

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000－355548
(P2000－355548A)

(43)公開日 平成12年12月26日(2000.12.26)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395			A 6 1 K 39/395	D
				H
				N
A 6 1 P 9/00			A 6 1 P 9/00	
43/00	105		43/00	105
審査請求 有 請求項の数 15 O L（全 22数） 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2000－126131(P2000－126131)	(71)出願人	500194485
(62)分割の表示	特願平5－510309の分割		コア セラピューティクス , インコーポレイティド
(22)出願日	平成4年12月1日(1992.12.1)		アメリカ合衆国,カリフォルニア 94080,サウス サンフランシスコ,エスティーイー. 80,イースト グランド アベニュー 256
(31)優先権主張番号	07/801795	(72)発明者	ラマクリシュナン , バニタ
(32)優先日	平成3年12月2日(1991.12.2)		アメリカ合衆国,カリフォルニア 94002,ベルモント,アーバー アベニュー 2019
(33)優先権主張国	米国(US)	(74)代理人	100077517
			弁理士 石田 敬 (外2名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 哺乳動物の血管系における内膜の過形成を阻害するための医薬組成物

(57)【要約】

本発明は、ヒト・ベータ型PDGFレセプタの細胞外ドメインに特異的に結合する免疫グロブリン・ポリペプチドに向けられている。このレセプタへのこの免疫グロブリン・ポリペプチドの結合は、レセプタのリン酸化及びダイマー化の阻害により、並びにその細胞表面上のヒトPDGFベータ型レセプタ表示細胞のPDGF- 仲介有糸分裂誘発、化学走性及び転移の阻害により、示されるように、PDGF - 誘導(又は刺激) レセプタ活性化を阻害する。この免疫グロブリン・ポリペプチドをエンコードしている核酸も、本発明中に含まれる。好ましくは免疫グロブリン・ポリペプチドは、診断及び治療の用途をもつ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有効量の抗一血小板由来の成長因子(PDGF)レセプタ抗体を含む、哺乳動物の血管系における内膜の過形成を阻害するための医薬組成物である組成物。

【請求項2】 前記哺乳動物が霊長目の動物である請求項1の医薬組成物。

【請求項3】 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項1の医薬組成物。

【請求項4】 前記抗体が抗-PDGF-βレセプタ抗体である請求項1の医薬組成物。

【請求項5】 一団の抗-β-PDGFレセプタ抗体を含む請求項1の医薬組成物。

【請求項6】 前記一団の抗-PDGFレセプタ抗体がBBイソ形のPDGFのβ-PDGFレセプタへの結合を中和することができる請求項5の医薬組成物。

【請求項7】 前記一団の抗-PDGFレセプタ抗体が抗-PDGF-βレセプタ抗体を含む請求項5の医薬組成物。

【請求項8】 前記抗体がヒトモノクローナル抗体である請求項1の医薬組成物。

【請求項9】 前記抗体が一本鎖抗体である請求項1の医薬組成物。

【請求項10】 前記抗体がキメラ抗体である請求項1の医薬組成物。

【請求項11】 前記抗体がヒトマウスキメラ抗体である請求項10の医薬組成物。

【請求項12】 前記キメラ抗体がヒト不変ドメインに操作可能に結合したマウス可変ドメインを含む請求項11の医薬組成物。

【請求項13】 血管の移植器官に内膜の過形成を生じさせる請求項1の医薬組成物。

【請求項14】 血管の損傷部位での平滑筋細胞の増殖を阻害するための医薬組成物であって、損傷部位での血管の平滑筋細胞の有糸分裂誘発及び／または移動を阻害するのに十分な量の抗一成長因子レセプタ抗体を含むこと及び前記抗体が抗-PDGF-βレセプタ抗体から選択されるという事実を特徴とする前記組成物。

【請求項15】 前記哺乳動物が霊長目の動物である請求項14の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、ヒトベータ血小板由来成長因子レセプタ提示細胞のPDGF- 仲介増殖を阻害する免疫グロブリン・ポリペプチドの製造及び使用に関する。

【0002】

【従来の技術】血小板由来成長因子(platelet derived growth factor(PDGF))は、間充織(mesenchymal) 起源の細胞における有効な増殖剤である(Antoniades, H.N. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1809-1813; Bowen-Pope, D.F. and Ross. R. (1982) J. Biol.

Chem. 257:5167-5171; Heldin, C-H. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258: 10054-10059(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。PDGF(分子量30kDa)は、A又はB という2つの相同鎖から成るジスルフィド結合ダイマーである(Johnsson, A. et al. (1982) Biochim. Biophys. Res. Commun. 104:66-74(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。この鎖は、同一又は異なる型の鎖と組み合わせられ、相同形態(isoforms) AA、BB又はABをもたらす(Heldin, C-H. et al. (1986) Nature 319:511-514 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))。この有糸分裂促進物質(mitogen)PDGFは、最初に同定され(Antoniades, H.N. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1809-1813; Raines, E.W. and Ross, (1982) J. Biol. Chem. 257:5154-5160 (これらの両方を、引用により本明細書中に取り込む。))、そしてヒト血小板から精製された(Raines, 前掲書中)、但し、その後の研究は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージ及び繊維芽細胞さえも含む幾つかの細胞がPDGFを合成することを、示した(Ross, R. et al. (1986) Cell 46:155-169 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))。

【0003】PDGFの相同形態のすべてにより誘導される細胞増殖は、PDGFレセプタへのリガンド結合により仲介される(Heldin, C-H. (1983)前掲書中., EK, B. et al. (1982) Nature 295:419-420; Glenn, K. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:5172-5176; Frackelton, A.R. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:7909-7915; Williams, L.T. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:5287-5294(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。PDGFレセプタ(分子量180kDa)は、チロシン・キナーゼ・ファミリーに属し、そしてA型(又はα型)(Matsui, T. et al. (1989)Science 243: 800-804,及びClaesson-Welsh, L. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4917-4921 (これらの両方を、引用により本明細書中に取り込む。))及びB型(又はベータ型)(Yarden, Y. et al. (1986) Nature 323:226-232,及びEscobedo, J.A. et al. (1988) Science 240:1532-1534(これを、引用により本明細書中に取り込む。))という2つのレセプタ・サブタイプから成る。

【0004】PDGFのレセプタへの高いアフィニティー結合が、レセプタ・ダイマー化(Bishayee, S. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:11699-11705, 及びHeldin, C-H. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 8905-8912) 及び自動リン酸化(Frackelton, et al. 前掲書中)の後に起こり、そしてDNA合成における最高点に達する一連の複雑な細胞間シグナル事件(signalling events)をもたらす。マウス及びヒトPDGFベータ・レセプタ並びにPDGFアルファ・レセプタ遺伝子が、クローン化されている(Matsui et al. 前掲書中, Claesson-Welsh et al. 前掲書中, Yarden et al. 前掲書中, 及びEscobedo et al. 前

掲書中)。本明細書中でPDGFレセプタについていうとき、A型とアルファ型とを、同様に、B型とベータ型とを、交換できるものとして使用する。

【0005】2つのタイプの相同形態は、それらの顕著に異なるリガンド結合の特性により、区別されることができる。PDGFベータ・レセプタは、B鎖(相同形態BB及びAB)のみに結合し、一方、PDGFアルファ・レセプタは、PDGFのすべての形態(A及び/又はB鎖を含む形態(Matsui et al.前掲書中, Claesson-Welsh et al. 前掲書中, 及びSeifert, R.A. et al. (1989) J. Biol. Chem. 10 264:8771-8778))に結合することができる。PDGFレセプタは、マクロファージ-コロニー刺激因子レセプタ(Coussens, L. et al. (1986) Nature 320:277-280) 及びc-kit プロトオンコジーン(protooncogene) 生成物(Yarden, et al.,前掲書中) に対する高い程度の構造相同性を示す。

【0006】PDGFレセプタは、それらのβ-シート豊富構造に基づく5つのIg-様ドメイン(ドメイン1-5)中にはっきり分けられることができる細胞外ドメインを特徴とする。約100アミノ酸のこれらのIg反復は、(第4反復を除き)それぞれ、規則的に間隔をあけて配置されたシステイン残基をもつ。このレセプタは、単一のトランスメンブラン・ドメイン及び細胞質チロシン・キナーゼ・ドメインをもつ(Williams, L. T. (1989) Science 24 3: 1564-1570(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。

【0007】PDGFは、正常な生理学的過程、例えば、組織修復及び胚形成(embryogenesis)において重要な役割を演じている(Ross, R. et al.前掲書中)。しかしながら、目下、研究は、病因学的増殖失調における及び特定の肉腫の発達におけるこの有効な有糸分裂促進物質(mitogen)に係わっている(Ross, R. et al.前掲書中)。PDGF A鎖及びPDGFベータ・レセプタの発現は、その場のハイブリダイゼーションによるヒト・アテローム性動脈硬化症プラークにおいて検出された(Wilcox, J.N. et al. (1988) J. Clin. Invest. 82:1134-1143)。最近、Ferns et al.((1991) Science 253:1129-1132)は、PDGFに対するポリクローナル抗体が無胸腺の(athymic)ヌード・ラットにおける脱内皮化頸動脈(deendothelialised carotid arteries)における脈管内膜の(intimal)病変の形成を有意に減少させることを、報告した。PDGFは、間充組織起源の細胞における増殖疾患の病因論において掛かり合っている(Nister, M. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:926-930, 及びNister, M. et al. (1987) Cancer Res. 47:4953-4961 (これらの両方を、引用により本明細書中に取り込む。))。Golden et al. は、PDGF A鎖メッセージが、血管移植のためのヒヒ・モデルにおける脈管内膜の過形成(hyperplasia)の領域内において増加されたことを報告した((1990) J. Vasc. Surg. 11: 580-585)。また、PDGFは、平滑筋のために化学走

性(chemotactic)であり(Westermark, B. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:128-132)、及び血小板PDGFは、ヒヒ化ラット頸動脈における平滑筋細胞の転移及び増殖であって重症な狭窄症(stenosis)をもたらすものの、のための原因となる剤となることができる。

【0008】他の増殖因子及びそれらのレセプタの研究は、レセプタに対する抗体の発明により、援助された。例えば、表皮成長因子レセプタを認識する抗体は、レセプタ活性化の機構の評価における強力な道具であることが証明されている(Spaargaren, M. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:1733-1739, (これを、引用により本明細書中に取り込む。))。インターロイキン-2(IL-2)のためのレセプタに対する抗体は、IL-2の内面化(internalisation)を阻害し、そしてこれ故、応答性細胞の増殖のその後の導入を阻害する(Duprez, V. et al. (1991) J. Biol. Chem. 1497-1501(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。同様に、表皮成長因子(EGF)レセプタに対するモノクローナル抗体は、ヒト哺乳動物腺癌(adenocarcinoma)細胞系MCF-7のエストロゲン-刺激成長を阻害する(Eppstein, D.A.(1989) J. Cell. Physiol. 141: 420-430 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))。このような抗体は、成長因子-仲介疾患の治療において非常に治療的な価値を有することができる。

【0009】幾つかのグループは、PDGFレセプタに対する抗体を単離したが、これらの抗体は、用途を限定されていた(例えば、Kawahara, R.S. et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 147:839-845 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。))。追加のモノクローナル抗体が、ブタの子宮(porcine uterus)からのPDGFの細胞外PDGF-結合ドメインに対して作られたが(Ronnstrand, L. and Terracio, L. (1988) J. Biol. Chem. 263:10429-10435 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))、これらの抗体は、¹²⁵I-標識PDGFの、ヒト繊維芽細胞への結合を阻害しなかった。また、PDGF活性を阻害しないPDGFレセプタに対する多数の抗体が、Kanakaraj, P.S. et al. (1991) Biochemistry 30:1761-1767; Claesson-Welsh, L. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:1742-1747; Seifert, R. A. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:8771-8778; Kumjian, D. A. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8232-8236; Bishayee, S. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3696-3702; Hart, C. E. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:10780-10785; Escobedo, J. A. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:1482-2487; Daniel, T. O. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 9778-9784; Keating, M. T. and L. T. Williams (1987) J. Biol. Chem. 262:7932-7937; Kazlauskas, A. and J. A. Copper (1990) EMBO J. 9:3279-3286; (これらの全てを、引用により本明細書中に取り込む。))により、報告されて

いる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】このように、ヒト・レセプタの活性化を特異的に阻害、及び/又はヒト・ベータ型PDGFレセプタを提示する細胞の増殖を、可能にする免疫グロブリン及び他の剤の必要性が在る。このような剤は、そのレセプタの異なる機能的ドメインのマッピングにおいて、そして正常及び疾患状態におけるPDGF及びそのレセプタの役割を吟味することにおいて、有用であろう。さらに、このような剤は、PDGF- 仲介増殖性疾患、そしてまた、PDGF- 仲介化学走性及び転移の治療における治療的価値をもつであろう。このような疾患は：a)再狭窄(restenosis)であって、血管形成(angioplasty)、atherectomy、又はプラーク(plaque)除去の他の侵入方法後の冠状動脈再狭窄(coronary restenosis)、並びに同一手順の後の腎臓(renal)又は末梢(peripheral)の動脈再狭窄を含むもの；b)血管増殖現象及び繊維症(fibrosis)であって急性損傷の他の形態と関連のあるもの、例えば：成人呼吸困難症候群関連肺繊維症、腎炎(nephritis) 関連腎臓繊維症、カワサキ病関連冠状狭窄、及び他の動脈炎(arteritis)、例えば、タカヤス病関連血管狭窄(vascular narrowing)；c)静脈移植における狭窄の防止；d)移植臓器における加速された平滑筋細胞の転移及び増殖を原因とする狭窄の防止；e)他の繊維症の(fibrotic)過程、例えば、他の硬皮症(scleroderma)、筋繊維症(myofibrosis)；及び、f)PDGFにより仲介される腫瘍細胞増殖の阻害、を含む。

【0011】本発明は、これらの及び他の必要性を実現する。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、ヒト型ベータ血小板由来成長因子レセプタ(β PDGF-R)に特異的に結合する免疫グロブリン・ポリペプチドであって、その免疫グロブリン・ポリペプチドの、ヒト β PDGF-Rの第5 Ig-様ドメインへの結合が、以下の効果の1以上をもつものを提供する：i)レセプタへのPDGF BB 結合の阻害；ii) PDGF-誘導 β PDGF-Rリン酸化の阻害；iii)PDGF-誘導 β PDGF-Rダイマー化の阻害；iv)ヒト β PDGF-R提示細胞のPDGF-誘導有糸分裂誘発の阻害；及びv) β PDGF-R提示細胞のPDGF-誘導化学走性及び転移。本発明の好ましい態様は、モノクローナル抗体、例えば、モノクローナル抗体2A1E2であってIgG₁イソタイプを有するものである。

【0013】上記の性質をもつ免疫グロブリン・ポリペプチドの全部又は部分をコードしているものに実質的に同じ配列をもつ単離核酸も、本発明に包含される。これらの核酸によりトランスフェクト、形質転換、又は感染された細胞系は、請求の核酸を含む細胞系を培養しそし

てその免疫グロブリン・ポリペプチド又は断片を収穫することによりその免疫グロブリン・ポリペプチド又はこれらの断片を製造する方法と同様に、本発明の他の態様である。

【0014】本発明の免疫グロブリン・ポリペプチドは、診断及び治療の用途をもつ。例えば、本発明のさらなる態様は、平滑筋細胞の増殖に関連するPDGF- 仲介疾患をもつヒトを治療する方法であって、患者に、本発明の免疫グロブリン・ポリペプチドの治療的有効投与量を投与することを含んで成る方法を含む。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明は、ヒト型ベータPDGFレセプタに特異的に結合する免疫グロブリン・ポリペプチドを提供する。この抗体は、その細胞表面上にヒト・ベータ型PDGFレセプタを提示する細胞のPDGF-誘導有糸分裂誘発を阻害することができる。本発明は、診断用途において、並びに、ヒト・ベータ型PDGFレセプタを提示する細胞の、PDGF- 仲介増殖、転移及び化学走性に関連する疾患の治療のためにも、有用であろう。

定義

a)蛋白

用語"ペプチド"、"ポリペプチド"又は"蛋白"は、本明細書中で互換可能に使用される。用語"実質的同一性"は、ポリペプチドについていうとき、問題のポリペプチド又は蛋白が天然蛋白の全体又はそれらの部分に少なくとも約30%同じであり、普通には少なくとも約70%同じであり、そして好ましくは少なくとも約95%同じであることを示している。

【0016】本明細書中で使用するとき、用語"単離された"、"実質的に純粋な"及び"実質的に均一な"

は、互換可能に使用され、そして蛋白に天然に同伴する成分から分離された蛋白について記載している。典型的には、モノマー蛋白が、サンプルの少なくとも約60~75%が1本鎖ポリペプチド骨格を示すとき、実質的に純粋である。僅かな変異体又は化学修飾は、典型的には、同じポリペプチド配列を占めている。実質的に純粋な蛋白は、典型的には、蛋白サンプルの約85~90%を超えるもの、より普通には約95%を含んで成るであろうし、そして好ましくは約99%を超えるものであろう。蛋白の純度又は同質性(homogeneity)は、本分野においてよく知られた多数の手段、例えば、蛋白サンプルのポリアクリルアミド・ゲル電気泳動、その後の、染色の間のポリアクリルアミド・ゲル上の単一ポリペプチド・バンドの可視化により、示されることができる。特定の目的のためには、高分解能が必要であろうし、そしてHPLC又は精製用途のための類似の手段が必要であろう。

【0017】ポリペプチドは、それがその天然の状態においてそれを同伴する生来の汚染物から分離されるとき、天然関連成分を実質的に含まない。したがって、化学的に合成される又はそれが天然に生じる細胞と異なる

細胞系内で合成されるポリペプチドは、その天然関連成分を実質的に含まないであろう。蛋白は、硫酸アンモニウムのような物質による選択的沈降、カラム・クロマトグラフィー、免疫精製法、及びその他を含む本分野においてよく知られた標準的な技術により、実質的な同質性まで精製されることができる。例えば、R. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag: New York (1982) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)を参照のこと。

b) 核酸

本明細書中で使用するとき、核酸は、DNA 又はRNA であることができる。核酸についていうとき、用語" 実質的同一性" は、2 つの核酸配列、又はそれらの設計された部分が、場合により並べられそして比較されたとき、適当なヌクレオチドの挿入又は欠失を伴って、そのヌクレオチドの少なくとも約80% において、そのヌクレオチドの、普通には少なくとも約90% ~95% 、そしてより好ましくは少なくとも約98~99.5% において、同一であることを、示している。

【0018】あるいは、実質的な核酸配列の同一性は、核酸セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下、他の核酸ストランドとハイブリダイズするであろうときに、存在する。" 実質的に相補的な" は、同様に、ある核酸が他の核酸と同一であり、又はそれに選択的にハイブリダイズするということを、意味している。典型的には、選択的ハイブリダイゼーションは、少なくとも14-25 ヌクレオチドのストレッチにわたり少なくとも約55% の同一性が、好ましくは少なくとも約65% の同一性が、より好ましくは少なくとも約75% の、そして最も好ましくは少なくとも約90% の同一性が、在るときに、起こる。M. Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12:203 (1984) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)を参照のこと。

【0019】ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、典型的には、約1M未満の、より普通には約500mM 未満の、そして好ましくは約200mM 未満の塩濃度を含むであろう。温度条件は、典型的には、22℃よりも高く、より典型的には約30℃よりも高く、そして好ましくは約37℃を超えるであろう。その相補的ストランドの塩基組成及びサイズ、有機溶媒の存在及び塩基非適合の程度を含む他の要素が、劇的にハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与えることができるので、パラメーターの組み合わせが、いずれか1 つの単独の絶対的な測定よりも、より重要である。

【0020】" 単離された" 又は" 実質的に純粋な" は、核酸についていうとき、アルカリ/SDS処理、CsCl結合、カラム・クロマトグラフィー。そして本分野においてよく知られているその他を含む標準的な技術により、他の細胞成分又は他の汚染物、例えば、他の細胞核酸又は蛋白から精製されているものをいう。F. Ausubel, et

al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing andWiley-Interscience, New York (1987) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)を参照のこと。

【0021】核酸は、それが他の核酸配列との機能的関係に中に置かれてるとき、" 作用可能な状態で結合されて(operably linked)"いる。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合に、コーディング配列に作用可能な状態で結合されている。一般的には、作用可能な結合は、結合されている核酸配列が連続しており、2 つの蛋白コーディング領域を連結させる必要がある場合には、連続しており、そして読み取り枠内にある。

【0022】核酸操作のための技術、例えば、ポリペプチドをエンコードしている核酸配列の、発現ベクターへのサブクローニング、プローブの標識付け、DNA ハイブリダイゼーション、等は、一般的に、例えば、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 又はAusbel et al., ed. (1987) 前掲書中、(これらの両方を、引用により本明細書中に取り込む。)の中に記載されている。

【0023】" 発現ベクター" 、" クローニング・ベクター" 又は" ベクター" は、しばしば、プラスミド又は他の核酸分子であって選ばれた宿主内で複製することができるものである。発現ベクターは、自己複製可能であり、又はそれらは、本分野においてよく知られた方法により、宿主細胞のゲノム内に挿入されることにより、複製することができる。自己複製したベクターは、選ばれた宿主細胞内において機能的な複製起点又は自律複製配列(autonomous replicating sequence(ARS))をもつであろう。しばしば、ベクターが、1 以上の宿主細胞内において、例えば、クローニング及び構築のための大腸菌(*E.coli*)内において、並びに発現のための哺乳類細胞内において、使用可能であることが必要である。

【0024】哺乳類細胞系は、しばしば、真核生物から得られるポリペプチドの発現のための宿主細胞として使用される。培養における哺乳類細胞の増殖(Propagation) は、それ自体よく知られている。Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, ed. (1973) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)を参照のこと。また、宿主細胞系は、数ある中で、バクテリア(例えば、大腸菌(*E.coli*)又はバチルス・サブチリス(*B. subtilis*))、酵母、糸状菌、植物細胞、又は昆虫細胞、のような生物を含む。

【0025】" 形質転換" は、よく知られた方法により、問題の核酸を含むベクターを直接に宿主に導入することをいう。宿主のタイプに依存する形質転換の方法は、エレクトロポレーション; 塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE- デキストラン、又

は他の物質を使用するトランスフェクション；マイクロプロジェクトイル・ボンバードメント(microprojectile bombardment)；リポフェクション；感染(ベクターが感染性剤の場合)；及び他の方法を含む。一般的には、Sambrook et al., (1989) 前掲書中、及びAusbel et al. (ed.), (1987) 前掲書中、を参照のこと。また、先に記載した核酸が導入されている細胞への言及は、そのような細胞の子孫を含むことを意味している。

c) 抗体

本明細書中で使用するとき、"免疫グロブリン・ポリペプチド" は、特異的な免疫反応活性をもつ分子をいう。抗体は、典型的には、免疫グロブリン・ポリペプチドのテトラマーである。本明細書中で使用するとき、用語"抗体" は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされている1以上のポリペプチドから成る蛋白をいう。免疫グロブリン遺伝子は、カッパ又はラムダ型を有することができる軽鎖をコードしているもの、及び重鎖をコードしているものを含み、重鎖の型は、アルファ、ガンマ、デルタ、エプシロン及びミューである。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端部分は、定常領域であり、一方、そのアミノ末端部分は、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子によりコードされている。免疫グロブリンの可変領域は、抗原認識特異性を提供する部分である。特に、その特異性は、その免疫グロブリンの、相補性決定領域(complementarity determining regions(CDRs)) であって超可変領域としても知られているものの内に在る。免疫グロブリンは、例えば、Fv、Fab、及びF(ab)₂、を含む様々な形態において、並びに1本鎖において、存在することができる(例えば、Huston, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883(1988)及びBird, et al., Science 242:423-426 (1988)(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。(一般的には、Hood, et al., "Immunology", Benjamin, N. Y., 2nd ed. (1984), (これを、引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。))。重鎖及び軽鎖のための遺伝子が1本鎖コーディング配列内で組み合わせられているところの1本鎖抗体を、使用することもできる。

【0026】"モノクローナル抗体" は、当業者に馴染みのある様々な技術により得られることができる。簡単に言えば、所望の抗原により免疫化された動物からの脾臓細胞を、一般的には骨髓腫細胞との融合により、不死化する(Kohner and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976))。不死化の他の方法は、Epstein Barrウイルス、オンコジーン、又はレトロウイルスによる形質転換、あるいは、本分野においてよく知られた他の方法を含む。単一の不死化細胞から生じたコロニーは、所望の特異性及び抗原についてのアフィニティーを有する抗体を作り出すためにスクリーニングされ、そしてこのような細胞により作られたモノクローナル抗体の収率は、脊椎動物宿主の腹膜腔(peritoneal cavity)中への注射を含

む様々な技術により、増強されることができる。

【0027】また、モノ特異的免疫グロブリンが、原核生物又は真核生物宿主細胞における組換え技術により、作られることができる。"キメラ"抗体は、その軽鎖及び重鎖の遺伝子が異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから成るように遺伝子操作された免疫グロブリン遺伝子によりコードされている。例えば、マウス・モノクローナル抗体からの遺伝子の可変(V)セグメントを、ヒト定常(C)セグメントに結合することができる。このようなキメラ抗体は、マウス定常領域並びにマウス可変領域をもつ抗体よりもヒトに対してより少ない抗原性をもつようである。

【0028】本明細書中で使用するとき、また、用語キメラ抗体は、ヒト-様の枠組み(framework)をもち、そしてその中で、存在するいずれかの定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域に少なくとも約85-90%、そして好ましくは約95%同じポリペプチド配列をもつような免疫グロブリン、所謂"ヒト化"免疫グロブリンをいう(例えば、PCT 国際公開W0 90/07861、(これを、引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。))。これ故に、このような"ヒト化"免疫グロブリンの全ての部分は、ひょっとしたら相補性決定領域(CDR's)を除いて、1以上の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分に実質的に同一である。

【0029】用語"フレームワーク領域"は、本明細書中で使用するとき、Kabat, et al., (1987): Sequences of Proteins of Immunologic Interest, 4th Ed., US Dept. Health and Human Services, (これを、引用により本明細書中に取り込む。))により定められるような、免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の可変領域の部分であって単一種内の異なる免疫グロブリンの中の比較的保存されているような(すなわち、CDR's 以外の)ものをいう。本明細書中で使用されるとき、"ヒト-様フレームワーク領域"は、それぞれの現存鎖内に、ヒト免疫グロブリン内のものと同じ、少なくとも約70%以上のアミノ酸残基、典型的には75~85以上の残基を含んで成るフレームワーク領域である。

【0030】ヒト定常領域DNA配列は、よく知られた手順に従って、様々なヒト細胞から単離されることができるが、好ましくは、不死化B-細胞から単離されることができる。本発明のキメラ免疫グロブリンを作るための可変領域又はCDRsは、ヒト・ベータ型PDGFレセプタに結合することができるモノクローナル抗体から、同様に得られるであろうし、そしてマウス、ラット、ウサギ、又はよく知られた方法により抗体を作ることができる他の脊椎動物を含むいずれかの慣用の哺乳類源内で作られるであろう。

【0031】好適な、DNA配列のための源細胞及び免疫グロブリン発現及び分泌のための宿主細胞は、多数の源、例えば、American Type Culture Collection("Cata

logue of Cell Lines and Hybridomas," Fifth edition (1985) Rockville, Maryland, U.S.A., (これを、引用により本明細書中に取り込む。) から得られることができる。

【0032】本明細書中に特に記載するキメラ及び"ヒト化"免疫グロブリンに加えて、他の実質的に同一な修飾された免疫グロブリンを、当業者によく知られた様々な組換えDNA技術を使用して容易に設計及び製造することができる。一般的に、遺伝子の修飾は、様々なよく知られた技術、例えば、部位特異的突然変異誘発により容易に行われることができる(Gillman and Smith, Gene 8:81-97 (1979) 及び Roberts et al., Nature 328:731-734 (1987), (これらの両方を、引用により本明細書中に取り込む。)) を参照のこと。)

【0033】あるいは、一次免疫グロブリン構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を作ることができる。例えば、抗原認識に加えて、又はそれ以外の、1以上の免疫グロブリン活性(例えば、補体固定)を有する免疫グロブリン・ポリペプチド断片を作ることが要求されることができる。また、免疫グロブリン遺伝子は、全体として又は部分において、他の遺伝子からの機能的領域(例えば、酵素)と、又は他の分子、例えば、新たな性質をもつ融合蛋白(例えば、"免疫毒(immunotoxins)"を作るための毒素又は標識と、組み合わせることができる。遺伝子融合のこれらの場合においては、2つの成分が、同一ポリペプチド鎖内に存在する。あるいは、免疫グロブリン又はそれらの断片が、様々なよく知られた化学的手順のいずれかにより、毒素又は標識に化学的に結合されることができる。例えば、標識又は細胞毒性剤が蛋白であり、そして第2成分が無傷の免疫グロブリンであるとき、その結合は、ヘテロ2官能価の架橋剤、例えば、SPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、等の方法によるものであることができる。

【0034】好適な標識は、例えば、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光剤、化学発光剤、磁気粒子を含む。このような標識の使用を教示している特許の例は、以下のものである：米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；及び第4,366,241号，(これらの全てを、引用により本明細書中に取り込む。)

【0035】また、1本鎖分子を含む免疫毒は、組換え手段により、製造されることができる。様々な免疫毒の製造は、本分野によく知られており、そして方法は、例えば、"Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine," Academic Press, pp. 168-190 (1982); E. Vitetta, Science (1987) 238: 1098-1104; 及び G. Winter and C. Milstein, Nature (1991) 349:293-299; (すべてを、引用により本明細書中に取り込む。) 中に見られることができる。

【0036】様々な細胞毒剤(cytotoxic agent)が、免疫毒における使用に好適である。細胞毒剤は、放射性核種、例えば、インジウム-131、イットリウム-90、レンニウム-188、及びビスマス-212; 多数の化学療法医薬、例えば、ビンデジン(vindesine)、メトトレキサート、アドリアマイシン、及びシスプラチナム(cisplatinum); 及び細胞毒性蛋白、例えば、リボソーム阻害蛋白様ヤマゴボウ(pokeweed)抗ウイルス蛋白、シュードモナス外毒素A(Pseudomonas exotoxin A)、リシン(ricin)、ジフテリア毒素、リシンA鎖、等、又は細胞表面において活性な剤、例えば、ホスホリパーゼ酵素(例えば、ホスホリパーゼC)を、含むことができる(一般的に、"Chimeric Toxins," Olsnes and Phil, Pharmac. Ther., 15:355-381 (1981)、及び"Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy," eds. Baldwin and Byers, p. 159-179, 224-266, Academic Press (1985), (これらの両方を、引用により本明細書中に取り込む。)) を参照のこと。)

【0037】発明の説明

本発明の免疫グロブリン・ポリペプチドは、治療における並びに診断及び他の用途における使用を見つけられるであろう。これらの分野において有用な様々な技術は、例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (1988) (すべての目的のために、引用により本明細書中に取り込む。) 中に記載されており：免疫グロブリンを作るための動物の免疫化；モノクローナル抗体の生産；プローブとしての使用のための免疫グロブリンの標識付け；免疫アフィニティー精製；及び免疫検定を含む。

【0038】本発明の免疫グロブリン・ポリペプチドの例は、以下に記載するようなモノクローナル抗体2A1E2であって、ベータ型ヒトPDGFレセプタに特異的に結合するものである。モノクローナル抗体2A1E2であってIgG₁イソタイプを有するものは、American Type Culture Collection, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20231(ATCC no. HB10938)に、この出願の出願日に先立って、寄託されている。

【0039】本発明の抗-PDGFレセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを、ヒト・ベータ型PDGFレセプタの精製された又は部分的に精製された細胞外ドメインにより動物を免疫化することにより、調製することができる。免疫化された動物は、ヒト・ベータ型PDGFレセプタ細胞外ドメインに特徴的なエピトープを免疫学的に認識することができる様々な種、例えば、ネズミ、ウサギ(lagomorph)、ウマ(equine)等の中のいずれか1つである。

【0040】本発明のモノクローナル抗体は、ヒト・ベータ型PDGFレセプタ細胞外ドメインに特徴的な抗原決定基に特異的に結合する免疫グロブリン・ポリペプチド又はそれらの部分をエンコードしている核酸配列を免疫化することにより、調製されることができる。不死化過程

を、ハイブリドーマ融合技術により、抗体-産生リンパ球のウイルス形質転換、組換えDNA技術により、又は細胞融合、ウイルス形質転換及び/又は組換えDNA方法論を組み合わせることにより、行うことができる。

【0041】本発明の1つの態様に従って、ヒト抗-PDGFレセプタ・モノクローナル抗体産生細胞を、例えば、Epstein-Barrウイルス(EBV)形質転換技術を使用して、不死化する。例えば、患者の、末梢血液、骨髄、リンパ節、扁桃(tonsils)等、好ましくは、PDGFレセプタ又はそれらの部分により免疫化されたものを、米国特許第4,104,464,465号及びChan et al., J. Immunol. 136:106 (1986) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)に従ってEBVを使用して、不死化する。

【0042】また、ヒト抗-PDGFレセプタ・モノクローナル抗体を、様々な他の方法により、例えば、EBV又は他のウイルス形質転換とハイブリドーマ融合技術との組み合わせを使用して、調製することができる。例えば、ハイブリドーマを、PDGFレセプタ又はそれらの部分により免疫化された個体から得られた刺激されたB細胞を、マウス/ヒト・ヘテロハイブリッド融合パートナーと、20融合することにより、創出することができ、これらの様々なものが、記載されている。例えば、米国特許第4,624,921号及びJames and Bell, J. Immunol. Meths. 100:5-40 (1987) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)を、参照のこと。マウス/ヒト融合パートナーは、EBVにより刺激され又は形質転換されたヒト・リンパ球を、容易に入手可能なマウス骨髄腫系、例えば、NS-1又はP3NS-1と、例えば、ポリエチレン・グリコールの存在中で、融合することにより、構築されることができ30る。このハイブリッドは、好適に医薬-マークされるべきであり、これは、そのハイブリッドを、所望の医薬、例えば、6-チオグアニン、オウバイン(ouabain)、又はネオマイシン(neomycin)の増加濃度において培養することにより、達成されることができ。

【0043】問題の抗体を分泌するマイブリドーマ又はリンパ芽球様細胞(lymphoblastoid cells)は、ベータ型PDGFレセプタに結合する抗体について培養上澄液をスクリーニングすることにより同定されることができ。より好ましくは、スクリーニング検定は、例えば、PDGF-伸介有糸分裂誘発を阻害する抗体を検出するために使用40されることができ。所望の活性を有する細胞を、慣用の技術に従ってクローン化及びサブクローン化し、そして問題の抗-PDGFレセプタ・モノクローナル抗体を産生する安定な、不死化された系が同定されるまで、監視する。モノクローナル抗体は、異なる抗原結合特異性をもつ抗体を産生する細胞から分離されたクローンの、不死化された細胞系により作られた抗体を、意味する。したがって、このような抗体は、他のモノクローナル抗体から単離されて作られ、そして、従って、(他の抗体と比べて)実質的に純粋な形態であり、そしてB細胞源とし50

て役立つ動物種からの血清中に正常に生じるよりも一般的に高い濃度にある。

【0044】あるいは、ある者は、Huse et al., Science 246:1275-1281(1989) (これを、引用により本明細書中に取り込む。)により概説されるような一般的な手順に従ってヒトB細胞からDNAライブラリーをスクリーニングし、そして次に所望の特異性を有する抗-PDGFレセプタ抗体(又は結合断片)をコードしている配列をクローニング及び増幅することにより、PDGFレセプタの細胞外ドメインに特異的に結合するヒト抗-PDGFレセプタ免疫・ポリペプチド又はそれらの部分をコードしているDNA配列を単離することができる。

【0045】免疫グロブリンを、次に、適当な免疫グロブリン遺伝子、又はそれらの部分を含む発現ベクターを、適当な宿主細胞に導入することにより、作ることができる。この宿主細胞を、次に、免疫グロブリン・ヌクレオチド配列の高レベル発現に好適な条件下で、維持し、そして必要なときに、軽鎖、重鎖、軽/重鎖ダイマー又は無傷抗体、結合断片、又は他の免疫グロブリン形態の回収及び精製が、続くことができる。

【0046】好適な宿主細胞は、微生物を含むが、哺乳類又は昆虫の組織細胞培養物が、本発明のモノクローナル抗体の生産に好まれることができる(E. Winnacker, "From Genes to Clones," VCH Publishers, N. Y., N.Y. (1987) (これを、引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。)。無傷の免疫グロブリンを分泌することができる多数の好適な宿主細胞系が、本分野において開発されており、そしてこれは、チャニーズ・ハムスター卵巣(CHO)細胞系を含むが、好ましくは、形質転換されたB細胞又はハイブリドーマが使用されるであろう。

【0047】一旦発現されれば、本発明の、抗体全体、それらのダイマー、個々の軽鎖及び重鎖、又は他の免疫グロブリン形態を、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティ・カラム、カラム・クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等を含む、本分野の標準的技術に従って精製することができる(一般的には、R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982) (引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。)。少なくとも約90~98%同質性(homogeneity)を有する実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、そして医薬用途のためには、98~99%以上の同質性を有するものが最も好ましい。一旦、部分的に又は同質性まで精製されれば、そのポリペプチドを、次に、(体外を含み)治療的に、又は検定手順、免疫蛍光染色、等の開発及び実施において、使用することができる。(一般的に、Immunological Methods, Vols. I and II, Lefkovits and Pernis, eds., Academic Press, New York, N.Y. (1979 and 1981) (これを、引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。)。

【0048】本発明に従って作られた免疫グロブリン・ポリペプチドは、IgG、IgM、IgA又はIgD イソタイプを有することができ、そしてさらに、それらの適当なサブクラス、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、又はIgG₄の中のいずれかであることができる。組換えDNA技術を使用して、単離された免疫グロブリン・ポリペプチドの"クラス-スイッチング(class-switching)"を、容易に行うことができる。この方法においては、問題の免疫グロブリン分子のイソタイプを決定する定常領域をコードしている遺伝子が、欧州特許出願第EP1 314,161号(10引用により本明細書中に取り込む。)中に一般的に記載されるように、所望のイソタイプ又はサブクラスをコードしている遺伝子により、置き換えられる。また、クラス-スイッチされた免疫グロブリンは、本分野において知られた選択方法を使用して自発的スイッチングを経験した細胞を選択することにより、単離されることもできる。

【0049】実質的に非-ヒトである免疫グロブリン・ポリペプチドのヒトへの投与は、抗-抗体応答を顕現させることができる。したがって、実質的にヒトである本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを調製することが必要であることができる。"実質的にヒト"とは、特に、確立されたPDGF- 仲介細胞増殖失調を治療するために必要であることができる長い期間にわたる反復投与のための、起源において少なくとも約50%、より好ましくは約70~80%以上、そして最も好ましくは約95~99%以上であるアミノ酸配列から成る抗体又はそれらの結合断片を、意味する。本明細書中で使用するとき、ヒト抗体は、その文脈が特にことわらない限り、完全にヒト起源の抗体並びに実質的にヒトであるものを含むことを、意味する。30

【0050】ヒト抗-PDGF レセプタ・モノクローナル抗体の生産が慣用の不死化技術によっては困難であることができるので、まず、非-ヒト抗体を作り、そして次に組換えDNA技術を介して、非-ヒト抗体の抗原結合領域、例えば、Fab、相補性決定領域(CDRs)又は超可変領域を、実質的なヒト分子を作るために適用なヒト定常領域(Fc)又はフレームワーク領域に、移すことが、必要であることができる。このような方法は、本分野において一般的に知られており、そして、例えば、米国特許第4, 816,397号、PCT 国際公開WO 90/07861、及び欧州特許出願第 173494号及び239400号(これらのそれぞれを、引用により本明細書中に取り込む。)中に記載されている。

【0051】ヒト・ベータ型PDGFレセプタに特異的に結合し、そしてこれ故、そのレセプタへのPDGFの結合を阻害する、得られたキメラ抗体及びキメラ免疫グロブリン・ポリペプチドも、本発明の範囲内にある。典型的な治療的キメラ抗体は、ヒトPDGFベータ型レセプタ抗原決定基に特異的なマウス免疫グロブリンからの可変(V)又は50

抗原結合ドメイン、及びヒト免疫グロブリンからの定常(C)又はエフェクター・ドメインから成るハイブリッド蛋白であるであろう。但し、他の哺乳類種からのドメインを、可変及び定常ドメインの両方のために使用することができる。本明細書中で使用するとき、また、用語"キメラ抗体"は、相補性決定領域(CDR's)だけがその抗原決定基を特異的に認識する免疫グロブリンから移されており、その免疫グロブリン遺伝子の残りがヒト(又は所望により他の哺乳類)の免疫グロブリン遺伝子から得られているような、免疫グロブリン遺伝子により、コードされている抗体をいう。このタイプのキメラ抗体は、"ヒト化(humanized)"(ヒト免疫グロブリン遺伝子が使用される場合)抗体といわれる。

【0052】抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドの可変ドメインの超可変領域は、本発明の関連態様を含んで成る。この超可変領域又はCDRsは、フレームワーク領域(単一種内の異なる免疫グロブリンの中で比較的保存されている免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の可変領域の部分)と共に、抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドがヒト・ベータ型PDGFレセプタを認識し且つそれ故それに結合することを、可能にする。この超可変領域を、クローン化し、そして配列決定することができる。一旦、同定されれば、PDGFレセプタの特異的認識を与えるこれらの領域は、次に、他の免疫グロブリン分子の一部として又は融合蛋白、例えば、そのクローン化イディオタイプの免疫原性を強化する働きをもつ担体分子として、宿主内での発現のために、ベクター内にクローン化されることができる。

【0053】本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドは、一般的に無傷で、又は免疫原性断片、例えば、F_v、Fab、又はF(ab')₂断片として、使用されるであろう。この断片を、慣用の技術により、例えば、ペプシン又はパパインのようなものを使用した抗体の蛋白分解消化により、又は所望の断片をコードしている遺伝子又はそれらの部分がクローン化又は合成され、そして様々な宿主内で発現されてるような組換えDNA技術により、抗体から得ることができる。

【0054】当業者は、"抗-イディオタイプ"抗体を標準的な技術に従って免疫原として特異的免疫グロブリンを使用することにより作ることができることを認めるであろう。例えば、PDGFレセプタ・ポリペプチド、又はそれらの断片による感染又は免疫化は、そのFab可変領域結合部位の上に、その特定の免疫グロブリン、例えば、イディオタイプに対しユニークなPDGFレセプタ・ポリペプチドのイメージをもつ中和免疫グロブリンを、誘導する。このような抗-PDGF-R免疫グロブリンによる免疫化は、抗-イディオタイプ抗体であって元のPDGF-R抗原の構造を真似たその結合部位において立体配置をもつものを、誘導する。これらの抗-イディオタイプ抗体は、それ故に、PDGF- 仲介疾患を治療するためにPDGF-R

抗原の代わりに、使用されることができる(例えば、Nisonoff (1991) J. Immunol. 147:2429-2438 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))を参照のこと。)

【0055】本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドは、治療及び診断方法並びに組成物における用途を見いだしている。治療用途のためには、抗-PDGFレセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを、ヒト・ベータ型PDGFレセプタのための可溶性リガンドとして使用され、そのレセプタをマスキングし又はその他にそのレセプタへの結合からPDGF分子を阻害し、そしてそれにより不所望の細胞の転移及び増殖を阻害する。

【0056】医薬組成物のためには、本明細書中に記載するような本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを、PDGF- 仲介細胞増殖失調をもつ個体に投与する。治療用途においては、組成物を、細胞レセプタを有効にブロックするのに充分な量で患者に投与し、そしてそれによりその細胞増殖及びその徴候及び/又は合併症を少なくとも部分的に休止させる。これを達成するのに適当な量は、"治療の有効投与量"として定められる。この使用のために有効な量は、例えば、抗-PDGFレセプタ免疫グロブリン・ポリペプチド組成物の性質、投与のやり方、治療される疾患の段階及び重度、患者の体重及び健康の総合状態、及び処方内科医の判断に依存するであろうが、一般的には、1日当たり約0.01mg/kgから約100.0mg/kg体重までの範囲にあるであろうし、1日当たり約0.1mg/kgから約10.0mg/kg 体重までの投与量が、より一般的に使用される。抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチド及びそれから得られたペプチド組成物が、重症な疾患状態、すなわち、致死の又は潜在的に致死な状態において使用されることができるということに留意しなければならない。このような場合には、実質的に過剰のこれらの組成物を投与することが、可能であり、そしてその処方内科医により必要と思われることができる。したがって、本発明の、ヒト抗-PDGFレセプタ・モノクローナル抗体又は実質的ヒト抗-PDGFレセプタ・モノクローナル抗体が、これらの状況の下では最も好ましい。

【0057】本組成物の単一又は複数の投与を、その処方内科医により選ばれた投与レベル及びパターンにより、行うことができる。いずれの事件においても、医薬配合物は、患者を有効に治療するのに充分な本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドの量を提供すべきである。投与は、不所望の細胞増殖の第一指標において又は診断直後に開始され、そして徴候が実質的に軽減され、そしてその後の期間にわたり、続けられるべきである。よく確立された病気の場合においては、負荷投与量その後の維持投与量が、必要であろう。

【0058】治療処置のための医薬組成物は、非経口的、局所的、経口的又は居所投与について意図されてい

る。好ましくは、医薬組成物は、非経口的に、例えば、静脈中に、皮下内に、皮膚内に、又は筋肉内に、投与される。したがって、本発明は、許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解され又は懸濁される抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドの溶液を含んで成る非経口投与のための組成物を提供する。様々な水性担体、例えば、水、バッファー水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸、等を、使用することができる。これらの組成物は、慣用の、よく知られた滅菌技術により、滅菌され、又は滅菌濾過されることができる。得られた水溶液を、それ自体としての使用のために包装し、又は凍結乾燥することができる。投与に先立ちその凍結乾燥調製物が無菌溶液と組み合わせられる。この組成物は、生理学的条件に近づけるために必要な、医薬として許容される補助物質、例えば、pH調整及び緩衝化剤、浸透圧調整剤、水和剤、等、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタン・モノラウレート、トリエタノールアミン・オレエート、等を含むことができる。

【0059】医薬配合品中の本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドの濃度は、広く、すなわち、約1%未満、普通には約10-15%において又は少なくとも約10-15%においてから、50重量% 以上と同じ程度まで、変動することができ、そして選ばれた投与の特定の態様に従って、主に、液体の容量、粘度等により、選ばれることができるであろう。

【0060】したがって、静脈中の注入のための典型的な医薬組成物は、250ml の滅菌Ringer's溶液、及び100mg の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを含むように調製されることができる。非経口的に投与することができる化合物を製造するための実際の方法は、当業者に知られ又は明らかになるであろうし、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Merck Publishing Company, Easton, PA (1985)(これを、引用により本明細書中に取り込む。))中により詳細に記載されている。

【0061】また、抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチド及びそれらの断片は、リポソームを介して投与されることもできる。この抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドは、そのリポソームを、ヒト・ベータ型PDGFレセプタを表示する特定の組織又は細胞に、標的化することに役立つことができる。リポソームは、エマルジョン、泡、ミセル、不溶性単層、脂質結晶、リン脂質分散体、ラメラ層、等を含む。これらの調製物においては、配達されるべき免疫グロブリン・ポリペプチド又は断片は、リポソームの一部として、単独で又は例えば、その標的細胞に対して毒性である分子と共に、取り込まれる。免疫グロブリン・ポリペプチドを含むリポソーム懸濁液は、静脈内に、局所的に、局所的に、等に、とりわけ、投与のやり方、配達されるペプチ

ド、及び治療される疾患の段階に従って変動する投与量において、投与されることができる。

【0062】本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドの固体組成物のために、慣用の非毒性固体担体であって、例えば、医薬グレードのマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、シュクロース、炭酸マグネシウム等を含むものを、使用することができる。経口投与のためには、医薬として許容される非毒性組成物を、正常に使用される賦形剤、例えば、先に列記したような担体、一般的に10-95%の活性成分、すなわち、1以上の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドのいずれかを、そしてより好ましくは25%-75%の濃度において、取り込むことにより配合する。

【0063】診断目的のためには、抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを、標識又は非標識のいずれかを行うことができる。標識は、本分野においてよく知られ且つ報告されている様々な技術の中のいずれかにより検出することができるシグナルを提供する物質である。あるいは、本発明内に含まれる非標識抗体を、標識され、そして本発明の抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドを認識する他の抗体(第二抗体)と共に、使用することができる。例えば、抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチドの定常領域に特異的な標識抗体を、サンプルに結合した免疫グロブリン・ポリペプチドを検出するために使用することができる。

【0064】多種多様の標識、例えば、放射性核種、ホタル石(fluors)、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド(特にハプテン)、等を、使用することができる。多くのタイプの免疫検定が利用でき、そして当業者によく知られている。本発明の、抗-PDGF レセプタ免疫グロブリン・ポリペプチド、及びそれらの断片は、生理学的試料中のPDGFレセプタの検出のための様々な免疫検定において使用されることができる。このような免疫検定は、液相イムノアッセイ及びウェスタン・ブロット検定、競合的及び非競合的蛋白結合検定、酵素-結合イムノソルベント検定(ELISA)、一般的に使用され、そして科学的及び特許の刊行物において広く記載されている他のもの、並びに商業的に使用される多くのものを、含むことができる。

【0065】このような免疫グロブリン及びペプチドは、同様に、本分野においてよく知られた方法により、免疫組織化学的染色技術において、使用されることができる。以下の例を、限定ではなく、例示により、提供する。

実施例

材料

PDGF BB を Amgen から購入した。抗-ホスホチロシン・モノクローナル抗体(MAb) PY20を、ICI から購入した。

DMEM、RPMI 1640、F12、ウシ血清、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、G418-ネオマイシン、200mM グルタミン、1M HEPES、ピルビン酸ナトリウム(11mg/ml)、及びリン酸塩バッファー生理食塩水(PBS)を、GIBCO から入手した。ウシ胎児血清(FCS)及びモノクローナル抗体サブタイピング・キットは、Hyclone からのものであった。Tris、リン酸ナトリウム、硼酸ナトリウム、酢酸、ピロリン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、ジチオトレオトール(DDT)、エチレン・ジアミン・テトラ酢酸(EDTA)、EGTA、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ナトリウム・オルトバナデート、塩化ナトリウム(NaCl)、クエン酸、フェニル・メチル・スルホニル・フルオリド(PMSF)、ウシ血清アルブミン(BSA)、Triton X100、Tween 20、2,2'アジノ-bis(3-エチルベンズチアゾリン)-6-スルホン酸(ABTS)、及び過酸化水素は、Sigma からのものであった。ヤギ抗-マウス・ペルオキシダーゼ及びヒポキサンチン-チアミン(HT)は、Boehringer Mannheim からのものであった。ゼラチン、非染色蛋白分子量マーカー及びニトロセルロースは、BioRadからのものであった。前染色高分子量蛋白マーカーは、BRL からのものであった。プロテインA セファロースCL4B、プロテインG セファロースCL4B、ImmunopureTM結合バッファー、F(ab')₂及びFab 調製キットは、Pierceからのものであった。前包装PD10カラムは、Pharmacia からのものであった。¹²⁵I-プロテインA 及び¹⁴C-分子量マーカーは、Amershamからのものであった。¹²⁵I-ジョード-Bolton-Hunter試薬は、New England Nuclear からのものであった。メタノールは、Burdick-Jackson からのものであった。組織培養供給物は、Costarからのものであった。AG 01523B細胞は、ATCCから得た。HR5細胞は、J.A. Escobedo(UCSF)により好意的に提供された。初期のヒト腕動脈平滑筋細胞は、J. Anderson 及びS. Hanson (Emory Univ.)により、親切に提供された。

方法

細胞培養。NIH 3T3細胞を、10% ウシ胎児血清、1Xペニシリン-ストレプトマイシン、2mM グルタミン、及びピルビン酸ナトリウム(0.11mg/ml)を含むDMEM中で、定期的に維持した。細胞外ドメイン(PΔ1-5)又は完全長PDGFベータ・レセプタ(HR5)を表示するCHO細胞を、10% FCS、1Xペニシリン-ストレプトマイシン、2mM グルタミン、ピルビン酸ナトリウム(0.11mg/ml)及びG418(200µg/ml)を含むRPMI中で培養した。ヒト包皮繊維芽細胞(AG01523B)を、10% FCS、1Xペニシリン-ストレプトマイシン、2mM グルタミン、及びピルビン酸ナトリウム(0.11mg/ml)を含むDMEM中で培養した。モノクローナル・ハイブリドーマ細胞を、20%FCS、1Xペニシリン-ストレプトマイシン、2mM グルタミン、ピルビン酸ナトリウム(0.1mg/ml)、1X HT、及び10% マクロファージ-ならし培地を含む50:50 DME:RPMI中で維持した。

【0066】切り詰められたヒトPDGFベータ・レセプタ

- 発現細胞系の構築。ヒトPDGFベータ・レセプタcDNAの切り詰めを、オリゴヌクレオチド- 特異的欠失突然変異誘発(oligonucleotide-directed deletion mutagenesis)により、行った。オリゴヌクレオチド- 特異的インビトロ突然変異誘発は、Kunkel et al. (1987) Meth. Enzymol. 154: 367-382(これを、引用により本明細書中に取り込む。)の修飾された方法に従って行われた。最初に、ヒトPDGFベータ・レセプタのコーディング領域全体の3.9kb EcoRI-HindIII cDNA断片(残基-32 ~499)を、ml3mpl8 産生ベクターmpl8PRのEcoRI とHindIII と10の中にサブクローン化した(Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY,(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。

【0067】オリゴヌクレオチドを、アミノ酸499-1074(PR Δ1; GTG TGA GGA ACG GGA AATTCA TCG AAG GAC ATC CCC CGAC)、又はアミノ酸384-1074(PR Δ2; GGA AGG TCGATG TCT AGT TAA TCG AAG GAC ATC CCC CGAC)をコードしているヒトPDGFベータ・レセプタcDNAの部分を欠失させるために設計した(図1)。終止コドン(20(PR Δ1)又は残基384(PR Δ2)の後に導入した。サブクローニングの正当化を、制限酵素消化分析及びジデオキシ連鎖終止配列決定により行った(Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467, (これを、引用により本明細書中に取り込む。))。

【0068】修飾されたPDGFベータ・レセプタ・ポリペプチドを、発現ベクターPBJ1 (Lin, A. et al. (1990) Science 249: 677-679, (これを、引用により本明細書中に取り込む。))のEcoRI とHindIII との中にサブクローン化し、ベクターpSV2Neo(Southern, P.J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1:327-341 (これを、引用により本明細書中に取り込む。))と共に、1:10の比において、CHO-K1細胞中に、リポフェクティン試薬取り込み(lipofectin reagent uptake)の方法(Felgner, P. L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417(これを、引用により本明細書中に取り込む。))により、共同トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、G418- ネオマイシン耐性について選択し、そして個々のクローンを、単離し、そして無血清培地中の細胞外PDGFベータ・レセプタの高レベル40発現のための等しい細胞密度において、スクリーニングした。修飾された細胞外PDGFベータ・レセプタ蛋白の発現を、ヒトPDGFレセプタ残基51-68に基づく合成ペプチド(SVLTLTLNLTGLDTGEYFC 配列番号3)に対して作られたウサギ・ポリクローナル血清(Ab 1-3-5、図1を参照のこと。)を使用して、ウェスタン・ブロット検定により、測定した。組換えクローンp Δ1-5(完全長細胞外PDGFレセプタを発現するもの)及びp Δ2-7(細胞外PDGFレセプタのドメイン1-4を発現するもの)を、その後の蛋白製造のために使用した。

【0069】ヒトPDGFベータ・レセプタに対するMAbsの調製。抗体を、Harlow and Lane (1988), In Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY,(これを、引用により本明細書中に取り込む。)により記載されているように、開発した。マウスを、PDGFベータ・レセプタ(p Δ1-5)の部分的に精製された細胞外ドメインにより、50-100 μg/免疫注射を使用して、免疫化した。免疫化マウス中の抗体の力価を、以下のように、酵素- 結合イムノソルベント検定(ELISA)を使用して測定した。96-well Immunolon II マイクロタイター・プレートに、PDGFベータ・レセプタの部分精製(10-15%)細胞外ドメイン(200-300 ng/well)により、4度において一夜被覆した。残りの操作を、室温において行った。このwellを、100 mM NaCl及び0.5%ゼラチンを含む0.05 M Tris, pH 7により、1時間ブロックした。プレートを、各種希釈のマウス血清により2時間インキュベートし、洗浄バッファー(0.05 M Tris, pH 7、100 mM NaCl及び0.3%ゼラチン)により5回洗浄し、ヤギ抗- マウス・ペルオキシダーゼ(洗浄バッファー中1:1000)と共に1時間インキュベートした。プレートを、先に記載したように洗浄し、そして過酸化水素(最終濃度0.003%)を含む、0.1 M クエン酸、0.1 M リン酸ナトリウム2塩基、pH 4中の2,2'-アジノ-bis(3エチルベンズチアゾリン)6-スルホン酸(ABTS、1 mg/ml)により、顕色させた。650 nmにおける吸光度を測定し、そしてその値を、pBJベクター単独によりトランスフェクトされたCHO細胞からのならし培地から類似の程度まで精製された蛋白により得られた値と比較した。

【0070】高い反応性を示すマウスを、殺し、そしてその脾臓を単離した。脾臓細胞を取り出し、そして先に記載したような骨髓腫細胞と融合した(harlow and Lane, 前掲書中)。ハイブリドーマを、同一ELISAを使用してスクリーニングし、そして陽性ハイブリドーマを、クローン化し、そして再スクリーニングした。陽性モノクローナル抗体細胞を、培養し、そして腹水(ascites)を、記載されたBalb/cマウス中で調製した(Harlow and Lane, 前掲書中)。組織培養を、製造者による指示に従ってHyCloneからのサブタイピング・キットを使用してそのMAbsをサブタイプ(sub-type)するために使用した。

【0071】抗体の精製。抗体を、以下のようにプロテインA CL4B上で精製した。腹水液を、ImmunopureTM結合バッファー(Pierce)中で1:5希釈し、そして同一バッファー中で平衡にしたプロテインA CL4Bカラム上でクロマトグラフィーにかけた。通過物を、回収し、そしてそのカラムを、Immunopure結合バッファー(10カラム容量)により洗浄した。この結合IgGsを、0.1 M グリシン、pH 2.8により溶出させ、そして中和剤として2 M Tris, pH 11(40 μg/ml)を入れたチューブ内に回収した。ピーク50蛋白画分を、280 nmにおける吸光度を測定することによ

り検出し、プールし、そしてPBS 中で透析した(それぞれ4 L の2 回交換)。

【0072】Mab 2A1E2 F(ab')₂ 及びFab 蛋白分解断片の調製。Mab 2A1E2 のF(ab')₂ 断片を、製造者の指示に従ってImmunopure F(ab')₂ 調製キット(Pierce)を使用して無傷Mab から調製した。モノクローナル抗体2A1E2 を、pH 4.2において37℃において4 時間、固定化ペプシンと共にインキュベートし、そして非解裂IgG 及びFc断片を、プロテインA セファロースCL4Bを使用してF(ab')₂ 断片から分離した。Fab 断片を、同様に、Pierce I 10 mmunopure Fab 調製キットを使用して調製した。このIg G を、37℃においてpH 7で5 時間、固定化パパインと共にインキュベートし、そして未消化IgG 及びFc断片を、プロテインA を使用して除去した。サンプルを、酵素消化後SDS-PAGEにより分析し、そしてPDGFベータ・レセプタELISAを、たとえあるにしても、抗原認識の損失について測定するために使用した。

【0073】免疫沈降検定。免疫沈降検定を、Kessler, S.W. (1981), Meth. Enzymol. 73:442-471 (これを、引用により本明細書中に取り込む。) の手順の修正により行った。精製p Δ1-5 又はp Δ2-7 を使用するとき、蛋白を、室温において2 時間か又は4 °Cにおいて12時間かのいずれかで、免疫沈降(IP)バッファー(40mM Tris, pH 8, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1mM EGTA 及び1% Triton X100) 中で、Mab とインキュベートした。完全長レセプタを免疫沈降させる場合、その時、PDGFベータ・レセプタ表現細胞は、1 μM ナトリウム・オルトバナデート及び1mM PMSFを含むIPバッファー中で可溶化され、そして4 °Cにおいて8-12時間、Mab とインキュベートされた。次に、サンプルを、プロテインA-セファロース CL4 30 B とプロテインG-セファロース CL4B との1:1 混合物の50% スラリー(50-100 μl / サンプル) と共にインキュベートした。4 °Cにおいて1-2 時間後、樹脂を、3 サイクルの遠心分離により洗浄し、そしてIPバッファー中に再懸濁させ、そして最終的に、その樹脂を、Laemmli サンプル可溶化バッファー中で煮沸した(50-100 μl / サンプル)(1970, Nature 227:680-685(これを、引用により本明細書中に取り込む。))。サンプルを、7%又は10% Laemmli ゲル上でSDS-PAGEに供し、そして次に、ニトロセルロースに移した。ウェスタン・ブロットを、ブロッキ 40 ング・バッファー(0.5% NaCl及び4% BSAを含む0.05 M Tris, pH 8)中でブロックし、そして4 °Cにおいて12時間、一次抗体と共にインキュベートした。このニトロセルロースを、ブロッキング・バッファーにより洗浄し、そして¹²⁵I-プロテインA(0.4mCi/ml)と、室温において1-2 時間インキュベートし、そしてX-線に露出させた。

【0074】PDGF BB の放射ヨウ素化。PDGF BB を、Du an et al. (1991, J. Biol. Chem. 266: 413-418(これを、引用により本明細書中に取り込む。)) により記載されているようなBolton-Hunter 手順の修正によりヨウ 50

素化した。簡単に言えば、¹²⁵I-ジヨードBolton-Hunter 試薬(1 mCi) を、窒素下で乾燥させた。次に、PDGFBB (2.5 μg)を、10μl の0.1 M ホウ酸ナトリウム(pH 8.5)中4 °Cにおいて15分間、¹²⁵I-ジヨードBolton-Hunter 試薬に添加した。この試薬混合物を、500 μl の0.1 M ホウ酸ナトリウム、0.2 M グリシン、pH 8.5により、4 °Cにおいて10分間、クエンチした。この材料を、1mg/ml BSAを含む0.3 M 酢酸により前もって平衡としたPD10 カラム上のゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ピーク放射標識蛋白画分を、ガンマ・カウンターを使用して検出した。典型的には、ヨウ素化PDGF BB の比活性は、50000 カウント/ng であった。

【0075】無傷HR5 細胞への¹²⁵I-PDGF BB の結合。HR5 細胞を、2mM EDTAを含むPBS により、37℃において20分間、収穫した。洗浄HR5 細胞(1 x 10⁶ 細胞/100 μl) を、0.5% BSAを含むPBS 中のMab(又はF(ab')₂ 又はFab 断片) の各種濃度をもつ懸濁液中で、3 連で、30分間室温においてインキュベートした。HR5 細胞を、100倍過剰の非標識PDGF BB 及び担体蛋白(血小板貧血漿、50μl) の非存在中(全結合) 又は存在中(非特異的結合) において¹²⁵I-PDGF BB (約1ng/チューブ) と、室温において45分間、インキュベートした。インキュベーションの最終容量は、500 μl であった。このインキュベーション混合物(400μl) を、Ficoll-paque(700μl) 上に層化し、そして遠心分離した。その上澄液を、除去し、そして細胞ペレット中の放射能を測定した。

【0076】リン酸化検定。HR5 細胞を、6-well皿内で集密まで増殖させ、そして一次細胞を、100mm 皿内で培養した。細胞を、冷無血清DMEMにより2 回洗浄し、そして10分間氷上でインキュベートした。細胞を、回転振とう機上で氷上で30-45 分間、Mab 2A1E2 と2 連で、前インキュベートし、そして次に、リガンドPDGF BB を、そのwellに添加し、そしてインキュベーションを、1.5-2 時間続けた。細胞を冷PBS により2 回洗浄し、そして溶菌バッファー(100mM Tris, pH 8、30mM ピロリン酸ナトリウム、50mM フッ化ナトリウム、5mM EDTA、5mM EGTA、1% SDS、100mM DTT)、又はIPバッファーであって両者が1mM PMSF及び1 μM オルトバナデートを含むもののいずれかにおいて、可溶化した。次に、サンプルを、電気泳動に先立ってさらに加工した。

【0077】ヒト包皮繊維芽AG01523B細胞及びヒヒ平滑筋細胞における有糸分裂誘発。ヒト包皮繊維芽AG01523B 細胞及びヒヒ平滑筋細胞を、96-well 皿内で集密まで増殖させた。ヒヒ平滑筋細胞を、0.5%ウシ血清を含むDMEM と一夜インキュベートすることにより、静止させた。次に、細胞を、PDGF BB の存在中37℃において18時間、その後37℃において5 時間、2 μCi/well の³H-チミジンと共に、様々な濃度のMab 2A1E2 と共に3 連でインキュベートした。対照ヒヒ初期平滑筋細胞を、非特異的Mab

と共に並行してインキュベートし、そして対照AG01523B細胞を、非阻害性抗-PDGF ベータ・レセプタMab(4C5C8)と共にインキュベートした。次に、Wellを、氷冷5% TCA (2 x 250 μ l) により洗浄し、そして0.25 N NaOH (2 x 100 μ l) により可溶化した。この可溶化サンプルを、シンチレーション・バイアルに移し、そして放射能を測定した。

【0078】ダイマー化検定。集密HR5細胞を、100mm皿内で先に記載したように培養した。細胞を、冷PBS 中で2回洗浄し、そしてBSA(1.5mg/ml) 及び25mM Hepesを含むPBS 中の各種濃度のMab 2A1E2 と共に4 $^{\circ}$ Cにおいて1時間、インキュベートした。PDGF BB を、細胞に添加し、そしてインキュベーションを、4 $^{\circ}$ Cにおいて2時間続けた。細胞を、冷PBS 中で2回洗浄し、25mM Hepesを含むPBS 中の架橋剤BS³ (0.75mg/プレート) と共に4 $^{\circ}$ Cにおいて30分間、インキュベートした。この反応を、クエンチ・バッファー(150mM NaCl を含む0.025 M Tris, pH 7.4; 10ml/プレート) 中の希釈により終了させた。細胞を、1mM PMSF及び100 μ M ナトリウム・オルトパナデートを含むIPバッファー(0.5ml/ プレート) 中で4 $^{\circ}$ C 20において20分間、抽出した。細胞溶解物を、ポリクロナル抗ヒト・ベータ・レセプタAb(AB88、1:500 希釈) を使用して4 $^{\circ}$ Cにおいて一夜免疫沈降させた。次に、プロテインA CL4B(60 μ l の50% スラリー) を、それぞれのサンプルに添加した。4 $^{\circ}$ Cにおいて1時間後、ビーズを、逐次、0.5% NP400を含むPBS、0.5% NP40 を含む0.5M塩化リチウム、0.5 M 塩化リチウム、そして最後に、水により、洗浄した。サンプルを、Laemmli サンプル可溶化バッファーにより可溶化し、そして3%-8% グラジエント・ゲル上のSDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動、その後の、ニトロセルロースへのウェスタン転移に供した。ウェスタン・プロットを、抗ホスホチロシンMab(1:1000) 又はAb88(1:500希釈) のいずれかと、4 $^{\circ}$ Cにおいて一夜、その後、¹²⁵I-プロテインA(0.15 μ Ci/ml) と、室温において2時間、インキュベートした。次に、ウェスタン・プロットをX-線フィルムに露出させた。

結果

Mab 2A1E2 の性質。Mab 2A1E2 は、IgG₁ モノクローナル抗体である。ウェスタン分析は、Mab 2A1E2 が、非還元ヒトPDGFベータ・レセプタ(図2、パネルA、レーン4)を認識するが、還元蛋白(図2、パネルA、レーン1)を認識しないことを示している。Mab 2A1E2 は、溶液から完全長の細胞外レセプタ(p Δ 1-5; 残基1-499)を免疫沈降させる(図2、パネルC、レーン3)。しかしながら、精製 Δ 2-7(ドメイン5を除く; 残基1-384)が抗原であるとき、反応性は全くない(図2、パネルB、レーン2)。このデータは、Mab 2A1E2 により認識されるエピトープが第5 Ig- 様ドメイン内に、すなわち、ヒトPDGFベータ・レセプタの残基385-499 間にあることを示している。

【0079】Mab 2A1E2 によるHR5細胞への¹²⁵I-PDGF BB 結合の投与量- 依存性阻害。HR5細胞(完全長ヒトPDGFベータ・レセプタを発現するCHO-K細胞) が最初にMab2A1E2 と、その後¹²⁵I-PDGF BB とインキュベートされるとき、有意(48.1%) な阻害が、Mab 2A1E2 により処理されていない細胞と比べて、0.1nM Mab と同程度に低い濃度にあることが観察される。1nM 以上の濃度のMab 2A1E2 を使用するとき、その細胞上の完全長PDGFベータ・レセプタへのリガンド結合の100%阻害が在る(図3、パネルA)。PDGFベータ・レセプタに対する200nM の異なる、非阻害性Mab(4C5C8)を前インキュベーションにおいて使用するとき、阻害の量は、ほんの36.1% である。これは、200nM の非関連Mab(抗-IIb/IIIa)の効果に匹敵する(19.18% 阻害)。1nM Mab 2A1E2 の存在中の¹²⁵I-PDGF BB 結合の量は、非標識PDGFBB の1500倍過剰の存在中に見られるリガンド結合の量に(図3、パネルA)、又はヒトPDGFレセプタを発現しない非トランスフェクトCHO細胞へのリガンドの結合量に(データを示さず)、等しい。

【0080】Mab 2A1E2 により見られる阻害が立体障害によるものであるかどうかを決定するために、我々は、Mab のF(ab')₂ 及びFab 断片を調製した。この抗体のこれらの蛋白分解断片は、ELISA におけるPDGFベータ・レセプタを末だに認識する(データを示さず)。但し、それらの活性は、僅かに減少されていた。これを、放射標識リガンド結合検定において使用するとき、我々は、その抗体断片が、濃度に依存してHR5細胞上の完全長PDGFベータ・レセプタへの¹²⁵I-PDGF BB の結合を末だ阻害することを見つけた(図3、パネルB)。しかしながら、完全な阻害が、10nM Mab 2A1E2の F(ab')₂ 又はFab 断片により見られ、一方、1nM 無傷抗体は、完全に、結合を阻害した。1nM F(ab')₂ 断片の存在中のリガンドの結合は、64.5% 程阻害され、1nM Fab 断片の存在中の結合は、50% 程阻害された。

【0081】Mab 2A1E2 によるリン酸化の阻害。図4中に示すように、Mab 2A1E2 は、濃度に依存して、HR5細胞におけるPDGF誘導リン酸化を特異的に阻害し、約50%の阻害が1.3nM の濃度において生じ(レーン4)、そして100%の阻害が13.3 nM Mab 2A1E2 において生じている(レーン5)。対照の非関連Mab(抗-IIb/IIIa)は、効果なく(レーン3)、そしてMab 4C5C8 であってこれもヒトPDGFベータ・レセプタに対して開発されたが異なるエピトープを認識するものは、リガンド- 誘導リン酸化に対する効果を全くもっていなかった(レーン8)。

【0082】ヒトPDGFベータ・レセプタのPDGF BB 誘導ダイマー化に対するMab 2A1E2 の効果。PDGF BB によるHR5細胞の処理は、PDGFベータ・レセプタの、リガンド- 仲介リン酸化(図5、レーン1-6中の180KDa) 及びダイマー化(図5、レーン2 及び6中の390KDa) をもたらした。HR5細胞を、Mab 2A1E2 と最初の前インキュベ

トし、そして次に、PDGF BB とインキュベートするとき、ダイマー化は、テスト濃度のすべてにおいて阻害された(図5、レーン3、4及び5)。このデータは、レセプタ上のMab 2A1E2 の結合がリガンド結合及びレセプタ・ダイマー化を排除することを示している。

【0083】Mab 2A1E2 による有糸分裂誘発の阻害。図6中に示すように、Mab 2A1E2 は、濃度に依存して、ヒト包皮繊維芽AG01523B細胞におけるPDGF BB-誘導有糸分裂誘発を阻害し、最大阻害(69.55%)は、1.3 μ M の濃度において生じる。非-阻害性Mab、4C5C8 を使用したとき、我々は、有糸分裂誘発の有意な阻害を検出なかった。Mab 2A1E2 の濃度の増加は、阻害の程度を改善しなかった。主な理由は、これらの細胞が、2A1E2 により結合又は阻害されないPDGFアルファ・レセプタ(データを示さず。)をも発現するからである。

【0084】また、我々は、ヒト動脈からの初期平滑筋細胞に対する様々な濃度のMab 2A1E2 の効果について測定した。ヒト平滑筋細胞におけるPDGF BB-仲介PDGFレセプタ・リン酸化は、200nM 及び20nM Mab 2A1E2により阻害された(それぞれ、図7中、レーン4及び5)。図8中に見られるように、1nM Mab 2A1E2 は、1-2ng/mlのPDGFの存在中の³H-チミジンの取り込みを、90% 程、阻害し、そして25nM Mabは、1-10ng/ml からのリガンドの濃度範囲において、80% 程、有糸分裂誘発を阻害する。250nM を超える濃度のMab 2A1E2 は、リガンドのすべてのテスト濃度において90% 程、有糸分裂誘発を阻害する。非関連MAbsを使用するとき、ヒト平滑筋細胞における有糸分裂誘発の有意な効果は全くなかった。

【0085】要約すると、我々は、ヒトPDGFベータ・レセプタに高く特異的であるモノクローナル抗体、Mab 2A1E2 を開示した。Mab 2A1E2 は、ナノモル濃度においてヒト・ベータ型PDGFレセプタへのPDGFの結合を阻害し、そしてそれ故、リガンド-仲介リン酸化及びダイマー化の阻害により示されるようなレセプタの活性化を阻害する。この抗体は、マイクロモルの濃度においてインビトロにおける有糸分裂誘発を阻害する。本Mab の蛋白分解*

*断片は、¹²⁵I-PDGF BB 結合の阻害により測定されるように、阻害作用を保持している(図3A)。Mab 2A1E2 は、PDGFベータ・レセプタの第5 Ig-様ドメイン内のエピトープを認識するようであり(図2)、そしてこのドメインへの結合は、このレセプタのダイマー化を防ぐようである(図5)。1.3nM Mab 2A1E2 と同程度に低い濃度において、PDGFベータ・レセプタのリガンド-誘導自動リン酸化の特異的且つ有意な阻害が在る(図4)。結果として、我々は、0.1 μ M Mab 2A1E2 においてHR5 細胞におけるPDGF誘導有糸分裂誘発の完全な阻害を見つけ(データを示さず。)、そしてヒト包皮繊維芽細胞(AG01523B)において、70% 阻害が、1 μ M Mab 2A1E2 濃度において達成される。

【0086】また、Mab 2A1E2 を、ヒト腕動脈からの平滑筋細胞との交差反応についてテストした。PDGF BB-誘導リン酸化(図7)及び有糸分裂誘発(図8)は、20-25nM Mab2A1E2 により80% まで阻害された。モノクローナル抗体2A1E2 は、イヌ、ウサギ、マウス、又はブタからのPDGFレセプタと交差反応せず、そしてまた、ヒト・アルファ型PDGFレセプタと交差反応しない(データを示さず。)

【0087】特に興味のあるのは、我々が、Mab 2A1E2 がPDGFベータ型レセプタの第5 Ig-様ドメインに結合し、そしてそれ故、PDGF-仲介活性を阻害するということを証明したと同時に、PDGFが第3 Ig-様ドメインに結合するということである。これまでの記載は、例示的なものであって、限定的なものではないことを理解すべきである。先の記載をレビューする間、多くの態様が当業者にとって明らかとなるであろう。それ故、本発明の範囲は、先の記載を参照により決定されるべきではなく、代わりに、添付の請求の範囲を参照して、このような請求の範囲が権利をもつ等価な範囲の全体を伴って、決定されるべきである。

【0088】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> COR Therapeutics, Inc.
 <120> A Pharmaceutical Composition for Inhibiting-Intimal Hyperplasia in the Vasculature of a Mammal
 <150> US 07/801,795
 <151> 02-DEC-1991
 <160> 3
 <210> 1
 <211> 40
 <212> DNA
 <400> 1
 gtgtgaggaa cgggaaattc atcgaaggac atcc
 cccgac
 <210> 2
 <211> 36

<212> DNA
 <400> 2
 ggaaggtcga tgtctagtta atcgaaggac atcc
 cc 36
 <210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <400> 3
 Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly
 Leu Asp ~~Thr~~ Gly Glu Tyr 30

【図面の簡単な説明】

5

【図1】組換えヒトPhe^εCys^α・レセプタ細胞外ドメイン構築物。完全長のPDGFベータ・レセプタの欠失突然変異誘発を、方法中に記載するように行った。P Δ1 は、第5ドメイン細胞外PDGFベータ・レセプタ(アミノ酸1-49)であって、PDGFベータ型レセプタcDNAからアミノ酸残基500-1074のコドンオリゴヌクレオチドGTG TGA GGA ACG GGA AAT TCA TCG AAG GAC ATC CCC CGAC(配列番号1)を使用して欠失させることにより作られたものをいう。P Δ2 は、第4ドメイン細胞外PDGFレセプタ(aa1-384)であって、上記cDNAからアミノ酸残基385-1074のコドンオリゴヌクレオチドGGA AGG TCG ATG TCT AGT TAA TCG AAG GAC ATC CCC CGAC(配列番号2)を使用して欠失させることにより作られたものをいう。仮定のIgドメインを、以下のように示す:D1(aa 1-91)、D2(aa 92-181)、D3(aa182-282)、D4(aa283-384)及びD5(aa385-499)。ポリクローナル抗血清1-3-5のペプチド決定基は、先に示したD1である。

【図2】A. 分泌された第5ドメイン細胞外PDGFベータ・レセプタp Δ1-5のウェスタン・プロット。還元された(レーン1-3)及び非還元(レーン4-6)のPDGFベータ・レセプタの分泌細胞外ドメイン(p Δ1-5、5 μg/レーン)を、7% Laemmliゲル上で電気泳動にかけ、その後、方法中に記載するようにウェスタン転移をおこなった。ニトロセルロースを、2%ミルクを含むリン酸塩・バッファ生理食塩水(PBS)中でブロックし、ストリップに切断し、そしてMab 2A1E2(レーン1及び4)、他のPDGFベータ・レセプタ・モノクローナル抗体(1C7D5)(レーン2及び5)、又は非特異的モノクローナル抗体(レーン3及び6)のいずれかの60 μg/mlと共に、4 °Cにおいて一夜インキュベートした。このニトロセルロース・ストリップを、0.5%ミルク及び0.1% Tween 20を含むPBSにより洗浄し、室温において2時間¹²⁵I-標識プロテインAと共にインキュベートし、そしてX-線フィルムに露出させた。矢印は、p Δ1-5の位置を示している。

B. 分泌された第4ドメイン細胞外PDGFベータ・レセプタp Δ2-7の免疫沈降。分泌された第4ドメイン細胞外PDGFベータ・レセプタp Δ2-7(2.6 μg)を、Mab 2A1E2(レーン2、5 μg)、1C7D5(レーン3、5 μg)又は非特異的Mab(レーン4、5 μg)のいずれかと共にI.P.バッ

10ー中の最終容量500 μl 中で4 °Cにおいて3時間インキュベートした。プロテインA セファロースCL4B: プロテインG セファロースCL4B(1:1)を、それぞれのチューブに添加し(60 μl の50% スラリー)、そしてインキュベーションを、4 °Cにおいて2時間続けた。ビーズを、分離し、I.P.バッファ中で5回洗浄し、そして10% Laemmli ゲル上で電気泳動にかけた。このゲルを、ニトロセルロースに移し、そして5%ミルクを含むPBS 中でブロックした。このプロットを、0.5%ミルクを含むPBS 中のウサギ・ポリクローナル抗-PDGF ベータ・レセプタAb(1-3-5)の1:100希釈物と共にインキュベートした。一夜のインキュベーション後、このプロットを、洗浄し、¹²⁵I-プロテインA と共にインキュベートし、洗浄し、そしてX-線フィルムに露出させた。レーン1は、免疫沈降をもたないp Δ2-7の標準を示している。矢印は、p Δ2-7の位置を示している。

C. Mab 2A1E2による分泌細胞外PDGFベータ・レセプタの免疫沈降。細胞外ヒトPDGFベータ・レセプタ(p Δ1-5、5 μg)を、非特異的Mab(レーン2)、Mab 2A1E2(レーン3)、又は1C7D5(レーン4)のいずれかの5 μg と共に、パネルAについて記載したように、免疫沈降させた。このサンプルを、加工し、そしてそのプロットを、ウサギ・ポリクローナル抗-PDGF ベータ・レセプタ1-3-5(1:100希釈物)及び¹²⁵I-プロテインA と共に、パネルBについての凡例中に記載したように、インキュベートした。

【図3】HR5細胞への¹²⁵I-PDGF BB 結合の阻害。A) HR5細胞を、方法中に記載したように、様々な濃度のMab 2A1E2 又は対照Mabs(200nM抗-IIb/IIIa 又は200nM 4C5C8)と共にインキュベートした。次に、この細胞を、¹²⁵I-PDGF BB とインキュベートし、そして結合された放射能を先に記載したように測定した。非特異的結合は、100倍過剰の非標識PDGF BB の存在中で結合した¹²⁵I-PDGF BB の量として決定する。B) HR5細胞を、様々な濃度の完全長Mab 2A1E2、Mab 2A1E2-F(ab')₂、又はMab 2A1E2-Fab、及び方法中に記載するような100nM 完全長抗-IIb/IIIa と共にインキュベートした。Mabs及びそれらの誘導体の存在及び非存在中の細胞への¹²⁵I-PDGF BB の全結合を測定した。100倍過剰の非標識PDGF BB の存在中で結合した¹²⁵I-PDGF BB の量は、非特異的結合

を表している。

【図4】Mab 2A1E2 によるHR5 細胞のリン酸化の阻害。6-well皿中のHR5 細胞の集密単層を、様々なMAbsと2 前インキュベートし、その後、方法中に記載するようにリガンドPDGF BB とインキュベートした。細胞を、可溶化し、そして1 つの6-well皿の当量を、7% Laemmliゲル上で電気泳動し、そしてニトロセルロースに移した。ウェスタン・ブロットをブロックし、そして次に¹²⁵I-プロテインA と共にインキュベートし、そしてオートラジオグラフィを行った。レーン3-7 は、0.13 nM Mab 2A1E2 (レーン3)、1.3nM Mab 2A1E2(レーン4)、13.3nM Mab 2A1E2(レーン5)、0.13μM Mab 2A1E2(レーン6)又は0.53 μM 2A1E2(レーン7)のいずれかと前インキュベートされ、その後100ng/ml PDGF BBとインキュベートされたcells を表している。レーン2 は、その細胞が0.53 μM の非特異的Mab と第一前インキュベートされたときの100ng/ml PDGF BBの存在中のリン酸化の程度を示しており、そしてレーン8 は、その細胞が0.53 μM のPDGFベータ・レセプタMab 4C5C8 と前インキュベートされたときのPDGF BB-誘導体リン酸化を示している。矢印は、完全長のヒトPDGFベータ・レセプタの位置を示している。

【図5】Mab 2A1E2 によるPDGFレセプタのPDGF BB-仲介ダイマー化の阻害。HR5細胞を、0.13 nM Mab 2A1E2(レーン3)、0.13 μM Mab 2A1E2(レーン4)、又は1.3 μM Mab 2A1E2(レーン5)のいずれかと、その後、100ng/ml PDGF BBとインキュベートし、そして架橋を、方法中に記載するように行った。レーン6 は、ダイマー化に対する0.1 μM の抗-IIb/IIIa Mab の効果を表している。レーン*

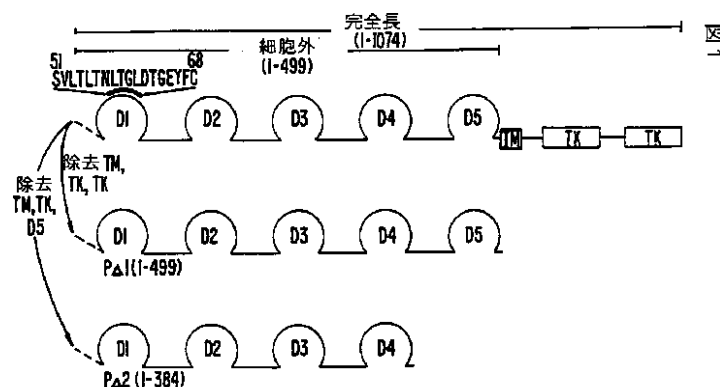
*1 は、添加された架橋剤の非存在中のダイマーの相対量を示しており、そしてレーン2 は、抗体の非存在中のダイマー化PDGFレセプタの量を示している。

【図6】Mab 2A1E2 によるAG01523B細胞における有糸分裂誘発の阻害。細胞を、集密まで増殖させ、そして方法中に記載したように、様々な濃度の、Mab 2A1E2(白丸)又は非阻害的対照PDGFベータ・レセプタMab 4C5C8(黒四角)のいずれかと共に、50ng/ml のPDGF BB の存在中でインキュベートした。³H-チミジンの取り込みを、記載するように測定した。

【図7】ヒヒ平滑筋細胞におけるMab 2A1E2 によるリン酸化の阻害。ヒヒ平滑筋細胞を、PDGF BB 無し(レーン1)、又は100ng/ml PDGF BBと共に、Mab の非存在中(レーン2)、又は2nM Mab 2A1E2 (レーン3)、200 nM Mab 2A1E2(レーン4)又は20nM Mab 2A1E2(レーン5)の存在中、インキュベートした。リガンド誘導リン酸化を、方法中に記載したようにウェスタン分析により測定した。

【図8】Mab 2A1E2 によるヒヒ平滑筋細胞における有糸分裂誘発の阻害。集密ヒヒ平滑筋細胞を、様々な濃度のPDGF BB の存在で、1nM、5nM、25nM、250 nM、又は1 μM Mab 2A1E2 とインキュベートした。³H-チミジン取り込みを、方法中に記載したように測定した。データは、Mab の非存在中の飽和リガンド濃度(10ng/ml)における最大³H-チミジン取り込み(約30-50000 cpm)のパーセントとして、表されている。PDGF BB の非存在中の³H-チミジン取り込みは、5-8000 cpmである。このグラフは、4 つの別々の実験の平均を表している。

【図1】



【図2】

2 1 2 3 4 5 6 7 8

(A)

(B)

1 2 3 4

97 —

← ~90 kDa

(C)

1 2 3 4

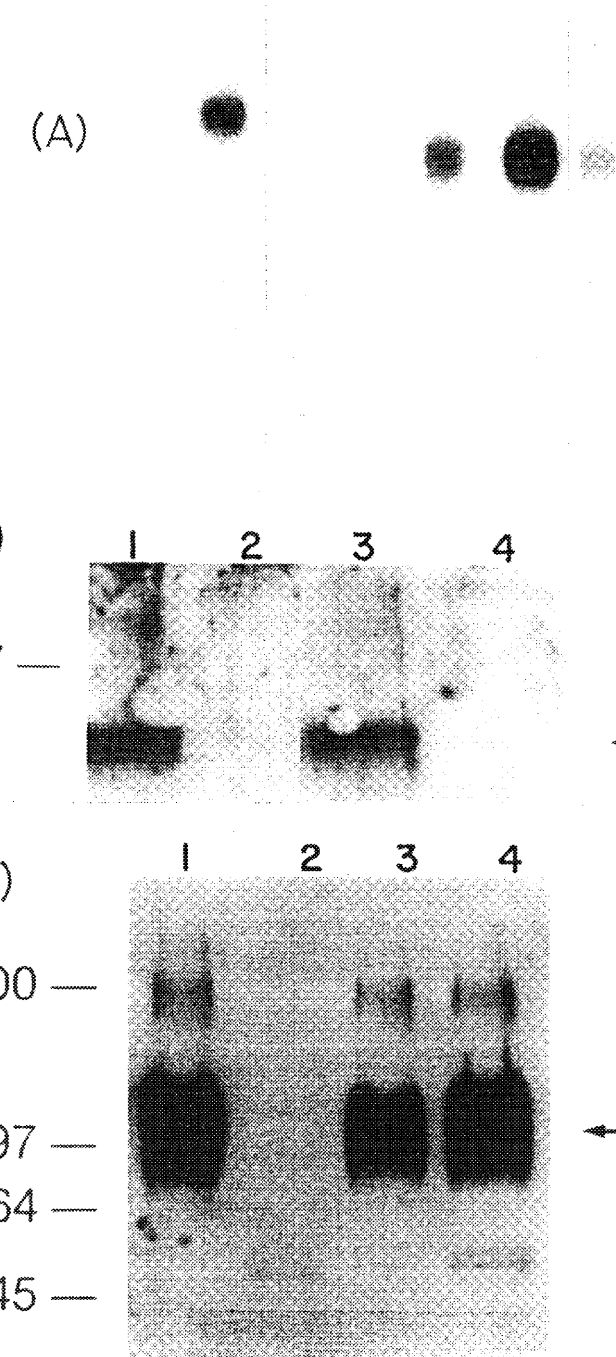
200 —

97 —

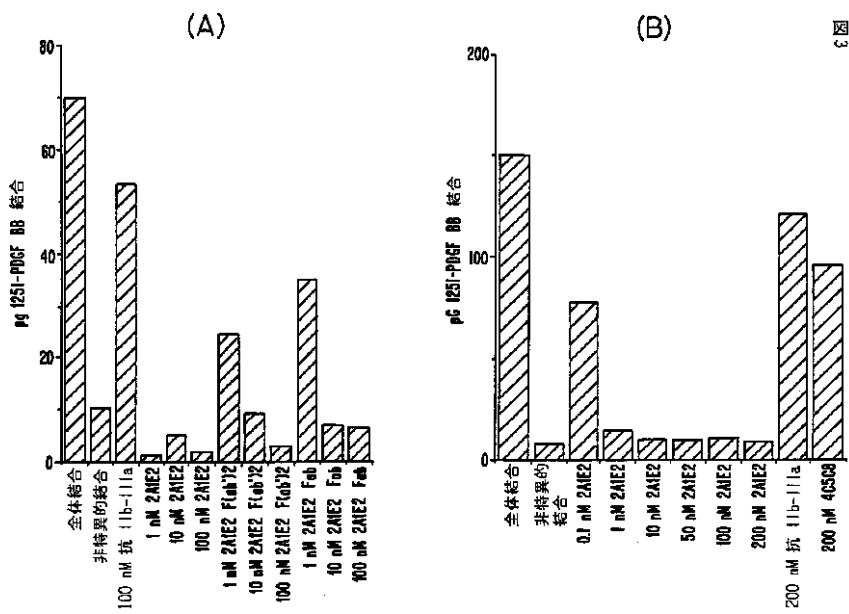
64 —

45 —

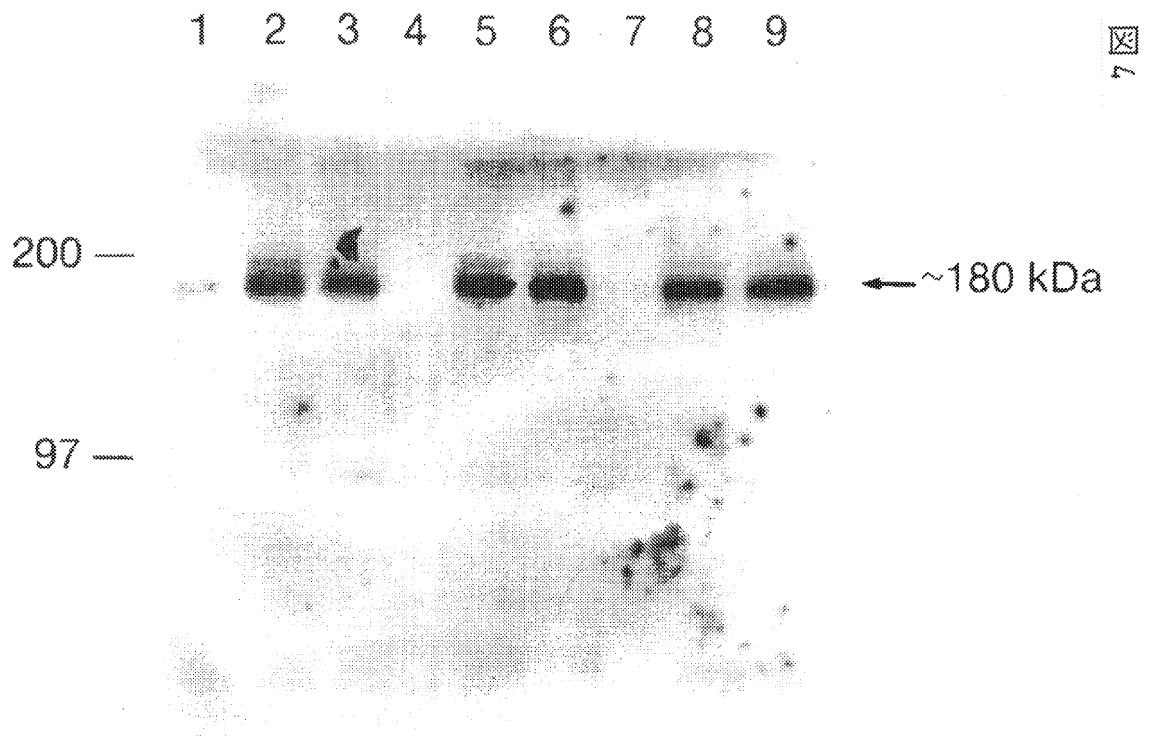
← ~110 kDa



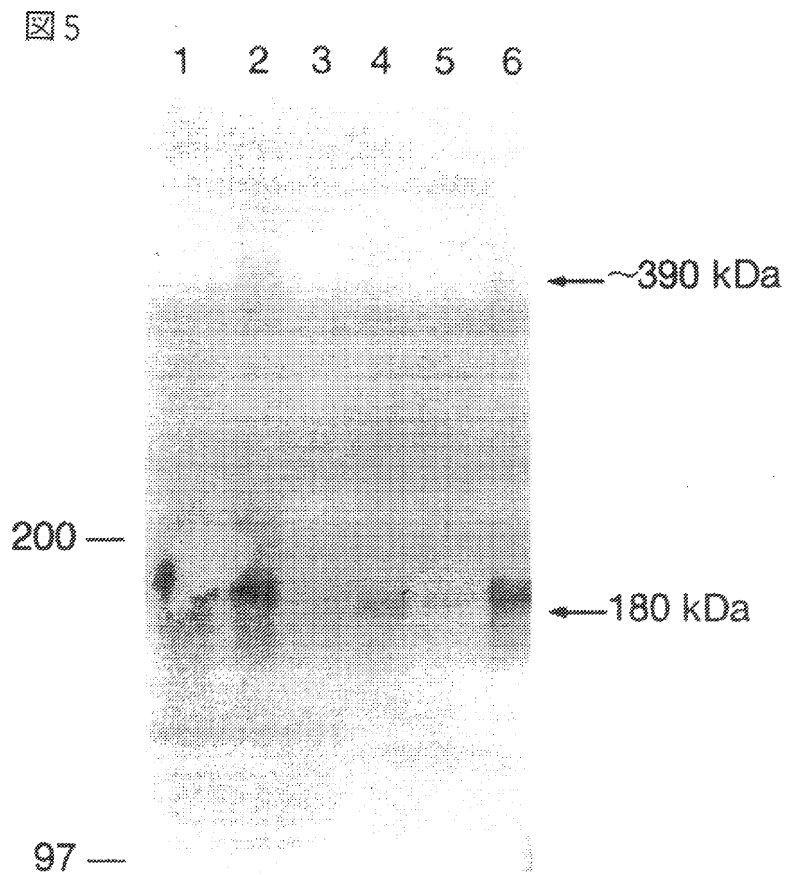
【図3】



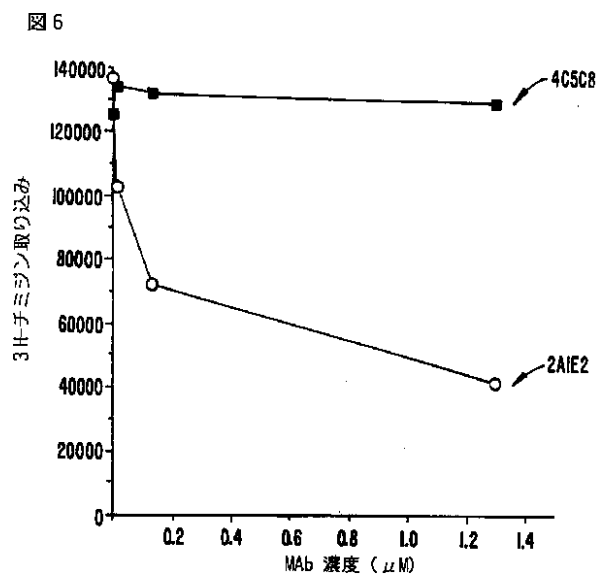
【図4】



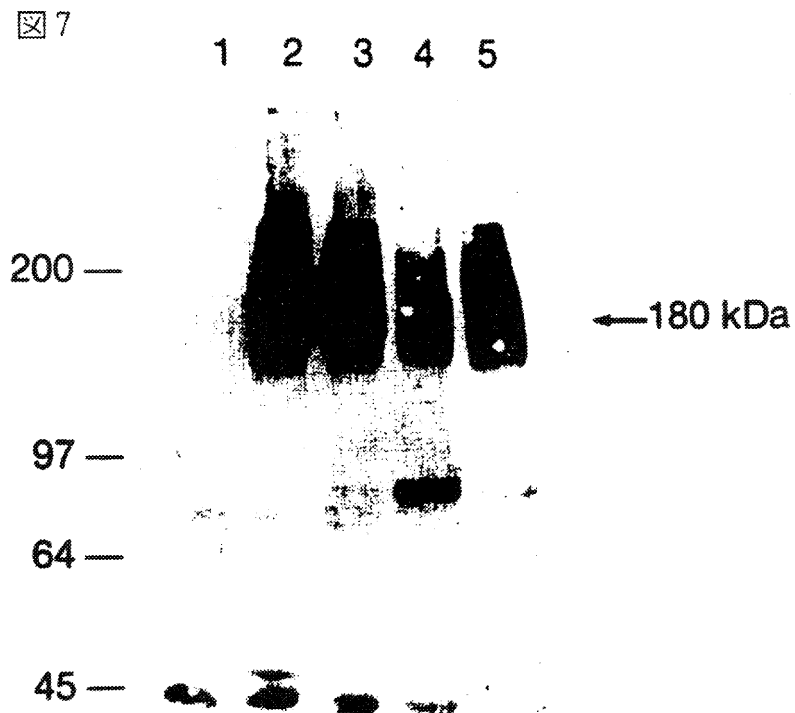
【図5】



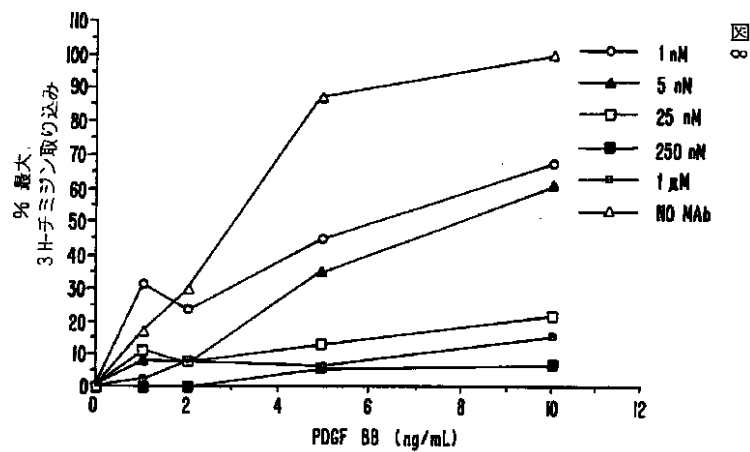
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷		識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N	33/53	ZNA	G 0 1 N 33/53	D
	33/566		33/566	
	33/577		33/577	
// C 0 7 K	16/28		C 0 7 K 16/28	B
C 1 2 N	15/09		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P	21/08		C 1 2 N 15/00	
				ZNAA

(72)発明者 エスコベド, マリア エー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94117,
サンフランシスコ, # 3, アッパー テラ
ス 455

(72)発明者 フレット, ラリー ジェイ.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002,
ベルモント, エスコンディッド ウェイ
1553

专利名称(译)	用于抑制哺乳动物脉管系统内膜增生的药物组合物		
公开(公告)号	JP2000355548A	公开(公告)日	2000-12-26
申请号	JP2000126131	申请日	2000-04-26
申请(专利权)人(译)	核心治疗，Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ラマクリシュナンバニタ エスコベドマリアエー フレットラリージェイ		
发明人	ラマクリシュナン,バニタ エスコベド,マリア エー. フレット,ラリー ジェイ.		
IPC分类号	A61K39/395 A61K9/20 A61K38/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/08 A61P35/00 A61P43/00 C07K7/08 C07K14/705 C07K14/71 C07K16/00 C07K16/28 C12N5/18 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/2863 A61K38/00 C07K14/71 C07K2317/34		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.H A61K39/395.N A61P9/00 A61P43/00.105 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B C07K16/28 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A A61P43/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA54 4H045/FA72 4H045/GA26		
优先权	07/801795 1991-12-02 US		
其他公开文献	JP3732385B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过包括可特异性结合特定生长因子受体的抗体以获得用于治疗再狭窄，成人呼吸窘迫综合征相关性纤维性肺等的主题组合物，从而能够特异性抑制受体的激活。溶液：该组合物通过包括有效水平的抗血小板衍生生长因子（PDGF）受体抗体而获得。该抗体优选是单克隆抗体，优选抗PDGF-β受体抗体。上述组合物优选是抑制血管损伤部位平滑肌细胞增殖的药物组合物，优选包含足够量的抗生长因子受体抗体以抑制有丝分裂诱导和/或平滑肌细胞转移血管，并且优选地上述抗体选自抗-PDGF-β受体抗体。在上述组合物中，可以使用水性载体，常规无毒固体载体等。

【図1】

