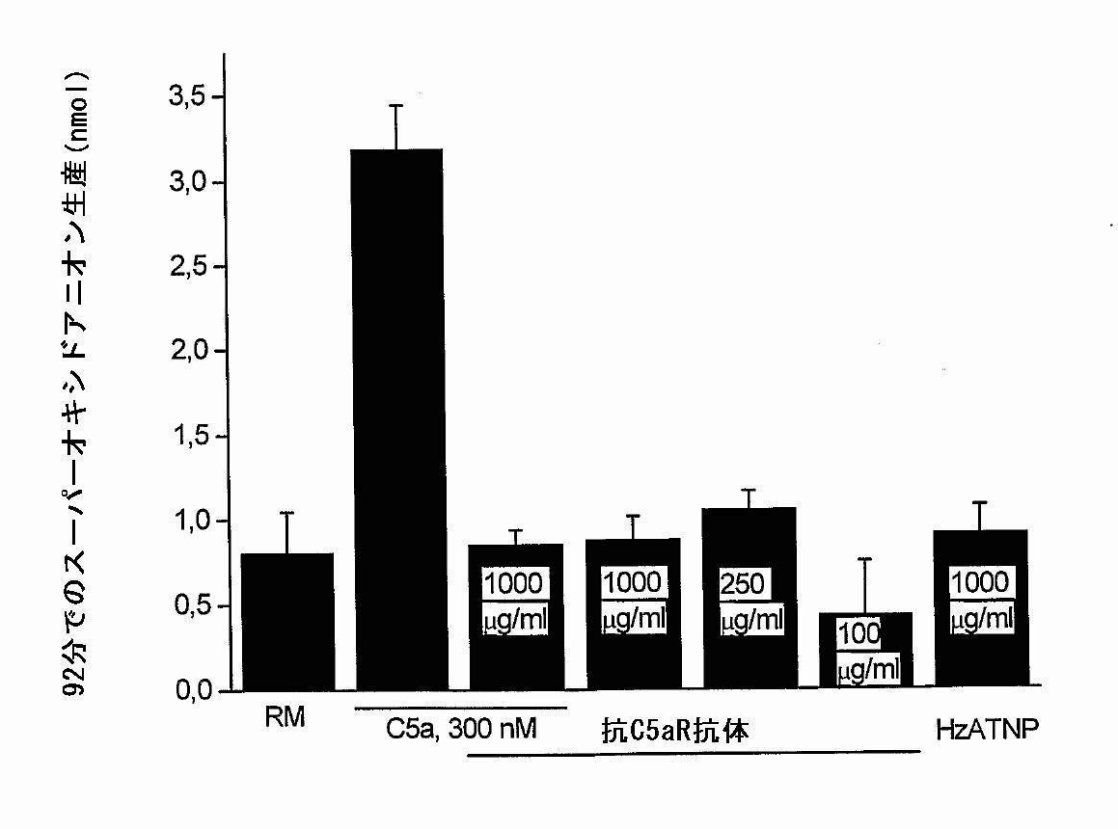

A
n=4, +/- 標準誤差
CD11b ～倍の発現
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
hAb-J (ug/ml)
0.1
1
10
100
hAb-G (ug/ml)
C5a 10nM
C5a 100nM
dPBS


B
n=4, +/- 標準誤差
CD62L ～倍の発現
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.1
1
10
100
hAb-J (ug/ml)
0.1
1
10
100
hAb-G (ug/ml)
C5a 10nM
C5a 100nM
dPBS

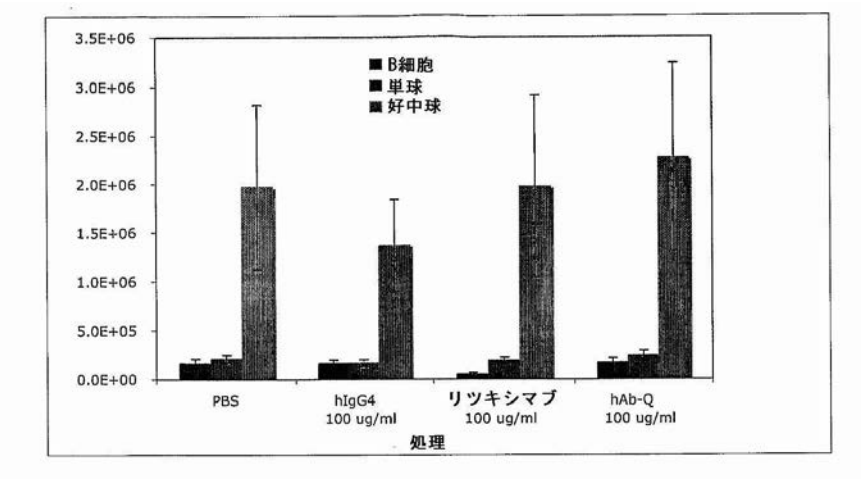
【図２６】


100nMのC5aによる最大活性化率%
(CD11b発現の増加)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
1000
抗体 (ug/ml)
A
hAb-Q
hIgG アイソタイプ 対照
hIgGアイソタイプ対照 + 100nM C5a
抗体 アイソタイプ 対照 アイソタイプ 対照
100nMのC5aによる最大活性化率%
(CD62L発現の喪失)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
1000
抗体 (ug/ml)
B
hAb-Q
hIgG アイソタイプ 対照
hIgGアイソタイプ対照 + 100nM C5a

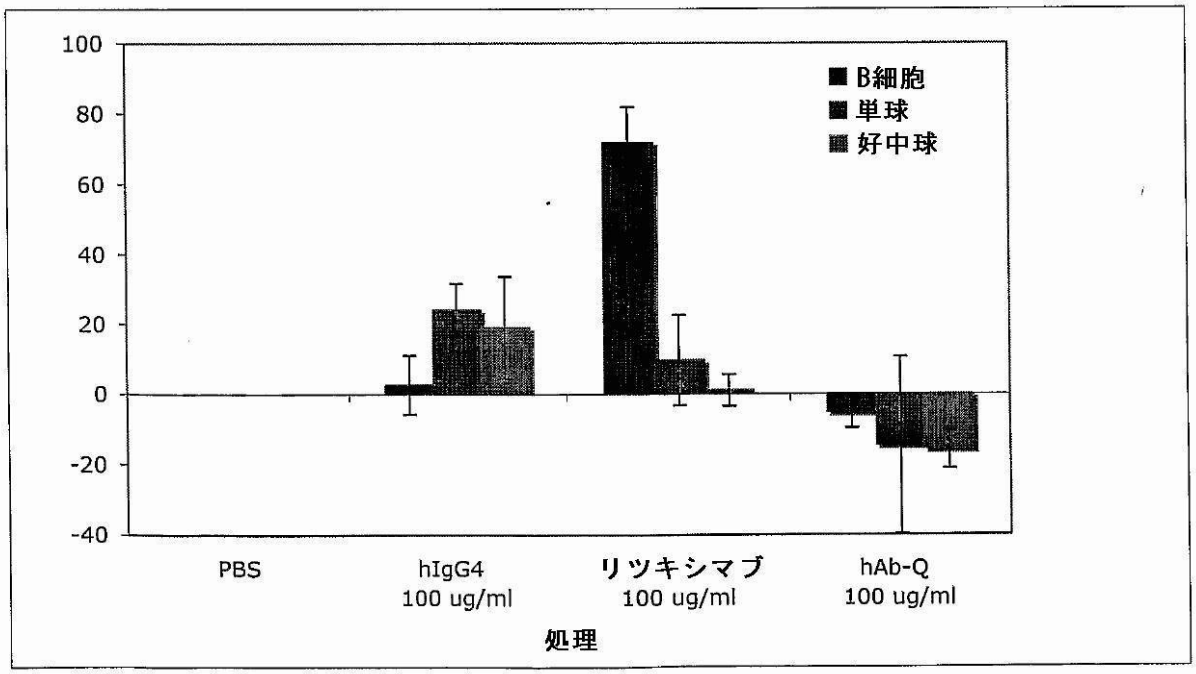
【図２７】


92分でのスーパーオキシドアニオン生産(nmol)
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1000 μg/ml
1000 μg/ml
250 μg/ml
100 μg/ml
1000 μg/ml
RM
C5a, 300 nM
抗C5aR抗体
HzATNP

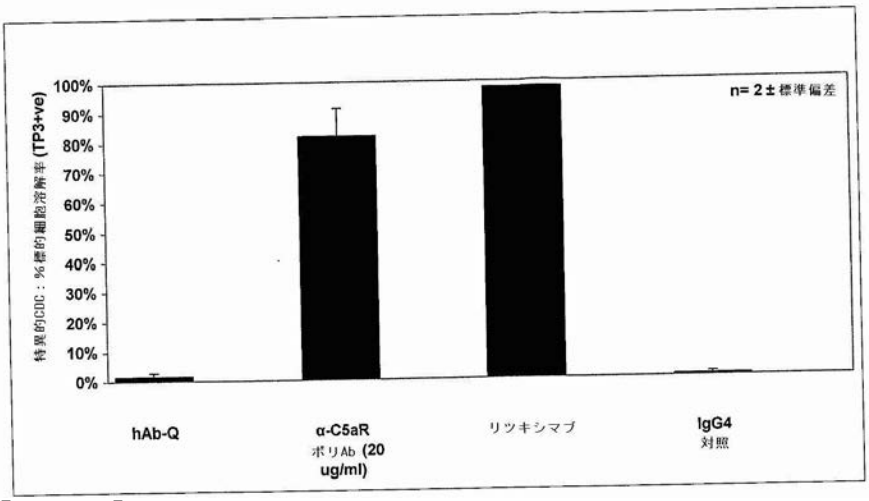
【図２８】


3.5E+06
3.0E+06
2.5E+06
2.0E+06
1.5E+06
1.0E+06
5.0E+05
0.0E+00
B細胞
単球
好中球
PBS
hIgG4 100 ug/ml
リツキシマブ 100 ug/ml
hAb-Q 100 ug/ml
処理

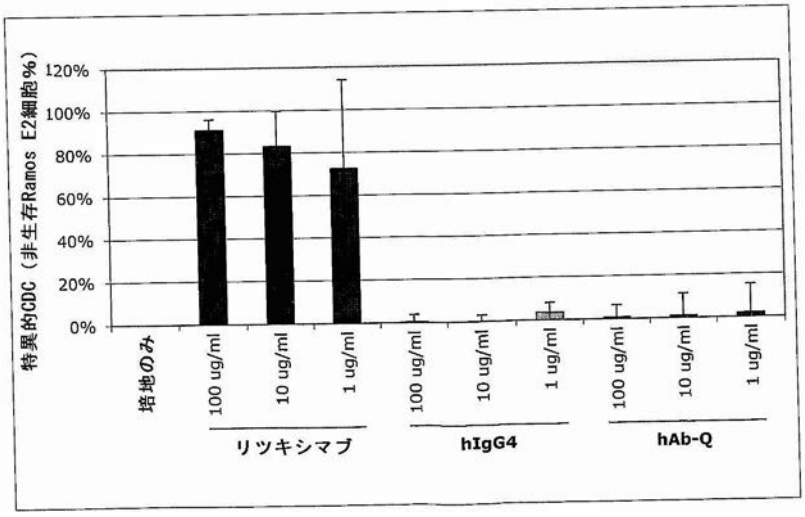
【図２９】


100
80
60
40
20
0
-20
-40
B細胞
単球
好中球
PBS
hIgG4
100 ug/ml
リツキシマブ
100 ug/ml
hAb-Q
100 ug/ml
処理

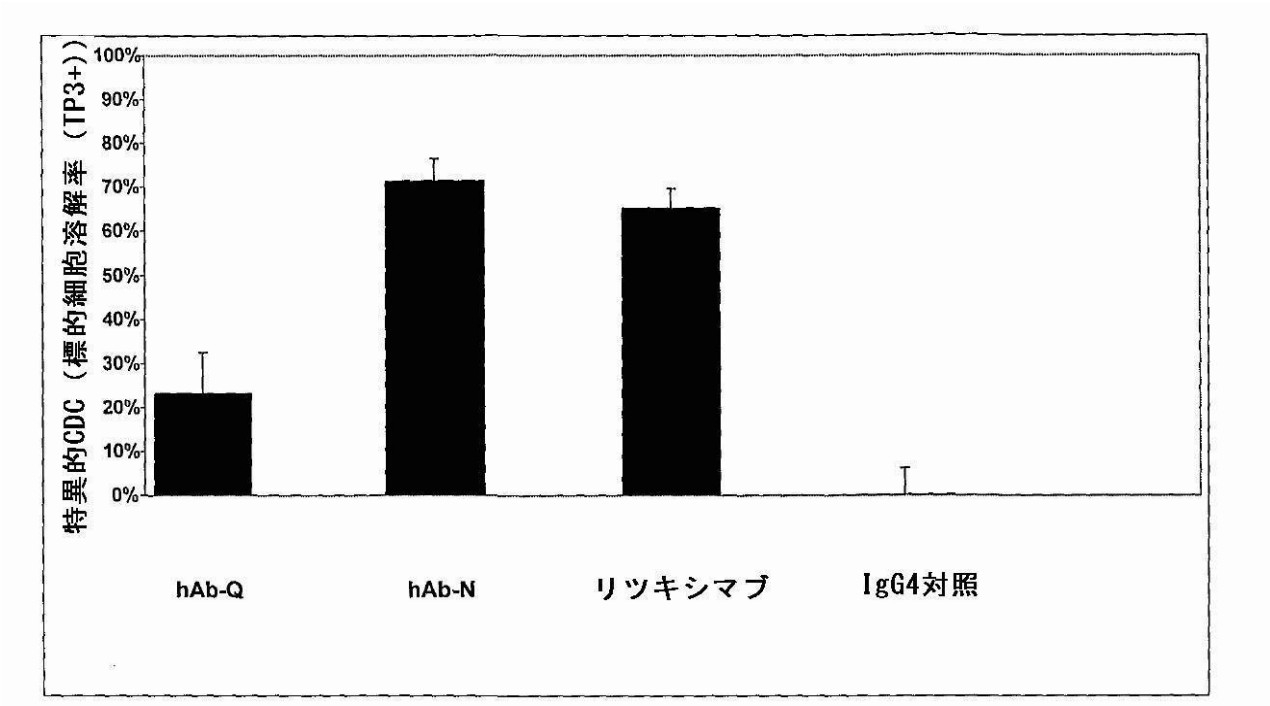
【図３０】


特異的CDC：%標的細胞溶解率 (TP3+ve)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
n= 2±標準偏差
hAb-Q
α-C5aR
ポリAb (20
ug/ml)
リツキシマブ
IgG4
対照

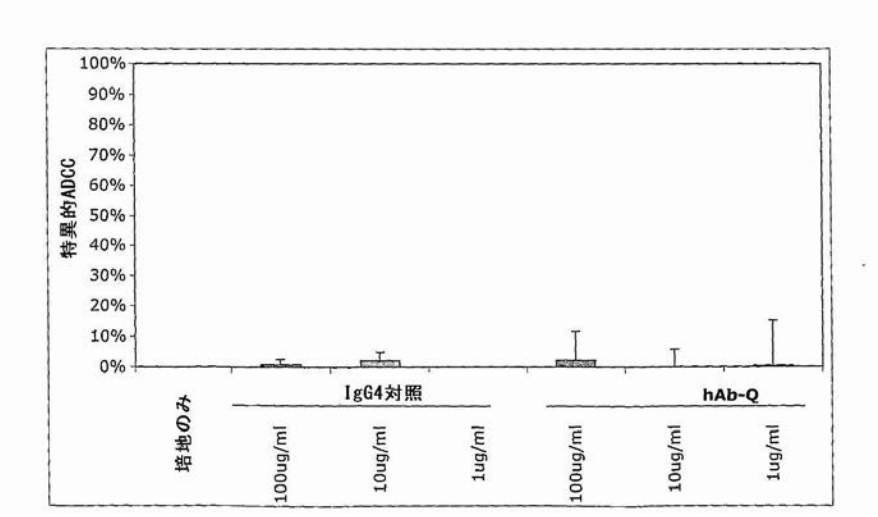
【図３１】


特異的CDC（非生存Ramos E2細胞%）
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
培地のみ
100 ug/ml
10 ug/ml
1 ug/ml
100 ug/ml
10 ug/ml
1 ug/ml
100 ug/ml
10 ug/ml
1 ug/ml
リツキシマブ
hIgG4
hAb-Q

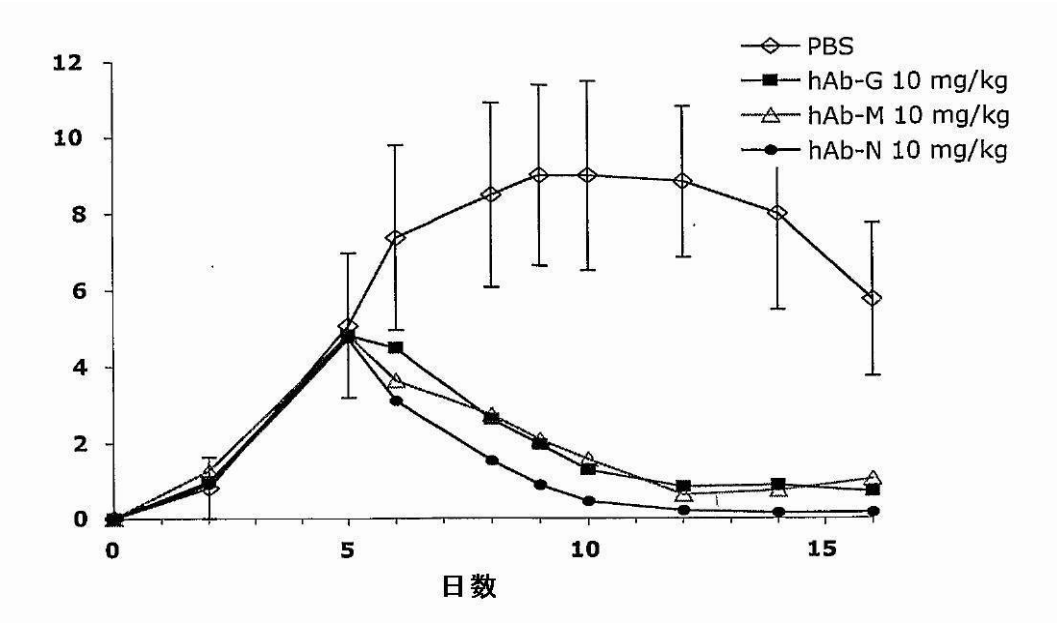
【図３２】


特異的CDC（標的細胞溶解率（TP3+））
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
hAb-Q
hAb-N
リツキシマブ
IgG4対照

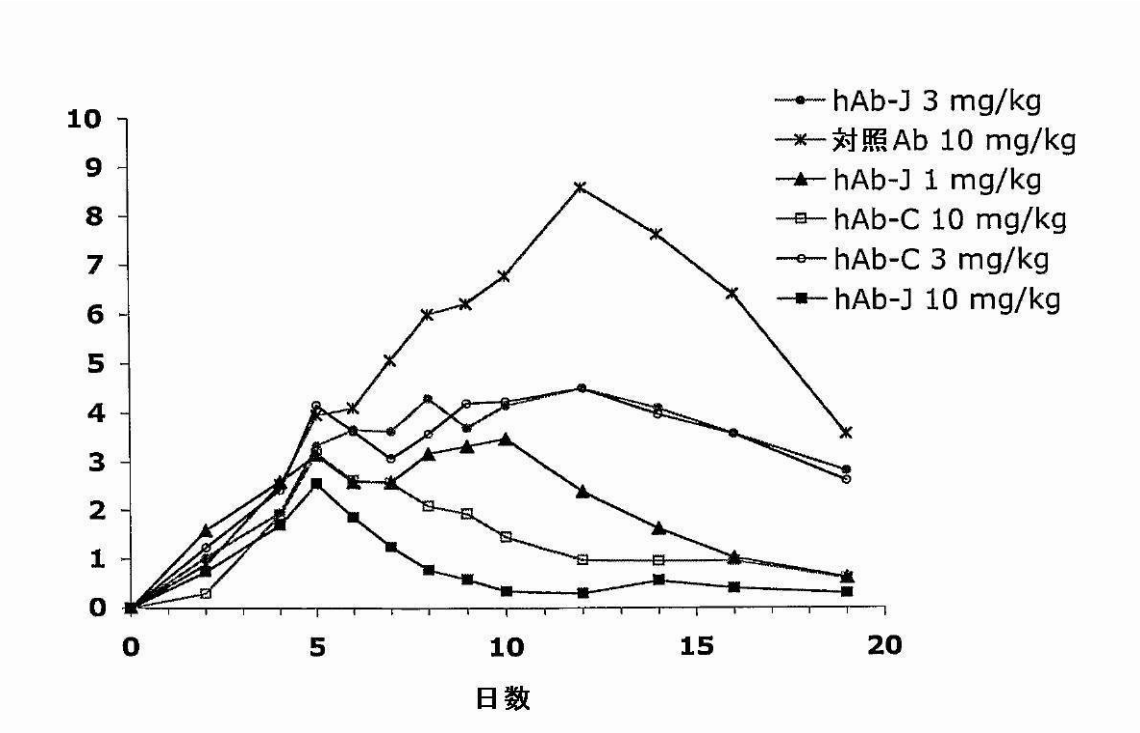
【図３３】


特異的ADCC
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
IgG4対照
hAb-Q
培地のみ
100ug/ml
10ug/ml
1ug/ml
100ug/ml
10ug/ml
1ug/ml

【図３４】


PBS
hAb-G 10 mg/kg
hAb-M 10 mg/kg
hAb-N 10 mg/kg
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
日数

【図３５】


hAb-J 3 mg/kg
対照Ab 10 mg/kg
hAb-J 1 mg/kg
hAb-C 10 mg/kg
hAb-C 3 mg/kg
hAb-J 10 mg/kg
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
5
10
15
20
日数

【図３６】

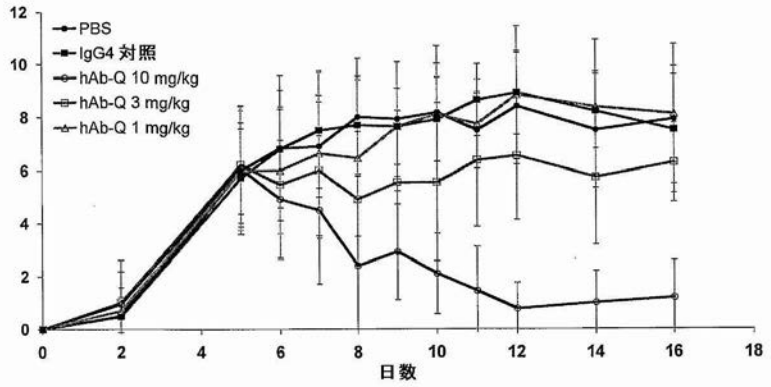


Figure 36a

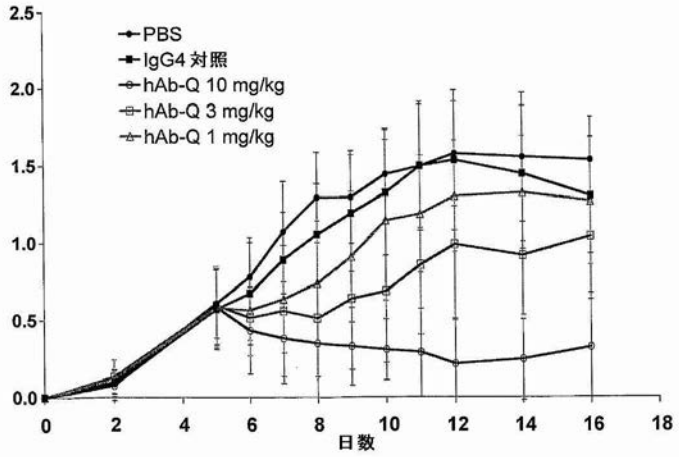
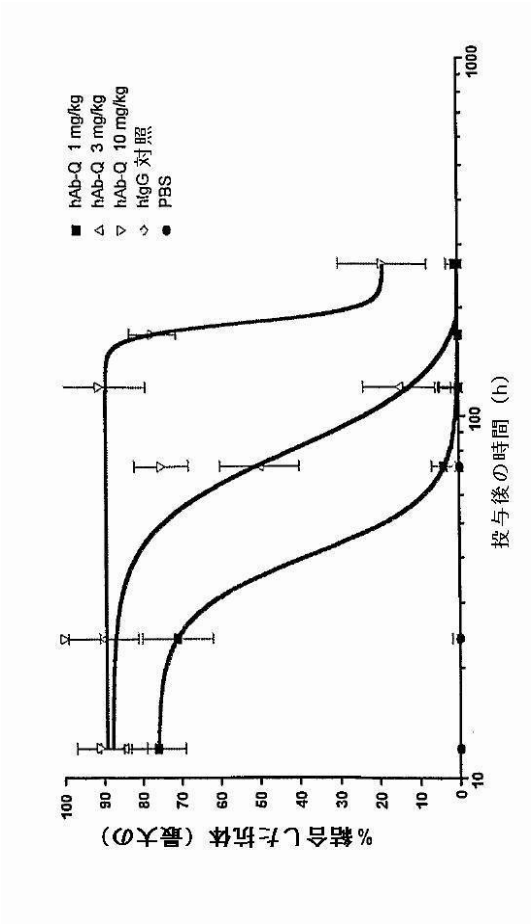
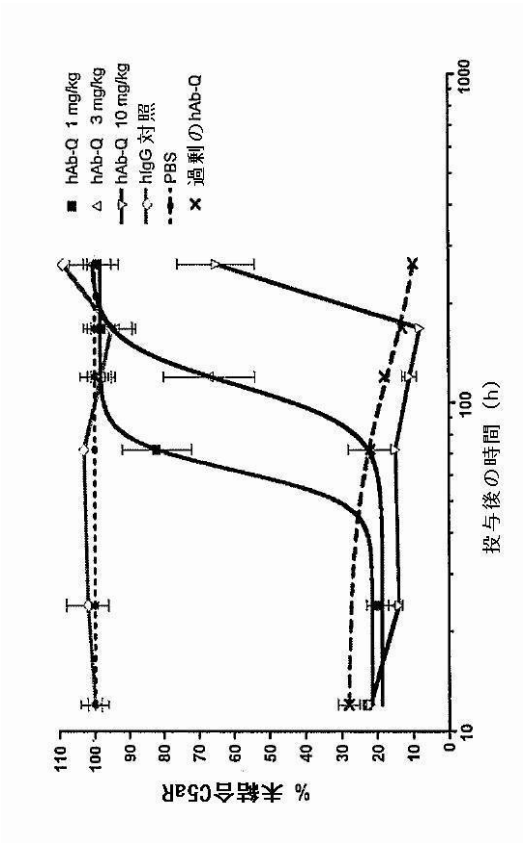


Figure 36b

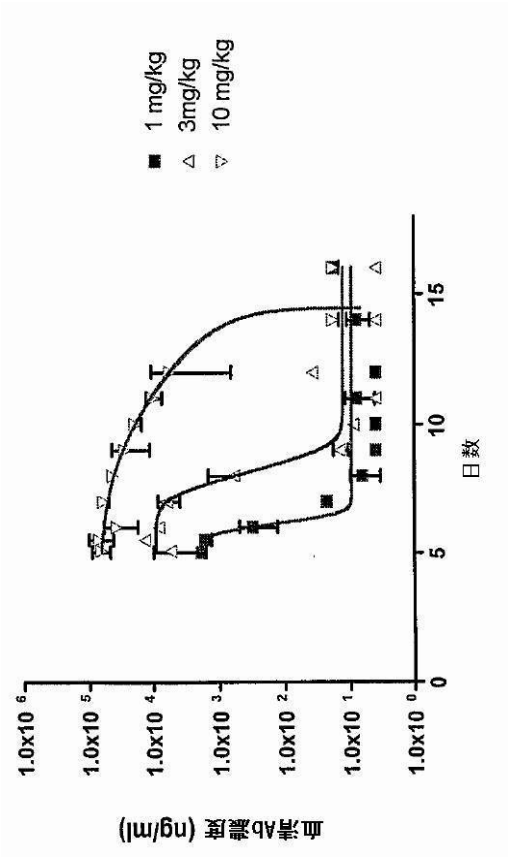
【図３７】


hAb-Q 1 mg/kg
hAb-Q 3 mg/kg
hAb-Q 10 mg/kg
hIgG 対照
PBS
％結合した抗体（最大の）
投与後の時間（h）

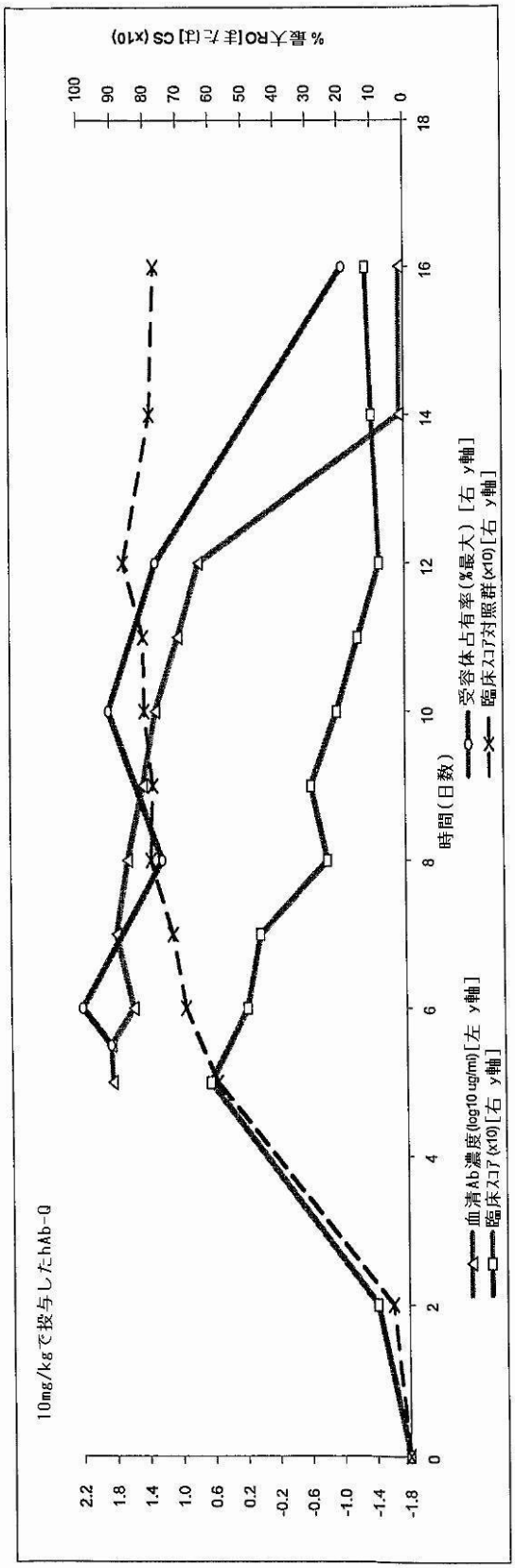
【図３８】


hAb-Q 1 mg/kg
hAb-Q 3 mg/kg
hAb-Q 10 mg/kg
hIgG 対照
PBS
過剰のhAb-Q
％ 未結合C5aR
投与後の時間（h）

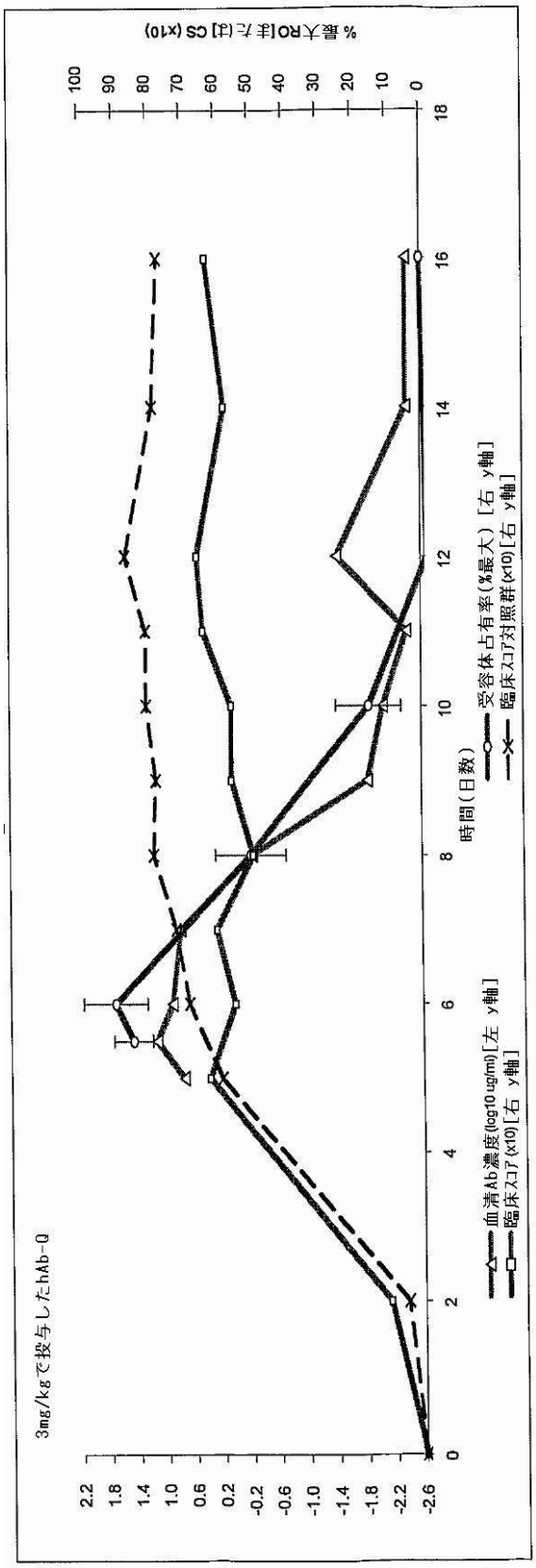
【図３９】


血清Ab濃度 (ng/ml)
1.0x10 6
1.0x10 5
1.0x10 4
1.0x10 3
1.0x10 2
1.0x10 1
1.0x10 0
0
5
10
15
日数
1 mg/kg
3mg/kg
10 mg/kg

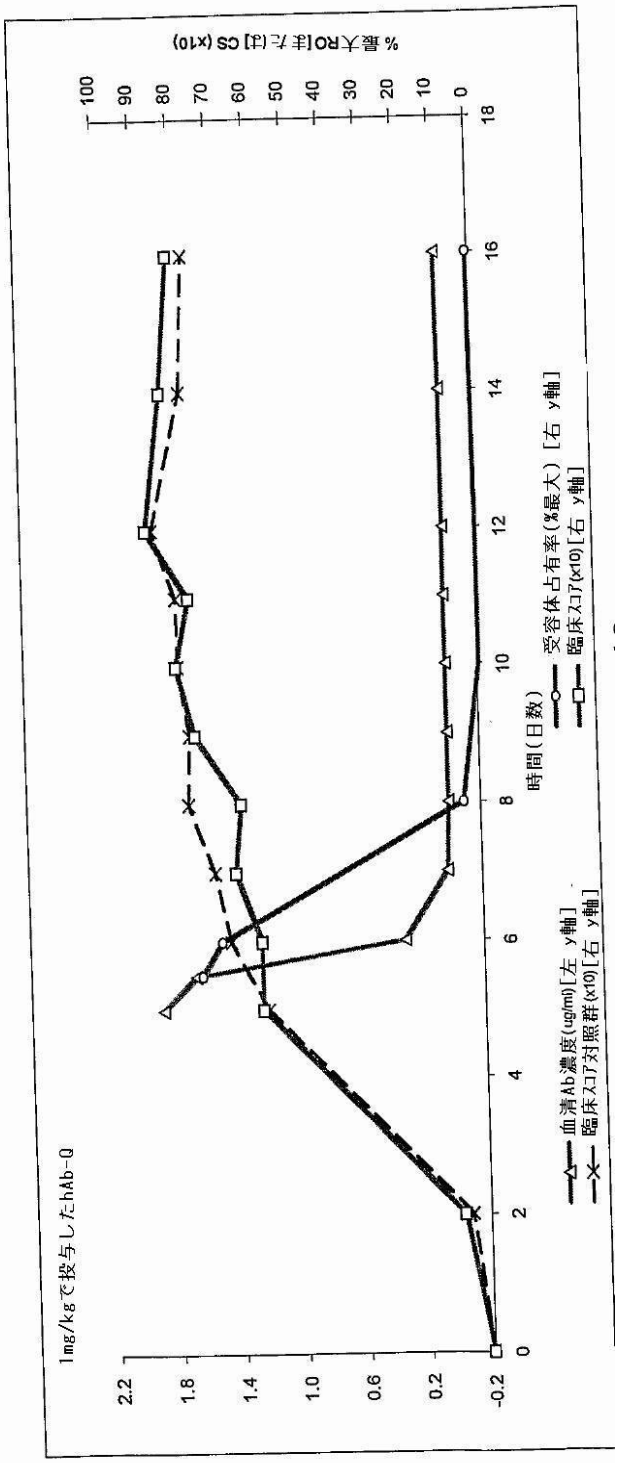
【図４０】


10mg/kgで投与したhAb-Q
2.2
1.8
1.4
1.0
0.6
0.2
-0.2
-0.6
-1.0
-1.4
-1.8
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
時間(日数)
血清Ab濃度(log10 ug/ml)[左 y軸]
臨床スコア(x10)[右 y軸]
受容体占有率(%最大)[右 y軸]
臨床スコア対照群(x10)[右 y軸]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% 最大RO[注た(ま] CS (x10)

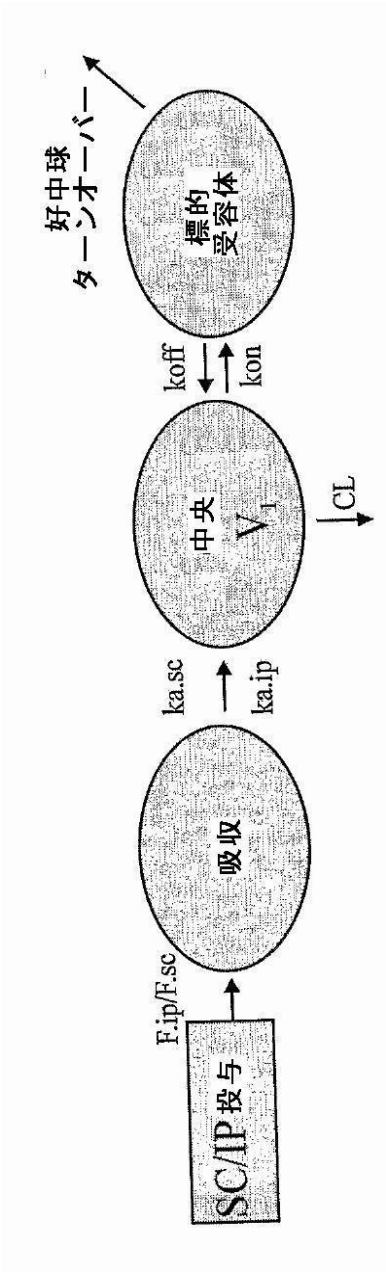
【図４１】


3mg/kgで投与したhAb-Q
2.2
1.8
1.4
1.0
0.6
0.2
-0.2
-0.6
-1.0
-1.4
-1.8
-2.2
-2.6
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
時間(日数)
血清Ab濃度(log10 ug/ml)[左 y軸]
臨床スコア(x10)[右 y軸]
受容体占有率(%最大)[右 y軸]
臨床スコア対照群(x10)[右 y軸]
% 最大RO[または] CS (x10)

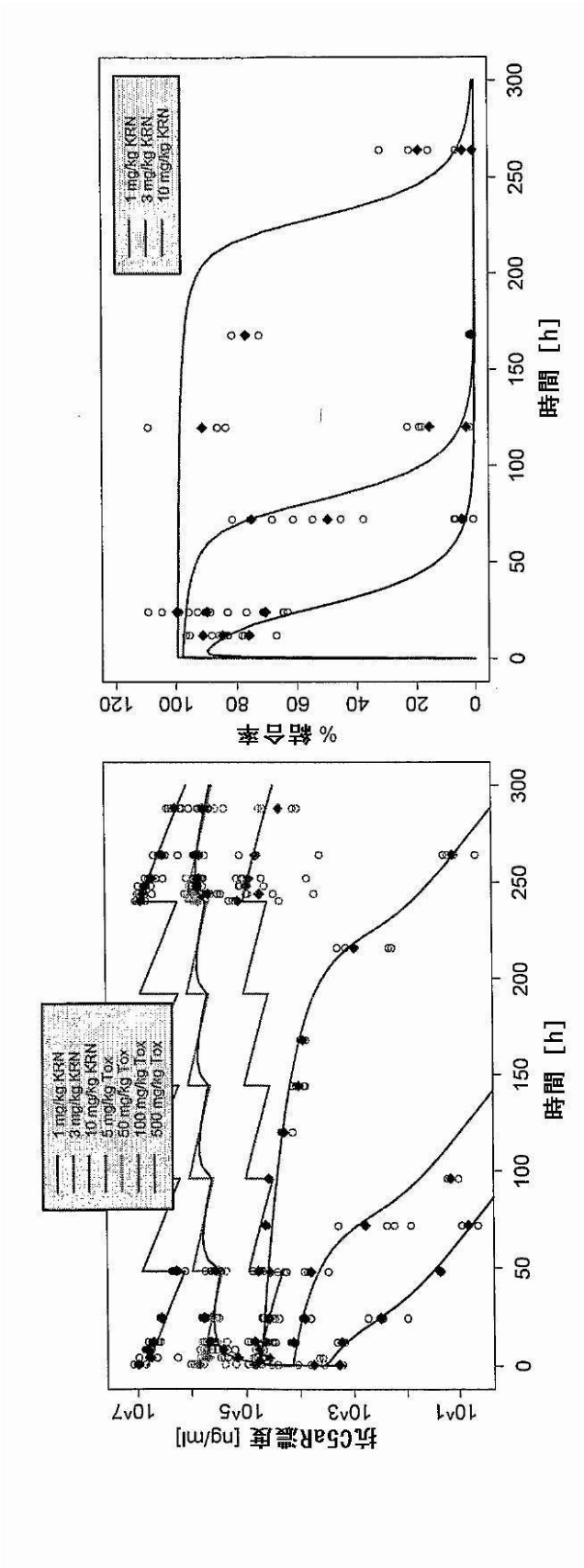
【図４２】


1mg/kgで投与したhAb-0
2.2
1.8
1.4
1.0
0.6
0.2
-0.2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
時間（日数）
血清Ab濃度(ug/ml)[左 y軸]
臨床スコア対照群(x10)[右 y軸]
受容体占有率(%最大)［右 y軸］
臨床スコア(x10)[右 y軸]
% 最大RO[ほたほ] CS (x10)

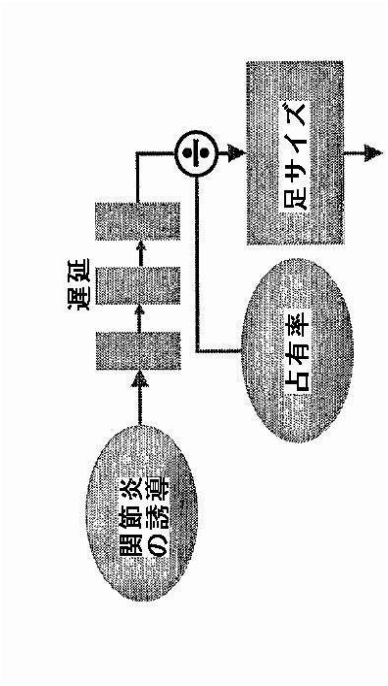
【図４３】


SC/IP 投与
F.ip/F.sc
吸収
ka.sc
ka.ip
中央
V_1
CL
koff
kon
標的
受容体
好中球
ターンオーバー

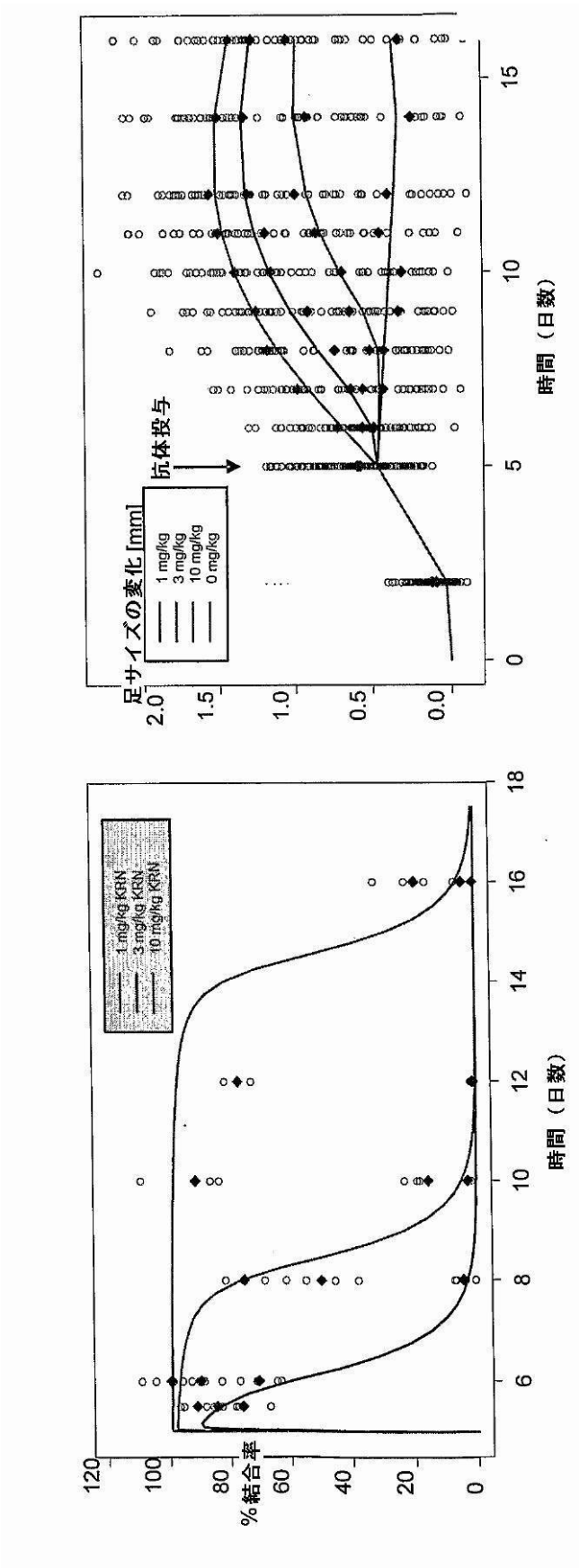
【図４４】


1 mg/kg KRN
3 mg/kg KRN
10 mg/kg KRN
5 mg/kg Tox
50 mg/kg Tox
100 mg/kg Tox
500 mg/kg Tox
抗C5aR濃度 [ng/ml]
10^7
10^5
10^3
10^1
時間 [h]
0
50
100
150
200
250
300
1 mg/kg KRN
3 mg/kg KRN
10 mg/kg KRN
% 結合率
120
100
80
60
40
20
0
時間 [h]

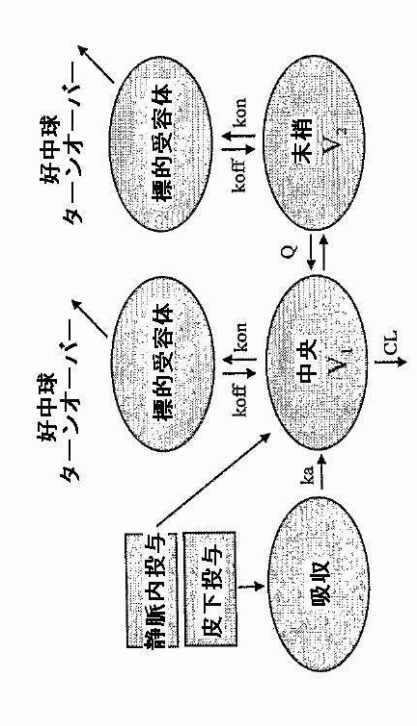
【図４５】



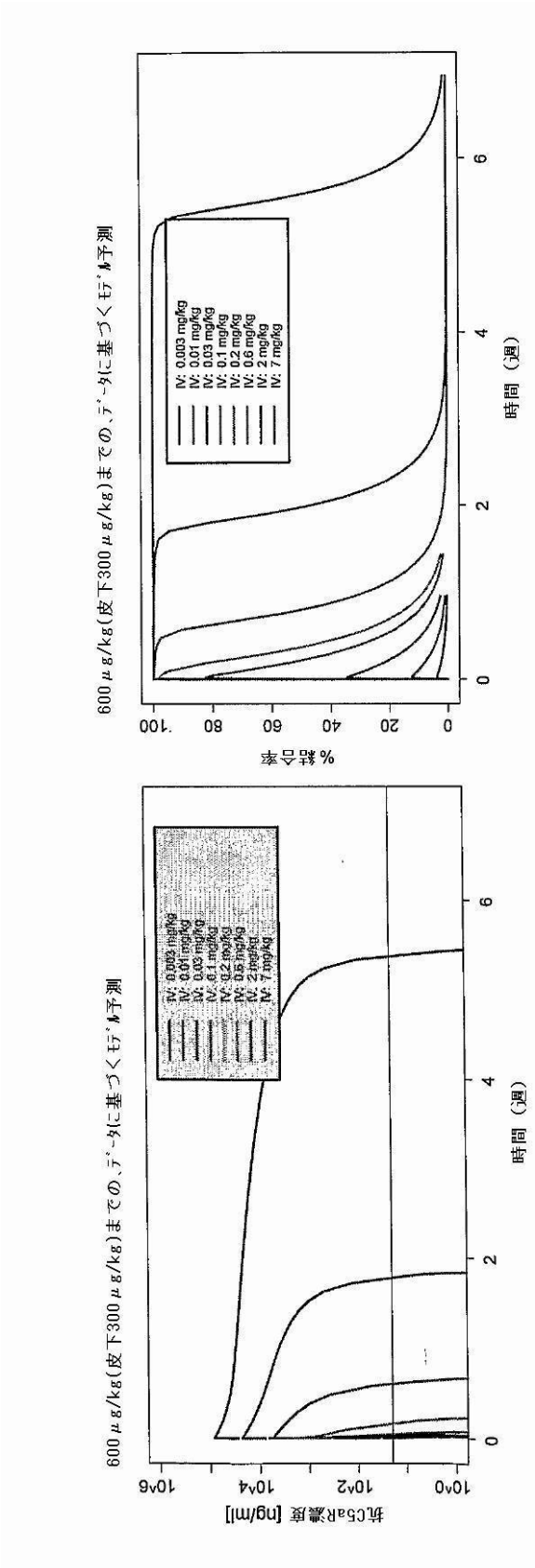
【図４６】


足サイズの変化 [mm]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
0 mg/kg
抗体投与
0
5
10
15
時間（日数）
%結合率
120
100
80
60
40
20
0
1 mg/kg KRN
3 mg/kg KRN
10 mg/kg KRN
6
8
10
12
14
16
18
時間（日数）

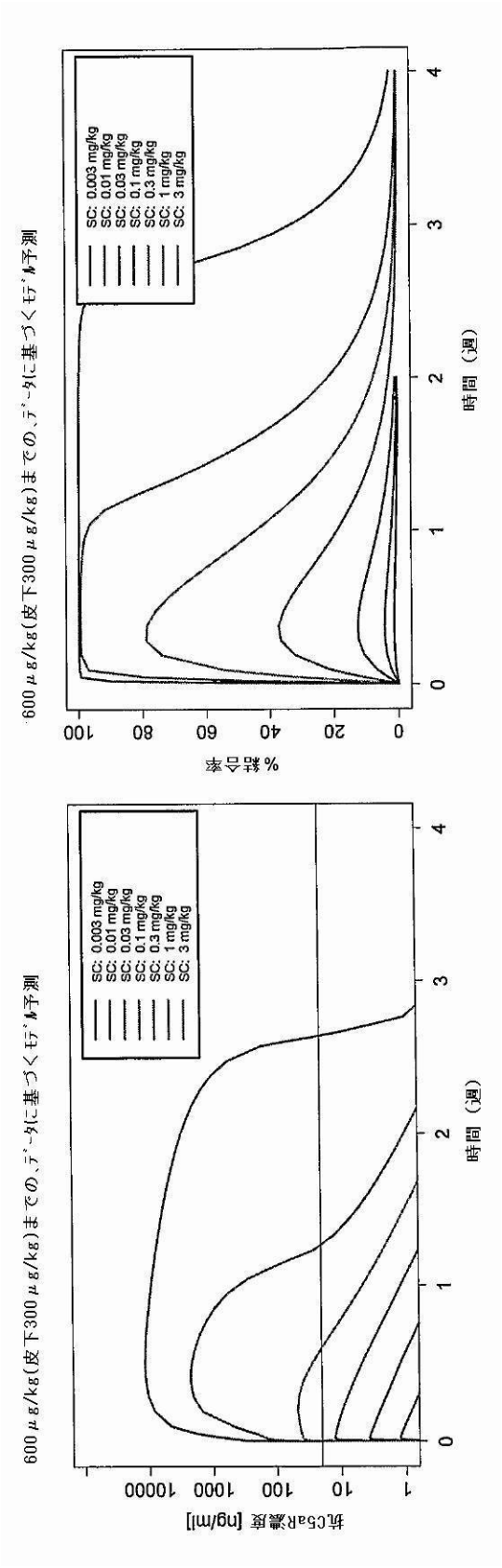
【図４７】


好中球
ターンオーバー
好中球
ターンオーバー
静脈内投与
皮下投与
標的受容体
標的受容体
吸収
koff
kon
koff
kon
ka
中央
V_1
末梢
V_2
Q
CL

【図４８】


600μg/kg(皮下300μg/kg)までの、データに基づくモデル予測
抗C5aR濃度 [ng/ml]
10^6
10^4
10^2
10^0
0
2
4
6
時間（週）
IV: 0.003 mg/kg
IV: 0.01 mg/kg
IV: 0.03 mg/kg
IV: 0.1 mg/kg
IV: 0.2 mg/kg
IV: 0.6 mg/kg
IV: 2 mg/kg
IV: 7 mg/kg
600μg/kg(皮下300μg/kg)までの、データに基づくモデル予測
%結合率
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
時間（週）
IV: 0.003 mg/kg
IV: 0.01 mg/kg
IV: 0.03 mg/kg
IV: 0.1 mg/kg
IV: 0.2 mg/kg
IV: 0.6 mg/kg
IV: 2 mg/kg
IV: 7 mg/kg

【図４９】



【配列表】
2014193164000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成26年5月28日(2014.5.28)
【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
本願明細書に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			ＦＩ				テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21			４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08			
Ａ０１Ｋ	*67/027*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｋ	67/027			
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｕ	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｌ	
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00			
Ａ６１Ｋ	*35/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76			
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12			
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02			
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00			
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00			
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06			
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00			
			Ｇ０１Ｎ	33/53		Ｄ	

(72)発明者　ウィットフェルド，ピーター
オーストラリア国　ニュー　サウス　ウェールズ　２０１０，サリー　ヒルズ，リッジ　ストリート　３２
(72)発明者　ザアラ，デビット
オーストラリア国　ニュー　サウス　ウェールズ　２１２５，ウエスト　ペナント　ヒルズ，クリスティン　プレイス　１０
(72)発明者　マッカイ，チャールズ
オーストラリア国　ニュー　サウス　ウェールズ　２０１０，ボークリューズ，ベラ　ガーデンズ　１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA53 CA02 CA07 DA02 EA04 HA17
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA88X AA90X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA362 ZB072 ZB082 ZB112 ZB212 ZB262 ZC412
4C085 AA13 AA14 AA25 AA26 AA27 AA34 BB41 DD59
4C087 AA01 AA02 BC83 NA13 ZB07 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA22 FA74

【外国語明細書】
2014193164000001.pdf

专利名称(译)	人源化抗-C5aR抗体		
公开(公告)号	JP2014193164A	公开(公告)日	2014-10-09
申请号	JP2014092573	申请日	2014-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	G2炎症		
申请(专利权)人(译)	柔术基础设施梅化专有有限公司		
[标]发明人	ウィットフェルドピーター ザアラデビット マッカイチャールズ		
发明人	ウィットフェルド,ピーター ザアラ,デビット マッカイ,チャールズ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A01K67/027 A61K39/395 A61K48/00 A61K35/76 A61K35/12 A61P37/02 A61P9/00 A61P35/00 A61P43/00 A61P37/06 A61P29/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P11/00 A61P17/06 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K16/2896 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K16/461		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A01K67/027 A61K39/395.U A61K39/395.L A61K48/00 A61K35/76 A61K35/12 A61P37/02 A61P9/00 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P37/06 A61P29/00 G01N33/53.D A61K35/74.G A61K39/395.D C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/31 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/AA34 4C085/BB41 4C085/DD59 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA13 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
优先权	61/066539 2008-02-20 US		
其他公开文献	JP6034826B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供适合于人的诊断方法和/或治疗方法的人源化抗C5aR抗体。 免疫球蛋白轻链，其包含可变区，该可变区包含与一个或多个特定氨基酸序列至少93％相同的氨基酸序列，和/或ii）与一个或多个特定氨基酸序列至少90％相同。 一种基本上纯化和/或重组的人源化抗体，其包含免疫球蛋白重链，所述免疫球蛋白重链包含可变区，所述可变区包含与人C5aR结合的氨基酸序列相同的氨基酸序列，所述C5aR与抗体结合。 包含药物的缀合物，编码该缀合物的多核苷酸，包含核苷酸人的载体和包含该载体的宿主细胞。 [选择图]无

表1:例示的な置換

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