

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4468172号
(P4468172)

(45) 発行日 平成22年5月26日(2010.5.26)

(24) 登録日 平成22年3月5日(2010.3.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 Z N A
C12N 15/00 A
C07K 17/00
G01N 33/53 D
A61K 39/395 T

請求項の数 17 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-529174 (P2004-529174)
(86) (22) 出願日 平成15年8月19日 (2003.8.19)
(65) 公表番号 特表2005-536534 (P2005-536534A)
(43) 公表日 平成17年12月2日 (2005.12.2)
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/026232
(87) 国際公開番号 WO2004/016769
(87) 国際公開日 平成16年2月26日 (2004.2.26)
審査請求日 平成18年7月7日 (2006.7.7)
(31) 優先権主張番号 60/404,802
(32) 優先日 平成14年8月19日 (2002.8.19)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504213799
アブジエニックス・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国・カリフォルニア・945
55・フレモント・カイザー・ドライブ・
6701
(74) 代理人 100064908
弁理士 志賀 正武
(74) 代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人 100110364
弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) に対する抗体、およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単球走化性タンパク質-1(MCP-1)を中和し、10pM以下のK_DでMCP-1と結合する、完全ヒトモノクローナル抗体またはその結合断片であって、

前記抗体が、

- (i) 配列番号4の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号2の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (ii) 配列番号32の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号30の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (iii) 配列番号40の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号38の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (iv) 配列番号44の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号42の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (v) 配列番号8の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号6の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (vi) 配列番号124の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号122の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (vii) 配列番号128の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号126の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；
- (viii) 配列番号20の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号18の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；

10

20

列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；

(ix) 配列番号92の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号90の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；

(x) 配列番号140の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号138の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；

(xi) 配列番号64の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号62の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；

(xii) 配列番号68の配列からなる軽鎖の可変領域のポリペプチドおよび配列番号66の配列からなる重鎖の可変領域のポリペプチドを含む抗体；ならびに

(xiii) そのアミノ酸配列が、前記(i)から(xii)に定義した抗体からなる群から選択される抗体のアミノ酸配列と95%一致するアミノ酸配列である、抗体からなる群から選択される、抗体またはその結合断片。10

【請求項 2】

前記抗体が完全抗体である、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記抗体または断片が、薬剤として許容可能な担体と混合している、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体またはその結合断片。

【請求項 4】

前記抗体またはその断片が、5pM以下のK_DでMCP-1と結合して中和する、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体またはその結合断片。20

【請求項 5】

前記抗体が、IgG4アイソタイプを有する、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、IgG2アイソタイプを有する、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体。

【請求項 7】

前記断片がFab'断片を含む、請求項 1 に記載の結合断片。

【請求項 8】

前記抗体が、MCP-1のN末端ドメインのアミノ酸3から53の間のエピトープに結合する、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体。30

【請求項 9】

前記抗体が、MCP-1のN末端ドメインのアミノ酸20から35の間のエピトープに結合する、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体。

【請求項 10】

前記抗体が、MCP-1活性を少なくとも50%減少させる、請求項9に記載の完全ヒトモノクローナル抗体。

【請求項 11】

不溶性マトリクス上に固定された、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

患者サンプル中の単球走化性タンパク質-1(MCP-1)のレベルをアッセイするための改善された方法であって、患者サンプルのアッセイにおいてMCP-1のレベルを検出するために、請求項1に記載の完全ヒト抗体を使用することを含む方法。40

【請求項 13】

前記患者サンプルが血液である、請求項 1_2 に記載の方法。

【請求項 14】

動物における腫瘍性疾患の有効な治療のための医薬の製造における、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体またはその結合断片の使用。

【請求項 15】

前記腫瘍性疾患が、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、膠芽細胞腫、胃癌、子宮内膜癌、腎50

臓癌、結腸癌、肺臓癌、および前立腺癌からなる群から選択される、請求項1_4に記載の使用。

【請求項 1_6】

動物における炎症性症状の有効な治療のための医薬の製造における、請求項 1 に記載の完全ヒトモノクローナル抗体またはその結合断片の使用。

【請求項 1_7】

前記炎症性症状が、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、再狭窄、自己免疫疾患、および多発性硬化症からなる群から選択される、請求項1_6に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本明細書に記載する本発明の実施形態は、抗原単球走化性タンパク質-1(MCP-1)に対する抗体、およびこのような抗体の使用に関する。特に、本発明の実施形態に従えば、抗原 MCP-1に対する完全ヒトモノクローナル抗体が提供される。重鎖および軽鎖免疫グロブリン分子をコードするヌクレオチド配列、およびそれらの分子を含むアミノ酸配列、特にフレームワーク領域および/または相補性決定領域(CDR)、具体的にはFR1からFR4、あるいは CDR1からCDR3に広がる、隣接の重鎖および軽鎖配列に対応する配列が提供される。本発明の抗体は、MCP-1の過剰生成と関係がある疾患の診断物質および治療物質として用途が見出される。また、このような免疫グロブリン分子およびモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマまたは他の細胞系も提供される。

20

【背景技術】

【0002】

癌細胞、血管内皮細胞、および他のストロマ細胞型による、血管形成因子の生成の増大および血管形成阻害剤の生成の低下は、腫瘍血管形成を誘導すると考えられる。間質結合組織、基底板、血液細胞、血管および纖維芽細胞から構成されるストロマは、ほぼすべての固体腫瘍細胞を囲んでいる。ストロマと癌細胞の間の相互作用は、腫瘍の血管新生において重要な役割を果たしている。さらに、ストロマの構成成分であるマクロファージもまた、腫瘍血管形成において重要である(M.Ono他、Cancer Chemother.Pharmacol.(1999)43(Suppl.):S69～S71.)。

30

【0003】

マクロファージは、単核食細胞系の主要な末期分化細胞型であり、主要な血管形成エフェクター細胞の1つでもあり、幾つかの増殖刺激物質および阻害物質を生成する。幾つかの血管形成サイトカインは、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)を含めたマクロファージによって生成されることが知られている。

【0004】

MCP-1は、Tリンパ球、好塩基球およびNK細胞に化学走性があることが知られている。MCP-1は、最も強力なマクロファージ補充分子の1つである。ひとたび炎症または腫瘍の部位に補充されると、マクロファージは幾つかの血管形成サイトカインを生成し、これによって病的血管形成を刺激することができる。幾つかの研究によって、血管形成と、マクロファージ補充と、さまざまな種類の腫瘍を有する患者の予後との間の関係が示されている(G.Fantanini他、Int.J.Cancer(1996)67:615;N.Weidner他、J.Natl.Cancer Inst.(1992)84:1875)。Leek他は、集中的に増大するマクロファージの数が、乳癌患者の血管新生および予後と密接な関係があることをさらに実証している(Cancer Res.(1996)56:4625)。R.Huang他(Cancer Res.(2002)62:2806～2812)は、コネクシン43が、タンパク質アレイ技術を使用することにより発見されたように、MCP-1をダウンレギュレーションすることによって、ヒト膠芽細胞腫細胞の増殖を抑制することを示している。

40

【0005】

Goede他(Int.J.Cancer(1999)82:765～770)は、MCP-1が、ウサギ角膜モデルにおいて試験した場合に、VEGFと同等の血管形成能を有することを最初に実証した。彼らのモデルで

50

は、MCP-1によって誘導される血管形成活性は、ウサギ角膜中へのマクロファージの充分な補充と関係があった。Salcedo他は、MCP-1がヒト内皮細胞の化学走性をナノモル濃度で誘導したことを報告している。この化学走性応答は、ヒトMCP-1に対するポリクローナル抗体によって阻害された(R.Salcedo他、Blood(2000)96(1):34~40)。

【0006】

MCP-1は、卵巣癌で発現される主要なケモカインである(Negus、R.P.M.他、J.Clin.Investig.(1995)95: 2391~96; Sica、A.他、J.Immunology(2000) 164(2):733~8)。MCP-1は、膀胱、乳、肺および膠芽細胞腫を含めた幾つかの他のヒト癌中でも増大する。

【0007】

さらに、炎症におけるMCP-1の重要性が、幾つかの研究で示されている。例えば、H.J.Anders他は、免疫複合糸球体腎炎の開始および消散中の、ケモカインおよびケモカイン受容体発現を実証している(J:Am.Soc.Nephrol.(2001)12:919~2001)。Segerer他(J.Am.Soc.Nephrol.(2000)11:2231~2242)も、ヒト半月形糸球体腎炎における、MCP-1およびその受容体であるケモカイン受容体2の発現を研究している。J.A.Belperio他は、閉塞性細気管支炎症候群の病因における、ケモカインMCP-1/CCR2の重要な役割を示してきている(J:Clin.Investig.(2001)108:547~556)。N.G.Frangogiannis他は、心筋梗塞の炎症応答におけるMCP-1の役割を述べている(Cardiovascular Res.(2002)53:31~47)。GerardおよびRollins(Nature Immunol.(2001)2:108~115)、ならびにReapeおよびGroot(Atherosclerosis(1999)147:213~225)は、アテローム性動脈硬化症および他の疾患における、MCP-1の役割を論じている。さらに、SchmidtおよびStern(Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.(2001)21:297~299)は、再狭窄におけるMCP-1の相互作用を記載している。

【0008】

ヒトMCP-1、N末端ピログルタミン酸を有する76-アミノ酸CCケモカインは、フィトヘマグルチニン刺激ヒトリンパ球(Yoshimura、T他、J.Immunol(1989)142:1956~62)、ヒトグリオーム細胞系(Yoshimura、T他、J.Exp.Med.(1989)169:1449~59)、およびヒト骨髄単球細胞系THP-1(Matsushima、K他、(1989)J.Exp.Med.(1989)169:1485~90)を含めた、幾つかの源から本来精製された。MCP-1は、リンパ球由来の化学走性因子(LDCF)として最初に記載された。タンパク質に関する他の名称は、腫瘍細胞由来の化学走性因子(TDCF)、グリオーム由来の単球化学走性因子(TDCF)、グリオーム由来の単球化学走性因子(GDCF)、平滑筋細胞由来の化学走性因子(SMC-CF)、単球化学走性活性化因子(MCAF)およびCCL2である。MCP-1をコードするcDNAの分子クローニング(Furutani、Y他、(1989)Biochem.Biophys.Res.Comm(1989)169:249~55; B.J.Rollins他、Mol.Cell.Biol.(1989)9:4687~95; Chang、H.C他、Int.Immunol.(1989)1:388~97)によって、23アミノ酸のシグナルペプチドを含む99アミノ酸のオープンリーディングフレームが明らかになった。MCP-1のマウス相同遺伝子はJEと名付けられた(B.J.Rollins他、1989)。

【0009】

2001年11月29日に公開されたW0200189565は、ヒトMCP-1に対するポリクローナル抗体を開示し、このようなポリクローナル抗体を使用することによる、ヌードマウスモデルにおける腫瘍増殖の阻害を記載している。

【非特許文献1】M.Ono他、Cancer Chemother.Pharmacol.(1999)43(Suppl.):S69~S71.

40

【非特許文献2】G.Fantanini他、Int.J.Cancer(1996)67:615

【非特許文献3】N.Weidner他、J.Natl.Cancer Inst.(1992)84:1875

【非特許文献4】Cancer Res.(1996)56:4625

【非特許文献5】R.Huang他(Cancer Res.(2002)62:2806~2812

【非特許文献6】Goede他(Int.J.Cancer(1999)82:765~770)

【非特許文献7】R.Salcedo他、Blood(2000)96(1):34~40

【非特許文献8】Negus、R.P.M.他、J.Clin.Investig.(1995)95:2391~96

【非特許文献9】Sica、A.他、J.Immunology(2000) 164(2):733~8

【非特許文献10】J:Am.Soc.Nephrol.(2001)12:919~2001)

【非特許文献11】Segerer他(J.Am.Soc.Nephrol.(2000)11:2231~2242

50

- 【非特許文献 1 2】 J:Clin. Investig.(2001)108:547 ~ 556)
- 【非特許文献 1 3】 Cardiovascular Res.(2002)53:31 ~ 47
- 【非特許文献 1 4】 Gerard および Rollins (Nature Immunol.(2001)2:108 ~ 115)
- 【非特許文献 1 5】 Reape および Groot (Atherosclerosis(1999)147:213 ~ 225)
- 【非特許文献 1 6】 Schmidt および Stern (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2001)21:297 ~ 299)
- 【非特許文献 1 7】 Yoshimura、T他、J. Immunol.(1989)142:1956 ~ 62
- 【非特許文献 1 8】 Yoshimura、T他、J. Exp. Med.(1989)169:1449 ~ 59
- 【非特許文献 1 9】 Matsushima、K他、(1989)J. Exp. Med.(1989)169:1485 ~ 90
- 【非特許文献 2 0】 Furutani、Y他、(1989)Biochem. Biophys. Res. Comm(1989)169:249 ~ 55 10
- 【非特許文献 2 1】 B.J. Rollins 他、Mol. Cell. Biol.(1989)9:4687 ~ 95
- 【非特許文献 2 2】 Chang、H.C他、Int. Immunol.(1989)1:388 ~ 97
- 【非特許文献 2 3】 B.J. Rollins 他、1989
- 【特許文献 1】 WO200189565
- 【非特許文献 2 4】 Kabat 他、Sequences of Proteins of Immunological Interest vols. 1 ~ 3(Fifth Edition、NIH Publication 91 ~ 3242、Bethesda MD 1991)
- 【非特許文献 2 5】 Sambrook 他、Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.1989)
- 【非特許文献 2 6】 LaPlanche 他、Nucl. Acids Res.14:9081(1986)
- 【非特許文献 2 7】 Stec 他、J. Am. Chem. Soc.106:6077(1984) 20
- 【非特許文献 2 8】 Stein 他、Nucl. Acids Res.16:3209(1988)
- 【非特許文献 2 9】 Zon 他、Anti-Cancer Drug Design.6:539 (1991)
- 【非特許文献 3 0】 Zon 他、Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach、pp .87 ~ 108(F. Eckstein、Ed.、Oxford University Press、Oxford England(1991))
- 【特許文献 2】 Stec 他、米国特許第5,151,510号
- 【非特許文献 3 1】 Uhlmann および Peyman Chemical Reviews 90:543(1990)
- 【非特許文献 3 2】 M.O. Dayhoff、Atlas of Protein Sequence and Structure、Vol.5、1 01 ~ 110 および Supplement 2 ~ Vol.5、1 ~ 10(National Biomedical Research Foundation 1972
- 【非特許文献 3 3】 Smith および Waterman、Adv. Appl. Math.2:482(1981) 30
- 【非特許文献 3 4】 Needleman および Wunsch、J. Mol. Biol.48:443(1970)
- 【非特許文献 3 5】 Pearson および Lipman、Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)85:2444(1988)
- 【非特許文献 3 6】 Immunology-A Synthesis(2d ed.、Golub、E.S. および Gren、D.R. eds.、Sinauer Associates、Sunderland、Mass.1991)
- 【非特許文献 3 7】 Bowie 他、Science 253:164(1991)
- 【非特許文献 3 8】 Proteins、Structures and Molecular Principles(Creighton, ed.、W. H. Freeman and Company、New York 1984)
- 【非特許文献 3 9】 Introduction to Protein Structure(Branden、C. and Tooze、J. eds.、Garland Publishing、New York、N.Y.1991)
- 【非特許文献 4 0】 Thornton 他、Nature 354:105(1991) 40
- 【非特許文献 4 1】 Fauchere、J. Adv. Drug Res.15:29(1986)
- 【非特許文献 4 2】 Veber および Freidinger、TINS p.392(1985)
- 【非特許文献 4 3】 Evans 他、J. Med. Clem.30:1229(1987)
- 【非特許文献 4 4】 Rizo および Giersch Ann. Rev. Biochem.61:387(1992)
- 【特許文献 3】 米国特許第4,275,149号
- 【非特許文献 4 5】 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker、S.、Ed.、McGraw-Hill、San Francisco(1985))
- 【非特許文献 4 6】 Fundamental Immunology Ch.7(Paul、W.、ed.、2nd ed. Raven Press、N.Y. (1989))
- 【非特許文献 4 7】 Kabat、Sequences of Proteins of Immunological Interest(Nationa 50

I Institutes of Health、Bethesda、Md.1991)(1987) 【非特許文献 4 8】ChothiaおよびLesk、J.Mol.Biol.196:901～17(1987) 【非特許文献 4 9】Chothia他、Nature 342:878～83(1989) 【非特許文献 5 0】SongsivilaiおよびLachmann、Clin.Exp.Immunol.79:315～21(1990) 【非特許文献 5 1】Kostelniky他、J.Immunol.148:1547～53(1992) 【非特許文献 5 2】Green他、Nature Genetics 7:13～21(1994) 【非特許文献 5 3】Mendez他、Nature Genetics 15:146～56(1997) 【特許文献 4】米国特許出願第08/759,620号 【特許文献 5】米国特許出願第60/334,508号 【特許文献 6】WO00/76310	10
【特許文献 7】米国特許出願第07/466,008号 【特許文献 8】米国特許出願第07/610,515号 【特許文献 9】米国特許出願第07/919,297号 【特許文献 1 0】米国特許出願第07/922,649号 【特許文献 1 1】米国特許出願第08/031,801号 【特許文献 1 2】米国特許出願第08/112,848号 【特許文献 1 3】米国特許出願第08/234,145号 【特許文献 1 4】米国特許出願第08/376,279号 【特許文献 1 5】米国特許出願第08/430,938号 【特許文献 1 6】米国特許出願第08/464,584号 【特許文献 1 7】米国特許出願第08/464,582号 【特許文献 1 8】米国特許出願第08/463,191号 【特許文献 1 9】米国特許出願第08/462,837号 【特許文献 2 0】米国特許出願第08/486,853号 【特許文献 2 1】米国特許出願第08/486,857号 【特許文献 2 2】米国特許出願第08/486,859号 【特許文献 2 3】米国特許出願第08/462,513号 【特許文献 2 4】米国特許出願第08/724,752号 【特許文献 2 5】米国特許出願第08/759,620号	20
【特許文献 2 6】米国特許第6,162,963号 【特許文献 2 7】米国特許第6,150,584号 【特許文献 2 8】米国特許第6,114,598号 【特許文献 2 9】米国特許第6,075,181号 【特許文献 3 0】米国特許第5,939,598号 【特許文献 3 1】日本国特許3068180B2号 【特許文献 3 2】日本国特許3068506B2号 【特許文献 3 3】日本国特許3068507B2号 【非特許文献 5 4】Green and Jakobovits J Exp.Med.、188:483～495(1998) 【特許文献 3 4】欧州特許EP463,151B1号	30
【特許文献 3 5】国際特許出願No.WO94/02602 【特許文献 3 6】国際特許出願No.WO96/34096 【特許文献 3 7】WO98/24893 【特許文献 3 8】米国特許第5,545,807号 【特許文献 3 9】米国特許第5,545,806号 【特許文献 4 0】米国特許第5,625,825号 【特許文献 4 1】米国特許第5,625,126号 【特許文献 4 2】米国特許第5,633,425号 【特許文献 4 3】米国特許第5,661,016号 【特許文献 4 4】米国特許第5,770,429号 【特許文献 4 5】米国特許第5,789,650号	40
	50

【特許文献 4 6】米国特許第5,814,318号	
【特許文献 4 7】米国特許第5,877,397号	
【特許文献 4 8】米国特許第5,874,299号	
【特許文献 4 9】米国特許第6,255,458号	
【特許文献 5 0】米国特許第5,591,669号	
【特許文献 5 1】米国特許第6,023.010号	
【特許文献 5 2】米国特許第5,612,205号	
【特許文献 5 3】米国特許第5,721,367号	
【特許文献 5 4】米国特許第5,789,215号	
【特許文献 5 5】米国特許第5,643,763号	10
【特許文献 5 6】米国特許出願第07/574,748号	
【特許文献 5 7】米国特許出願第07/575,962号	
【特許文献 5 8】米国特許出願第07/810,279号	
【特許文献 5 9】米国特許第07/853,408号	
【特許文献 6 0】米国特許出願第07/904,068号	
【特許文献 6 1】米国特許出願第07/990,860号	
【特許文献 6 2】米国特許出願第08/053,131号	
【特許文献 6 3】米国特許出願第08/096,762号	
【特許文献 6 4】米国特許出願第08/155,301号	
【特許文献 6 5】米国特許出願第08/161,739号	
【特許文献 6 6】米国特許出願第08/165,699号	
【特許文献 6 7】米国特許出願第08/209,741号	20
【特許文献 6 8】欧州特許546,073B1号	
【特許文献 6 9】国際特許出願Nos.WO92/03918	
【特許文献 7 0】WO92/22645	
【特許文献 7 1】WO92/22647	
【特許文献 7 2】WO92/22670	
【特許文献 7 3】WO93/12227	
【特許文献 7 4】WO94/00569	
【特許文献 7 5】WO94/25585	30
【特許文献 7 6】WO96/14436	
【特許文献 7 7】WO97/13852	
【特許文献 7 8】WO98/24884	
【特許文献 7 9】米国特許第5,981,175号	
【特許文献 8 0】欧州特許出願第773,288号	
【特許文献 8 1】欧州特許出願第843,961号	
【特許文献 8 2】米国特許第5,476,996号	
【特許文献 8 3】米国特許第5,698,767号	
【非特許文献 5 5】WinterおよびHarris、Immunol Today 14:43 ~ 46(1993)	
【非特許文献 5 6】Wright他、Crit、Reviews in Immunol. 12:125 ~ 168(1992)	40
【特許文献 8 4】WO92/02190	
【特許文献 8 5】米国特許第5,530,101号	
【特許文献 8 6】米国特許第5,585,089号	
【特許文献 8 7】米国特許第5,693,761号	
【特許文献 8 8】米国特許第5,693,792号	
【特許文献 8 9】米国特許第5,714,350号	
【特許文献 9 0】米国特許第5,777,085号	
【非特許文献 5 7】Liu他、P.N.A.S84:3439(1987)	
【非特許文献 5 8】J. Immunol. 139:3521(1987)	
【特許文献 9 1】米国特許第4,683,195号	50

- 【特許文献 9 2】米国特許第4,683,202号
- 【非特許文献 5 9】Kabat他、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、
N.I.H.publication no.91 ~ 3242(1991)
- 【非特許文献 6 0】Okayama他、Mol.Cell.Bio.3:280(1983)
- 【非特許文献 6 1】Gorman他、P.N.A.S.79:6777(1982)
- 【非特許文献 6 2】Grosschedl他、Cell 41:885(1985)
- 【非特許文献 6 3】HanesおよびPlucthau、PNAS USA 94:4937 ~ 4942(1997)
- 【非特許文献 6 4】ParmleyおよびSmith、Gene 73:305 ~ 318(1988)
- 【非特許文献 6 5】Scott、TIBS 17:241 ~ 245(1992)
- 【非特許文献 6 6】Cwirla他、PNAS USA 87:6378 ~ 6382(1990) 10
- 【非特許文献 6 7】Russel他、Nucl.Acids Res.21:1081 ~ 1085(1993)
- 【非特許文献 6 8】Hoganboom他、Immunol Reviews 130:43 ~ 68(1992)
- 【非特許文献 6 9】ChiswellおよびMcCafferty、TIBTECH 10:80 ~ 84(1992)
- 【特許文献 9 3】米国特許第5,733,743号
- 【特許文献 9 4】米国特許第5,703,057号
- 【特許文献 9 5】米国特許出願第08/759,620号
- 【特許文献 9 6】国際特許出願Nos.WO98/24893
- 【非特許文献 7 0】Vieira他、Braz.J.Med.Biol.Res.21:1005 ~ 1011(1988)
- 【非特許文献 7 1】Visser他、Acta Endocrinol.90:90 ~ 102(1979)
- 【非特許文献 7 2】Logue他、J.Immunol.Methods 137:159 ~ 66(1991) 20
- 【非特許文献 7 3】Magerlein他、Drug Res.48:783 ~ 87(1998)
- 【非特許文献 7 4】Babcock他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 93:7843 ~ 7848(1996)
- 【特許文献 9 7】米国特許第4,399,216号
- 【特許文献 9 8】米国特許第4,912,040号
- 【特許文献 9 9】米国特許第4,740,461号
- 【特許文献 1 0 0】米国特許第4,959,455号
- 【特許文献 1 0 1】米国特許第4,816,397号
- 【特許文献 1 0 2】米国特許第6,331,415号
- 【特許文献 1 0 3】米国特許第5,916,771号
- 【特許文献 1 0 4】米国特許第6,207,418号 30
- 【非特許文献 7 5】Jarnagin他、(1999)Biochemistry 38:16167 ~ 16177
- 【非特許文献 7 6】Hemmerich他、(1999)Biochemistry 38:13013 ~ 13025
- 【非特許文献 7 7】Thomas、Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 77:5201 ~ 5205(1980)
- 【非特許文献 7 8】Ausubel他、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sons(1997)
- 【非特許文献 7 9】Rupp and Locker、Lab Invest.、56:A67(1987)
- 【非特許文献 8 0】De Andres他、BioTechniques、18:42044(1995)
- 【非特許文献 8 1】Schena他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 93(20)L106-49
- 【非特許文献 8 2】Narang、Tetrahedron 39:3(1983)
- 【非特許文献 8 3】Itakura他、Annu.Rev.Biochem.53:323(1984) 40
- 【非特許文献 8 4】Itakura他、Science 198:1056(1984)
- 【非特許文献 8 5】Ike他、Nucl.Acid.Res.11:477(1983)
- 【非特許文献 8 6】Fanger他、Immunol Methods 4:72 ~ 81(1994)
- 【非特許文献 8 7】Traunecker他、Int.J.Cancer(Suppl)7:51 ~ 52(1992)
- 【非特許文献 8 8】Deo他、18:127(1997)
- 【非特許文献 8 9】Valerius他、Blood 90:4485 ~ 4492(1997)
- 【非特許文献 9 0】Vitetta Immunol Today 14:252(1993)
- 【特許文献 1 0 5】米国特許第5,194,594号
- 【非特許文献 9 1】Junghans他、Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655 ~ 686(2d edition、Chafner and Longo、eds.、Lippincott Raven(1996)) 50

- 【特許文献 106】米国特許第4,681,581号
 【特許文献 107】米国特許第4,735,210号
 【特許文献 108】米国特許第5,101,827号
 【特許文献 109】米国特許第5,102,990(RE35,500)号
 【特許文献 110】米国特許第5,648,471号
 【特許文献 111】米国特許第5,697,902号
 【非特許文献 92】Remington's Pharmaceutical Sciences(18th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA(1990))
 【非特許文献 93】Langer他、J.Biomed Mater.Res., 15:167 ~ 277(1981)
 【非特許文献 94】Langer、Chem.Tech., 12:98 ~ 105(1982) 10
 【特許文献 112】米国特許第3,773,919号
 【特許文献 113】EP58,481
 【非特許文献 95】Sidman他、Biopolymers, 22:547 ~ 556(1983)
 【特許文献 114】EP133,988
 【特許文献 115】米国特許第DE3,218,121号
 【非特許文献 96】Epstein他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82:3688 ~ 3692(1985)
 【非特許文献 97】Hwang他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:4030 ~ 4034(1980)
 【特許文献 116】EP52,322
 【特許文献 117】EP36,676
 【特許文献 118】EP88,046 20
 【特許文献 119】EP143,949
 【特許文献 120】EP142,641
 【特許文献 121】日本国特許出願83 ~ 118008
 【特許文献 122】米国特許第4,485,045号
 【特許文献 123】米国特許第4,544,545号
 【特許文献 124】EP102,324
 【非特許文献 98】Wild他(2000)
 【発明の開示】
 【課題を解決するための手段】
 【0010】 30

本明細書に記載する本発明の実施形態は、THP-1細胞、急性単球白血病を有する患者由來の細胞系のMCP-1誘導型化学走性を阻害する、ヒトMCP-1に対する完全ヒトモノクローナル抗体に関する。これらの細胞は、循環中の正常なヒト単核細胞の移動を評価するための代用物として使用される。MCP-1によって刺激される単核細胞の浸潤は、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、移植拒絶反応、乾鱗、再狭窄、および多発性硬化症などの自己免疫疾患を含めた、いくつかの腫瘍性疾患において病理学的役割を果たす。MCP-1活性を阻害し単球の浸潤を防ぐ抗体は、これらおよび他の炎症性疾患用の治療剤としての用途が見出される。

【0011】
 本明細書に記載する本発明の実施形態は、MCP-1と結合しMCP-1機能に影響を与えることが見出された、モノクローナル抗体に関する。他の実施形態は、MCP-1に対する強い結合親和性、MCP-1を *in vitro*で中和する能力、および固形腫瘍の血管新生を阻害する能力を含めた治療的観点から望ましい性質を有する、ヒト抗MCP-1抗体および抗MCP-1抗体調製物に関する。 40

【0012】
 本発明の一実施形態は、MCP-1と結合し、配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142および146からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列を有する、完全ヒトモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗体は、配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、50

80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144および148からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含む。

【0013】

したがって、本明細書に記載する本発明の一実施形態は、MCP-1と結合する単離抗体、またはこれらの抗体の断片を提供する。当分野で知られているように、抗体は例えばモノクローナル、キメラおよび/またはヒト抗体であることが有利である可能性がある。本明細書に記載する本発明の実施形態は、これらの抗体を生成するための細胞も提供する。

【0014】

本発明の他の実施形態は、MCP-1と結合し、図7および10に示す配列を含むCDRを有する重鎖アミノ酸配列を含む、完全ヒト抗体である。CDRの決定は当業者によって容易に行うことができるに留意されたい。一般にCDRは、Kabat他、Sequences of Proteins of Immunological Interest vols.1~3(Fifth Edition, NIH Publication 91~3242, Bethesda MD 1991)中により定義されるものとして、本明細書に記載する発明中に示す。

10

【0015】

本発明のさらに他の実施形態は、MCP-1と結合し、図8および9に示す配列を含むCDRを有する軽鎖アミノ酸配列を含む、完全ヒト抗体である。

【0016】

本発明の他の実施形態は、MCP-1と結合し、図7および10に示す配列を含むCDRを有する重鎖アミノ酸配列を含み、図8および9に示す配列を含むCDRを有する軽鎖アミノ酸配列を含む、完全ヒト抗体である。

20

【0017】

本発明の他の実施形態は、MCP-2、MCP-3およびMCP-4だけには限られないがこれらを含めた他のMCP-1ファミリーのメンバーと結合する、完全ヒト抗体である。本発明の他の実施形態は、MCP-1との結合に関して本発明の完全ヒト抗体と交差競合する抗体である。

【0018】

本発明の実施形態は、任意の特定の形の抗体、あるいは生成方法または作製方法に限られないことは理解されよう。例えば、抗MCP-1抗体は完全長抗体(例えば、完全なヒトFc領域を有する)、または抗体断片(例えばFab、Fab'またはF(ab')₂)であってよい。さらに、この抗体は、抗体を分泌するハイブリドーマから、あるいは抗体をコードする1つまたは複数の遺伝子を用いて、形質転換またはトランスフェクトされている組換えによって作製した細胞から製造することができる。

30

【0019】

本発明の他の実施形態は、本明細書に記載する任意の抗体をコードする単離核酸分子、任意のこのような抗MCP-1抗体をコードする単離核酸分子を有するベクター、任意のこのような核酸分子を用いて形質転換した宿主細胞を含む。さらに、本発明の一実施形態は、核酸分子が発現されて抗体が生成する条件下で宿主細胞を培養し、次に抗体を回収することによる、抗MCP-1抗体の作製方法である。

【0020】

本発明の他の実施形態は、ヒトMCP-1またはその断片、および1つまたは複数のオルソロガス配列またはその断片を用いて、哺乳動物を免疫することによる、MCP-1に対する高親和性抗体の作製方法を含む。

40

【0021】

本明細書に記載する本発明の実施形態は、MCP-1と特異的に結合する単離抗体の作製および同定に基づく。MCP-1は、腫瘍などの腫瘍性疾患、および他の炎症性疾患において、高レベルで発現される。MCP-1の生物学的活性の阻害によって、単核細胞の組織へのさらなる浸潤を防ぐことができる。

【0022】

本発明の他の実施形態は、本明細書に記載する本発明に従い調製した抗体を使用して、患者サンプル中のMCP-1のレベルを検出する、疾患または症状を診断する方法を含む。一実施形態では、患者サンプルは血液または血清である。他の実施形態では、危険因子を同

50

定し、疾患、および疾患の段階を診断する方法を示し、この方法は、抗MCP-1抗体を使用して、MCP-1の過剰発現を同定することを含む。

【0023】

他の実施形態では、本発明は、細胞中のMCP-1の発現と関係がある症状を診断するための方法であって、細胞と抗MCP-1抗体を接触させること、およびMCP-1の存在を検出することを含む方法を含む。好ましい症状には、腫瘍、癌、例えば乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌などを非限定的に含む腫瘍性疾患、ならびに慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、臓器移植、再狭窄および自己免疫疾患だけには限られないが、これらを含めた他の炎症性症状があるが、これらだけには限られない。

10

【0024】

他の実施形態では、本発明は、哺乳動物組織または細胞中のMCP-1およびMCP-1ファミリーのメンバーを検出して、腫瘍性疾患または炎症性症状をスクリーニングするためのアッセイキットであって、MCP-1と結合する抗体、および存在する場合は抗原と抗体の反応を示すための手段を含むアッセイキットを含む。抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。一実施形態では、MCP-1と結合する抗体を標識する。他の実施形態では、抗体は非標識の第1の抗体であり、反応を示すための手段は、抗免疫グロブリンである標識された第2の抗体を含む。蛍光色素、酵素、放射性核種および放射線不透物質からなる群から選択されるマーカーで抗体を標識することが好ましい。

【0025】

20

本発明の他の実施形態は、薬剤として許容可能な担体または希釈剤と混合された、有効量の本発明の抗体を含む薬剤組成物を含む。さらに他の実施形態では、抗MCP-1抗体またはその断片を治療物質と結合させる。治療物質は、毒素または放射性同位体であってよい。好ましくは、このような抗体を、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌などの癌を非限定的に含めた、例えば腫瘍などの疾患、ならびに慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、臓器移植、再狭窄および自己免疫疾患だけには限られないが、これらを含めた他の炎症性症状を治療するために使用することができる。

【0026】

30

本発明のさらに他の実施形態は、患者中のMCP-1の発現と関係がある疾患または症状を診断するための方法であって、患者に有効量の抗MCP-1抗体を投与することを含む方法を提供する。この方法はin vivoで行うことができる。患者は哺乳動物患者、好ましくはヒト患者である。好ましい実施形態では、この方法は、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌などの癌を非限定的に含めた、腫瘍の治療に関する。他の実施形態では、この方法は、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、臓器移植、再狭窄および自己免疫疾患だけには限られないが、これらを含めた炎症性症状の治療に関する。他の実施形態は、MCP-1の発現と関係がある疾患および症状を治療するための方法を含み、この方法は、MCP-1の過剰発現に関する治療の必要性がある哺乳動物を同定すること、および抗MCP-1抗体の治療上有効量を哺乳動物に投与することを含むことができる。

40

【0027】

他の実施形態では、本発明は、抗MCP-1抗体を含む組成物、および組成物を使用してMCP-1の過剰発現によって特徴付けられる腫瘍性疾患および炎症性疾患を治療することができることを示す、パッケージ挿入体または標識を含む容器を含む製造品を提供する。好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに抗MCP-1抗体を与える。好ましい実施形態では、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、膠芽細胞腫、腎臓癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌などの癌を非限定的に含めた腫瘍、ならびに慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、臓器移植、再狭窄および多発性硬化症などの自己免疫疾患だけには限られないが、これらを含めた他の炎症性症状を治療する。

50

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施形態では、抗MCP-1抗体、次に洗浄物質を投与して、循環抗体を血液から除去する。

【 0 0 2 9 】

幾つかの実施形態では、抗MCP-1抗体を修飾して、補体を固定し補体依存性細胞毒性(CD C)に関するそれらの能力を高めることができる。一実施形態では、アミノ酸置換などにより、抗MCP-1抗体を修飾して、抗体のクリアランスを変えることができる。例えば、幾つかのアミノ酸置換によって、身体からの抗体のクリアランスを促進することができる。あるいは、アミノ酸置換によって、身体からの抗体のクリアランスを遅らせることができる。他の実施形態では、抗体が身体からよりゆっくりと除去されるように、抗MCP-1抗体を改変することができる。10

【 0 0 3 0 】

さらに他の実施形態は、腫瘍性疾患および炎症性症状などの疾患を治療するための医薬品の調製における、抗MCP-1抗体の使用である。一実施形態では、腫瘍性疾患は、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌などの、腫瘍および癌を含む。他の実施形態では、炎症性症状は慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、臓器移植、再狭窄および自己免疫疾患だけには限られないが、これらを含む。

【発明を実施するための最良の形態】**【 0 0 3 1 】**

本明細書に記載する本発明の実施形態は、MCP-1と結合するモノクローナル抗体に関する。幾つかの実施形態では、抗体はMCP-1と結合し、MCP-1機能に影響を与える。他の実施形態は、MCP-1に対する強い結合親和性、MCP-1を *in vitro*で中和する能力、および固形腫瘍の増殖および血管新生を *in vivo*で阻害する能力を含めた治療的観点から望ましい性質を有する、完全ヒト抗MCP-1抗体および抗MCP-1抗体調製物を提供する。20

【 0 0 3 2 】

したがって、本発明の実施形態は、MCP-1と結合する単離抗体、またはこれらの抗体の断片を提供する。当分野で知られているように、抗体は例えばモノクローナル、キメラおよび/またはヒト抗体であることが有利である場合がある。本発明の実施形態は、これらの抗体を生成するための細胞も提供する。30

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載する抗体は、治療上の有用性を有する。抗MCP-1抗体は、腫瘍血管新生および腫瘍増殖の広がりを部分的に阻害または制限することができる。膠芽細胞腫および腎臓癌由来の細胞を含めた多くの癌細胞は、MCP-1、CCR2の受容体を発現する。同じ腫瘍細胞中のリガンドと受容体の同時発現によって、両方の要素を発現する癌細胞中の自己増殖ループをMCP-1が制御することができることが示唆される。Huang他(Cancer Res. (2002) 62:2806 ~ 2812)は、MCP-1のCCR2受容体を発現する腫瘍細胞の増殖および生存に、MCP-1が直接影響を与えることを近年報告している。したがって、血管新生に対するその影響以外に、MCP-1は、腫瘍細胞の増殖、移動および侵襲を直接制御することもできる。40

【 0 0 3 4 】

さらに、本発明の実施形態は、疾患の診断物質または治療物質としての、これらの抗体の使用を提供する。例えば、本発明の実施形態は、腫瘍および炎症性症状と関係があるMCP-1の発現を阻害するための方法および抗体を提供する。抗体を使用して、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌および膀胱癌などの癌、ならびに慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、乾鱗、臓器移植、再狭窄および自己免疫疾患だけには限られないが、これらを含めた他の炎症性症状を治療することが好ましい。このような治療と共に、本明細書に記載する本発明の抗体を含む製造品を提供する。さらに、本明細書に記載する本発明の抗体を含むアッセイキットを提供して、腫瘍および炎症性症状をスクリーニングする。50

【 0 0 3 5 】

さらに、本明細書に記載する核酸、ならびにその断片および変異体は、例えば非限定的な例、(a)対応するコードタンパク質、ポリペプチド、組換えまたは異種遺伝子産物としての断片および変異体の生合成を指令するため、(b)本明細書に開示する核酸の検出および定量化用のプローブとして、(c)アンチセンス分子などを調製するための配列鑄型としてなど、使用することができる。このような使用は、以下の開示中でさらに十分に説明する。

【 0 0 3 6 】

さらに、本明細書に記載するタンパク質およびポリペプチド、ならびにその断片および変異体は、(a)抗MCP-1抗体の生成を刺激するための免疫原として働くかせるように、(b)このような抗体に関する免疫アッセイでの捕捉抗原を含めた方法で、(c)本明細書に記載するMCP-1ポリペプチドと結合する物質のスクリーニングの標的として、ならびに(d)抗体による処理が標的にによって仲介される分子および/または細胞機能に影響を与えるようなMCP-1特異的抗体の標的として、使用することができる。

10

【 0 0 3 7 】

細胞増殖の調節におけるその強い影響を鑑みると、MCP-1ポリペプチドの発現または活性の増大を使用して、細胞の生存を促進することができる。逆に、MCP-1ポリペプチドの発現の低下を使用して、細胞死を誘導することができる。

【 0 0 3 8 】

本発明の抗体に関する、他の実施形態、特徴などは、以下の追加的な詳細で示す。

20

【 0 0 3 9 】**配列表**

代表的なヒト抗MCP-1抗体の、重鎖および軽鎖可変領域、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を配列表中に示し、その内容は以下の表1にまとめる。

【 0 0 4 0 】

【表1 - 1】

表1

mAb ID 番号	配列	配列番号
1.1.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	1
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	2
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	3
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	4
1.10.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	5
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	6
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	7
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	8
1.12.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	9
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	10
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	11
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	12
1.13.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	13
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	14
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	15
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	16
1.18.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	17
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	18
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	19
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	20
1.2.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	21
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	22
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	23
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	24
1.3.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	25
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	26
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	27
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	28
1.5.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	29
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	30
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	31
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	32
1.6.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	33
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	34
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	35
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	36
1.7.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	37
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	38
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	39
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	40
1.8.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	41
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	42
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	43
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	44

【0041】

【表1-2】

1.9.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	45	10
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	46	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	47	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	48	
2.3.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	49	20
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	50	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	51	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	52	
2.4.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	53	30
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	54	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	55	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	56	
3.10.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	57	40
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	58	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	59	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	60	
3.11.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	61	20
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	62	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	63	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	64	
3.15.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	65	30
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	66	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	67	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	68	
3.16.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	69	40
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	70	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	71	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	72	
3.2	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	73	30
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	74	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	75	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	76	
3.4.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	77	40
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	78	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	79	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	80	
3.5.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	81	40
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	82	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	83	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	84	
3.6.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	85	40
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	86	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	87	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	88	
3.7.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	89	40
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	90	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	91	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	92	
3.9	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	93	50
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	94	
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	95	
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	96	

【表1 - 3】

4.4	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	97
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	98
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	99
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	100
4.5.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	101
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	102
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	103
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	104
4.6.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	105
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	106
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	107
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	108
4.7.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	109
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	110
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	111
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	112
5.3.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	113
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	114
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	115
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	116
3.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	117
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	118
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	119
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	120
1.11.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	121
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	122
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	123
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	124
1.14.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	125
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	126
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	127
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	128
1.4.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	129
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	130
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	131
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	132
3.14.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	133
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	134
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	135
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	136
3.8	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	137
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	138
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	139
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	140
4.8.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	141
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	142
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	143
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	144
5.1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	145
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	146
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	147
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	148

定義

他に明示しない限り、本明細書に記載する本発明に関して使用する科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈から他に必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。一般に、本明細書に記載する細胞および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチドの化学およびハイブリダイゼーションの技法に関して使用される命名はよく知られており、当分野で一般的に使用されているものである。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養、および形質転換(例えは、エレクトロポレーション、リポフェクション)用の標準的技法を使用する。酵素反応および精製技法は、製造者の仕様書に従って、または当分野で一般的に行われていると同様に、あるいは本明細書に記載するのと同様に行う。前述の技法および手順は、当分野でよく知られている従来の方法に従って、または本出願中に引用し論じている、さまざまな一般的およびさらに具体的な参考文献中に記載されたのと同様に一般的に行う。例えば、Sambrook他、Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.1989)を参照のこと。本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、および医薬品化学および薬品化学の実験手順および技法に関して使用される命名は当分野でよく知られており、一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、薬剤調製、配合、および送達、および患者の治療用の標準的技法を使用する。

【0044】

本明細書で提供される実施形態に従い使用するように、以下の用語は、他に示さない限り、以下の意味を有すると理解されたい。

【0045】

本明細書で使用する用語「単離ポリヌクレオチド」は、ゲノム、cDNA、または合成起源、あるいはこれらの幾つかの組合せのポリヌクレオチドを意味するものとし、その起源によって「単離ポリヌクレオチド」は、(1)ポリヌクレオチドの全体または一部分と結合しないか、「単離ポリヌクレオチド」は天然で見られるか、(2)天然では連結しないポリヌクレオチドと動作可能に連結しているか、あるいは(3)大きな配列の一部分として天然に存在しない。

【0046】

本明細書で言及する用語「単離タンパク質」は、cDNA、組換えRNA、または合成起源、あるいはこれらの幾つかの組合せのタンパク質を意味し、その起源、または派生源によって「単離タンパク質」は、(1)天然で見られるタンパク質と結合しないか、(2)同じ源由來の他のタンパク質を含まないか、例えはネズミタンパク質を含まないか、(3)異種由來の細胞によって発現されるか、あるいは(4)天然に存在しない。

【0047】

用語「ポリペプチド」は、本明細書では一般用語として使用して、本来のタンパク質、ポリペプチド配列の断片、または類似体を指す。したがって、本来のタンパク質、断片、および類似体は、ポリペプチド属の種である。本発明の好ましいポリペプチドは、ヒト重鎖免疫グロブリン分子およびヒト 軽鎖免疫グロブリン分子、および重鎖免疫グロブリン分子と、 軽鎖免疫グロブリン分子などの軽鎖免疫グロブリン分子を含む組合せ、あるいはこの逆によって形成される抗体分子、ならびにこれらの断片および類似体を含む。

【0048】

本明細書で使用される、物体に適用する用語「天然に存在する」は、ある物体が天然で見ることができる事実を指す。例えは、(ウイルスを含めた)生物中に存在し、天然の供給源から単離することができ、研究室またはそれ以外の場所で人間によって意図的に修飾されていない、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【0049】

本明細書で使用する用語「動作可能に連結した」は、このように記載する要素の位置が、それらの要素をその目的とする方式で機能させることができる関係にあることを指す。

10

20

30

40

50

コード配列と「動作可能に連結した」調節配列は、調節配列と適合性がある条件下で、コード配列の発現が得られるような方法で連結している。

【0050】

本明細書で使用する用語「調節配列」は、それが連結するコード配列の発現およびプロセシングを実施するのに必要な、ポリヌクレオチド配列を指す。このような調節配列の性質は宿主生物に応じて異なり、原核生物では、このような調節配列は一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終了配列を含み、真核生物では一般に、このような調節配列は、プロモーターおよび転写終了配列を含む。用語「調節配列」は、その存在が発現およびプロセシングに必要不可欠である、あらゆる要素を最低限含むものとし、その存在が有利である他の要素、例えばリーダー配列および融合パートナー配列も含むことができる。10

【0051】

本明細書で使用する用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10塩基長のポリマー形態のヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、あるいは修飾形のいずれかのタイプのヌクレオチドを意味する。この用語は、一本鎖および二本鎖形態のDNAを含む。

【0052】

本明細書で言及する用語「オリゴヌクレオチド」は、天然に存在する、および天然に存在しないオリゴヌクレオチド結合によって1つに連結した、天然に存在する修飾されたヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、200塩基以下の長さ部分を一般に含む、ポリヌクレオチドのサブセットである。オリゴヌクレオチドは、10~60塩基長であることが好ましく、12、13、14、15、16、17、18、19、または20~40塩基長であることが最も好ましい。オリゴヌクレオチドは、例えばプローブ用には、通常一本鎖であるが、オリゴヌクレオチドは、例えば遺伝子突然変異体の構築で使用するためには二本鎖であってよい。本発明のオリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。20

【0053】

本明細書で言及する用語「天然に存在するヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。本明細書で言及する用語「修飾ヌクレオチド」は、修飾または置換された糖基などを有するヌクレオチドを含む。本明細書で言及する用語「ヌクレオチド結合」は、例えばホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホジセレノエート、ホスホロアニーロオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデートなどの、オリゴヌクレオチド結合を含む。例えば、LaPlanche他、Nucl. Acids Res. 14:9081(1986); Stec他、J. Am. Chem. Soc. 106:6077(1984); Stein他、Nucl. Acids Res. 16:3209(1988); Zon他、Anti-Cancer Drug Design. 6:539 (1991); Zon他、Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87~108(F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)); Stec他、米国特許第5,151,510号; Uhlmann およびPeyman Chemical Reviews 90:543(1990)を参照のこと。オリゴヌクレオチドは、それが所望されるならば、検出用の標識を含むことができる。30

【0054】

本明細書で言及する用語「選択的にハイブリダイズする」は、検出可能かつ特異的な結合を意味する。本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびそれらの断片は、測定可能な量の非特異的核酸との検出可能な結合を最小限にするハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、核酸鎖と選択的にハイブリダイズする。高ストリンジェンシー条件を使用して、当分野で知られており本明細書で論じる選択的ハイブリダイゼーション条件を達成することができる。一般に、本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびそれらの断片と、当該の核酸配列の間の核酸配列の相同性は、少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも85%、90%、95%、99%および100%の高い相同性が好ましい。これらの配列間に部分的または完全な同一性が存在する場合、2つのアミノ酸配列は相同である。例えば、85%の相同性とは、2つの配列を最大の整合性でアライメントをとった4050

場合に、85%のアミノ酸が同一であることを意味する。(2つの配列のいずれかを整合させる際に)ギャップを最大に整合させることができる。5以下のギャップ長が好ましく、2以下がさらに好ましい。あるいは好ましくは、2つのタンパク質配列(または少なくとも30アミノ酸長のタンパク質に由来するポリペプチド配列)が、突然変異データマトリクスおよび6以上のギャップペナルティーを用いるプログラムALIGNを使用して、これらの配列が5を超えるアライメントスコア(標準偏差単位)を有する場合、この語を本明細書で使用するように相同である。M.O.Dayhoff、Atlas of Protein Sequence and Structure、Vol.5、101～110およびSupplement 2～Vol.5、1～10(National Biomedical Research Foundation 1972)中を参照のこと。2つの配列またはそれらの一部分は、ALIGNプログラムを使用して最適状態にアライメントをとった場合、それらのアミノ酸が50%以上同一であれば、より好ましくは相同である。用語「対応する」は、ポリヌクレオチド配列が、参照ポリヌクレオチド配列の全体または一部分と相同である(すなわち同一である、進化上は厳密には関係がない)か、あるいはポリヌクレオチド配列が、参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために本明細書で使用する。対照的に、用語「相補的である」は、相補配列が参照ポリヌクレオチド配列の全体または一部分と、相同であることを意味するために本明細書で使用する。例えば、ヌクレオチド配列「TATAC」は参照配列「TATAC」に対応し、「GTATA」と相補的である。

【0055】

以下の用語は、2つ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の配列関係を記載するために使用する:「参照配列」、「比較ウインドウ」、「配列同一性」、「配列同一性の割合」、および「実質的同一性」。「参照配列」は、配列比較のベースとして使用される明確な配列である;参照配列は、大きな配列の亜群、例えば配列表中に与えられる完全長cDNAまたは遺伝子配列のセグメントなどであってよく、あるいは完全なcDNAまたは遺伝子配列を含むことができる。一般に、参照配列は少なくとも18ヌクレオチドまたは6アミノ酸長であり、しばしば少なくとも24ヌクレオチドまたは8アミノ酸長であり、少なくとも48ヌクレオチドまたは16アミノ酸長であることが多い。2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列はそれぞれ、(1)2分子間で類似している配列(すなわち、完全なポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一部分)を含み、(2)2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間で互いに異なる配列をさらに含むことができるので、2つ(あるいはそれを超える)分子間の配列比較は、2分子の配列を「比較ウインドウ」で比較して、配列が類似している局所領域を同定および比較することによって、典型的には行われる。本明細書で使用する用語「比較ウインドウ」は、少なくとも18の隣接ヌクレオチド位置または6アミノ酸の概念上のセグメントを指し、ポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、少なくとも18の隣接ヌクレオチドまたは6アミノ酸配列の参照配列と比較することができ、比較ウインドウ中のポリヌクレオチド配列の一部分は、2つの配列の最適なアライメント用の参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、20パーセント以下の付加、欠失、置換など(すなわちギャップ)を含む可能性がある。比較ウインドウを一直線に並べるための配列の最適なアライメントは、SmithおよびWaterman、Adv.Appl.Math.2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch、J.Mol.Biol.48:443(1970)の相同性アライメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman、Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A)85:2444(1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施によって(GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、(Genetics Computer Group, 575 Science Dr、Madison、Wis.)、Geneworks、またはMacVectorソフトウェアパッケージ)、あるいは調査によって行うことができ、さまざまな方法によって生じる、最良のアライメント(すなわち、比較ウインドウの最高の相同性の割合をもたらす)が選択される。

【0056】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、比較ウインドウに関して同一であることを意味する(すなわち、ヌクレオチド毎または残基毎の単位で)。用語「配列同一性の割合」は、比較ウインドウの2つの最適にアライメントをとった配

10

20

30

40

50

列を比較すること、同一の核酸塩基(例えばA、T、C、G、U、またはI)または残基が両方の配列中に存在する位置の数を決定して、整合した位置の数を得ること、その整合した位置の数を比較ウインドウ中の位置の全体数(すなわちウインドウの大きさ)で割ること、その結果に100を掛けて配列同一性の割合を得ることによって計算する。本明細書で使用する用語「実質的同一性」は、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の性質を示し、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸は、少なくとも18ヌクレオチド(6アミノ酸)位置の比較ウインドウ、しばしば少なくとも24~48ヌクレオチド(8~16アミノ酸)位置のウインドウの参照配列と比較して、少なくとも85パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90~95パーセントの配列同一性、さらに通常は少なくとも99パーセントの配列同一性を有する配列を含み、配列同一性の割合は、欠失または付加を含む可能性があり、比較ウインドウの参照配列が合計20パーセント以下の配列と、参照配列を比較することによって計算する。参照配列は、大きな配列の亜群であってよい。

【0057】

本明細書で使用するように、20の従来のアミノ酸およびそれらの略語は、従来の使用に従う。Immunology-A Synthesis(2d ed., Golub, E.S.およびGren, D.R.eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.1991)を参照のこと。20の従来のアミノ酸の立体異性体(例えばD-アミノ酸)、-L-, -D-二置換アミノ酸などの非天然アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、および他の非従来的アミノ酸も、本明細書に記載する本発明のポリペプチドに適した要素である場合がある。非従来的アミノ酸の例には、4-ヒドロキシプロリン、-L-カルボキシグルタメート、-L-N,N,N-トリメチルリシン、-L-N-アセチルリシン、D-ホスホセリン、N-アセチルリシン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、-L-N-メチルアルギニン、および他の同様のアミノ酸およびイミノ酸(例えば4-ヒドロキシプロリン)がある。本明細書で使用するポリペプチド表示では、標準的使用および慣習に従い、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシ末端方向である。

【0058】

同様に、他に明示しない限りは、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手端が5'端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向を5'方向と呼ぶ。5'から3'の、新生RNA転写産物の付加方向を転写方向と呼び；RNAと同じ配列を有し、RNA転写産物の5'から5'端に存在するDNA鎖上の配列領域を、「上流配列」と呼び；RNAと同じ配列を有し、RNA転写産物の3'から3'端に存在するDNA鎖上の配列領域を、「下流配列」と呼ぶ。

【0059】

ポリペプチドに適用する、用語「実質的同一性」は、2つのペプチド配列が、デフォルトギャップによる重み付けを使用するプログラムGAPまたはBESTFITなどによって、最適にアライメントをとった場合、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセントの配列同一性、および最も好ましくは少なくとも99パーセントの配列同一性を有することを意味する。同一でない残基の位置は、保存アミノ酸の置換によって異なることが好ましい。保存アミノ酸の置換は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の基はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシリル側鎖を有するアミノ酸の基は、セリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の基は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の基は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の基は、リシン、アルギニン、およびヒスチジンであり；およびイオウ含有側鎖を有するアミノ酸の基は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存アミノ酸の置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、およびアスパラギン-グルタミンである。

【0060】

本明細書で論じるように、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列のわずかな変化は、本明細書に記載する本発明によって含まれるものとして企図される。ただし、アミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列の変化が、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、および最も好ましくは99%を維持するものとする。特に、保存アミノ酸の置換が企図される。保存的置換は、それらの側鎖に関係があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は一般に、(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸;(2)塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン;(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン;および(4)非電荷極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンのファミリーに分けられる。より好ましいファミリーは以下の通りである:セリンおよびスレオニンは脂肪族ヒドロキシファミリーであり;アスパラギンおよびグルタミンはアミド含有ファミリーであり;アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンは脂肪族ファミリーであり;かつフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは芳香族ファミリーである。例えば、ロイシンとイソロイシンまたはバリン、アスパラギン酸とグルタミン酸、スレオニンとセリンの単離型置換、または一アミノ酸と構造上関係があるアミノ酸の同様の置換は、置換がフレームワーク部位中のアミノ酸とは関係がない場合は特に、生成する分子の結合または性質に対して重大な影響はない予想することは理にかなっている。アミノ酸の変化が機能性ペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の特異的活性をアッセイすることによって、容易に判定することができる。アッセイは本明細書に詳細に記載する。抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体は、当業者によって容易に作製することができる。断片または類似体の、好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能性ドメインの境界付近に存在する。構造および機能性ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを、公共あるいは専有の配列データベースと比較することによって識別することができる。コンピュータによる比較法を使用して、知られている構造および/または機能の他のタンパク質中に存在する配列モチーフまたは予想タンパク質の立体配座ドメインを同定することが好ましい。知られている三次元構造中に折りたたまれている、タンパク質配列を同定するための方法が知られている。Bowie他、Science 253:164(1991)。したがって、前述の例によって、当業者は、本発明に従い構造および機能性ドメインを定義するために使用することができる、配列モチーフおよび構造の立体配座を理解することができることが実証される。

【0061】

好ましいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させるもの、(2)酸化に対する感受性を低下させるもの、(3)タンパク質複合体形成に関する結合親和性を変えるもの、(4)結合親和性を変えるもの、および(4)このような類似体の他の物理化学的または機能的性質を付与または改変するものである。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列のさまざまなムテインを含むことができる。例えば、1つまたは多数のアミノ酸置換(好ましくは保存アミノ酸の置換)を、天然に存在する配列(好ましくは、分子間接触部を形成するドメインの外側のポリペプチドの一部分)に行うことができる。保存アミノ酸の置換が、親配列の構造的性質を実質的に変えることはないはずである(例えば、アミノ酸置換が、親配列中に存在するヘリックスを破壊したり、あるいは親配列を特徴付ける他の型の二次構造を破壊する傾向はないはずである)。当分野で認められているポリペプチド二次構造および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton,ed., W.H.Freeman and Company, New York 1984); Introduction to Protein Structure(Branden, C.and Tooze, J.ed., Garland Publishing, New York, N.Y.1991); およびThornton他、Nature 354:105(1991)中に記載されている。

【0062】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド断片」は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端欠失を有するが、残りのアミノ酸配列は、天然に存在する推定配列、例えば完全長cDNA配列由来の配列中の対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。断片は典型的には、少なくとも5、6、8または10アミノ酸長、好ましくは少なくとも14アミノ酸長、より好ましくは少なくともアミノ酸長、通常は少なくとも50アミノ酸長、さらにより好ましくは少なくとも70アミノ酸長である。本明細書で使用する用語「類似体」は、推定アミノ酸

10

20

30

40

50

配列の一部分と実質的な相同性があり、少なくとも1つの以下の性質:(1)適切な結合条件下でのMCP-1との特異的結合性、(2)適切なMCP-1結合を阻害する能力、または(3)in vitroまたはin vivoでのMCP-1発現細胞の増殖を阻害する能力を有する、少なくとも25個のアミノ酸のセグメントから構成される、ポリペプチドを指す。典型的には、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に対して、保存アミノ酸の置換(あるいは付加または欠失)を含む。類似体は典型的には、少なくとも20アミノ酸長、好ましくは少なくとも50アミノ酸長以上であり、しばしば完全長の天然に存在するポリペプチドほどの長さである可能性がある。

【0063】

ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの性質と類似の性質を有する非ペプチド薬剤として、
10 製薬産業において一般的に使用される。これらの型の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体」または「ペプチド模倣体」と呼ばれる。Fauchere、J.Adv.Drug Res.15:29(1986);V
eberおよびFreidinger、TINS p.392(1985);およびEvans他、J.Med.Clem.30:1229(1987)。
このような化合物は、コンピュータによる分子モデリングによって開発されることが多い。
このように化合物は、構造的に類似しているペプチド模倣体を使用して、同等の治療
効果または予防効果を生み出すことができる。一般にペプチド模倣体は、範例ペプチド(すなわち、生物学的性質または薬理学的活性を有するポリペプチド)、ヒト抗体などと構
造的に類似しているが、1つまたは複数のペプチド結合であって、--CH₂NH--、--CH₂S--、
-CH₂-CH₂--、--CH=CH--(シスおよびトランス)、--COCH₂--、--CH(OH)CH₂--、および--CH₂
SO-からなる群から選択される結合で、当分野でよく知られている方法によって、場合によ
りては置換されたペプチド結合を有する。コンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ
酸を、同じ型のD-アミノ酸(例えば、L-リシンの代わりにD-リシン)で系統的に置換するこ
とを使用して、より安定性のあるペプチドを生成することができる。さらに、コンセンサス
配列または実質的に同一なコンセンサス配列の変形を含む束縛型ペプチドを、当分野で
知られている方法によって(RizoおよびGierasch Ann.Rev.Biochem.61:387(1992));例えば、
ペプチドを環化させる分子間ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン
残基を加えることによって、生成することができる。

【0064】

「抗体」または「抗体ペプチド」は、特異的結合に関して完全な抗体と競合する、完全
30 な抗体、またはその結合断片を指す。結合断片は、組換えDNA技法によって、あるいは完全な抗体の酵素的または化学的切断によって生成する。結合断片には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、および单鎖抗体がある。「二重特異性」または「二機能性」抗体以外の抗体は、
それぞれのその結合部位が同一であると理解される。過剰の抗体が抗受容体と結合する受
容体の量を、(in vitroの競合結合アッセイで測定して)少なくとも約20%、40%、60%または80%、さらにより通常は約85%を超えて低下させると、抗体は受容体と抗受容体の接着を
実質的に阻害する。

【0065】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体と特異的に結合することができる、任意のタンパク質抗原決定基を含む。エピトープ抗原決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖などの化学的活性がある表面の分子群からなり、特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性を通常有する。抗体は、解離定数が1 μM以下、好ましくは100nM以下、および最も好ましくは10nM以下であると、抗原と特異的に結合すると言われている。

【0066】

用語「物質」は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物マクロ分子、または生物物質から作製した抽出物を示すために、本明細書で使用する。

【0067】

本明細書の目的の「活性がある」または「活性」は、本来または天然に存在するMCP-1
ポリペプチドの生物学的および/または免疫学的活性を保持している、MCP-1ポリペプチド
の形を指し、「生物学的活性」は、本来または天然に存在するMCP-1ポリペプチドによ
つて保有される抗原エピトープに対する抗体の生成を誘導する能力以外の、本来または天然
50

に存在するMCP-1ポリペプチドによって引き起こされる生物学的機能(阻害的または刺激的)を指し、「免疫学的」活性は、本来または天然に存在するMCP-1ポリペプチドによって保有される抗原エピトープに対する抗体の生成を誘導する能力を指す。

【0068】

「治療」は、療法治療および予防または防止対策を指し、対象は標的の病状または障害が予防または遅延(低下)される。治療の必要がある人には、既に障害を有している人、および障害を有する傾向がある人、またはその障害を予防すべき人がある。

【0069】

「哺乳動物」は、ヒト、他の霊長類、例えばサル、チンパンジーおよびゴリラなど、飼育および農場動物、および動物園、スポーツ施設、研究室、またはペットの動物、例えばイヌ、ネコ、蓄牛、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、げっ歯類などを含めた、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。治療の目的では、哺乳動物はヒトであることが好みしい。

10

【0070】

本明細書で使用する「担体」は、使用する用量および濃度でそれらに曝される細胞または哺乳動物に対して非毒性である、薬剤として許容可能な担体、賦形剤、または安定剤を含む。生理学的に許容可能な担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容可能な担体の例には、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液;アスコルビン酸を含めた抗酸化剤;低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質;ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー;グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸;单糖、二糖、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含めた他の炭水化物;EDTAなどのキレート剤;マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール;ナトリウムなどの塩形成対イオン;および/またはTween(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)、およびPluronics(商標)などの非イオン性界面活性剤がある。

20

【0071】

抗体をパパインで消化することによって、それぞれが1つの抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、および容易に結晶化する能力を反映する残りの「Fc」断片が生成する。ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位を有する「F(ab')₂」断片が生成し、これは依然として抗原と交差結合することができる。

30

【0072】

「Fv」は、抗体の完全な抗原認識および結合部位を含む、最小の抗体断片である。この領域は、強く非共有結合した、1つの重鎖と1つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。それぞれの可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を画定するのは、この形状中である。全体では、6つのCDRが、抗体に対する抗原結合特異性を付与する。しかしながら、例えば、1つの可変ドメイン(例えば、Fv二量体のVHまたはVL部分、または抗原に特異的なFvを含むわずか3つのCDRの半分)が、抗原を認識しそれと結合する能力を有することができても、完全な結合部位よりおそらく親和性は低い。

【0073】

Fab断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインの、カルボキシ末端に数個の残基を加えることによって、Fab断片はFab'断片とは異なるものとなる。F(ab')₂抗体断片は本来、その間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

40

【0074】

「固相」は、本明細書に記載する抗体が付着することができる、非水性マトリクスを意味する。本明細書に含まれる固相の例には、ガラス(例えば孔径制御ガラス)、多糖(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコーンで一部分または全体が形成された固相がある。幾つかの実施形態では、文脈に応じて、固相はアッセイプレートのウエルを含むことができ、;他の実施形態では、それは精

50

製カラム(例えば、親和性クロマトグラフィーカラム)である。この用語は、分離粒子の不連続固相、米国特許第4,275,149号に記載されたものなども含む。

【0075】

用語「リポソーム」は、哺乳動物に薬剤(MCP-1ポリペプチドまたはその抗体など)を送達するのに有用な、さまざまな型の脂質、リン脂質および/または界面活性剤から構成される、小胞を示すために本明細書で使用する。リポソームの要素は一般に、生物膜の脂質配置と同様に、二層形で配置されている。

【0076】

用語「小分子」は、約500ダルトン未満の分子量を有する分子を記載するために、本明細書で使用する。

10

【0077】

本明細書で使用する用語「標識」または「標識された」は、例えば放射標識アミノ酸の取り込み、あるいは印付けしたアビジン(例えば、光学または比色定量法によって検出することができる、蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン)によって検出することができる、ポリペプチドのビオチニル部分との結合による、検出可能なマーカーの取り込みを指す。幾つかの状況では、標識またはマーカーは治療用であってもよい。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する、さまざまな方法が当分野で知られており、それらを使用することができる。ポリペプチド用の標識の例には、以下のもの:放射性同位体または放射性核種(例えば、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I)、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、熒光発光性ランタニド)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシド、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光物質、ビオチニル基、第2のレポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)があるが、これらだけには限られない。幾つかの実施形態では、標識をさまざまな長さのスペーサーアームによって結合させて、考えられる立体的障害を減少させる。

20

【0078】

本明細書で使用する用語「薬剤物質または薬剤」は、患者に適切に投与すると所望の治療効果を誘導することができる、化学化合物または組成物を指す。本明細書中の他の化学用語は、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco(1985))によって例示されるような、当分野における従来の使用法に従って使用する。

30

【0079】

本明細書で使用する「実質的に純粋である」は、対象種が存在する優勢種である(すなわちモルベースで、組成物中の任意の他の個々の種より、その種が多量に存在する)ことを意味し、実質的に精製された分画は、存在するすべてのマクロ分子種の少なくとも約50パーセントを(モルベースで)対象種が構成する組成物であることが好ましい。一般に、実質的に純粋である組成物は、組成物中に存在するすべてのマクロ分子種の約80パーセントを超える、より好ましくは約85%、90%、95%および99%を超える割合を構成する。組成物が1つのマクロ分子種から本質的になるように、対象種をほぼ均質に精製する(従来の検出法によって、組成物中で汚染種を検出することができない)ことが最も好ましい。

40

【0080】

用語「患者」は、ヒトおよび家畜被験体を含む。

【0081】

抗体構造

基本的な抗体の構造単位は、テトラマーを含むことが知られている。それぞれのテトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの同一対から構成され、それぞれの対は1つの「軽」(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。それぞれの鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含む。それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を画定する。ヒト軽鎖は、および

50

軽鎖として分類される。重鎖は μ 、 γ 、 δ 、 ϵ 、または α として分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして定義する。軽鎖および重鎖中では、可変領域と定常領域が、約12以上のアミノ酸の「J」領域によってコンジュゲートしており、重鎖は約10個を超えるアミノ酸の「D」領域も含む。Fundamental Immunology Ch.7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)))を概略的に参照のこと。それぞれの軽鎖/重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。したがって、完全な抗体は2つの結合部位を有する。二機能性または二重特異性抗体中以外では、2つの結合部位は同じである。

【0082】

鎖はいずれも、相補性決定領域すなわちCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって接合した、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の、同一の一般的な構造を示す。それぞれの対の2つの鎖由来のCDRは、フレームワーク領域の近くに一直線に並び、特定のエピトープとの結合を可能にする。N末端からC末端にむかって、軽鎖および重鎖は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。アミノ酸のそれぞれのドメインへの割り当ては、Kabat、Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md.1991)(1987)、またはChothiaおよびLesk、J.Mol.Biol.196:901~17(1987); Chothia他、Nature 342:878~83(1989)の定義に従う。

10

【0083】

二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する、人工のハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含めたさまざまな方法によって作製することができる。例えば、SongsivilaiおよびLachmann、Clin.Exp.Immunol.79:315~21(1990); Kostelnik他、J.Immunol.148:1547~53(1992)を参照のこと。二重特異性抗体の生成は、従来の抗体の生成と比較すると、相対的に煩雑なプロセスである可能性があり、収率および純度は二重特異性抗体より一般に低い。二重特異性抗体は、1つの結合部位を有する断片(例えば、Fab、Fab'、およびFv)の形では存在しない。

20

【0084】

ヒト抗体および抗体のヒト化

ヒト抗体は、ネズミまたはラット可変領域および/または定常領域を有する抗体に関する、幾つかの問題を回避する。このようなネズミまたはラット由来のタンパク質の存在によって、抗体の迅速な除去がもたらされる可能性があり、あるいは患者による抗体に対する免疫応答の生成がもたらされる可能性がある。ネズミまたはラット由来の抗体の使用を回避するために、げっ歯類が完全ヒト抗体を生成するように、ヒト抗体の機能をげっ歯類に導入することによって、完全ヒト抗体を作製することができる。

30

【0085】

ヒト抗体

完全ヒト抗体を生成するための1つの方法は、遺伝子工学処理されてヒト重鎖および軽鎖遺伝子をそのゲノム内に含む、マウスのXenoMouse(登録商標)系統を使用することによるものである。例えば、ヒト重鎖遺伝子座および 軽鎖遺伝子座の245kbおよび190kbの大きさの生殖形断片を含む、XenoMouse(登録商標)マウスは、Green他、Nature Genetics 7:13~21(1994)中に記載されている。Green他の文書は、それぞれヒト重鎖遺伝子座および

40

軽鎖遺伝子座の、メガ塩基の大きさの生殖形YAC断片を使用することによって、約80%を超えるヒト抗体のレパートリーを導入することまで広がった。Mendez他、Nature Genetics 15:146~56(1997)、および1996年12月3日に出願された、米国特許出願第08/759,620号を参照のこと。さらに、完全な 軽鎖遺伝子座を含む、XenoMouse(登録商標)マウスが作製されている(2001年11月30日に出願された、米国特許出願第60/334,508号)。さらに、多数のアイソタイプを生み出す、XenoMouse(登録商標)マウスが作製されている(例えばWO00/76310を参照)。XenoMouse(登録商標)系統は、Abgenix, Inc.(Fremont, CA)から入手可能である。

【0086】

50

XenoMouse(登録商標)マウスの生成は、1990年1月12日に出願された米国特許出願第07/466,008号、1990年11月8日に出願された米国特許出願第07/610,515号、1992年7月24日に出願された米国特許出願第07/919,297号、1992年7月30日に出願された出願された米国特許出願第07/922,649号、1993年3月15日に出願された米国特許出願第08/031,801号、1993年8月27日に出願された米国特許出願第08/112,848号、1994年4月28日に出願された米国特許出願第08/234,145号、1995年1月20日に出願された米国特許出願第08/376,279号、1995年4月27日に出願された米国特許出願第08/430,938号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/464,584号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/464,582号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/463,191号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/462,837号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/486,853号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/486,857号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/486,859号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/462,513号、1996年10月2日に出願された米国特許出願第08/724,752号、および1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、ならびに米国特許第6,162,963号、米国特許第6,150,584号、米国特許第6,114,598号、米国特許第6,075,181号、および米国特許第5,939,598号、ならびに日本国特許3068180B2号、日本国特許3068506B2号、および日本国特許3068507B2号中で、さらに論じられ示されている。Mendez他、Nature Genetics 15:146～156(1997)、およびGreen and Jakobovits J Exp. Med.、188:483～495(1998)も参照のこと。1996年6月12日に付与公開された欧州特許EP463,151B1号、1994年2月3日に公開された国際特許出願No.WO94/02602、1996年10月31日に公開された国際特許出願No.WO96/34096、1998年6月11日に公開されたWO98/24893、2000年12月21日に公開されたWO00/76310も参照のこと。10
20

【 0 0 8 7 】

代替的手法、GenPharm International、Inc.を含めた他の手法は、「小遺伝子座」手法を使用している。小遺伝子座手法では、外因性Ig遺伝子座を、Ig遺伝子座由来の断片(個々の遺伝子)を含ませることによって模倣する。したがって、1つまたは複数のV_H遺伝子、1つまたは複数のD_H遺伝子、1つまたは複数のJ_H遺伝子、μ定常領域、および第2の定常領域(好ましくは定常領域)を、動物への挿入用の構築体に形成する。この手法は、Surani他への米国特許第5,545,807号、ならびにそれぞれLonbergおよびKayへの米国特許第5,545,806号、米国特許第5,625,825号、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,661,016号、米国特許第5,770,429号、米国特許第5,789,650号、米国特許第5,814,318号、米国特許第5,877,397号、米国特許第5,874,299号および米国特許第6,255,458号、KrimpenfortおよびBernsへの米国特許第5,591,669号および米国特許第6,023,010号、Berns他への米国特許第5,612,205号、米国特許第5,721,367号、および米国特許第5,789,215号、ならびにChoiおよびDunnへの米国特許第5,643,763号、Genpham Internationalの1990年8月29日に出願された米国特許出願第07/574,748号、1990年8月31日に出願された米国特許出願第07/575,962号、1991年12月17日に出願された米国特許出願第07/810,279号、1992年3月18日に出願された米国特許出願第07/853,408号、1992年6月23日に出願された米国特許出願第07/904,068号、1992年12月16日に出願された米国特許出願第07/990,860号、1993年4月26日に出願された米国特許出願第08/053,131号、1993年7月22日に出願された米国特許出願第08/096,762号、1993年11月18日に出願された米国特許出願第08/155,301号、1993年12月3日に出願された米国特許出願第08/161,739号、1993年12月10日に出願された米国特許出願第08/165,699号、1994年3月9日に出願された米国特許出願第08/209,741号中に記載されている。欧州特許546,073B1号、国際特許出願Nos.WO92/03918、WO92/22645、WO92/22647、WO92/22670、WO93/12227、WO94/00569、WO94/25585、WO96/14436、WO97/13852、およびWO98/24884、ならびに米国特許第5,981,175号も参照のこと。Taylor他(1992)、Chen他(1993)、Tuailion他(1993)、Choi他(1993)、Lonberg他(1994)、Taylor他(1994)およびTuailion他(1995)、Fishwild他(1996)をさらに参照のこと。30
40

【 0 0 8 8 】

Kirinは、ミクロ細胞融合によって染色体の大きな断片、または完全な染色体が導入されたマウスからのヒト抗体の產生を実証している。欧州特許出願第773,288号および欧州50

特許出願第843,961号を参照のこと。

【0089】

Lidak Pharmaceuticals(現Xenorex)も、ヒトドナー由来の非悪性の成熟末梢リンパ球を注射することによって改変されたSCIDマウスにおける、ヒト抗体の産生を実証している。改変型マウスは、免疫原で刺激すると、ヒト抗体の産生からなるヒトドナーの免疫応答性を示す。米国特許第5,476,996号および米国特許第5,698,767号を参照のこと。

【0090】

ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答が、キメラあるいはそれ以外の場合はヒト化抗体の作製へと当分野を導いている。キメラ抗体はヒト定常領域およびネズミ可変領域を有するが、特に慢性または高用量使用の抗体では、幾つかのヒト抗キメラ抗体(HACA)応答が観察されると予想される。したがって、MCP-1に対する完全ヒト抗体を提供して、HAMAまたはHACA応答の懸念および/または影響を低下させることが望ましいと思われる。

【0091】

ヒト化およびディスプレー技術

ヒト抗体の作製に関して前で論じたように、低い免疫原性を有する抗体を生成する、幾つかの利点が存在する。ある程度までは、適切なライブラリーを使用するヒト化の技法およびディスプレー技術と共に、これを行うことができる。ネズミ抗体、または他種由來の抗体を、当分野でよく知られている技法を使用して、ヒト化または靈長類化することができることが理解されよう。例えば、WinterおよびHarris、Immunol Today 14:43~46(1993)、およびWright他、Crit. Reviews in Immunol. 12:125~168(1992)を参照のこと。当該の抗体を組換えDNA技法によって遺伝子工学処理して、CH1、CH2、CH3、ヒンジドメイン、および/またはフレームワークドメインを、対応するヒト配列に置換することができる(WO 92/02190、ならびに米国特許第5,530,101号、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,693,792号、米国特許第5,714,350号、および米国特許第5,777,085号を参照のこと)。さらに、キメラ免疫グロブリン遺伝子を構築するためのIg cDNAの使用が、当分野で知られている(Liu他、P.N.A.S 84:3439(1987)およびJ. Immunol. 139:3521(1987))。mRNAは、抗体を生成するハイブリドーマまたは他の細胞から単離し、これを使用してcDNAを生成する。当該のcDNAは、特異的なプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって增幅させることができる(米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,202号)。あるいは、ライブラリーを作製し、スクリーニングして当該の配列を単離する。抗体の可変領域をコードするDNA配列を、次いでヒト定常領域配列と融合させる。ヒト定常領域遺伝子の配列は、Kabat他、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、N.I.H. publication no. 91~3242(1991)中で見ることができる。ヒトC領域遺伝子は、知られているクローンから容易に入手可能である。アイソタイプの選択は、補体固定、または抗体依存性の細胞の細胞毒性の活性などの、所望のエフェクター機能によって導かれる。好ましいアイソタイプは、IgG1、IgG3およびIgG4である。ヒト軽鎖定常領域のいずれか、またはを使用することができる。キメラ、ヒト化抗体を、従来的方法によって次いで発現させる。

【0092】

Fv、F(ab')₂およびFabなどの抗体断片は、例えばプロテアーゼまたは化学的切断による、完全なタンパク質の切断によって調製することができる。あるいは、切斷型遺伝子を設計する。例えば、F(ab')₂断片の一部分をコードするキメラ遺伝子は、CH1ドメインおよびH鎖のヒンジ領域、次に翻訳終了コドンをコードするDNA配列を含み、切斷型分子を生成すると思われる。

【0093】

HおよびL J領域のコンセンサス配列を使用して、プライマーとして使用するためのオリゴヌクレオチドを設計し、V領域セグメントとヒトC領域セグメントの二次的結合用のJ領域に、有用な制限部位を導入することができる。C領域cDNAを部位特異的突然変異誘発によって改変して、ヒト配列中の同様の位置に制限部位に配置することができる。

【0094】

10

20

30

40

50

発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、YAC、EBV由来のエピソームなどがある。好都合なベクターは、任意のVHまたはVL配列を容易に挿入および発現することができるよう遺伝子工学処理された適切な制限部位を有する、機能的に完全なヒトCHまたはCL免疫グロブリン配列をコードするベクターである。このようなベクターでは、スプライシングは通常、挿入されたJ領域中のスプライスドナー部位とヒトC領域の前にあるスプライスアクセプター部位の間、およびヒトCHエクソン中に存在するスプライス領域でも起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域下流の本来の染色体部位で起こる。生成するキメラ抗体は、レトロウイルスLTR、例えばSV-40初期プロモーター(Okayama他、Mol. Cell. Bio. 3:280(1983))、ラウス肉腫ウイルスLTR(Gorman他、P.N.A.S. 79:6777(1982))、およびモロニーネズミ白血病ウイルスLTR(Grosschedl他、Cell 41:885(1985))を含めた、任意の強力なプロモーターと接合させることができる。さらに、理解されるように、本来のIgプロモーターなどを使用することができる。

【0095】

さらに、ヒト抗体または他種由来の抗体を、ファージディスプレー、レトロウイルスディスプレー、リボソームディスプレーを非限定的に含めたディスプレー型技術、および当分野でよく知られている技法を使用する他の技法によって作製することができ、生成した分子には、親和性熟成などのさらなる熟成を施すことができる。なぜならこのような技法は、当分野でよく知られているからである。WrightおよびHarris、上記、HanesおよびPlutchau、PNAS USA 94:4937～4942(1997)(リボソームディスプレー)、ParmleyおよびSmith、Gene 73:305～318(1988)(ファージディスプレー)、Scott、TIBS 17:241～245(1992)、Cwirka他、PNAS USA 87:6378～6382(1990)、Russel他、Nucl. Acids Res. 21:1081～1085(1993)、Hoganboom他、Immunol. Reviews 130:43～68(1992)、ChiswellおよびMcCafferty、TIBTECH 10:80～84(1992)、および米国特許第5,733,743号。ディスプレー技術を使用して、ヒトではない抗体を生成する場合、そのような抗体は前に記載したようにヒト化させることができる。

【0096】

これらの技法を使用して、MCP-1発現細胞、MCP-1自体、幾つかの形のMCP-1、そのエピトープまたはペプチド、およびそのための発現ライブラリーに対する、抗体を作製することができ(例えば、米国特許第5,703,057号を参照のこと)、抗体は後に、前に記載した活性に関して、前に記載したのと同様にスクリーニングすることができる。

【0097】

抗体の調製

本発明の抗体は、以下に記載するXenoMouse(登録商標)技術を使用することによって調製した。したがって、このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を生成することができ、ネズミ免疫グロブリン分子および抗体の生成に欠陥がある。同じことを実施するために使用される技術は、本明細書の背景技術で開示した特許、出願、および参考文献中に開示されている。しかしながら、特に、マウスおよびそれに由来する抗体のトランジェニック生成の好ましい実施形態は、1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、および1998年6月11日に公開された国際特許出願Nos. WO98/24893、および2000年12月21日に公開されたWO00/76310中に開示されている。Mendez他、Nature Genetics 15:146～156(1997)も参照のこと。

【0098】

本明細書に記載する抗体は、ヒトMCP-1に対する中和高親和性抗体である。さらに、幾つかの実施形態では、抗体はラットMCP-1と交差反応する。幾つかの異なる方法が、ヒトMCP-1のN末端に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を作製するために、歴史的に使用されてきている。これらの手法は、完全長ヒトMCP-1(hMCP-1)またはウシMCP-1(bMCP-1)(Vieira他、Braz. J. Med. Biol. Res. 21:1005～1011(1988))、ヒトMCP-1の合成ペプチド(1～34または1～37)(Visser他、Acta Endocrinol. 90:90～102(1979))；Logue他、J. Immunol. Methods 137:159～66(1991))、およびhMCP-1(1～10)、hMCP-1(9～18)およびhMCP-1(24～37)の多重抗原ペプチド(MAP)を用いた免疫化を含んでいる(Magerlein他、Drug Re

10

20

30

40

50

s.48:783～87(1998))。これらの手法によって、ヒト治療に適した抗体が生成されることはなかった(治療基準に関する本明細書の「治療投与および配合」という表題の項を参照のこと)。hMCP-1に対する高親和性抗体は、ペプチドに対するB細胞の寛容性のために、作製するのが困難である。しかしながら、Bradwell他(1999)は、ヒトMCP-1(1～34)とウシMCP-1(1～34)MAPの混合物、次にhMCP-1(51～84)とbMCP-1(51～86)を標的とするヒトMAPおよびウシMAPの混合物を用いた免疫化が、手術不能な副甲状腺腫瘍を有するヒト患者において、MCP-1に対するB細胞の寛容性を害する際に、有効であったことを実証している。

【0099】

本明細書に記載する手法を設計して、hMCP-1に対するB細胞の寛容性を克服し、ならびに治療および診断用途に適した完全ヒトモノクローナル抗体を生成した。XenoMouse(登録商標)動物を、MCP-1(hMCP-1(1～34)およびrMCP-1(1～34))の合成ペプチドを用いて免疫した。なぜなら、合成ペプチドは、内因性ヒトMCP-1に特異的な抗体を作製するために、首尾よく使用されてきているからである(Visser他、(1979))。さらに、ネズミMCP-1のN末端は、ヒトMCP-1(85%同一)およびラットMCP-1(91%)と共に充分保存されているので、ペプチドの組合せを、分子模倣によってネズミMCP-1に対するB細胞の寛容性を害するための免疫原として使用し、それによって高親和性ヒト抗ヒトMCP-1抗体の作製が可能となった。これらのペプチドはいずれもキーホールリンペットヘモシアニンと結合しており、フロイントの完全アジュvantまたはフロイントの不完全アジュvantにこれらを乳濁させて、これらのタンパク質の免疫原性を増大させた。

【0100】

免疫化の後、リンパ球細胞(B細胞など)を、抗体を発現したマウスから回収し、このような回収した細胞系を骨髄型細胞系と融合させて、不死ハイブリドーマ細胞系を調製した。このようなハイブリドーマ細胞系をスクリーニングおよび選択して、当該の抗原に特異的な抗体を生成した、ハイブリドーマ細胞系を同定した。本明細書では、MCP-1に特異的な抗体を生成する多数のハイブリドーマ細胞系の生成を記載する。さらに、このような抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の分析を含めて、このような細胞系によって生成される抗体の特徴を与える。

【0101】

本発明の幾つかの実施形態は、MCP-1に特異的な抗体を生成する多数のハイブリドーマ細胞系の生成を与える。他の実施形態は、MCP-2、MCP-3、およびMCP-4を含めた他のMCP-1ファミリーのメンバーと結合し、その活性を中和する抗体に関する。上清もMCP-1の断片に対する免疫反応性についてスクリーニングして、関連ヒトケモカイン、ならびにラットMCP-1およびマウスのMCP-1オロソログ、JEに対する、異なる抗体のエピトープをさらにマッピングして、種の交差反応性を決定する。他の実施形態は、このような抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の分析を含めて、このような細胞系によって生成される抗体の特徴を与える。

【0102】

あるいは、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製する代わりに、B細胞を直接アッセイすることができる。例えば、CD19+B細胞を過免疫XenoMouse(登録商標)マウスから単離することができ、増殖させ、抗体分泌プラズマ細胞に分化させることが可能である。細胞上清由来の抗体を、MCP-1免疫原に対する反応性について、次いでELISAによってスクリーニングする。上清もMCP-1の断片に対する免疫反応性についてスクリーニングして、関連ヒトケモカイン、ならびにラットMCP-1およびマウスのMCP-1オロソログ、JEに対する、異なる抗体のエピトープをさらにマッピングして、種の交差反応性を決定する。次に、所望の特異性を有する抗体を分泌する一種のプラズマ細胞を、MCP-1特異的な溶血プランクアッセイ(Babcock他、Proc.Natl..Acad.Sci.USA、93:7843～7848(1996))を使用して単離する。溶解対象の細胞は、MCP-1抗原でコーティングされた、ヒツジ赤血球細胞(SRBC)であることが好ましい。当該の免疫グロブリンおよび補体を分泌するプラズマ細胞を含むB細胞培養物の存在下では、プランクの形成は、当該のプラズマ細胞周辺のヒツジ赤血球細胞の、特異的なMCP-1仲介の溶解を示す。プランク中心の一一種の抗原特異的プラ

10

20

30

40

50

ズマ細胞を単離することができ、抗体の特異性をコードする遺伝情報を、その一種のプラズマ細胞から単離する。逆転写PCRを使用して、抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードするDNAを、クローニングすることができる。次いでこのようなクローニングしたDNAを、適切な発現ベクター、好ましくはpcDNAなどのベクターカセット、より好ましくは免疫グロブリン重鎖および軽鎖の定常ドメインを含むこのようなpcDNAベクター中にさらに挿入することができる。次いで作製したベクターを、宿主細胞、好ましくはCHO細胞中にトランスフェクトし、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅用に適切に改変した、従来の栄養培地で培養することができる。MCP-1に特異的な抗体を生成する、多数の一種のプラズマ細胞の単離は、以下に記載する。さらに、抗MCP-1抗体の特異性をコードする遺伝物質を単離し、次いで宿主細胞にトランスフェクトすることができる適切な発現ベクターに導入することができる。

【0103】

一般に、融合ハイブリドーマにより生成された抗体は、ヒトIgG2重鎖、および完全ヒトまたは軽鎖であった。幾つかの実施形態では、抗体はヒトIgG4重鎖およびIgG2重鎖を有する。抗体は、IgG1を含めた他のヒトアイソタイプであってもよい。固相および溶液相によって測定すると、抗体は高い親和性を有しており、典型的には約 10^{-6} ～約 $10^{-12}M$ 以下のKDを有していた。少なくとも $10^{-11}M$ のKDを有する抗体が、MCP-1の活性を阻害するためには嬉しい。

【0104】

抗MCP-1抗体の治療有用性に対する親和性の重要性に関しては、抗MCP-1抗体を例えれば組換えによって作製し、結合親和性に関してこのような抗体を評価することができることは理解されよう。使用することができる1つの手法は、前に記載したように調製し、MCP-1に対する良い親和性を有することが見出された抗体から重鎖cDNAを採取し、前に記載したように調製しMCP-1に対する良い親和性を有することも見出された、第2の抗体由来の軽鎖cDNAと、その重鎖cDNAを組み合わせて、第3の抗体を生成させることである。生成した第3の抗体の親和性は、本明細書に記載するように測定することができ、望ましい解離定数を有する抗体を単離し特徴付けすることができる。あるいは、前に記載した任意の抗体の軽鎖を、重鎖の作製を手助けするためのツールとして使用することができ、重鎖を軽鎖と対にして、MCP-1に関する高い親和性を示し、あるいは逆も然りであろう。このライブラリー中のこれらの重鎖可変領域は、非投薬動物から単離することができるか、過免疫動物から単離することができるか、CDR領域が異なる可変重鎖配列を含むライブラリーから人工的に作製することができるか、あるいは任意の重鎖可変領域遺伝子のCDR領域内の多様性を生み出す任意の他の方法(ランダムまたは部位特異的突然変異誘発など)によって、作製することができると思われる。これらのCDR領域、特にCDR3は、元の抗体と最初に対にした重鎖とは、著しく異なる長さまたは配列同一性である可能性がある。次いで生成したライブラリーを、MCP-1との高い親和結合性に関してスクリーニングして、元の抗体と同様の性質(高親和性および中和性)を有する、治療上関連のある抗体分子を作製することができると思われる。重鎖または重鎖可変領域を使用する同様のプロセスを使用して、独特な軽鎖可変領域を有する、治療上関連のある抗体分子を作製することができる。さらに、したがって新規の重鎖可変領域または軽鎖可変領域を前に記載したのと同様の方式で使用して、新規の軽鎖可変領域または重鎖可変領域を同定することができ、これによって新規の抗体分子を作製することができる。

【0105】

使用することができる他の組合せ手法は、本明細書に記載する本発明の抗体、特に相補性決定領域(CDR)中で使用されることが実証されている、生殖系の重鎖および/または軽鎖に、突然変異誘発を行うことである。生成した抗体の親和性は、本明細書に記載するのと同様に測定することができ、望ましい解離定数を有する抗体を単離し特徴付けすることができる。好ましい結合剤を選択することによって、同じものをコードする1つまたは複数の配列を使用して、前に記載したのと同様の組換え抗体を作製することができる。オリゴヌクレオチドの突然変異誘発を行う適切な方法は当業者に知られており、例えば重亜硫酸

10

20

30

40

50

ナトリウムを用いた化学的突然変異誘発、酵素の取り込み誤り、および放射線への暴露を含む。本明細書に記載する本発明は、突然変異誘発によって生成されようとも任意の他の手段によって生成されようとも、本明細書で明確に述べる抗体と本明細書で定義する実質的な同一性を有する抗体を含むことが理解されよう。さらに、本明細書で明確に述べる抗体において作製した、本明細書で定義する、保存型または非保存型アミノ酸置換基を有する抗体は、本明細書に記載する本発明の実施形態中に含まれる。

【0106】

使用することができる他の組合せ手法は、他の可変領域遺伝子由来のフレームワーク領域の概念で前に記載した、抗体のCDR領域、特にCDR3を発現させることである。例えば、1つの抗MCP-1抗体の重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3は、他の重鎖可変遺伝子のフレームワーク領域の概念で発現させることができるとと思われる。同様に、抗MCP-1抗体の軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3は、他の軽鎖可変遺伝子のフレームワーク領域の概念で、発現させることができるとと思われる。さらに、これらのCDR領域の生殖系配列は、他の重鎖または軽鎖可変領域遺伝子の概念で、発現させることができるとと思われる。生成した抗体は、特異性および親和性に関してアッセイすることができ、新規の抗体分子を作製することができる。

【0107】

理解されるように、本明細書に記載する本発明に従い調製した抗体は、さまざまな細胞系で発現させることができる。特定の抗体をコードする配列を、適切な哺乳動物宿主細胞の形質転換用に使用することができる。形質転換は、例えばウイルス中(あるいはウイルスベクター中の)ポリヌクレオチドのパッケージ化、およびウイルス(またはベクター)を用いた宿主細胞の形質導入を含めた、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の知られている方法によるものであっても、あるいは米国特許第4,399,216号、米国特許第4,912,040号、米国特許第4,740,461号および米国特許第4,959,455号により例示される、当分野で知られているトランスフェクション手順によるものであってよい。使用する形質転換手順は、形質転換する宿主に依存する。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は当分野でよく知られており、デキストラン仲介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン仲介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリポソーム被包、およびDNAの核への直接的なマイクロインジェクションを含む。

【0108】

発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は当分野でよく知られており、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えばHep G2)、および幾つかの他の細胞系だけには限られないがこれらを含めた、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能なもののがある。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有し、構成的MCP-1結合性を有する抗体を生成するかを判定することによって選択する。

【0109】

抗体治療に関する他の規準

本明細書で論じるように、MCP-1抗体の機能は、その作業形態の少なくとも一部分に重要なようである。本発明の抗MCP-1抗体は、補体依存性細胞毒性(CDC)および抗体依存性細胞毒性(ADCC)を含めた、エフェクター機能を可能にすることができます。以下の:ネズミIgM、ネズミIgG2a、ネズミIgG2b、ネズミIgG3、ヒトIgM、ヒトIgG1、およびヒトIgG3を非限定的に含めた、同じことができる幾つかのアイソタイプの抗体が存在する。作製される抗体は最初は必ずしもこのようなアイソタイプを有していないが、作製される抗体は任意のアイソタイプを有することができ、当分野でよく知られている従来の技法を後に使用することによって、抗体のアイソタイプを変更することは理解されよう。このような技法には特に、直接的な組換え技法の使用(例えば、米国特許第4,816,397号および米国特許第6,331,415号を参照)、細胞-細胞融合技法(例えば、米国特許第5,916,771号および米国特許第6,207,418号を参照)がある。

10

20

30

40

50

【0110】

細胞-細胞融合技法では、任意の所望のアイソタイプを有する重鎖を有するミエローマまたは他の細胞系を調製し、軽鎖を有する他のミエローマまたは他の細胞系を調製する。このような細胞は後に融合させることができ、完全な抗体を発現する細胞系を単離することができる。

【0111】

例えば、本明細書で論じるMCP-1抗体は、ヒト抗MCP-1 IgG2およびIgG4抗体である。このような抗体がMCP-1分子との望ましい結合を有する場合、同じ可変領域(抗体の特異性およびある程度の抗体親和性を定義する)を保ちながら、抗体は容易にアイソタイプを変更して、ヒトIgM、ヒトIgG1、またはヒトIgG3、IgA1またはIgGA2アイソタイプを作製することができると思われる。したがって、このような分子は、補体を固定しCDCに関与することができると思われる。10

【0112】

したがって、前に論じた望ましい「構造」特性に見合う抗体候補が作製されるので、アイソタイプ変更によって少なくともある程度の望ましい「機能」特性を有する抗体を一般に提供することができる。

【0113】

エピトープマッピング

イムノプロット分析

本明細書に記載する抗体とMCP-1の結合は、幾つかの方法によって調べることができる。例えば、MCP-1にSDS-PAGEを施すことができ、イムノプロッティングによって分析することができる。SDS-PAGEは、還元剤の不在下または存在下で行うことができる。このような化学的修飾によって、システイン残基のメチル化がもたらされる可能性がある。したがって、本明細書に記載する抗MCP-1抗体が、MCP-1上の線状エピトープと結合するかどうかを判定することができる。20

【0114】

表面増強レーザー脱離/イオン化(SELDI)

本明細書に記載するMCP-1抗体のエピトープのエピトープマッピングは、SELDIを使用して行うこともできる。SELDI Protein Chip(登録商標)アレイを使用して、タンパク質-タンパク質相互作用の部位を画定する。詳細には抗原を、最初のインキュベーションおよび洗浄によって、Protein Chipアレイ表面に共有結合により固定された抗体で捕捉する。結合した抗原はレーザー誘起脱離法によって検出することができ、直接分析してそれらの質量を測定することができる。結合する抗原のこのような断片は、タンパク質の「エピトープ」と呼ばれる。30

【0115】

SELDI法によって、複合分子組成物中の個々の要素を直接検出することができ、迅速、高感度かつ測定可能な方法で、他の要素に対して定量的にマッピングすることができる。SELDIは異なる多数の表面化学物質を使用して、レーザー誘起脱離法による検出用に、多数の個々のタンパク質分子を捕捉し提示する。SELDI法の成功は、表面(「チップ」)における異なる技術にそれぞれ依存する、多数の機能の縮小および統合によって部分的に定義される。SELDI BioChipsおよび他の型のSELDIプローブは表面「増強」されており、その結果それらは、評価する個々の標的分子(例えばタンパク質)または分子群の、捕捉、精製(分離)、提示、検出、および特徴付けにおいて、活性のある関係物質となっている。40

【0116】

本来のサンプルのみを載せた、1つのSELDIタンパク質BioChipは、数千回読み取ることができます。LumiCyteからのSELDIタンパク質BioChipは、1平方センチメートル当たり、10,000ものアクセス可能なタンパク質ドッキング位置を保持している。それぞれの位置によって、多数の個々のタンパク質の存在を明らかにすることができます。それぞれの位置からのタンパク質組成の情報を比較し、独自の情報セットを組み合わせると、生成する組成地図によって、数セットの特徴を有する像が明らかになり、それらをまとめて使用して、特50

異的のパターンすなわち分子の「フィンガープリント」を定義する。異なるフィンガープリントは、さまざまな健康段階、適切な治療剤の投与と関係がある疾患の発症、または疾患の退行と関係がある可能性がある。

【0117】

SELDI法は、4つの部分にさらに詳細に記載することができる。最初に、1つまたは複数の当該のタンパク質を、サンプル調製せずサンプル標識なしで、元の原料物質から直接Protein Chip Array上に捕捉するか、あるいは「ドッキング」させる。第2のステップでは、「シグナル対ノイズ」比を、化学および生物分子「ノイズ」を低下させることによって増大させる。このような「ノイズ」は、望ましくない物質を洗浄除去することによって、チップ上に標的を選択的に保持することによって低下する。さらに、捕捉する1つまたは複数の標的タンパク質を、迅速で高感度のレーザー誘起法(SELDI)によって読み取り、これによって標的についての直接的な情報(分子量)が得られる。最後に、アレイ中の任意の1つまたは複数の位置における標的タンパク質を、1つまたは複数のチップ上の結合または修飾反応を行って、タンパク質の構造および機能を特徴付けすることによって、in situで特徴付けすることができる。10

【0118】

ファージディスプレー

本明細書に記載する抗MCP-1抗体のエピトープは、纖維状ファージで示されるランダムなペプチド12量体のコンビナトリアルライブラリー(New England Biolabs)に、Protein Chip Arrayを曝すことによって決定することができる。20

【0119】

ファージディスプレーでは、ペプチドがバクテリオファージのコートタンパク質との融合体として発現され、ビリオンの表面上に融合タンパク質の表示がもたらされる、選択的技法を記載する。ファージディスプレーしたペプチドのライブラリーを、標的でコーティングしたプレートまたはチューブを用いてインキュベーションし、非結合ファージを洗浄除去し、特異的に結合したファージを溶出することによって、選別を行う。次いで溶出させたファージを、追加的な結合および增幅サイクルによって増幅させ採取し、結合配列用の集合を増大させる。3または4ラウンドの後、個々のクローンの結合を、抗体をコーティングしたウエル上で行うファージELISAアッセイにより結合に関してさらに試験し、陽性クローンの特異的なDNAの塩基配列決定によって特徴付けする。30

【0120】

本明細書に記載する抗MCP-1抗体に対する、複数ラウンドのこのような選別の後、結合したファージを溶出させ、結合したペプチドの同定および特徴付けするための、さらなる試験を施すことができる。

【0121】

本発明のモノクローナル抗体は、MCP-1のコアドメイン中の重要な残基と結合することが示された。試験した中和モノクローナル抗体は、ヒトMCP-1中の2つの機能的に重要な部位が異なり、受容体との結合に必要とされることが以前に示された2つの残基と関係があった。1つの部位が試験したすべての抗体によって認識され、抗体はMCP-1との結合に関して受容体タンパク質と競合し、Arg24を含んでいた。第2の部位は、立体配座エピトープと結合した6抗体のグループによって検出され、それらの結合部位は、C11とC36の間のジスルフィド結合によってN末端の非常に近くに保持される、Arg24およびLys35を含んでいたようであった。40

【0122】

本明細書に記載するMCP-1変異体は、生物学的活性、物理的な受容体結合性および構造無欠性について以前に分析されており(Jarnagin他、(1999)Biochemistry 38:16167 ~ 16177; Hemmerich他、(1999)Biochemistry 38:13013 ~ 13025)、以下に記載するように抗体の結合エピトープを決定する際の、貴重なツールを与えてきている。

【0123】

抗MCP-1抗体3.11.1は立体配座エピトープを認識し、重鎖および軽鎖のその独特の配列

50

、およびMCP-2、MCP-3およびMCP-4などのMCPファミリーの他のメンバーと交差反応し、それらを交差中和するその能力が、他の抗体と異なる。突然変異誘発の実験により示されるように、mAb3.11.1の結合部位は、K35Aによる変化ではなくR24Aの変化によって影響を受けた。これらの結果はチップ上のLyc-C、SELDIを用いた消化の結果によって確認され、これによって、結合エピトープがMCP-1の残基20～35の間に存在することが示される。

【0124】

3.11.1のエピトープが残基20～35の間に存在するという決定は、K35ではなくR24が、MCPファミリーの他のメンバー、特にMCP-2、MCP-3およびMCP-4中で保存されたことを示す、配列アライメントによっても指示された。膜上で合成したSPOTペプチド(Sigma-Genosys、The Woodlands、Texas)による結合分析によって、線状エピトープを有する少なくとも8個のmAbの結合部位が、残基20～25と関係があり、R24を含んでいたことが明らかになった。MCP-1上の線状エピトープと結合したすべてのmAbに関する、これらの結合試験の結果の類似性、およびさまざまな遺伝子構造間の有意な相同性を考慮すると、すべての抗体がこの中和エピトープと結合するようである。10

【0125】

R24およびK35周囲のエピトープ群によって、全36個の抗体の中和活性が説明される。MCP-1上で認識されるエピトープは、Pro9までのN末端残基には広がらないようである。この残基は、結合親和性ではなく受容体シグナルに影響を与えるようである。

【0126】

診断用途20

本明細書に記載する本発明の実施形態に従い調製した抗体は、アッセイ、特にin vitroでの診断アッセイ、例えば患者サンプル中のMCP-1および全てのMCP-1ファミリーのメンバーのレベルを測定する際に、使用するのに有用である。患者サンプルは、例えば体液、好ましくは血液、より好ましくは血清、関節液、組織溶解物、および疾患組織から調製した抽出物であってよい。診断アッセイの例は、例えばヒト血清、関節液および組織溶解物中の、MCPファミリーのケモカインのレベルを測定することを含む。特異的なMCPファミリーのメンバーのレベルの測定は、治療に対する患者の応答性の代替的措置として、および患者の疾患の重篤度を調べる方法として使用することができる。他の可溶性マーカーのレベルと比較して高いレベルのMCP-1は、炎症の存在を示すと思われる。患者サンプル中に存在するMCP-1抗原の濃度は、存在する抗原の量を具体的に測定する方法を使用して測定する。このような方法には、例えば本発明の抗体を、ポリマーマトリクスなどの不溶性マトリクス上に好都合に固定することができる、ELISA法がある。進行または治療のそれぞれの段階に関する、統計的に有意な結果をもたらす一連のサンプルを使用して、それぞれの疾患の段階に特徴的であるとみなすことができる、一定範囲の濃度の抗原を指定することができる。30

【0127】

試験中の被験体の炎症の程度を測定するため、あるいは治療行程に対する被験体の応答性を特徴付けするために、血液のサンプルを被験体から採取し、サンプル中に存在するMCP-1抗原の濃度を測定する。このように得た濃度を使用して、どの濃度範囲で値が低下するかを確認する。このように確認した範囲は、さまざまな群の診断被験体で確認した、進行の段階または治療の段階と相関関係があり、これによって試験中の被験体の段階が与えられる。40

【0128】

遺伝子の増幅および/または発現は、例えば、mRNAの転写を定量化するための従来のサザンプロットティング、ノーザンプロットティング(Thomas、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、77:5201～5205(1980))、ドットプロットティング(DNA分析)、またはin situハイブリダイゼーションによって、本明細書で提供する配列に基づいて適切に標識したプローブを使用して、サンプル中で直接測定することができる。あるいは、DNA二重らせん、RNA二重らせん、およびDNA-RNAハイブリッド二重らせんまたはDNA-タンパク質二重らせんを含めた、特定の二重らせんを認識することができる、抗体を使用することができる。したがって抗体を標

10

20

30

40

50

識することができ、アッセイを行うことができ、二重らせんが表面に結合し、したがって表面上に二重らせんが形成されることによって、二重らせんと結合した抗体の存在を検出することができる。

【0129】

例えば、抗体断片を含めた抗体を定性的あるいは定量的に使用して、MCP-1タンパク質の発現を検出することができる。前に示したように、抗体は検出可能な、例えば蛍光標識を備えることが好ましく、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光測定、または当分野で知られている他の技法によって、結合を調べることができる。増幅した遺伝子が細胞表面タンパク質、例えば増殖因子をコードする場合、これらの技法は特に適している。これらの結合アッセイは、当分野で知られているように行う。

10

【0130】

MCP-1タンパク質との抗体の結合のin situ検出は、例えば免疫蛍光顕微鏡検査または免疫電子顕微鏡検査によって行うことができる。この目的のために、組織試料を患者から除去し、好ましくは抗体を生物学的サンプルに重ねることによって、標識した抗体をそれに施す。この手順によって、試験する組織中のマーカー遺伝子産物の分布を決定することができる。広くさまざまな組織学的方法が、in situ検出用に容易に利用可能であることは、当業者には明らかであろう。

【0131】

差次的な遺伝子発現を定量化するための、最も感度が良く最も柔軟性のある定量法の1つはRT-PCRであり、これを使用して、薬剤処理有りまたは無しで、正常組織および腫瘍組織の異なるサンプル群中のmRNAレベルを比較し、遺伝子発現のパターンを特徴付けし、密接に関連したmRNA間を区別し、RNA構造を分析することができる。

20

【0132】

この方法の最初のステップは、標的サンプルからmRNAを単離することである。出発物質は典型的には、それぞれ疾患組織および対応する正常組織から単離した、完全なRNAである。したがってmRNAは、例えば同じ型の正常組織と比較するための疾患組織の、凍結または保管パラフィン包埋および固定(例えばホルマリン固定)サンプルから抽出することができる。mRNAを抽出するための方法は当分野でよく知られており、Ausubel他、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sons(1997)を含めた、分子生物学の標準的な教本中で開示されている。パラフィン包埋組織からRNAを抽出するための方法は、例えばRupp and Locker、Lab Invest.、56:A67(1987)、およびDe Andres他、BioTechniques、18:42044(1995)中で開示されている。特にRNAの単離は、Qiagenなどの市販品製造者からの精製キット、バッファーセットおよびプロテアーゼを、製造者の教示書に従い使用して行うことができる。例えば、培養中の細胞由来の完全なRNAを、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離することができる。組織サンプル由来の完全なRNAは、RNA Stat-60(Tel-Test)を使用して単離することができる。

30

【0133】

RNAはPCR用の錆型として働くことができないので、RT-PCRによる差次的遺伝子発現の分析の最初のステップは、RNA錆型のcDNAへの逆転写、次にPCR反応におけるその指數関数的増殖である。2つの最も一般的に使用される逆転写酵素は、トリ骨髓芽球症ウイルス逆転写酵素(AMV-RT)およびモロニーネズミ白血病ウイルス逆転写酵素(MMLV-RT)である。逆転写ステップは典型的には、発現概略の状況および目的に応じて、特異的プライマー、ランダムヘキサマー、またはオリゴ-dTプライマーを使用してプライマー処理する。例えば、抽出したRNAを、製造者の教示書に従いGeneAmp RNA PCRキット(Perkin Elmer、CA、USA)を使用して逆転写することができる。誘導したcDNAは、後のPCR反応における錆型として、次いで使用することができる。

40

【0134】

PCRのステップは、さまざまな熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼを使用することができるが、それは典型的には、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するが3'-5'エンドヌクレアーゼ活性を欠いている、TaqDNAポリメラーゼを使用する。したがって、TagManPCRは典型的に

50

は、TaqまたはTthポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性を使用して、その標的増幅産物と結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、同等の5'ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素を使用することができる。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCR反応の典型的な増幅産物を作製する。第3のオリゴヌクレオチド、またはプローブを設計して、2つのPCRプライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出する。プローブはTaqDNAポリメラーゼ酵素によって伸長せず、レポーター蛍光色素および蛍光消光色素で標識される。レポーター色素からの任意のレーザー誘起発光は、2つの色素が近くに一緒に位置し、それらがプローブ上にあるときは、消光色素によって消光させる。増幅反応中に、TaqDNAポリメラーゼ酵素は、鋳型依存式にプローブを切断する。生成したプローブ断片は溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルには、第2の発色団の消光効果がない。レポーター色素の一分子が合成されるそれぞれの新しい分子に遊離し、非消光レポーター色素を検出することは、データの定量的解釈の基盤となる。

【0135】

TagManRT-PCRは、例えばABI PRIZM 7700TM Sequence Detection SystemTM(PerkinElmer-Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)、またはLightcycler(Roche Molecular Biochemicals、Mannheim、Germany)などの市販の機器を使用して行うことができる。好ましい実施形態では、5'ヌクレアーゼ手順を、ABI PRIZM 7700TM Sequence Detection System TMなどの、リアルタイム定量PCR装置で行う。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)、カメラおよびコンピュータからなる。このシステムは、サーモサイクラーの96ウエルフォーマットで、サンプルを増幅させる。増幅中に、レーザー誘起の蛍光シグナルを、全96ウエルに関してファイバーオプティックケーブルによってリアルタイムで回収し、CCDで検出する。このシステムは、装置を動かしデータを分析するためのソフトウェアを含む。

【0136】

5'-ヌクレアーゼアッセイのデータは、Ct、すなわち閾値サイクルとして最初は表す。前に論じたように、蛍光性の値は毎サイクル中記録し、増幅反応中のその地点で増幅された生成物の量を表す。蛍光シグナルが統計的に有意であるとして最初に記録される地点が、閾値サイクル(Ct)である。Ct値は、疾患組織由来の細胞中でのRNA発現と正常細胞由来のそれを比較したときの、核酸サンプル中の特定の標的配列の開始コピーの相対数の、定量的測定値として使用する。

【0137】

誤りおよびサンプル毎の変動の影響を最小限にするために、RT-PCRは通常、内標準を使用して行われる。理想的な内標準は、異なる組織間において一定レベルで発現され、実験処置によって影響を受けない。遺伝子発現のパターンを標準化するために、最も頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ(GAPDH)および-アクチンのmRNAである。

【0138】

差次的な遺伝子発現も、マイクロアレイ技法を使用して、同定または確認することができる。この方法では、当該のヌクレオチド配列を、マイクロチップ基盤上でプレート状またはアレイ状にする。次いでアレイ状配列を、当該の細胞または組織由来の特異的なDNAプローブとハイブリダイズさせる。

【0139】

マイクロアレイ技法の具体的な実施形態では、cDNAクローンのPCR増幅させた挿入体を、高密度アレイの基盤に施す。少なくとも10,000のヌクレオチド配列を、基盤に施すことが好ましい。それぞれ10,000要素でマイクロチップに固定された、マイクロアレイ状の遺伝子は、厳密な条件下でのハイブリダイゼーションに適している。蛍光標識されたcDNAプローブは、当該の組織から抽出したRNAの逆転写による、蛍光ヌクレオチドの取り込みによって作製することができる。チップに施される標識されたcDNAプローブは、アレイ上のDNAのそれぞれのスポットと、選択的にハイブリダイズする。非特異的結合プローブを除去するための厳密な洗浄の後、共焦点レーザー顕微鏡によってチップを調べる。それぞれ

のアレイ状要素のハイブリダイゼーションの定量化によって、対応するmRNA量を評価することができる。二色蛍光によって、2つのRNA源から作製され、別々に標識されたcDNAプローブを、一対毎にハイブリダイズさせてアレイにする。それぞれの特定の遺伝子に対応する2つの源からの、転写産物の相対量は、したがって同時に測定される。小規模なハイブリダイゼーションによって、多数の遺伝子に関する発現パターンの、好都合かつ迅速な評価が与えられる。このような方法は、細胞当たり数個のコピーで発現される珍しい転写産物を検出するために必要とされる感度を有し、発現レベルの少なくとも約2倍の差異を再現的に検出することが示されてきている(Schena他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 93(20) L10 6-49)。核酸のハイブリダイゼーションの方法、およびマイクロアレイ技術は、当分野でよく知られている。

10

【0140】

MCP-1アゴニストおよびアンタゴニスト

本明細書に記載する本発明の実施形態は、MCP-1アゴニスト(模倣体)として、あるいはMCP-1アンタゴニストとして機能する、MCP-1タンパク質の変異体にも関する。MCP-1タンパク質の変異体は、突然変異誘発、例えば不連続な点突然変異、またはMCP-1タンパク質の切断によって作製することができる。MCP-1タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形のMCP-1タンパク質の生物学的活性と実質的に同じであるか、あるいはその一部分を保つことができる。MCP-1タンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形のMCP-1タンパク質の1つまたは複数の活性は、例えばMCP-1タンパク質を含む細胞シグナルカスケードの下流または上流要素と、競合的に結合させることによって阻害することができる。したがって、特異的な生物学的效果を、限られた機能の変異体を用いた治療によって誘導することができる。一実施形態では、天然に存在する形のタンパク質の生物学的活性の一部分を有する、変異体を用いた被験体の治療には、天然に存在する形のMCP-1タンパク質を用いた治療と比較して、被験体においてほとんど副作用がない。

20

【0141】

MCP-1アゴニスト(模倣体)として、あるいはMCP-1アンタゴニストとして機能する、MCP-1タンパク質の変異体は、タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニスト活性に関して、MCP-1タンパク質の突然変異体、例えば切断型突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。一実施形態では、MCP-1変異体の多彩なライブラリーを、核酸レベルでの組合せ突然変異誘発によって作製し、これは多彩な遺伝子ライブラリーによってコードされる。MCP-1変異体の多彩なライブラリーは、例えば合成オリゴヌクレオチドの混合物の遺伝子配列への酵素による連結によって生成することができ、したがって、縮重組の考えられるMCP-1配列が、個々のポリペプチドとして、あるいはまた、MCP-1配列の組をその中に含む一組の大きな融合タンパク質(例えばファージディスプレー用)として発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列から考えられるMCP-1変異体のライブラリーを生成するために使用することができる、さまざまな方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は自動式DNA合成装置で行うことができ、次いで合成した遺伝子を適切な発現ベクターに連結させる。縮重組の遺伝子を使用することによって、1つの混合物に、所望組の考えられるMCP-1変異体配列をコードする全ての配列を与えることができる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当分野で知られている(例えば、Narang、Tetrahedron 39:3(1983); Itakura他、Annu.Rev.Biochem.53:3 23(1984); Itakura他、Science 198:1056(1984); Ike他、Nucl.Acid.Res.11:477(1983)を参照)。

30

【0142】

他の治療剤の設計および作製

本明細書に記載する本発明の実施形態に従い、MCP-1に対して生成され本明細書で特徴付けされる抗体の活性に基づいて、抗体成分以外の他の治療用物理的療法の設計を助長する。このような物理的療法には、非限定的に、最新の抗体治療、例えば二重特異性抗体、免疫毒素、および放射標識治療など、ペプチド治療剤、遺伝子治療剤、特に細胞内発現抗体、アンチセンス治療剤、および小分子の作製がある。

40

50

【 0 1 4 3 】

最新の抗体治療剤の作製に関して、補体結合が望ましい性質である場合、例えば二重特異性抗体、免疫毒素、または放射標識を使用することによって、細胞殺傷に関する補体依存性を低下させることができる。

【 0 1 4 4 】

例えば二重特異性抗体に関しては、(i)1つがMCP-1に対する特異性を有し、他方が一緒に結合している第2の分子に対する特異性を有する2つの抗体、(ii) MCP-1に対して特異的な1つの鎖、および第2の分子に対して特異的な第2の鎖を有する単抗体、または(iii)MCP-1および他の分子に対する特異性を有する单鎖抗体を含む、二重特異性抗体を作製することができる。このような二重特異性抗体は、例えばよく知られている技法を使用して作製することができ、例えば(i)および(ii)に関しては、Fanger他、Immunol Methods 4:72~81(1994)、ならびにWrightおよびHarris、上記を参照し、(iii)に関しては、例えばTraunercker他、Int.J.Cancer(Suppl)7:51~52(1992)を参照のこと。それぞれの場合、第2の特異性を、CD16またはCD64(例えばDeo他、18:127(1997)を参照のこと)、またはCD89(例えばValerius他、Blood 90:4485~4492(1997)を参照のこと)を非限定的に含めた、重鎖活性化受容体に施すことができる。10

【 0 1 4 5 】

免疫毒素に関しては、当分野でよく知られている技法を使用し、抗体を改変して免疫毒素として作用させることができる。例えばVitetta Immunol Today 14:252(1993)を参照のこと。米国特許第5,194,594号も参照のこと。放射標識抗体の調製に関しては、このような改変型抗体は、当分野でよく知られている技法を使用して、容易に作製することもできる。例えばJunghans他、Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655~686(2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven(1996))中を参照のこと。米国特許第4,681,581号、米国特許第4,735,210号、米国特許第5,101,827号、米国特許第5,102,990(RE35,500)号、米国特許第5,648,471号、および米国特許第5,697,902号も参照のこと。20

【 0 1 4 6 】**治療的投与および配合**

本明細書に記載する本発明に従い調製した、生物学的活性がある抗MCP-1抗体を、滅菌薬剤の調製または配合において使用して、疾患および炎症組織で生成されるMCP-1の活性を中和することができ、これによって単核細胞の組織へのさらなる浸潤を防ぐことができる。このような疾患および炎症組織は、乳癌、卵巣癌および肺癌を含めた多くの型のヒトの癌中に、あるいは糸球体腎炎、アテローム性動脈硬化症、および多発性硬化症などの状態で存在する。本発明の生物学的活性がある抗MCP-1抗体は単独で、あるいは他の治療物質と組み合わせて使用することができる。癌用に、抗MCP-1抗体を、タキソール、ドキソルビシン、シス-プラチナ、5-フルオロウラシルなどの従来式の化学療法剤、および血管新生プロセスの他の新規の阻害剤と組み合わせることができる。炎症性疾患を治療するために、MCP-1抗体を、病状に貢献している他のサイトカインおよびケモカインに対するステロイドまたは抗体と、組み合わせることができる。30

【 0 1 4 7 】

in vivo投与用に使用するとき、抗体配合物は滅菌済みであってよい。凍結乾燥および還元の前後に、滅菌濾過膜を介した濾過によって、これを容易に行うことができる。抗体は通常は凍結乾燥形で、あるいは溶液中に保存される。治療用抗体組成物は一般に、滅菌済みアクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈注射溶液用バッグまたはバイアル中に置かれる。40

【 0 1 4 8 】

抗体投与の経路は、知られている方法、例えば静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、髄腔内、吸入または病巣内経路による、あるいは以下に示す徐放システムによる、注射または注入に従うものであってよい。抗体は注入によって、あるいはボーラス注射によって、連続的に投与することが好ましい。

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

50

治療上使用される抗体の有効量は、例えば治療目的、投与の経路、および患者の状態に依存するであろう。したがって、必要に応じて用量を滴定し投与の経路を変えて、最適な治療効果を得ることがセラピストには必要であろう。典型的には、臨床医は、所望の効果を得る用量に達するまで、治療抗体を投与するであろう。この治療の進行は、従来のアッセイによって、あるいは本明細書に記載するアッセイによって、容易に調べることができる。

【0150】

本発明の抗体は、薬剤として許容可能な担体との混合物として調製することができる。この治療用組成物は静脈内に、あるいは鼻または肺を介して、好ましくは液体または粉末状エアロゾル(凍結乾燥)として投与することができる。望むならば非経口的あるいは皮下に、組成物を投与することもできる。全身に投与するとき、治療用組成物は滅菌済みで、発熱物質を含まず、pH、等張性、および安定性に関して当然の事項を有する非経口的に許容可能な溶液中に溶けていなければならない。これらの条件は、当業者には知られている。簡潔には、本明細書に記載する本発明の実施形態の、化合物の用量配合物は、望ましい純度を有する化合物と、生理的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤を混合することによって、保存または投与用に調製する。このような物質は、使用する用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、TRIS HCl、リン酸、クエン酸、酢酸、および他の有機酸塩などのバッファー; アスコルビン酸などの抗酸化剤; ポリアルギニンなどの低分子量(約10残基未満)ペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質; ポリビニルピロリジノンなどの親水性ポリマー; グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニンなどのアミノ酸; 单糖、二糖、およびセルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含めた他の炭水化物; EDTAなどのキレート剤; マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール; ナトリウムなどの対イオンおよび/またはTWEEN、PLURONICSまたはポリエチレングリコールなどの非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0151】

注射用の滅菌済み組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences(18th ed、Mack Publishing Company、Easton、PA(1990))中に記載されたのと同様の、従来の薬剤慣習に従って配合することができる。例えば、水、またはゴマ、ピーナッツ、または綿花油などの天然に存在する植物油などの媒体、あるいはオレイン酸エチルなどの合成脂質媒体中に、活性化合物を溶解または懸濁させることができ、望ましい可能性がある。容認されている薬剤慣習に従って、バッファー、防腐剤、抗酸化剤などを取り込ませることができる。

30

【0152】

徐放性調製物の適切な例には、ポリペプチドを含む固体状疎水性ポリマーの半透過性マトリクスがあり、このマトリクスは、成形品、フィルムまたはマイクロカプセルの形である。徐放性マトリクスの例には、Langer他、J.Biomed Mater.Res.、15:167～277(1981)およびLanger、Chem.Tech.、12:98～105(1982)によって記載されたのと同様のポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidman他、Biopolymers、22:547～556(1983))、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langer他、上記)、LUPRON Depot(商標)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドから構成される注射可能なミクロスフェア)、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸(EP133,988)がある。

40

【0153】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日間で分子を放出することができる一方で、いくつかのヒドロゲルは、さらに短い時間周期でタンパク質を放出する。被包タンパク質が長時間身体中に留まると、37における湿気への露出の結果として、タンパク質が変性または凝集する可能性があり、生物学的活性の損失、および免疫原性の考えられる変化がもたらされる。関係する機構に応じて、タンパク質安定化の

50

ための妥当な戦略を考案することができる。例えば、凝集機構が、ジスルフィドの相互変化による分子間S-S結合形成であることが見出される場合、スルフィドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥させること、含水率を調節すること、適切な添加剤を使用すること、および特異的なポリマーマトリクス組成物を開発することによって、安定化を達成することができる。

【0154】

徐放性組成物は、リポソームに被包された本発明の抗体も含む。このような抗体を含むリポソームは、それ自体が知られている方法:米国特許第DE3,218,121号;Epstein他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、82:3688 ~ 3692(1985);Hwang他、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030 ~ 4034(1980);EP52,322;EP36,676;EP88,046;EP143,949;EP142,641;日本国特許出願83~11 8008;米国特許第4,485,045号および米国特許第4,544,545号;およびEP102,324によって調製される。抗体の用量は、疾患の重篤度およびタイプ、体重、性別、食事、投与の時間および経路、他の薬学的要因および他の関連する臨床的要因を含めた、薬剤の作用を変えることが知られているさまざまな要因を考慮に入れて、担当医により決定されるであろう。治療上有効な用量は、in vitroまたはin vivoでの方法によって決定することができる。

【0155】

所与の患者用の抗体配合物の用量は、疾患の重篤度およびタイプ、体重、性別、食事、投与の時間および経路、他の薬学的要因および他の関連する臨床的要因を含めた、薬剤の作用を変えることが知られているさまざまな要因を考慮に入れて、担当医により決定されるであろう。治療上有効な用量は、in vitroまたはin vivoでの方法によって決定することができる。

【0156】

治療上使用される本発明の抗体の有効量は、例えば治療目的、投与の経路、および患者の状態に依存するであろう。したがって、必要に応じて用量を滴定し投与の経路を変えて、最適な治療効果を得ることがセラピストには必要であろう。典型的な1日の用量は、前述の要因に応じて、約0.001mg/kgから100mg/kg以上の範囲である可能性がある。望ましい用量濃度は、0.001mg/kg、0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、55mg/kg、60mg/kg、65mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、85mg/kg、90mg/kg、95mg/kg、および100mg/kg以上を含む。典型的には、臨床医は、所望の効果を得る用量に達するまで、治療抗体を投与するであろう。この治療の進行は、従来のアッセイによって、あるいは本明細書に記載するのと同様に、容易に調べられる。

【実施例】

【0157】

行った実験および得られた結果を含めた以下の実施例は、例示目的のみで提供し、本明細書に記載する本発明の実施形態を制限するものとして解釈すべきではない。

【0158】

(実施例1)

MCP-1抗原の調製

これらの試験において抗原として使用したヒトMCP-1ペプチドは、以下のアミノ酸配列を有していた:

QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQ
KWVQDSMDHLDKQTQTPKT(配列番号149)

【0159】

このペプチドは、大腸菌において組換えによって発現させたものであり、Prepro Tech(Rocky Hill、NJ)から購入した。

【0160】

(実施例2)

抗MCP-1抗体

抗体の作製

10

20

30

40

50

ELISAによって採取するための動物の免疫化および選択。MCP-1に対するモノクローナル抗体を、XenoMouse(登録商標)マウス(XenoMouse(登録商標)系 XMG2、XMG4(3C-1系)を連続的に免疫することによって開発し、ハイブリッド系統を、表2に示すスケジュールに従い、XMG2とXMG4(3C-1系)マウス、Abgenix、Inc.(Fremont、CA)を交雑させることによって作製した。例えば、最初の免疫化は、TiterMax Goldと1:1v/vで混合した10 μgの抗原を用いたものであった。その後の追加抗原刺激は、発熱物質を含まないD-PBS中の100 μgのアルミニウムゲルと1:1v/vで混合した、5または10 μgの抗原を用いて行った。幾つかの追加抗原刺激は50%のTiterMax Goldを用いて、次にアルミニウムゲル中の10 μgのMCP-1抗原と1:1v/vで混合した、10 μgの抗原を3回注射することによって行い、次いでPBSに溶かした10 μgの抗原の最後の追加抗原刺激を行った。詳細には、それぞれのマウスを、皮下注射によってフットパッドで免疫した。動物は第0、4、7、10、14、18、27、31、35および42日に免疫した。以下に記載するように、動物を第13日と第26に採血して、採取選択用の血清を得た。

【0161】

【表2】

表2

グループ	系統	マウス数	最初の注射	第2の追加抗原刺激	第3の追加抗原刺激	第4の追加抗原刺激	採血	第5の追加抗原刺激	第6の追加抗原刺激
1	xmg2	7	10μg/ マウス	5μg// マウス	5μg/ マウス	5μg/ マウス		5μg/ マウス	5μg/ マウス
2	3C-1	7	10μg// マウス	5μg/ マウス	5μg/ マウス	5μg/ マウス		5μg/ マウス	5μg/ マウス
3	(3C-1) ×xmg2	7	10μg/ マウス	5μg/ マウス	5μg/ マウス	5μg/ マウス		5μg/ マウス	5μg/ マウス
			Titer Max	アルミニ ウムゲル	アルミニ ウムゲル	アルミニ ウムゲル		アルミニ ウムゲル	Titer Max
日数			0	4	7	10	13	14	18

表2続き

グループ	系統	マウス数	採血	第7の追加抗原刺激	第8の追加抗原刺激	第9の追加抗原刺激	第10の追加抗原刺激	融合
1	xmg2	7		10μg/ マウス	10μg/ マウス	10μg/ マウス	10μg/ マウス	
2	3C-1	7		10μg/ マウス	10μg/ マウス	10μg/ マウス	10μg/ マウス	
3	(3C-1)× xmg2	7		10μg/ マウス	10μg/ マウス	10μg/ マウス	10μg/ マウス	
				アルミニ ウムゲル	アルミニ ウムゲル	アルミニ ウムゲル	D-PBS	
日数			26	27	31	35	42	46

【0162】

同様に、他のXenoMouse(登録商標)マウス(XenoMouse(登録商標)系 XMG2およびXMG2L3)を、表3に示すスケジュールに従い、連続的に免疫した。

【0163】

10

20

30

40

【表3】

表3

グループ	系統	マウス数	最初の注射	第2の追加抗原刺激	第3の追加抗原刺激	第4の追加抗原刺激	採血	第5の追加抗原刺激	第6の追加抗原刺激
4	xmg2	4	10µg/マウス	10µg/マウス	10µg/マウス	10µg/マウス		10µg/マウス	10µg/マウス
5	xmg2L3	4	10µg/マウス	10µg/マウス	10µg/マウス	10µg/マウス		10µg/マウス	10µg/マウス
			TiterMax	アルミニウムゲル	アルミニウムゲル	アルミニウムゲル		アルミニウムゲル	アルミニウムゲル
日数			0	3	6	10	13	14	17

10

表3続き

グループ	系統	マウス数	融合
4	xmg2	4	
5	xmg2L3	4	
日数			21

20

【0164】

抗MCP-1抗体の力値を、間接的なELISAによって測定した。力値の値は、基底の2倍のOD読み取り値を有する最大希釈血清の逆数である。簡潔には、MCP-1(84mer; 1 µg/mL)を、4で一晩、Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene96ウエルプレートにコーティングした。非結合MCP-1を含む溶液を除去し、UV光(365nm)で4分間(4000マイクロジュール)、プレートを処理した。プレートはdH₂Oで5回洗浄した。MCP-1で免疫した動物、または非投薬XenoMouse(登録商標)動物に由来するXenoMouse(登録商標)の血清を、1:100の最初の希釈から全く同様に、1:2希釈の2%ミルク/PBS中で滴定した。最後のウエルは空の状態にした。プレートはdH₂Oで5回洗浄した。

30

【0165】

ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的HRP結合抗体を、室温で1時間、1 µg/mLの最終濃度で加えた。プレートはdH₂Oで5回洗浄した。プレートは30分間TMBを加えることによって染色し、ELISAは1Mのリン酸を加えることによって停止させた。個々のXenoMouse(登録商標)動物の特定の力値を、450nmにおける光学濃度から測定し、表4、5、6、7および8に示す。力値は血清の相互的希釈を表し、したがって、その数が大きいほど、MCP-1に対する体液性免疫応答が高くなる。免疫したすべてのXenoMouse(登録商標)動物由来のリンパ節を、融合用に採取した。

40

【0166】

【表4】

表4

グループ1、フットパッド、xmg2、マウス7匹

	第13日に採血、 4回注射後	第26日に採血、 6回注射後	第46日に融合、 10回注射後
マウスのID番号	MCP-1に対する反応性 hIgGによる力値		
N160-1	1,000	73,000	300,000
N160-2	6,500	600,000	600,000
N160-3	2,300	250,000	125,000
N160-4	1,400	125,000	75,000
N160-5	4,000	200,000	225,000
N160-6	250	2,400	18,000
N160-7	60	1,600	35,000
NC	175	<100	200

【0167】

【表5】

表5

グループ2、フットパッド、3c-1、マウス7匹

	第13日に採血、 6回注射後	第46日に融合、 10回注射後
マウスのID番号	MCP-1に対する反応性 hIgGによる力値	
M724-1	35,000	24,000
M724-3	8,000	7,500
M724-5	8,000	20,000
N600-4	9,000	7,500
N600-5	1,800	75,000
N600-6	2,200	20,000
N600-7	800	25,000
NC	<100	<100

【0168】

10

20

30

【表6】

表6

グループ3、フットパッド、3c-1/xmg2(F1)、マウス7匹

	第13日に採血、 4回注射後	第26日に採血、 6回注射後	第46日に融合、 10回注射後
マウスのID番号	MCP-1に対する反応性 hIgGによる力値		
M219-1	50	2,200	8,000
M219-2	<100	9,000	18,000
M246-3	800	7,000	18,000
M246-5	850	18,000	65,000
M246-9	<100	18,000	55,000
M344-6	<100	800	12,000
M344-10	<100	6,000	25,000
NC	200	225	175

【0169】

【表7】

表7

グループ4、XMG2、フットパッド、マウス4匹

捕捉: マウスのID 番号	第13日に採血、4回注射後		第21日に採血、6回注射後	
	ヒトMCP-1 hIgGによる力値	ヒトMCP-1 hLによる力値	ヒトMCP-1 hIgGによる力値	ヒトMCP-1 hLによる力値
N493-1	<100	<100	2,500	<100
N493-2	<100	<100	1,000	<100
N493-3	300	<100	4,500	<100
N493-4	800	<100	10,000	<100
NC	900	100	600	<100
*PC	8,000		3,000	

【0170】

10

20

30

【表8】

表8

グループ5、XMG2L3、フットパッド、マウス4匹

捕捉:	4回注射後に採血		6回注射後に採血	
	ヒトMCP-1 MCP-1に対する反応性 hIgGによる力価	ヒトMCP-1 MCP-1に対する反応性 hLによる力価	ヒトMCP-1 MCP-1に対する反応性 hIgGによる力価	ヒトMCP-1 MCP-1に対する反応性 hLによる力価
N259-12	300	300	2,000	700
N259-14	100	400	2,500	650
N269-2	700	200	2,800	500
N263-3	900	900	24,000	8,000
NC	900	100	600	<100
*PC	8,000		3,000	

* 表4~8に関しては、NC(陰性対照)=XMG2 KLHグループ1、フットパッドL627-6PC、(陽性対照)=XMG2 MCP-1グループ1、フットパッドN160-1

【0171】

リンパ球の回収、B細胞単離、ハイブリドーマの融合および作製。免疫したマウスを頸椎脱臼によって屠殺し、リンパ節をそれぞれのコホートから採取してプールした。リンパ様細胞はDMEM中で粉碎することにより解離させて、組織から細胞を切り離し、細胞はDMEMに懸濁させた。細胞を計数し、1億個のリンパ球当たり0.9mLのDMEMを細胞ペレットに加えて、細胞を軽く、ただし完全に再懸濁させた。1億個の細胞当たり100 μLのCD90⁺磁気ビーズを使用して、4℃で15分間磁気ビーズと共に細胞をインキュベートすることによって、細胞を標識した。 10^8 個までの陽性細胞(または 2×10^9 個までの全細胞)を含む、磁気標識した細胞の懸濁液を、LS⁺カラムに充填し、カラムはDMEMで洗浄した。全溶出液を、CD90陰性分画として回収した(大部分のこれらの細胞はB細胞である)。

【0172】

P3ミエローマ細胞とB細胞が豊富なリンパ節細胞を、50mLの円錐形チューブ中のDMEMに、1:1の比で(ミエローマ:リンパ節)組み合わせた。組み合わせた細胞を、800 × g(2000rpm)で5~7分間遠心分離にかけ、生成したペレットから上清をすぐに除去した。2~4mLのPro nase溶液(CalBiochem、Cat.#53702;0.5mg/mL、PBS中)を細胞に加えて、細胞ペレットを軽く再懸濁させた。酵素処理は2分間を超えて進行させ、3~5mLのFBSを加えることによって反応を停止させた。充分なECF溶液を加えて合計体積を40mLにし、混合物を800 × g(2000 rpm)で5~7分間、遠心分離にかけた。上清を除去し、細胞ペレットは少量のECF溶液を用いて軽く再懸濁し、次に充分なECF溶液によって合計体積を40mLにした。細胞を充分に混合し計数し、次いで800 × g(2000rpm)で5~7分間、遠心分離にかけた。上清を除去し、細胞は少量のECF溶液中に再懸濁させた。充分な追加のECF溶液を加えて、濃度を細胞 2×10^6 個/mLに調整した。

【0173】

次いで細胞をElectro-Cell-Fusion(ECF)generator(Model ECM2001、Genetronic、Inc.、San Diego、CA)に入れ、製造者の教示書に従い融合させた。ECFの後、細胞懸濁液を、滅菌条件下で融合チャンバーから注意深く除去し、DMEMに溶かした同量のハイブリドーマ培地を含む滅菌チューブに移した。細胞を37℃で15~30分間インキュベートし、次いで400 × g(1000rpm)で5分間、遠心分離にかけた。少量の1/2のHA培地(Sigma、Cat.#A9666からの1ボトルの50X HA、および1リットルのハイブリドーマ培地)に細胞を軽く再懸濁させ、さらに1/2のHA培地を用いて体積を適切に調整した(96ウェルプレート当たり 5×10^6 個のB細胞、ウェル当たり200 μLに基づいて)。細胞を充分に混合し、96ウェルプレートにピペットで移し、増殖させた。第7日または第10日に、培地の半分を除去し、1/2のHA培地を細胞に再度加えた。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 4 】

ELISA用の候補抗体の選択。培養14日後、ハイブリドーマの上清を、MCP-1特異的モノクローナル抗体に関してスクリーニングした。ELISAプレート(Fisher、Cat.No.12-565-136)は、コーティングバッファー(0.1Mの炭酸塩バッファー、pH9.6、NaHCO₃8.4g/L)に溶かした50 μL/MCP-1のウエル(2 μg/mL)でコーティングし、次いで4℃で一晩インキュベートした。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファー(0.05%Tween20、PBS中)で3回洗浄した。200 μL/ウエルのプロッキングバッファー(0.5%BSA、0.1%Tween20、0.01%Thimerosal、1×PBS中)を加え、プレートは1時間室温でインキュベートした。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄した。50 μL/ウエルのハイブリドーマの上清、ならびに陽性対照および陰性対照を加え、プレートは2時間室温でインキュベートした。

10

【 0 1 7 5 】

全体を通して使用した陽性対照は、XMG2 MCP-1グループ1、フットパッドN160-7であり、陰性対照はXMG2 KLHグループ1、フットパッドL627-6であった。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄した。100 μL/ウエルの検出用抗体ヤギ抗hulgGf c-HRP(Caltag、Cat.#H10507)、(およびヤギ抗hIgG-HRP(Southern Biotechnology、Cat.#2060-05)、ならびにヤギ抗hIgG(Southern Biotechnology、Cat.#207005)、二次スクリーニング)を加え、プレートは1時間室温でインキュベートした。二次スクリーニングでは、三組のサンプル(最初のスクリーニングで陽性)をスクリーニングし、一組はhIgG検出用、一組はhIgG検出用、および一組はhIgG検出用であった。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄した。100 μL/ウエルのTMB(BioFX Lab.Cat.#TMSK-0100-01)を加え、プレートを約10分間染色し(陰性対照のウエルがようやく色を示し始めるまで)、次いで50 μL/ウエルの停止溶液(TMB Stop Solution(BioFX Lab.Cat.#STPR-0100-01)を加え、波長450nmにおいてELISAプレートリーダー上で、そのプレートを読み取った。陽性ウエルからのODの読み取り値を表9に示す。

20

【 0 1 7 6 】

【表9】

表9

mAbクローニング	ELISA OD-MCP-1	IC50 カルシウムフラックス (μg/mL)	IC50 化学走性 (μg/mL)	親和性 (pMol)	交差反応性
1.1.1	3.638	0.24 + 0.034	0.27 + 0.034	2.7	
1.2.1	3.466	0.18 + 0.008	0.24 + 0.034	77	
1.3.1	4	0.12 + 0.012	0.24 + 0.059	55	
1.4.1	4	0.11 + 0.005	0.51 + 0.035	96	
1.5.1	0.51	0.21 + 0.027	0.34 + 0.054	4.2	
1.6.1	3.918	1 + 0.24	12 + 5.8	228	
1.7.1	3.521	0.11 + 0.013	0.35 + 0.064	4.9	
1.8.1	3.472	0.26 + 0.076	0.88 + 0.21	4	
1.9.1	3.6561	1.2 + 0.38	35 + 54	96	
1.10.1	3.845	0.18 + 0.11	1.2 + 0.55	9.6	
1.11.1	3.905	0.098 + 0.008	0.81 + 0.24	4.2	
1.12.1	4	0.13 + 0.02	0.35 + 0.039	13	
1.13.1	4	0.11 + 0.015	0.5 + 0.091	71	
1.14.1	2.064	0.41 + 0.1	0.58 + 0.18	6	
1.18.1	0.9984	0.18 + 0.055	0.29 + 0.07	3.8	
2.3.1	3.876	0.14 + 0.021	0.58 + 0.085	96	
2.4.1	3.892	0.26 + 0.18	>5	14	マウス JE
3.2	3.96			ND	MCP-2, MCP-3, エオタキシン
3.4.1	3.86	0.24 + 0.019	0.51 + 0.1	45	
3.5.1	3.765	0.58 + 0.29	3.1 + 1.1	100	
3.6.1	3.593	0.17 + 0.04	0.52 + 0.18	15	
3.7.1	4	0.094 + 0.023	0.98 + 0.019	4.8	
3.8.1	3.603	0.27 + 0.028	0.7 + 0.19	3.4	
3.10.1	3.634	0.3 + 0.1	0.25 + 0.1	90	MCP-2, MCP-3, エオタキシン
3.11.1	4	0.092 + 0.023	0.33 + 0.47	3.3	MCP-2, MCP-3, MCP-4 エオタキシン
3.14.1	4	1.3 + 0.3	1.4 + 0.47	ND	
3.15.1	4	0.12 + 0.034	0.89 + 0.1	3.4	
3.16.1	3.921	0.16 + 0.08	0.4 + 0.081	25	
4.5.1	3.38	0.27 + 0.074	0.75 + 0.18	61	
4.6.1	3.51	0.31 + 0.06	0.4 + 0.056	330	
4.7.1	3.843	0.39 + 0.063	0.45 + 0.11	280	
4.8.1	4	0.22 + 0.77	0.29 + 0.032	102	
4.9.1	3.415	0.083 + .0094	0.21 + 0.035	ND	
5.1	4	3.5 + 2.1	1.3 + 1.2	1610	
5.2.1	3.714	2.5 + 0.66	2.1 + 1.7	319	ラントス
5.3.1	4	1.8 + 0.56	2.6 + 0.31	450	

ND=測定せず

【0177】

生物学的活性に関する抗MCP-1抗体の特徴付け。

抗MCP-1抗体を用いたMCP-1の生物学的活性の中和--FLIPRアッセイ。DMSOおよびPluroni

10

20

30

40

50

c Acid(20%DMSO溶液)を、Fluo-4(Molecular Probes)のバイアルに加えて、5mMのFluo4という最終濃度にした。THP-1細胞を、予め暖めた(37)ローディングバッファー中に 3×10^6 /mLで再懸濁させ、細胞1mL当たり1 μ LのFluo-4染料を加えて、5 μ Mにおいて染料の最終濃度を与えた。これらの細胞を暗所で、37 において45~50分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を1000RPMで5~10分間、遠心分離にかけた。細胞をローディングバッファー中に再懸濁させ、遠心分離を繰り返した。細胞は 1.667×10^6 /mLで再懸濁させた。200,000細胞/ウエルの濃度で、細胞を96ウエルプレートに加え、軽く遠心分離にかけた。基底の読み取り値を得た後、さまざまな濃度の抗MCP-1抗体の存在下または不在下において、3.5nMのMCP-1を後に加えることによって、第2の読み取り値を得た。MCP-1をTHP-1細胞に加えることによって、Fluo-4染料の蛍光強度の増大につながる、細胞内カルシウムの上昇がもたらされた。高濃度の中和抗体を加えることによって、細胞内の蛍光染料の強度が低下し、したがって、試験した抗体が中和されていたことが示された。MCP-1誘導型の蛍光強度の50%の低下をもたらす抗体の濃度を表9に示す。

【 0 1 7 8 】

MCP-1誘導型の細胞移動の無効化。自動式96ウエル化学走性アッセイを、THP-1細胞およびBeckman Biomek F/Xロボットシステムを使用して進めた。特別に設計した96ウエルプレート、剛性フレームと結合したフィルタ膜を有するフレーム付きフィルタを使用して、化学走性アッセイを、30 μ Lまたは300 μ Lのウエル体積および2~14 μ mの範囲の孔径を有する、NeuroProbe 96ウエル使い捨てマイクロプレートにおいて行った。Neuroprobe 96ウエルプレートは、細胞移動アッセイにおいて、MCP-1化学走性誘因物質および抗MCP-1抗体などの他の試薬を置くための底部ウエルを与える。上部ウエルは不要であった。なぜなら、フレーム付きフィルタが、それぞれの細胞懸濁液サンプルをフィルタ上部のその部位に閉じ込める、疎水性マスクでコーティングされていたからである。

【 0 1 7 9 】

このアッセイの最適条件は:100,000細胞/ウエル、37 で90分間のインキュベーションであった。Molecular Probesからの染料を予め充填したTHP-1細胞の懸濁液を、フィルタの上側の部位に直接ピペットで移し、37 で1~2時間インキュベートした。インキュベーションの後、フィルタの底部に移動した細胞、およびマイクロプレート中に移動した細胞を、Applied Biosystemsから購入したFMAT中にマイクロプレートを置くことによって計数した。

【 0 1 8 0 】

THP-1細胞のMCP-1誘導型の細胞移動、および最大の細胞移動に、1nM、10~15倍のシグナル対ノイズ比で達した。ハイブリドーマの上清、または新鮮なハイブリドーマ培地を使用して、MCP-1依存性の移動を検出した。アッセイの変動性は最少であった(C.V~15)。フィルタの底部に移動した細胞の数は、MCP-1に対する抗体が化学走性誘因物質と共に含まれると、用量依存式に低下した。

【 0 1 8 1 】

Biacore分析を使用した、抗MCP-1抗体親和性の測定。抗体/MCP-1相互作用の分析を、Biacore3000光学バイオセンサーにドッキングした2つのCM5チップを使用して25 で行った。それぞれのチップ上の個々のフローセルを、NHS/EDCの7分間の注射で活性化させ、カルボヒドラジドは7分間の注射を使用してNHSエステルを介して結合させ、残りの活性基は、エタノールアミンの7分間の注射によって阻害した。それぞれの抗体の単糖残基は、1mMのメタ過ヨウ素酸ナトリウムを100mMの酢酸ナトリウムに溶かしたもの、pH5.5を使用して、4~30分間で酸化させた。酸化した抗体を10mMの酢酸ナトリウム、pH5.0中で脱塩して、抗体をカルボヒドラジド修飾表面と結合させた。0.1Mのナトリウムカルボヒドラジドを用いてヒドラゾン結合を還元することによって、mAb表面を安定させた。抗原/抗体の相互作用は、0、0.049、0.15、0.4、1.3、4および12nMのMCP-1(Peprotech、NJ)をランニングバッファー(10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.005%の界面活性剤;200 μ g/mLのBSA、pH7.4)に溶かしたものを注射することによって試験した。15mMのH₃PO₄の12秒間のパルスによって、表面を再生した。抗原/抗体の相互作用は、300倍の濃度範囲でランニングバッファー(10m

MのHEPES、150mMのNaCl、0.005%の界面活性剤;200 μ g/mlのBSA、pH7.4)に希釈した、二連の抗原サンプルを注射することによって試験した。15mMのH₃PO₄の12秒間のパルスによって、表面を再生した。それぞれの相互作用の動態を測定するために、データセットを、質量移動に関するパラメータを含んでいた1:1相互作用モデルに全面的に適合させた。計算した相互作用の親和性を、表9に報告する。

【 0 1 8 2 】

抗MCP-1抗体と他のケモカインの交差反応性の測定。ELISAプレート(Fisher Cat.No.12-565-136)を、コーティングバッファー(0.1Mの炭酸塩バッファー、pH9.6、NaHCO₃8.4g/L)に溶かした50 μ l/ウェルのMCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、RANTES、GRO-、MIP-1、エオタキシン、ラットMCP-1およびマウスJE(2 μ g/ml)でコーティングし、次いで4度一晩インキュベートした。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファー(0.05%Tween20、PBS中)で3回洗浄した。200 μ l/ウェルのブロッキングバッファー(0.5%BSA、0.1%Tween20、0.01%Thimerosal、1×PBS中)を加え、プレートは1時間室温でインキュベートした。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄した。50 μ l/ウェルのハイブリドーマの上清、ならびに陽性対照および陰性対照(陽性対照はR&D Sciencesから購入した抗MCP-1抗体であり、陰性対照はAbgenixにおいて生成されたキーホールリンペットヘモシアニンに対する抗体であった)を加え、プレートは2時間室温でインキュベートした。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄した。100 μ L/ウェルの検出用抗体ヤギ抗hulgGfc-HRP(Caltag、Cat.#H10507)、(ヤギ抗hIg -HRP(Southern Biotechnology、Cat.#2060-05)、およびヤギ抗hIg (Southern Biotechnology、Cat.#2070-05)、二次スクリーニング)を加え、プレートは1時間室温でインキュベートした。インキュベーションの後、プレートは洗浄バッファーで3回洗浄し、100 μ L/ウェルのTMB(BioFX Lab.Cat.#TMSK-0100-01)を加え、プレートを約10分間染色した。このとき、50 μ L/ウェルの停止溶液(TMB Stop Solution(BioFX Lab.Cat.#STPR-0100-01)を加え、波長450nmにおいてELISAプレートリーダー上で、そのプレートを読み取った。表10に示す結果から、幾つかの抗MCP-1抗体が関連ケモカインと交差反応したことが実証される。10
20

【 0 1 8 3 】

【表10-1】

表10

mAb	rmJE/MCP-1 2μg/mL	rat MCP-1 1μg/mL	rhMCP-2 2μg/mL	rhMCP-3 2μg/mL	rhMCP-4 2μg/mL
1.1.1	0.045	0.051	0.051	0.064	0.052
1.2.1	0.041	0.044	0.056	0.048	0.055
1.3.1	0.046	0.048	0.065	0.052	0.048
1.4.1	0.042	0.05	0.046	0.049	0.045
1.5.1	0.043	0.045	0.047	0.069	0.05
1.6.1	0.042	0.062	0.042	0.046	0.044
1.7.1	0.041	0.042	0.044	0.053	0.041
1.8.1	0.045	0.049	0.048	0.054	0.046
1.9.1	0.053	0.065	0.04	0.044	0.042
1.10.1	0.041	0.059	0.04	0.047	0.052
1.11.1	0.041	0.052	0.041	0.043	0.043
1.12.1	0.042	0.062	0.042	0.046	0.044
1.13.1	0.043	0.06	0.046	0.047	0.045
1.14.1	0.042	0.062	0.042	0.046	0.044
1.18.1	0.044	0.058	0.04	0.045	0.045
2.3.1	0.054	0.058	0.052	0.059	0.064
2.4.1	0.129	0.077	0.045	0.066	0.06
3.4.1	0.044	0.053	0.042	0.05	0.047
3.5.1	0.042	0.053	0.042	0.045	0.044
3.6.1	0.047	0.046	0.052	0.045	0.048
3.7.1	0.046	0.048	0.043	0.048	0.048
3.8	0.042	0.062	0.042	0.046	0.044
3.10.1	0.054	0.045	0.845	0.167	0.042
3.11.1	0.063	0.057	0.336	1.317	0.981
3.14.1	0.044	0.046	0.045	0.05	0.045
3.15.1	0.041	0.05	0.043	0.046	0.051
3.16.1	0.042	0.046	0.049	0.043	0.043
4.5.1	0.049	0.055	0.042	0.046	0.046
4.6.1	0.049	0.05	0.047	0.05	0.047
4.7.1	0.042	0.062	0.042	0.046	0.044
4.8.1	0.042	0.091	0.041	0.043	0.039
4.9.1	0.05	0.05	0.046	0.049	0.05
5.1	0.044	0.054	0.051	0.05	0.043
5.2.1	0.04	0.054	0.041	0.048	0.041
5.3.1	0.05	0.047	0.043	0.045	0.043
3.2 (測定せず)	0.059	0.07	0.535	0.449	0.041
nc	0.042	0.134	0.045	0.084	0.074
pc	0.263	ND	ND	1.084	0.215

10

20

30

40

【0184】

【表10-2】

表10続き

mAb	hGRO/MGSA 1μg/mL	hMIP-1-α 1μg/mL	hランテス 1μg/mL	hエオタキシン 1μg/mL	陽性対照 hMCP-1 (MCAF) 2μg/mL
1.1.1	0.047	0.044	0.044	0.042	0.944
1.2.1	0.044	0.04	0.04	0.044	1.159
1.3.1	0.051	0.049	0.049	0.046	1.158
1.4.1	0.044	0.041	0.046	0.043	0.738
1.5.1	0.048	0.041	0.049	0.043	1.178
1.6.1	0.046	0.046	0.046	0.042	0.375
1.7.1	0.041	0.04	0.039	0.04	1.17
1.8.1	0.06	0.045	0.045	0.047	1.159
1.9.1	0.043	0.044	0.042	0.042	0.446
1.10.1	0.043	0.043	0.042	0.05	1.259
1.11.1	0.042	0.042	0.042	0.049	1.336
1.12.1	0.046	0.046	0.046	0.044	0.933
1.13.1	0.046	0.042	0.046	0.044	1.16
1.14.1	0.046	0.046	0.046	0.042	1.129
1.18.1	0.049	0.043	0.04	0.043	1.228
2.3.1	0.062	0.067	0.055	0.045	0.087
2.4.1	0.048	0.061	0.046	0.084	0.462
3.4.1	0.065	0.055	0.046	0.048	1.153
3.5.1	0.048	0.047	0.044	0.043	0.194
3.6.1	0.047	0.047	0.043	0.043	0.342
3.7.1	0.045	0.049	0.067	0.043	1.276
3.8	0.046	0.046	0.046	0.042	0.275
3.10.1	0.042	0.043	0.04	0.306	0.71
3.11.1	0.054	0.053	0.064	0.339	0.803
3.14.1	0.046	0.046	0.045	0.043	0.549
3.15.1	0.044	0.045	0.049	0.045	0.948
3.16.1	0.043	0.043	0.042	0.043	0.633
4.5.1	0.045	0.046	0.049	0.041	0.957
4.6.1	0.046	0.055	0.053	0.049	0.686
4.7.1	0.046	0.046	0.046	0.042	0.744
4.8.1	0.042	0.041	0.044	0.043	1.136
4.9.1	0.043	0.049	0.057	0.045	0.822
5.1	0.044	0.043	0.043	0.042	0.521
5.2.1	0.045	0.043	0.262	0.043	0.663
5.3.1	0.045	0.042	0.045	0.042	0.272
3.2 (測定せず)	0.042	0.041	0.043	0.194	0.235
nc	0.357	0.065	0.072	0.063	0.042
pc	1.075	0.794	1.219	0.221	0.281

コーティング:Ag@ 2μg/mLまたは1μg/mL; O/N

Ab: MCP-1精製クローニー 1:50

pc: 1μg/mL; nc: D39.2 IL8 @1μg/mL

検出サンプル、gxhG-Fc HRP1:2Kを含む;対照、混合xmIgG1、2a、2b、3 1:1Kを含む

【0185】

抗MCP-1抗体3.11.2が、他のMCPファミリーのメンバーの機能をブロックすることができたかどうかを判定するために、前に記載した移動アッセイを行った。最初に、MCP-1、MCP-2、MCP-3、およびMCP-4に応答して移動するTHP-1単球の能力を測定した。MCP-1、-2およ

10

20

30

40

50

び-3は、THP-1細胞の移動を効果的に誘導したが、MCP-4はこのアッセイでは活性を示さなかった(図1参照)。抗体3.11.2を、ウエルの底部側にさまざまな濃度で加えると、MCP-2およびMCP-3に応答して移動するTHP-1細胞の能力は、用量依存的に阻害された(図2および3)。

【 0 1 8 6 】

(実施例3)

MCP-1のエピトープマッピング

単球走化性タンパク質-1(MCP-1)は、特定の7回膜貫通型受容体によって作用して、単球、好塩基球およびTリンパ球を炎症部位に補充する、ケモカインファミリーのメンバーである。その抗原、76-アミノ酸残基は非グリコシル化状態であり、8.7kDの予想分子質量を有する。大腸菌中で発現されるヒトMCP-1は、R&D#279MC/CFから購入した。サルMCPは29
3F細胞中で発現され、三種のサルMCP-1変異体を使用して、明確なアミノ酸置換が、それぞれ個々のmAbの結合親和性にどのように影響を与えるかを分析した。
10

【 0 1 8 7 】

配列分析によって、抗体が5つのクラスの範疇にあったことが示された。28個の抗体を含んでいた最大のクラスは、VH1-24のその使用と非常に関連があり、そのうちの24個はVk遺伝子B3も使用する。3個の抗体から構成されたクラスはVH6-1遺伝子を使用し、そのうちの2個はVkB3を使用する。3つの他のクラスは、それぞれ一種の抗体によって表され、VH1-2、VH3-33およびVH4-31を使用し、これらのmAbの2つはVkB8遺伝子を使用する。1、2、3、または4で始まる抗体の名称は、XenoMouse(登録商標)マウスの独立したコホート由来の、異なるハイブリドーマ融合体を表すことを記さなければならない。したがって、これらのモノクローナル抗体は、XenoMouse(登録商標)マウスにおける独立した一次および二次免疫応答中に、独立したB細胞成熟系統から生じた。これらの独立性のために、抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の類似性、VHおよびVk遺伝子は、MCP-1と結合し強く中和することができる類似の可変領域構造に関する、収斂進化および淘汰を表す可能性がある(表11参照)。
20

【 0 1 8 8 】

【表11】

表11

サンプル	イソ型	VH	DH	JH	VK	JK	エピトープ
1.1.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座 (Conf.)
1.2.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-L5	JK1	線状
1.3.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(15)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
1.4.1	$\gamma 2/\kappa$	VH6-1	D1-26	JH4b	VK-A2	JH4	線状
1.5.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	線状
1.6.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D1-26(18)	JH3b	VK-A10	JK4	立体配座
1.7.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
1.8.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	線状
1.9.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D5-12(13)	JH4b	VK-B3	JK1	結合せず
1.10.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4B	VK-B3	JK1	線状
1.11.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH4b	VK-B3	JK1	線状
1.12.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
1.13.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	線状
1.14.1	$\gamma 2/\kappa$	VH6-1	D1-26	JH6b	VK-R3	JK1	線状
1.18.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(15)	JH4b	VK-B3	JK4	線状
2.3.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK2	結合せず
3.2	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-L16	JK4	立体配座
2.4.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-2	D6-13(15)	JH4b	VK-08	JK5	結合せず
3.4.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	線状
3.5.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	結合せず
3.6.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	結合せず
3.7.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
3.8	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH4B	VK-B3	JK1	結合せず
3.10.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-9(12)	JH6b	VK-A30	JK3	立体配座
3.11.1	$\gamma 4/\kappa$	VH4-31	D2-21(10)	JH3b	VK-08	JK2	立体配座
3.14.1	$\gamma 4/\kappa$	VH6-1	D1-26	JH6B	VK-B3	JK1	立体配座
3.15.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D5-12(13)	JH4b	VK-B3	JK1	線状
3.16.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
4.5.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
4.6.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH3B	VK-B3	JK1	ND
4.7.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
4.8.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH4b	VK-B3	JK1	立体配座
4.9.1	$\gamma 2/\kappa$	ND	ND	ND	ND	ND	立体配座
5.1	$\gamma 2/\lambda$	VH3-33	D6-6(15)	JH6B	V1-22	JK2	ND
5.3.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D5-12(13)	JH4b	VK-B3	JK1	結合せず

Conf. = 立体配座

ND = 測定せず

結合せず = ウエスタンプロットで結合せず。

【0189】

それぞれの抗体が線状または立体配座エピトープと結合したかどうかは、ウエスタンプロット分析によって判定した。還元剤による分子間結合の破壊によって、選択した抗MCP-1抗体の反応性が変化したかどうかを判定するために、精製したMCP-1を、非還元(NR)または還元(R)条件下においてSDS/PAGE(4~20%ゲル)上に載せた。SDS/PAGEは、ミニ-ゲル系を使用するLaemmliの方法によって行った。分離したタンパク質は、ニトロセルロース膜に移した。染色前に少なくとも1時間、5%(w/v)無脂肪乾燥乳を含むPBSを使用して、膜をブロッキングし、それぞれの抗体を用いて1時間プローブ処理した。抗MCP-1抗体は、HRP結合ヤギ抗ヒト免疫グロブリン(1:8,000希釈;Sigma Catalog No.A-8667)を使用して検出した。製造者の教示書に従い、強度の化学発光物質(ECL(登録商標);Amersham.Bioscience)を使用することによって膜を染色した。

10

20

30

40

50

【0190】

抗体-MCP-1複合体を、3つの方法によって分析した:(1)線状および立体配座エピトープの表面増強レーザー脱離イオン化(SELDI)(タンパク質チップ技術);(2)線状および立体配座エピトープの部位特異的突然変異誘発;および(3)線状エピトープのSPOTペプチドアレイ。SELDIは、ペプチドおよびタンパク質の分子量を正確、迅速かつ感度良く測定するための、近年開発された方法である。線状および立体配座エピトープは、SELDIタンパク質チップ技術によって、固定抗体と結合した断片の質量に基づいてマッピングした。SELDIによる線状エピトープのマッピングは、3ステップで行った。第1ステップでは、MCP-1を非常に特異的なタンパク質分解酵素によって消化して、数組のペプチド断片を作製した。第2ステップでは、線状エピトープを含むペプチド断片を、タンパク質チップ上の固定抗体との、それらの特異的結合によって選択した。このステップでは、エピトープを含むペプチドは抗体と複合体を形成し、一方、抗体と結合しない他のペプチドは、厳密な洗浄によって除去した。最終ステップでは、抗体結合ペプチドの同一性を、SELDIおよび特異的プロテアーゼの知られている消化部位により、その分子量によって判定した。

10

【0191】

抗体1.4.1、1.8.1、1.14.1、1.18.1は、ウエスタンプロットにおいて本来のMCP-1および変性MCP-1と等しく反応し、これらの抗体が線状エピトープを有することが示された。これらのエピトープはSELDIによってマッピングした。これらの実験は、MCP-1抗原をカルボキシメチル化して、タンパク質中のシステイン残基間のジスルフィド結合の形成を妨げることによって行った。メチル化MCP-1は、グルタミン酸(E)残基のカルボキシ末端側で、ペプチド結合を特異的に切断するエンドプロテイナーゼで、Glu-Cで消化した。mAbは、タンパク質チップアレイ、PS20と共有結合した。チップ表面は1Mのエタノールアミンでプロッキングし、PBS、0.5%Tritonで洗浄した。メチル化MCP-1抗原のGlu-C断片は、固定抗体と結合させた。非結合断片は、洗浄剤(PBS、0.1%Tween)で洗浄除去した。結合Glu-C断片(エピトープ)を分析し、それらの質量に基づきSELDIによって同定した。表12に、メチル化MCP-1およびGlu-Cを完全に消化して作製した、それぞれのペプチドの予想質量をまとめる。MCP-1は、3つの断片に完全に消化された。理論上のpIは9.39/Mw(平均質量):8685.03/Mw(モノアイソトピック質量):8679.44であった。洗浄後、残基1~39に対応する質量4635を有する断片は、抗体に結合したままの状態であり、これら全ての抗体のエピトープが、最初の39残基中に存在することが示された。なぜなら同じパターンが、これらの抗体それぞれに関して見られたからである。

20

【0192】

【表12】

表12

質量	配列番号149中の位置	#MC	人工的修飾	ペプチド配列
4458.2591	1~39	0	Cys_CM: 11, 12, 36 4632.2755	QPDAINAPVTCCYNFTNRKI SVQRLASYRRITSSKCPKE
3041.4819	51~76	0	Cys_CM: 52 3099.4873	ICADPKQKWVQDSMDHLDKQ TQTPKT
1218.7456	40~50	0		AVIFKTIVAKE

40

【0193】

SELDI手法は、立体配座エピトープをマッピングするためにも使用した。この場合、PS2タンパク質チップアレイ(Ciphergen Biosystems)と共有結合したタンパク質Aを使用してmAbを捕捉し、後にMCP-1と共にインキュベートした。非結合物質を除去した後に、複合体を高濃度の特異的プロテアーゼで消化した。MCP-1抗体(1.7.2、3.11.2および3.7.2)は、ウエスタンプロットにおいて還元、変性抗原と結合せず、そのエピトープが立体配座である可能性があることが示される。抗体1.7.2および3.7.2は、PS20チップと最初に共有結合した。元のMCP-1は抗体と結合し、次いでエンドプロテイナーゼを用いて消化した(一実験

50

ではLys-C、および他の実験ではAsp-N)。非結合断片は、PBS+、0.2%Triton、次にPBSおよびHPLC水洗浄で洗浄除去した。エピトープをSELDIによって測定し、断片の質量によって同定した。これらの抗体1.7.2および3.7.2はいずれも、洗浄後にそれと結合した、残基3～53に対応する質量5712の断片を有しており(表13; 理論上のpI:9.39/Mw(平均質量):3685.03/Mw(モノアイソトピック質量):8679.44)、元のMCP-1抗原の3～53アミノ酸残基中に、エピトープが存在することが示された。

【0194】

【表13】

表13

質量	配列番号149中の位置	#MC	ペプチド配列
5720.0059	3～53	0	DAINAPVTCCYNFTNRKISV QRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICA
1046.5476	68～76	0	DKQTQTPKT
1028.5523	54～61	0	DPKQKWVQ

【0195】

抗体3.11.2のエピトープをマッピングするために、結合ドメインの大きさを、異なるプロテアーゼを使用することによって最小にした。タンパク質A(Calbiochem、539202)は、P20チップに共有結合によって固定させた。残基結合部位は、エタノールアミン、pH8.0で阻害した。抗体3.11.2はタンパク質Aと結合させた。チップは、PBS、次いで50mMのHepes、pH7.5で洗浄した。MCP-1抗原は、抗体と結合させた。非結合抗原は、0.1%TweenをPBSに溶かしたもの、次に50mMのHepes、pH7.5、および100mMの重炭酸アンモニウムで洗浄することによって除去した。MCP-1の1つのチップ消化は、エンドプロテイナーゼ、Lys-Cを用いて行った。チップは0.1%TritonをPBSに溶かしたもので洗浄して、非結合断片を除去した。結合断片は、SELDIでその質量に基づいて分析した。質量1861.8の1つのピークのみが抗体と結合し、1865の質量を有するMCP-1の残基20～35に位置した15アミノ酸の配列(表14; 理論上のpI:9.39/Mw(平均質量):3685.03/Mw(モノアイソトピック質量):8679.44)、および配列ISVQRLASYRRITSSK(配列番号149の位置20～35)が、最も強く結合した断片として同定されたことが示された。

【0196】

【表14】

表14

質量	配列番号149中の位置	#MC	ペプチド配列
2155.0059	1～19	0	QPDAINAPVTCCYNFTNRK
1865.0715	20～35	0	ISVQRLASYRRITSSK
1373.6154	59～69	0	WVQDSMDHLDK
775.3654	50～56	0	EICADPK
706.4134	39～44	0	EAVIFK
702.3781	70～75	0	QTQTPK
531.3500	45～49	0	TIVAK

【0197】

MCP-1の突然変異誘発。主に塩基性である残基(R24、K35、K38、K49およびY13)の2群は、MCP-1とその受容体の間の相互作用に最も貢献している可能性があることは以前に示された(Hemmerich他、(1999)Biochemistry38、13013～13025)。結合データによって、N末端残基は結合活性にほとんど貢献しておらず、2つの重要な残基:K35およびR24は、MCP-1のシグナル活性に重要であることが明らかになった。K35は最も機能的に重要な残基である

10

20

30

40

50

。なぜなら、K35Aの突然変異は、結合および活性、ならびにR24のアラニン突然変異に対して相当な影響があるからである(Hemmerich他、(1999)Biochemistry38、13013～13025)。Arg24はMCP-1の異なる種の間、およびヒトMCP-2-4中で保存されるが、他のCCケモカインでは大幅に変わり、したがって受容体の特異性と関係がある可能性がある。抗体の結合に重要であった、Glu-C消化物である、MCP-1の最初の39残基中の個々の残基を同定するために、3つのMCP-1突然変異体を作製した:3つの塩基性残基、R24、K35、およびK38を部位特異的突然変異誘発によって突然変異させ、突然変異タンパク質を、ELISAによって全36個の中和抗体との結合に関してさらに分析した。Arg24は、アラニン(R24A)およびグルタミン酸(R24E)に突然変異した。Lys35およびK38は、アラニン(それぞれK35A、K38A)に突然変異した。すべての突然変異体をサルMCP-1の基底状態に導入した。サルMCP-1の構築体を、サル末梢血リンパ球(カニクイザルMCP-1PCR3.1双方向)から単離したRNAに、RT-PCRを行うことによって作製し回収した。ヒトとサルMCP-1の間のタンパク質の配列アライメントによって、C末端での2つのアミノ酸変化(位置71および76)との99%の相同性が明らかになった。C末端残基59～76は受容体との相互作用とは関係がなく、全36抗体の結合に影響を与えることはなかった。10

【 0 1 9 8 】

異なるMCP-1突然変異構築体でトランスフェクトした293個の細胞からの上清を使用して、ELISAアッセイを行った。ELISAプレートは、ELISAプレートのコーティングバッファーに1 μg/mLに希釀した、抗ヒトMCP-1ヤギIgGポリクローナル抗体(R&Dカタログ番号AF279NA)でコーティングした。293個の細胞中での突然変異MCP-1構築体の発現は、ビオチン化ヤギ抗ヒトMCP-1(R&Dカタログ番号BAF279)、次にストレプトアビジンHRPを用いた検出によって確認した。突然変異MCP-1とMCP-1抗体の結合は、HRP結合ヤギ抗ヒトIgG(Fc特異的、Caltagカタログ番号H10507)を用いて検出した。ELISAの結果は、K38が変化することは、全36抗体の結合活性にいかなる影響もなかったことを示している。全抗体とR24EおよびR24A MCP-1突然変異体抗原の結合は、完全に無効となった(表15参照)。しかしながら、K35A突然変異体は、わずか6個の抗体(1.6.1、1.9.1、3.6.1、3.10.1)の結合を阻害した。全てのこれらの抗体は、立体配座エピトープを有しているようであり、エピトープとの結合は、Arg24またはLys35の突然変異によって影響を受ける。これらのデータは、これら4つの抗体は異なる立体配座エピトープを認識するが、他の抗体と重複することを示唆する。20

【 0 1 9 9 】

30

【表15】

表15

mAb	エピトープ	Glu-C 消化	Lys-C	Asp-N 消化	ペプチド	残基	R24A/E	K35A
1.1.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害あり
1.2.1	線状	ND	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.3.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
1.4.1	線状	1_39	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.5.1	線状	ND	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.6.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害あり
1.7.1	立体配座	ND	ND	3-53/5712	ND	ND	阻害あり	阻害なし
1.8.1	線状	1_39	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.9.1	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害あり
1.10.1	線状	ND	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.11.1	線状	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
1.12.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
1.13.1	線状	ND	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.14.1	線状	1_39	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
1.18.1	線状	1_39	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
2.3.1	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.2	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
2.4.1	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.4.1	線状	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.5.1	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.6.1	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害あり
3.7.1	立体配座	ND	ND	3-53/5712	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.8	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害あり
3.10.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害あり
3.11.1	立体配座	ND	20-35 (1864)	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.14.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
3.15.1	線状	ND	ND	ND	7_11	21-25	阻害あり	阻害なし
3.16.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
4.5.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
4.6.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
4.7.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
4.8.1	立体配座	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
5.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし
5.3.1	結合せず	ND	ND	ND	ND	ND	阻害あり	阻害なし

ND = 測定せず

結合せず = ウエスタンプロットで結合せず。

【0200】

線状エピトープと結合する抗体に関して、ペプチドエピトープとのそれらの結合を、SPOT技術を使用して詳細に試験した。SPOTは、抗体エピトープの系統的分析に適した形式で、数百のペプチドの固相合成を可能にする技術である。このシステムは、試薬を使用する際に、簡潔、非常に迅速かつ経済的である。カスタムメイドのペプチドアレイは、Sigma-Genosys(The Woodlands, Texas)から入手した。一連の32、13量体ペプチドを、MCP-1配列の残基1~76の範囲で合成した。それぞれの構成ペプチドを、前のペプチド由来の2つのアミノ酸によって補い、一群の重複ライブラーを生成した。32ペプチドを有する膜を、8個のMCP-1抗体(1 μg/mL)を用いてプローブ処理し、HRP結合二次抗体、次に充分な化学発光物質(ECL)を用いて検出した。MCP-1のアミノ酸21~25に対応する5つの構成ペプチドスポット(7~11)で、反応を観察した。これらの結果から、線状エピトープと結合する、全

10

20

30

40

50

ての試験したMCP-1抗体のエピトープの中心は、SVQRL(21～25)であると思われる。MCP-1配列は以下のものである。

QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQK
WVQDSMDHLDKQTQTPKT(配列番号149)

【0201】

線状エピトープを認識した8個の抗体:1.2.1、1.4.1、1.5.1、1.8.1、1.10.1、1.13.1、1.14.1、および1.18.1が、同じSPOTで反応した。

【0202】

(実施例4)

高解像度Biacore分析による交差反応抗体の親和性測定

10

Biacore2000光学バイオセンサーにドッキングした2つのCM5チップを使用して、相互作用の分析を25において行った。それぞれのチップ上の個々のフローセルを、NHS/EDCの7分間の注射で活性化させ、カルボヒドラジドは7分間の注射を使用してNHSエステルを介して結合させ、残りの活性基は、エタノールアミンの7分間の注射によって阻害した。1/50に希釈したmAb3.11.2の単糖残基は、1mMのメタ過ヨウ素酸ナトリウムを100mMの酢酸ナトリウムに溶かしたもの、pH5.5を使用して、4～30分間で酸化させた。酸化した抗体を10mMの酢酸ナトリウム、pH5.0中で脱塩して、抗体をカルボヒドラジド修飾表面と結合させた。250RUのmAb3.11.2の表面密度を使用して、MCP-1とMCP-4の報告された相互作用を測定し、一方110RUの表面を使用して、抗原MCP-2およびMCP-3とmAb3.11.2の相互作用を測定した。0.1Mのナトリウムカルボヒドラジドを用いてヒドラゾン結合を還元することによって、mAb表面を安定させた。抗原/抗体の相互作用は、300倍の濃度範囲でランニングバッファー(10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.005%の界面活性剤;200 μg/mLのBSA、pH7.4)に希釈した二連の抗原サンプルを注射することによって試験した。15mMのH₃PO₄の12秒間のパルスによって、表面を再生した。

20

【0203】

それぞれの相互作用の動態を測定するために、データセットを、質量移動に関するパラメータを含んでいた1:1相互作用モデルに全面的に適合させた。抗体3.11.2の相互作用の、推定上の速度定数および理論上の親和性を表16に報告する。すべての他の抗体のデータは表8に示す。

【0204】

30

【表16】

表16

Ag	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (pM)
MCP-1	3.0×10 ⁸	1.0×10 ⁻³	3.3
MCP-2	2.6×10 ⁸	1.2×10 ⁻²	46
MCP-3	1.5×10 ⁸	7.4×10 ⁻³	49
MCP-4	1.5×10 ⁸	5.5×10 ⁻⁴	3.7

【0205】

40

(実施例5)

MCP-1に対する抗体を用いた血管新生の予防

MatrigelとヒトbFGF(10 μg/mL)、ヒトVEGF165(100ng/mL)および10 μg/mLのヘパリンまたはMCP-1(250ng/mL)およびMCP-3(100ng/mL)を混合することによって、マウスモデルにおいて血管新生を誘導した。約0.5mLの懸濁液を、6～8週齢の無胸腺のメスのヌードマウスの右側面に皮下注射した。MCP-1およびMCP-3のそれぞれの投与量に、5匹のマウスを使用した。さらに、陰性対照として、Matrigel単独(増殖因子なし)を含ませた。Matrigel片をin situで凝固させ、7日間平静状態にした。7日間の最後に、マウスに麻酔をかけ、顕微鏡手術装置を使用してMatrigelプラグを注意深く除去した。透照下でゲルの写真を撮った。プラグの一部分を、パラフィン包埋切片用に処理した。切片は2つの異なるレベルで切

50

断し、H/Eで染色した。ゲルの他の部分は液体窒素中で急速凍結させ、フィコエリスリンと結合したマウスCD31抗原を対象とするラットモノクローナル抗体を用いて、免疫組織細胞化学染色を施した。H+E染色スライドを、異なる内皮系血管の形成用に持ち上げた。抗CD31-PE染色スライドを、Spot Cameraと結合した蛍光顕微鏡(赤外線フィルタ)下で観察した。Metamorphソフトウェアプログラムを使用して、画像をデジタル的に捉えた。微細血管の密度を、Wild他(2000)によって公開された方法によって測定した。

【 0 2 0 6 】

MCP-1およびMCP-3は、充分に特徴付けされている血管新生因子VEGFおよびbFGFと同等の血管新生を示すことが見出された。さらに、動物中、おそらくヒト腫瘍または疾患組織中で、MCP-1またはMCP-3によって誘導される血管新生は、MCP-1に対する抗体または全てのMCPファミリーのメンバーの活性を中和する3.11.2などの抗体で治療することによって予防することができる。したがって、動物当たり約0.1～0.5mgの範囲の異なる用量で動物に抗MCP抗体を注射して、治療に関する用量依存的関係が得られると思われる。10

【 0 2 0 7 】

(実施例6)

腫瘍細胞によるMCP-1生成

腫瘍細胞が細胞培養中にMCP-1を生成したかどうかを判定するために、一群の細胞系を、MCP-1を培養培地に分泌するそれらの能力に関して試験した。10%ウシ胎児血清または同等物を含むダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)中で、集合状態まで細胞を培養した。上清を除去し、R & D Sciencesからの市販のELISAキットを使用して、MCP-1に対する反応性に関して等分試料を試験した。表17は、MCP-1を構成的に分泌する一連の癌細胞系、およびELISAによって測定したそのそれぞれのMCP-1レベルを示す。20

【 0 2 0 8 】

【表 17 - 1】

表17

		細胞系	MCP-1 (pg/mL)
1	結腸癌腫	COLO-205	<10
2	結腸癌腫	HCT-15	60
3	結腸癌腫	HCT-116	122
4	結腸癌腫	HT-29	102
5	子宮頸癌	HT-3	127
6	結腸癌腫	SW707	31
7	結腸癌腫	SW948	13
8	結腸癌腫	KM-12	6
9	結腸癌腫	HCC-2998	39
10	胃癌腫	NCI-N87	37
11	胃癌腫	NCI-SNU-1 4	0
12	胃癌腫	NCI-SNU-5	<10
13	CNS癌腫	SF-268	94
14	CNS癌腫	SF-295	223
15	CNS癌腫	SF-593	>2500
16	CNS癌腫	SNB-19	>2500
17	CNS癌腫	SNB-75	>2500
18	CNS癌腫	U251	>2500
63	CNS	XF-498(Curg)	>2500
61	神經膠芽腫	SF-295(Curg)	>2500
21	髓芽細胞腫	TE671(u)	>2500
25	白血病	SR	25
26	白血病	A673	>2501
27	白血病	K562	287
28	白血病	RPMI-8226	528
29	白血病	Jurkats	184
30	白血病	THP-1	113
31	白血病	HUT78	35
32	白血病	JY	0
33	白血病	CEM	0
34	肺癌腫	MV522	74
35	肺腺癌	EKVK	>2500
36	肺腺癌	HOP-62	>2500
37	肺癌腫NSC	HOP-92	897
38	肺癌腫NSC	NCI-H1299	384
39	肺癌腫NSC	NCI-H2126	107
55	肺腺癌	NCI-H522	0
42	肺腺癌	NCI-322M	0
40	IPF肺線維芽細胞	A549	>2501
57	肺腺癌	NCI-H292	245
43	肺癌腫NSC	NCI-H460	118
45	肺扁平上皮NSC	Skmes-1	410
44	肺癌腫小細胞	SHP-77	1663
58	肺癌腫小細胞	NCI-H510A	>2500
56	肺癌腫小細胞	NCI-H69	

10

20

30

40

【表 17 - 2】

53	乳腺癌腫	HCC-2218	129	
54	乳腺癌腫	HCC-1954	113	
46	乳腺癌腫	ZR-75-30	357	
47	乳腺癌腫	MCF-7	0	
48	乳腺癌腫	MDA-MB-453	40	
49	乳腺癌腫	MDA-MB-231	>2501	10
50	乳腺癌腫	MDA-MB-468	9	
51	乳腺癌腫	NCI/ADR	0	
52	乳腺癌腫	T47D	61	
22	乳腺癌腫	SK-BR-3	475	
20	乳腺癌腫	Hs 605T	>2500	
53	メラノーマ	A431	56	
54	メラノーマ	LOX IMVI	105	
55	メラノーマ	M14	786	
56	メラノーマ	RPMI 7591	>2501	
57	メラノーマ	SK-MEL-28	29	
58	メラノーマ	UACC-62	119	
59	メラノーマ	UACC-257	265	
41	メラノーマ	Hs 936.T	15	20
24	メラノーマ	SK-mel-5	38	
25	メラノーマ	Hs 940.T	>2500	
26	メラノーマ	A375	136	
6	メラノーマ	WM.266.4	>2500	
27	膵臓癌腫	HPAC	73	
29	膵臓癌腫	HPAF II	47	
41	膵臓癌腫	CAPAN-1	>2500	
60	膵臓癌腫	Panc-1	>2500	
30	卵巣癌腫	ES2	322	30
31	卵巣癌腫	IGROV1	199	
32	卵巣癌腫	MDA-H2774	314	
33	卵巣癌腫	SK-OV-3	86	
34	卵巣癌腫	OVCAR-3	126	
36	卵巣癌腫	OVCAR-5	336	
37	卵巣癌腫	OVCAR-8	36	
38	前立腺癌腫	22Rv1	55	
39	前立腺癌腫	LNCaP	>2500	
40	前立腺癌腫	DU150	>2500	
42	前立腺癌腫	PC-3	163	
28	前立腺癌腫	DU145	68	40
43	腎臓癌腫	A498	>2500	
44	腎臓癌腫	786-0 (35h)	>2500	
45	腎臓癌腫	SK-RC-01	>2500	
46	腎臓癌腫	SK-RC-10	>2500	
47	腎臓癌腫	Caki-1	115	
48	腎臓癌腫	Caki-2	>2500	
49	腎臓癌腫	RXF-393	>2500	
50	腎臓癌腫	SK-RC-52	>2500	
51	腎臓癌腫	SN12C	>2500	

【表17-3】

52	腎臓癌腫	TK-10	533
62	腎臓癌腫	769-P	512
23	肝臓癌腫	C3A	0
59	肝臓癌腫	HepG2	>2500
19	子宮頸癌、類上皮	MS 751	>2500
35	子宮頸癌	HeLa	>2501
	頸部	C-33A	20
1	頸部	Ca Ski	32
2	頸部	ME-180	54
3	子宮	KLE	>2500
4	子宮	RL95-2	28
5	子宮	HEC-1-A	47
			MCP-1

10

【0211】

(実施例7)

20

マウス腫瘍モデルにおける抗MCP-1抗体の影響

皮下腫瘍の増殖に対する抗MCP-1抗体の影響を評価するために、指數関数的に増殖するPanc-1細胞を採取し、0.2mLのハンクスの平衡塩溶液(HBSS)に再懸濁させた。増殖因子が少ないMatrigelと混合した 5×10^6 個のPanc-1細胞を、メスのBALB/cヌードマウスの側面に注射した後に、腫瘍が生成した。移植の日の最初に、グラフに示す時間で、KLHまたはPBSに対する0.5mgの抗MCP-1抗体1.7.3、および抗体PKで動物を処置した。腫瘍の増殖は毎週調べ、その結果は平均値±SDとして表した(図4)。対照動物と処理動物の間の違いをStudentのt検定を使用して比較すると、統計的に有意であった($P<0.002$)。したがって、抗MCP-1抗体によって、in vivoでの腫瘍の増殖を低下させるのに有効な治療がもたらされる。

30

【0212】

(実施例8)

MCP-1抗体のソフトウェア支援分析

前に記載したMCP-1抗体に関するカルシウムフラックス、化学走性、および親和性データは、Spotfire、Inc.、Somerville、MAから入手可能なGuided Analyticソフトウェアを使用して分析した。その結果を図5および6に示す。

【0213】

(実施例9)

抗MCP-1抗体の構造分析

表1に示す抗体の可変重鎖および可変軽鎖を塩基配列決定して、それらのDNA配列を決定した。すべての抗MCP-1抗体の完全な配列情報を、それぞれのgammaと鎖の組合せのヌクレオチドおよびアミノ酸配列と共に、配列表中に示す。

40

【0214】

可変重鎖配列を分析して、VHファミリー、D領域配列およびJ領域配列を決定した。次いでこれらの配列を翻訳して、主なアミノ酸配列を決定し、生殖系VH、DおよびJ領域配列と比較して、体細胞突然変異を評価した。図7は、VH1-24を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図であり、CD、CDR1、CDR2およびCDR3領域、および関連系統樹を示す。図8は、VK-B3を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図であり、CD、CDR1、CDR2およびCDR3領域、および関連系統樹を示す。図9は、VK-08を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図であり、CD、CDR1、CDR2およびCDR3領域、および関連系統樹を示す。図10は、

50

VH6-1を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図であり、CD、CDR1、CDR2およびCDR3領域、および関連系統樹を示す。

【0215】

(実施例10)

診断用物質としての抗MCP-1抗体の使用

A.サンプル中のMCP-1抗原の検出

サンプル中のMCP-1抗原を検出するための、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を開発する。このアッセイでは、96ウエルマイクロタイタープレートまたは384ウエルマイクロタイタープレートなどの、マイクロタイタープレートのウエルに、抗原に対する第1の完全ヒトモノクローナル抗体を数時間吸着させる。固定された抗体は、試験サンプル中に存在する可能性がある任意の抗原の捕捉抗体として働く。ウエルを洗浄し、乳タンパク質またはアルブミンなどのプロッキング剤で処理して、検体の非特異的吸着を防ぐ。

【0216】

次にウエルを、抗原を含む疑いがある試験サンプル、または標準量の抗原を含む溶液で処理する。このようなサンプルは例えば、病状を表すとみなされる循環抗原のレベルを有する疑いがある被験体由来の、血清サンプルであってよい。

【0217】

試験サンプルまたは標準を洗浄除去した後、ビオチンとの結合によって標識した第2の完全ヒトモノクローナル抗MCP-1抗体で、ウエルを処理する。標識された抗MCP-1抗体は、検出抗体として働く。過剰な第2の抗体を洗浄除去した後、アビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)および適切な発色基質で、ウエルを処理する。試験サンプル中の抗原の濃度は、標準サンプルから開発した標準曲線との比較によって測定する。

【0218】

このELISAアッセイは、試験サンプル中のMCP-1抗原を検出するための、大変特異的で、非常に感度の良いアッセイとなる。

【0219】

B.患者サンプル中のMCP-1濃度の測定

サンドウィッチELISAを開発して、ヒト血清中のMCP-1レベルを定量化する。

サンドwich ELISAで使用した2つの抗MCP-1抗体は、MCP-1分子上の異なるエピトープを認識することが好ましい(データ示さず)。ELISAは以下のように行う: 50 μlの捕捉抗MCP-1抗体を、コーティングバッファー(0.1MのNaHCO₃、pH9.6)に2 μg/mLの濃度で溶かしたもの、ELISAプレート(Fisher)にコーティングする。4 ℃で一晩インキュベーションした後、200 μlのプロッキングバッファー(0.5%BSA、0.1%Tween20、0.01%Thimerosal、PBS中)を用いて、25 ℃において1時間プレートを処理する。PBS中に溶かした0.05%Tween20(洗浄バッファー、WB)を使用して、プレートを洗浄する(3回)。正常または患者血清(Clinomics、Bioreclamation)は、50%ヒト血清を含むプロッキングバッファーに希釈する。4 ℃で一晩血清サンプルと共にプレートをインキュベートし、WBで洗浄し、次いで25 ℃において1時間、100 μl/ウエルのビオチン化検出抗MCP-1抗体と共にインキュベートする。洗浄後、プレートをHRP-ストレプトアビジンと共に15分間インキュベートし、前と同様に洗浄し、次いで色を生成するために、o-フェニレンジアミンをH₂O₂に溶かしたもの(Sigma現像溶液)100 μl/ウエルを用いて処理する。反応は50 μl/ウエルのH₂SO₄(2M)を用いて停止させ、492 nmでELISAプレートリーダーを使用して分析する。血清サンプル中のPRO抗原の濃度は、4パラメータの曲線適合プログラムを使用して、精製MCP-1抗原の希釈液との比較によって計算する。

【0220】

C.患者の癌の段階付け

実施例10A～10Bで述べ論じた結果に基づけば、本明細書に記載する本発明の実施形態を使用することによって、MCP-1抗原の発現レベルに基づき、被験体の癌を段階付けすることができるることは理解されよう。所与の型の癌用に、疾患の進行のさまざまな段階であると診断された、かつ/あるいは癌の治療療法のさまざまな地点の被験体から、血液のサン

10

20

30

40

50

プルを採取する。血液サンプル中に存在するMCP-1抗原の濃度は、存在する抗原の量を具体的に測定する方法を使用して測定する。このような方法は、実施例10A～10Bに記載した方法などのELISA法を含む。進行または治療のそれぞれの段階に関する、統計的に有意な結果をもたらす一連のサンプルを使用して、それぞれの段階に特徴的であるとみなすことができる、一定範囲の濃度の抗原を指定する。

【0221】

試験中の被験体の癌の進行を段階付けするため、あるいは治療行程に対する被験体の応答性を特徴付けするために、血液のサンプルを被験体から採取し、サンプル中に存在するMCP-1抗原の濃度を測定する。このように得た濃度を使用して、どの濃度範囲で値が低下するかを確認する。このように確認した範囲は、さまざまな群の診断被験体で確認した、進行の段階または治療の段階と相関関係があり、これによって試験中の被験体の段階が与えられる。

10

【0222】

(実施例11)

腫瘍治療のための抗MCP-1抗体の使用

腫瘍を有するヒト患者における、抗MCP-1抗体治療のin vivoでの影響を測定するために、このようなヒト患者に一定量を超える時間、有効量の抗MCP-1抗体を注射する。治療中の一定の時間に、その腫瘍が進行するかどうか、特に腫瘍が増殖し転移するかどうかを測定するために、ヒト患者を調べる。

【0223】

20

抗MCP-1抗体で治療した腫瘍患者は、対照抗体で治療した腫瘍患者における、腫瘍増殖および腫瘍転移のレベルと比較して、低いレベルの腫瘍増殖および転移を有する。使用することができる対照抗体には、試験した抗MCP-1抗体と同じアイソタイプの抗体があり、さらに対照抗体は、MCP-1腫瘍抗原と結合する能力を有することができない。

【0224】

上述の明細書は、当業者が本発明を実施するのを可能にするのに充分であると考えられる。本明細書に記載する本発明の実施形態は、寄託した構築体により範囲限定されるわけではない。なぜなら、寄託した実施形態は、本発明の幾つかの態様の単なる例示として考えられ、機能的に等価である任意の構築体は本発明の範囲に含まれるからである。

【0225】

30

上述の記載事項および実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態を詳細に述べ、本発明者によって企図される最良の形態を記載している。しかしながら、どれほど詳細に上述の事項が本文中に現れようと、本発明は多くの方法で実施することができ、添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って、本発明を解釈すべきであることは理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0226】

【図1】MCP-1、MCP-2、MCP-3およびMCP-4に応答したTHP-1単球の移動の、試験の結果を示す図である。

【図2】MCP-2に応答したTHP-1細胞の移動能力の、用量依存式の抗体3.11.2による阻害を示す図である。

40

【図3】MCP-3に応答したTHP-1細胞の移動能力の、用量依存式の抗体3.11.2による阻害を示す図である。

【図4】抗MCP-1抗体1.7.3の、膵臓腫瘍Panc-1の増殖に対する影響を示す図である。

【図5】MCP-1抗体に関するカルシウムフラックス、化学走性、および親和性データの、3次元の分散プロットを示す図である。

【図6】MCP-1抗体に関するカルシウムフラックス、化学走性、および親和性データの、他方向の3次元の分散プロットを示す図である。

【図7 A - 1】VH1-24を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

50

【図7A-2】VH1-24を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

【図7A-3】VH1-24を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

【図7B】VH1-24を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。関連系統樹を示す。

【図8A-1】VK-B3を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

【図8A-2】VK-B3を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

【図8B】VK-B3を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。関連系統樹を示す。

【図9A】VK-08を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

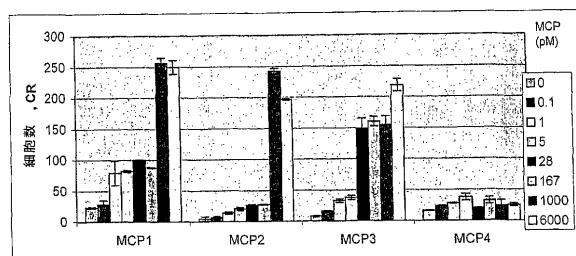
【図9B】VK-08を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。関連系統樹を示す。

【図10A】VH6-1を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。CDR1、CDR2およびCDR3領域を示す。

【図10B】VH6-1を使用する抗MCP-1配列のClustal W比較を示す図である。関連系統樹を示す。

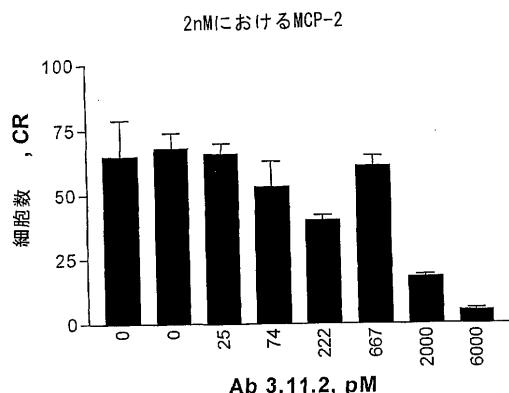
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2

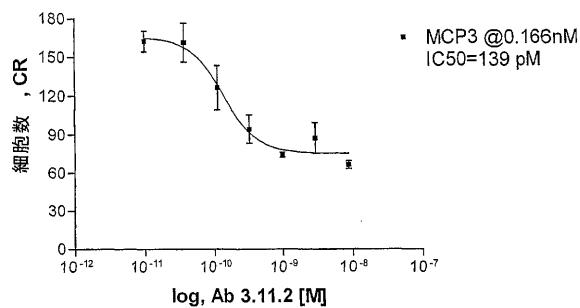


10

20

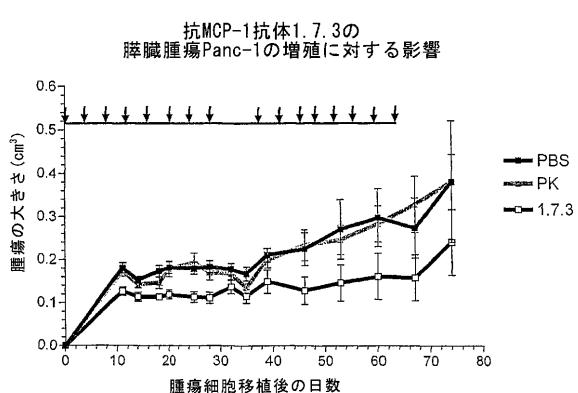
【図3】

Figure 3



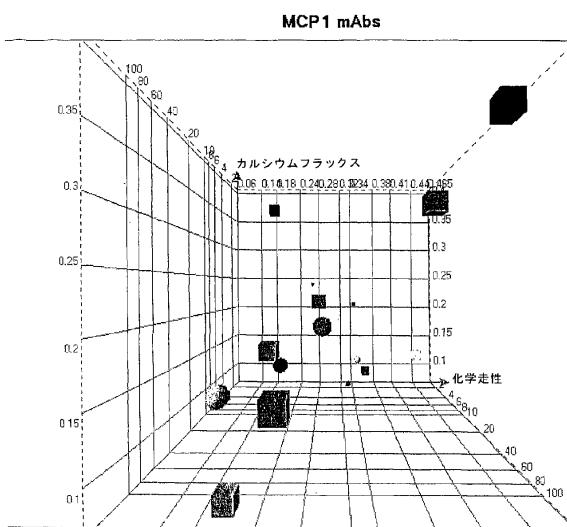
【図4】

Figure 4



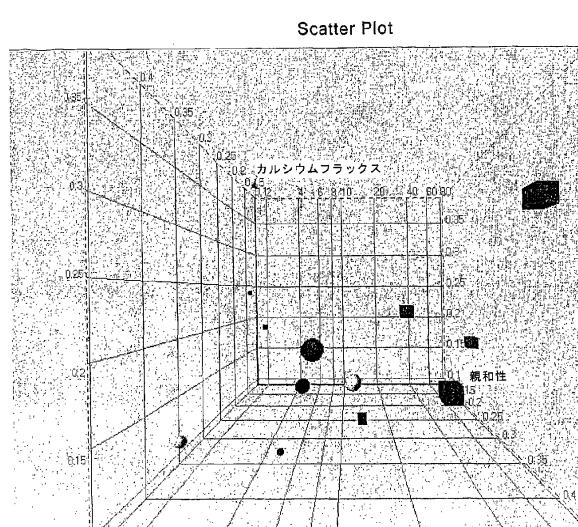
【図5】

Figure 5



【図6】

Figure 6



【図7A-1】

【図7A-2】

Figure 7A

VH1-24を使用する配列のアライメント

		CDR1	CDR2
VH1-24			
MCPI-1_1_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_10_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_11_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_12_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_13_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_16_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_17_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_19_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_57_HC	QVQLVQSGAEVKPKCSVKCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_6_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_7_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_8_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-1_9_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-2_3_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_10_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_15_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_16_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_2_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_3_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_5_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_6_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_7_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-3_8_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-4_5_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-4_6_3_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-4_7_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-4_5_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		
MCPI-4_6_1_HC	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKVCSKGTYLTTELSMHWVRQAPGKGLWNGGFPEDEGETIV		

Figure 7A (続き)

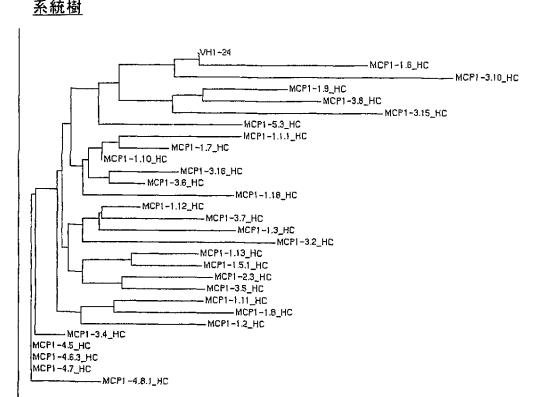
【図7A-3】

【図 7 B】

Figure 7A (続き)

VHL-24	---
MCP1-1,_1..1_HC	VSS
MCP1-1,_10_HC	VSS
MCP1-1,_11_HC	VSS
MCP1-1,_12_HC	VSS
MCP1-1,_13_HC	VSS
MCP1-1,_18_HC	VSS
MCP1-1,_2_HC	VSS
MCP1-1,_3_HC	VSS
MCP1-1,_5..1_HC	VSS
MCP1-1,_6..6_HC	VSS
MCP1-1,_8_HC	VSS
MCP1-1,_9_HC	VSS
MCP1-2,_3..3_HC	VSS
MCP1-3,_10_HC	VSS
MCP1-3,_15_HC	VSS
MCP1-3,_16_HC	VSS
MCP1-3,_2_HC	VSS
MCP1-3,_4_HC	VSS
MCP1-3,_5_HC	VSS
MCP1-3,_6_HC	VSS
MCP1-3,_7_HC	VSS
MCP1-3,_8_HC	VSS
MCP1-4,_5..5_HC	VSS
MCP1-4,_6..3_HC	VSS
MCP1-4,_7..7_HC	VSS
MCP1-5,_3..5_HC	VSS
MCP1-4,_8..1_HC	VSS

Figure 7B



【図 8 A - 1】

【図 8 A - 2】

Figure 8A

VK-B3を使用する配列のアライメント

	CDR1	CDR2
VC-B3		
MCP1-1. 1. 1_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 1. 10_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 11_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 12_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 13_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 14_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 15_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 3_IC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 5_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 7_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-1. 8_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-2. 1_IC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-2. 3_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 14-1. 1_IC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 15_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 16_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 7_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 6_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 7_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-3. 8_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-4. 5_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-4. 5_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-4. 7_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-4. 8_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	
MCP1-5. 3_LC	DIVMTQSPDSLVLGERATINCKSSQSIVLVSNNNNYLWYQKPGQPPLLLWYMASTR	

VK-B3	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTTF
MCP1-1.1..1_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..10_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..11_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..12_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..13_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..14..1_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..18_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..3_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYH18N1WTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..5..1_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..7..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..9..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-1..9..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-2..3_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..1..1..1_LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..1..5..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..1..6..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..5..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..6..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..7..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-3..8..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-4..5..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-4..6..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-4..7..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-4..8..1..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK
MCP1-5..3..LC	ESGVDFRPGSGGSGSGTDFYLTLISLQAEDWAVYVQCYQYTSPWTFGQGTQVWEIK

Figure 8A (続き)

【 図 9 A 】

Figure 9A

VK-08を使用する配列のアライメント

VK-08	MCP1-2.4_LC	MCP1-3.11_LC	CDR1	CDR2
			DIQMTQSPSLSASVGDRVITTCQASQDINHLYNWWYQQKPGKAPKLIIYDASNLETGVPS DIQMTQSPSLSASVGDRVITTCQASQDITTYLNWYQQKPGKAPKLIIYDASNLETGVPS DIQMTQSPSLSASVGDRVITTCQASQDINHLYNWWYQQKPGKAPKLIIYDASNLETGVPS	***** *****
VK-08	MCP1-2.4_LC	MCP1-3.11_LC	CDR3	----- RFSSGSSGCTDTFTISSLQPEPDIAITYVQCOQNLP----- RFSSGSSGCTDTFTISSLQPEPDIAITYVQCOQNLP----- RFSSGSSGCTDTFTISSLQPEPDIAITYVQCOQNLP-----

(図 1 0 B)

Figure 10B

MCP1-1.4.1.1_HC
MCP1-1.14.1.1_HC
MCP1-3.14.1.1_HC

〔図9B〕

Figure 9B

系統樹

```
graph TD; A["VK-08"] --- B["MCP1-2.4_LC"]; B --- C["MCP1-2.4_1C"]
```

The diagram illustrates a system tree structure. At the top level is the node 'VK-08'. A horizontal line extends from 'VK-08' to the right, ending in an arrowhead that points to the node 'MCP1-2.4_LC'. From 'MCP1-2.4_LC', another horizontal line extends further to the right, ending in an arrowhead that points to the node 'MCP1-2.4_1C'.

【 义 10A 】

Figure 10A

VH6-1を使用する配列のアライメント

VH6-1	MCP1-1.4.1.1_HC	OVOLOQSGFGLVVKPSQTLSLCAISGDSVSNSAANWIRQSPRSQRLWLGRTYRWSRWY	CDR1	CDR2
MCP1-1.4.1.1_HC	MCP1-1.4.1.1_HC	OVOADAOQSGFGLVVKPSQTLSLCAISGDSVSNSAANWIRQSPRSQRLWLGRTYRWSRWY		
MCP1-3.14.1.1_HC	MCP1-3.14.1.1_HC	OVOADAOQSGFGLVVKPSQTLSLCAISGDSVSNSAANWIRQSPRSQRLWLGRTYRWSRWY		
CDR2				
VH6-1	MCP1-1.4.1.1_HC	NNDVAVSVHSRITTPDNTSEQNQLSQQNLSVTPPEATVYVCCR	CDR3	
MCP1-1.4.1.1_HC	MCP1-1.4.1.1_HC	SDHRAVSVHSRITTPDNTSEQNQLSQQNLSVTPPEATVYVCCRISGYTQVHMDWQCGTTV		
MCP1-3.14.1.1_HC	MCP1-3.14.1.1_HC	SDHRAVSVHSRITTPDNTSEQNQLSQQNLSVTPPEATVYVCCRISGYTQVHMDWQCGTTV		
CDR3				
VH6-1	MCP1-1.4.1.1_HC	---		
MCP1-1.4.1.1_HC	MCP1-1.4.1.1_HC	VSS		
MCP1-3.14.1.1_HC	MCP1-3.14.1.1_HC	VSS		

【配列表】

0004468172000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
	A 6 1 P 37/00
	A 6 1 P 43/00 1 1 1
	C 1 2 P 21/08

- (72)発明者 ジーン・エム・グダス
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94560・ニュワーク・クリスタル・スプリングス・ドライヴ・36178
- (72)発明者 メアリー・ハック - フレンショ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94560・ニュワーク・ウイロウ・プレイス・8472
- (72)発明者 オリット・フォード
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94404・フォスター - シティ・ケイマン・レーン・712
- (72)発明者 メイナ・エル・リヤン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94526・ダンヴィル・グラスゴー・サークル・115
- (72)発明者 キラン・アルワリヤ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94536・フレモント・ボスウォース・コート・36525
- (72)発明者 サニル・バクタ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94545・ヘイワード・マイケルサン・ストリート・24405

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 国際公開第02/002640 (WO, A1)
特開平11-060502 (JP, A)
特開平09-067399 (JP, A)
国際公開第01/089565 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
PubMed
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
UniProt/PDB/GeneSeq

专利名称(译)	针对单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP4468172B2	公开(公告)日	2010-05-26
申请号	JP2004529174	申请日	2003-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	Abgenix公司公司		
申请(专利权)人(译)	Abgenix公司 , 公司		
当前申请(专利权)人(译)	Abgenix公司 , 公司		
[标]发明人	ジーンエムグダス メアリー・ハック・フレンショ オリット・フォード マイナエル・リヤン キラン・アルワリヤ サニル・バクタ		
发明人	ジーン・エム・グダス メアリー・ハック-・フレンショ オリット・フォード マイナ・エル・リヤン キラン・アルワリヤ サニル・バクタ		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/09 C07K17/00 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P13/12 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 A61P43/00 C12P21/08 A61P35/04 C07K16/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/24 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565		
FI分类号	C07K16/24.ZNA C12N15/00.A C07K17/00 G01N33/53.D A61K39/395.T A61K39/395.U A61P35/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P13/12 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 A61P43/00.111 C12P21/08		
代理人(译)	渡边 隆 村山彥		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	60/404802 2002-08-19 US		
其他公开文献	JP2005536534A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述的本发明的实施方案涉及抗原单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 的抗体和这些抗体的用途。特别地，根据一些实施方案，提供了针对抗原MCP-1的完全人单克隆抗体。编码重链和轻链免疫球蛋白分子的核苷酸序列和包含这些分子的氨基酸序列，特别是框架区和/或互补决定区 (CDR)，特别是FR1至FR4或CDR1至CDR3提供对应于侧翼相邻重链和轻链序列的序列。还提供了表达此类免疫球蛋白分子和单克隆抗体的杂交瘤或其他细胞系。

番号	配列	配列番号
	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	1
1.1.1	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	2
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	3
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	4
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	5
1.1.0.1	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	6
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	7
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	8
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	9
1.1.1.2	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	10
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	11
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	12
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	13
1.1.1.3	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	14
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	15
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	16
	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	17
1.1.1.8	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	18
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	19
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	20
	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	21
1.2.1	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	22
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	23
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	24
	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	25
1.3.1	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	26
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	27
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	28
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	29
1.5.1	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	30
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	31
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	32
	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	33
1.6.1	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	34
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	35
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	36
	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	37
1.7.1	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	38
	軽鎖の可変領域をコードする又クレオチド配列	39
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	40
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	41
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	42
1.8.1	重鎮の可変領域をコードする又クレオチド配列	43
	重鎮の可変領域をコードするアミノ酸配列	44