

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-544489

(P2013-544489A)

(43) 公表日 平成25年12月19日(2013.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-526447 (P2013-526447)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月30日 (2011. 8. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年4月9日 (2013. 4. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/064926
 (87) 国際公開番号 W02012/028622
 (87) 国際公開日 平成24年3月8日 (2012. 3. 8)
 (31) 優先権主張番号 10305929.1
 (32) 優先日 平成22年8月31日 (2010. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504456798
 サノファイ
 フランス国、エフ-75008・パリ、リ
 ユ・ラ・ボエテイ・54
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 カールステン・コルヴィー
 ドイツ連邦共和国65926フランクフル
 ト・アム・マイン、サノフィーアベンティ
 ス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・
 ハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 $\alpha 2$ インテグリンに結合するペプチド又はペプチド複合体並びにそれに関する方法及び使用

(57) 【要約】

この発明は、 $\alpha 2$ インテグリンに結合するペプチド又はペプチド複合体、このペプチド又はペプチド複合体をコードする1つ又はそれより多い核酸、このペプチド又はペプチド複合体を作製する組み換え細胞、このペプチド又はペプチド複合体の作製方法、医薬として使用するためのこのペプチド又はペプチド複合体、あるいは核酸(複数を含む)を含んでなる医薬組成物、 $\alpha 2$ インテグリンを検出する方法及びスクリーニング方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、該ペプチド又はペプチド複合体、抗体又はフラグメントは、ヒト 2 インテグリンの I - ドメインに特異的に結合し、該抗体又はフラグメントは、重鎖可変領域 (VH) ドメイン及び軽鎖可変領域 (VL) ドメインを含んでなり、該抗体又はフラグメントは、非ヒト霊長類 2 インテグリンと交差反応するが、非霊長類 2 インテグリンとは交差反応しない、上記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、該ペプチド又はペプチド複合体、抗体又はフラグメントは、ヒト 2 インテグリンの I - ドメインに特異的に結合し、該抗体は、重鎖可変領域 (VH) ドメイン及び軽鎖可変領域 (VL) ドメインを含んでなり、上記抗体又はフラグメントは、参照抗体のエピトープとの結合について参照抗体と競合し、該参照抗体は、アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 4 にて D S M Z に寄託されているプラスミドによってコードされる軽鎖、及び (i) アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 6 にて D S M Z に寄託されているプラスミド、又は (i i) アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 5 にて D S M Z に寄託されているプラスミドのいずれかによってコードされている重鎖を含んでなる、上記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3】

1 つ又はそれより多い下記のコンポーネント a) ~ f) :

a) L C D R 1 [ここで、L D R 1 は、R A S E S V E S Y G N S F I Y (配列番号 6) 又はその機能的に活性な変異体である]、

b) L C D R 2 [ここで、L D R 2 は、L A S N L A S (配列番号 7) 又はその機能的に活性な変異体である]、

c) L C D R 3 [ここで、L D R 3 は、Q Q N N E D P Y T (配列番号 8) 又はその機能的に活性な変異体である]、

d) H C D R 1 [ここで、H D R 1 は、G Y T F T S Y W M N (配列番号 3) 又はその機能的に活性な変異体である]、

e) H C D R 2 [ここで、H D R 2 は、R I D P S D S E T H Y N Q K F K (配列番号 4) 又はその機能的に活性な変異体である]、及び

f) H C D R 3 [ここで、H D R 3 は、V G R G Y F D Y (配列番号 5) 又はその機能的に活性な変異体である]

を含んでなるペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、

そして上記において、1 つ又はそれより多いコンポーネント a) ~ f) は、ペプチド又はペプチド複合体の 2 インテグリンへの結合を可能にするように配置されている、上記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体であって、

(i) a) ~ c) のコンポーネントは、軽鎖の可変ドメイン (VL) 中に含まれ；
及び / 又は

(i i) d) ~ f) のコンポーネントは、重鎖の可変ドメイン (VH) 中に含まれ；
及び / 又は

(i i i) ペプチド又はペプチド複合体は抗体であり；
及び / 又は

(i v) ペプチド又はペプチド複合体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗

10

20

30

40

50

体、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')$ ₂、 $F v$ 、ジスルフィド連結 $F v$ 、 $s c F v$ 、 $(s c F v)$ ₂、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多特異性抗体、デュアル特異性抗体、アイソタイプ抗体、デュアル可変ドメイン抗体及び二特異性抗体であり；

及び／又は

(v) ペプチド又はペプチド複合体は、ヒトIgM定常ドメイン、ヒトIgG1定常ドメイン、ヒトIgG2定常ドメイン、ヒトIgG3定常ドメイン、ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、ヒトIgE定常ドメイン、及びヒトIgA定常ドメインから成る群より選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含んでなり；

及び／又は

(v i) 機能的に活性な変異体は、配列番号3～8のいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性から成る機能的に活性なフラグメントであり；

10

及び／又は

(v i i) 機能的に活性な変異体は、配列番号3～8のいずれかのアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する機能的に活性な変異体であり、特に、機能的に活性な変異体は、1つ又はそれより多い保存的アミノ酸置換によって配列番号3～8のいずれかのアミノ酸配列から誘導され；

及び／又は

(v i i i)

- 配列番号1、又はその機能的に活性な変異体、及び／又は
- 配列番号2、又はその機能的に活性な変異体、及び／又は
- 配列番号9、又はその機能的に活性な変異体、及び／又は
- 配列番号10、又はその機能的に活性な変異体、及び／又は
- 配列番号11、又はその機能的に活性な変異体

20

のアミノ酸配列を含んでなり、

又は

(i x)

- 配列番号1、又はその機能的に活性な変異体、及び
- 配列番号2、又はその機能的に活性な変異体、及び
- 場合により、50個の付加アミノ酸残基、好ましくは1～40個、より好ましくは1～30個、更により好ましくは、多くとも1～25個、なおより好ましくは、多くとも1～10個、最も好ましくは1個、2個、3個、4個、又は5個の付加アミノ酸残基よりなるアミノ酸配列で構成され、

30

又は

(x)

- 配列番号9、又はその機能的に活性な変異体、及び
- 配列番号10、又はその機能的に活性な変異体、及び
- 場合により、50個の付加アミノ酸残基、好ましくは1～40個、より好ましくは1～30個、更により好ましくは、多くとも1～25個、なおより好ましくは、多くとも1～10個、最も好ましくは1個、2個、3個、4個、又は5個の付加アミノ酸残基よりなるアミノ酸配列で構成され、

40

又は

(x i)

- 配列番号9、又はその機能的に活性な変異体、及び
- 配列番号11、又はその機能的に活性な変異体、及び
- 場合により、50個の付加アミノ酸残基、好ましくは1～40個、より好ましくは1～30個、更により好ましくは、多くとも1～25個、なおより好ましくは、多くとも1～10個、最も好ましくは1個、2個、3個、4個、又は5個の付加アミノ酸残基よりなるアミノ酸配列で構成される、上記ペプチド又はペプチド複合体。

【請求項5】

50

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体であって、

- LDR 1 の機能的に活性な変異体は、11 位のアミノ酸での変異、特に、11 Asn Gln を含んでなり；及び/又は

- HDR 2 の機能的に活性な変異体は、6 位のアミノ酸での変異、特に、6 Asp Glu を含んでなり；及び/又は

- 配列番号 1 の機能的に活性な変異体は、特に、9 Ala Ser、12 Ala Ser、15 Leu Val、15 Leu Pro、22 Ser Thr、34 Asn Gln、46 Gln Lys、47 Ala Pro、80 Asp Asn、83 Glu Gln、85 Asp Glu、87 Ala Thr 及び 89 Thr Asn から成る群より選択される、9 位、12 位、15 位、22 位、34 位、46 位、47 位、80 位、83 位、85 位、87 位及び/又は 89 位のアミノ酸での 1 つ又はそれより多い変異を含んでなり；及び/又は

- 配列番号 2 の機能的に活性な変異体は、特に、5 His Val、7 Pro Ser、11 Leu Val、12 Val Lys、17 Pro Ser、20 Leu Val、38 Lys Arg、40 Arg Ala、43 Arg Gln、55 Asp Glu、61 Asn Ala、65 Lys Gln、66 Asp Gly、67 Lys Arg、76 Ser Thr、81 Ile Met、82 Gln Glu、87 Thr Arg、91 Ser Thr、93 Val Lys、112 Thr Leu、113 Leu Val 及び 116 Ser Val から成る群より選択される、5 位、7 位、11 位、12 位、17 位、20 位、38 位、40 位、43 位、55 位、61 位、65 位、66 位、67 位、76 位、81 位、82 位、87 位、91 位、93 位、112 位、113 位及び/又は 116 位のアミノ酸での 1 つ又はそれより多い変異を含んでなる、上記ペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 6】

前記抗体又はフラグメントが、ヒト 2 - インテグリンの I - ドメインに nM レベルの結合親和性で特異的に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 7】

前記ペプチド又はペプチド複合体が、インビトロでヒト 2 インテグリンのコラーゲンとの相互作用を阻害し、それによって、血小板と該コラーゲンの粘着による該血小板の活性を阻害する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 8】

前記重鎖可変領域ドメインが、配列番号 5 の重鎖 HCDR 3 を含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 9】

前記重鎖可変領域ドメインが、配列番号 3 (HCDR 1)、配列番号 4 (HCDR 2)、及び配列番号 5 (HCDR 3) の重鎖 CDR、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 10】

HCDR 2 の機能的に活性な変異体が、6 位のアミノ酸での Asp Glu の変異を含んでなる、請求項 9 に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 11】

前記軽鎖可変領域ドメインが、配列番号 8 の軽鎖 LCDR 3 を含んでなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 12】

前記軽鎖可変領域ドメインが、配列番号 6 (LCDR 1)、配列番号 7 (LCDR 2)、及び配列番号 8 (LCDR 3) の軽鎖 CDR、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 13】

LCDR 1 の機能的に活性な変異体が、11 位のアミノ酸での Asn Gln の変異を

10

20

30

40

50

含んでなる、請求項 12 に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 14】

前記重鎖可変領域 (VH) ドメインが、配列番号 2 の VH 配列に対して、少なくとも 90%、95%、97% 又は 99% の配列同一性を有している、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 15】

前記重鎖可変領域 (VH) ドメインが、配列番号 2 の配列又はその機能的に活性な変異体を含んでなる、請求項 14 に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 16】

前記軽鎖可変領域 (VL) ドメインが、配列番号 1 の VL 配列に対して、少なくとも 90%、95%、97% 又は 99% の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

10

【請求項 17】

前記軽鎖可変領域 (VL) ドメインが、配列番号 1 の配列又はその機能的に活性な変異体 (functionally active thereof) を含んでなる、請求項 16 に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 18】

前記重鎖可変領域 (VH) ドメインが、H5、H7、H11、H12、H17、H20、H38、H40、H43、H55、H61、H65、H66、H67、H76、H81、H82、H87、H91、H93、H112、H113 及び H116 から成る群より選択される位置における 1 つ又はそれより多いアミノ酸置換を含んでなる、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

20

【請求項 19】

1 つ又はそれより多いアミノ酸置換が、5 His Val、7 Pro Ser、11 Leu Val、12 Val Lys、17 Pro Ser、20 Leu Val、38 Lys Arg、40 Arg Ala、43 Arg Gln、55 Asp Glu、61 Asn Ala、65 Lys Gln、66 Asp Gly、67 Lys Arg、76 Ser Thr、81 Ile Met、82 Gln Glu、87 Thr Arg、91 Ser Thr、93 Val Lys、112 Thr Leu、113 Leu Val 及び 116 Ser Val から成る群より選択される、請求項 18 に記載のペプチド又はペプチド複合体。

30

【請求項 20】

前記軽鎖可変領域 (VL) ドメインが、L9、L12、L15、L22、L34、L46、L47、L80、L83、L85、L87、及び L89 から成る群より選択される位置における 1 つ又はそれより多いアミノ酸置換を含んでなる、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 21】

1 つ又はそれより多いアミノ酸置換が、9 Ala Ser、12 Ala Ser、15 Leu Val、15 Leu Pro、22 Ser Thr、34 Asn Gln、46 Gln Lys、47 Ala Pro、80 Asp Asn、83 Glu Gln、85 Asp Glu、87 Ala Thr 及び 89 Thr Asn から成る群より選択される、請求項 20 に記載のペプチド又はペプチド複合体。

40

【請求項 22】

前記重鎖可変領域 (VH) ドメインが、配列番号 38 (HC1)、配列番号 39 (HC2)、配列番号 40 (HC3)、配列番号 41 (HC4)、配列番号 42 (HC5)、配列番号 43 (HC6)、及び配列番号 44 (HC7) から成る群より選択される VH 配列に対して、少なくとも 90%、95%、97% 又は 99% の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項 23】

前記重鎖可変領域 (VH) ドメインが、配列番号 38 (HC1)、配列番号 39 (HC

50

2)、配列番号40(HC3)、配列番号41(HC4)、配列番号42(HC5)、配列番号43(HC6)、及び配列番号44(HC7)から成る群より選択されるVH配列を含んでなる、請求項22に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項24】

前記軽鎖可変領域(VL)ドメインが、配列番号33(LC1)、配列番号34(LC2)、配列番号35(LC3)、配列番号36(LC4)、及び配列番号37(LC5)から成る群より選択されるVL配列に対して、少なくとも90%、95%、97%又は99%の配列同一性を有する、請求項1~23のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項25】

前記軽鎖可変領域(VL)ドメインが、配列番号33(LC1)、配列番号34(LC2)、配列番号35(LC3)、配列番号36(LC4)、及び配列番号37(LC5)から成る群より選択されるVL配列を含んでなる、請求項24に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項26】

前記抗体又は結合部分が、キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項1~25のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項27】

抗原結合部分が、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、及び(scFv)₂から成る群より選択される、請求項1~26のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項28】

多特異性抗体、デュアル特異性抗体、アイソタイプ抗体、デュアル可変ドメイン抗体及び二特異性抗体から成る群より選択される、請求項1~27のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項29】

ヒトIgM定常ドメイン、ヒトIgG1定常ドメイン、ヒトIgG2定常ドメイン、ヒトIgG3定常ドメイン、ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、ヒトIgE定常ドメイン、及びヒトIgA定常ドメインから成る群より選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含んでなる、請求項1~28のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項30】

ヒトIgG4定常ドメインを含んでなる、請求項1~29のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項31】

ペプチド又はペプチド複合体が、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントを含んでなる、又はそれから成る、請求項1~30のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体

【請求項32】

請求項1~31のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体をコードする1つ又はそれより多い核酸。

【請求項33】

2インテグリン関連障害若しくは疾患の処置、予防又は診断において使用するための請求項1~31のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体。

【請求項34】

核酸(複数を含む)がベクター内に位置している、請求項32に記載の核酸(複数を含む)。

【請求項35】

請求項32又は34に記載の核酸の1つを異種発現する、細胞。

【請求項36】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体を生産する方法であって、請求項 3 5 に記載の細胞を該ペプチド又はペプチド複合体の発現を可能にする条件のもとで培養する工程、所望により宿主細胞から該ペプチド又はペプチド複合体を回収する工程を含んでなる、上記方法。

【請求項 3 7】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのペプチド又はペプチド複合体、及び / 又は請求項 3 2 又は 3 4 に記載の少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 3 8】

2 インテグリン関連疾患又は障害、好ましくは、血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含むがん、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植に対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (S L E)、多発性硬化症、レイノー症候群、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、及び炎症反応を誘発する感染症から成る群より選択される疾患又は障害を処置し又は予防する際に使用するための請求項 3 7 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3 9】

血管疾患及び / 又は血栓症を処置し、又は予防する際、特に、急性冠動脈症候群、経皮的冠動脈インターベンション、虚血性脳卒中、頸動脈狭窄又は末梢動脈閉塞性疾患の処置において使用するための請求項 3 7 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 4 0】

2 インテグリンの変化に関連する疾患を診断する方法であって、

a) 2 インテグリンを含むサンプルを請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の、ペプチド又はペプチド複合体と接触させる工程 ; 及び

b) 2 インテグリンの、該ペプチド又はペプチド複合体への結合を検出する工程 ; 及び

c) 工程 b) の結合を参照と比較する工程を含んでなり、上記において、参照と比較したサンプル中の 2 インテグリン結合の変化が疾患を示している、上記方法。

【請求項 4 1】

30

a) 包装材料、

b) 請求項 1 ~ 3 1 若しくは 3 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド若しくはペプチド複合体、又はその製薬学的に許容される塩、又は請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含んでなり、

c) 該ペプチド又はペプチド複合体が疾患又は障害、特に、2 インテグリン関連疾患・障害の処置に有効であることを示している、ラベル又は該包装材料内に含まれるパッケージインサート、を含んでなる物品。

【請求項 4 2】

2 インテグリン関連障害若しくは疾患の診断のための診断キットであって、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体、及び適切な包装、及び場合により、2 インテグリンの検出の際に該ペプチド又はペプチド複合体を使用するための適切な使用説明書を含んでなる、上記キット。

40

【請求項 4 3】

2 インテグリン関連障害若しくは疾患の処置又は診断方法であって、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の 1 つ又はそれより多いペプチド又はペプチド複合体、及び / 又は請求項 3 2 又は 3 4 に記載の 1 つ又はそれより多い核酸又は請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の 1 つを使用する、上記 2 インテグリン関連障害若しくは疾患の処置又は診断方法。

【請求項 4 4】

50

2 インテグリンの変化に関連する疾患の診断方法であって、

a) 個体から取得したサンプルを請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はペプチド複合体と接触させる工程；及び

b) 2 インテグリンのペプチド又はペプチド複合体への結合を検出する工程；及び

c) 工程 b) の結合を、1 つ又はそれより多い参照サンプル中の 2 インテグリンのペプチド又はペプチド複合体への結合と比較する工程；を含んでなり、

上記において、1 つ又はそれより多い参照サンプル中で検出される結合と比較して取得されたサンプル中の結合の変化が、疾患を示している、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

この発明は、処置、予防又は診断に使用するための 2 インテグリンに結合するペプチド又はペプチド複合体 (peptide complex)、このペプチド又はペプチド複合体をコードする 1 つ又はそれより多い核酸、このペプチド又はペプチド複合体を作製する組み換え細胞、このペプチド又はペプチド複合体の作製方法、医薬として使用するためのこのペプチド又はペプチド複合体、あるいは核酸 (複数を含む) を含んでなる医薬組成物、2 インテグリンを検出する方法及びスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

インテグリンは、隣接する細胞表面の接着分子及び/又は細胞外マトリックス (ECM) 間の相互作用を媒介する膜貫通タンパク質である。インテグリンは、発生、及び癒傷、細胞分化及びアポトーシスの間の細胞移動を含むいくつかの生物過程において多様な役割を演じている。こうした活性はまた、腫瘍細胞の転移及び浸潤能を調節しうる。これらは、及び サブユニットから成るヘテロダイマーとして存在する。いくつかの及び サブユニットは、互いに特異性を示し、VLA (最晩期抗原) メンバーと呼ばれうる。ヘテロダイマーはしばしば、優先的にいくつかの細胞接着分子、又は ECM (細胞外マトリックス) の構成成分に結合する。これらは触媒活性を持たないが、インテグリンは、焦点接着斑と呼ばれる複合体をシグナル伝達する多分子の一部でありうる。

20

【0003】

リガンドに結合する際に、インテグリンは、アウトサイド・インシグナル伝達 (outside-in signaling) と呼ばれる、細胞内シグナルをこうした細胞接着事象に应答して細胞活性を変化させる細胞骨格に細胞内シグナルを伝達する。こうしたシグナル伝達はまた、インサイド・アウトシグナル伝達 (inside-out signaling) と呼ばれる、同じ細胞で発現される他のインテグリンサブタイプを活性化しうる。インサイド・アウトシグナル伝達は更に、細胞の細胞質内に発生する、及び サブユニット間のクラスプ (clasp) 崩壊のような制御シグナルを介して生じ、次いで受容体の細胞外リガンド結合ドメインに伝達される。インテグリンは、発生、器官形態形成、生理機能及び病理、並びに正常組織ホメオスタシス、及び免疫及び血栓応答を制御する細胞接着事象において重要な役割を演じることができ、そしてこれに加えて、それらは細胞の環境センサーとしても働くことができる。

30

【0004】

インテグリンヘテロダイマーの 1 つに、2 1 インテグリンがある。この 2 1 インテグリンは、内皮及び上皮細胞、線維芽細胞、リンパ球、及び血小板を含めて、いくつかの異なる細胞種で発現される。2 1 のリガンド特異性は、細胞種によって変化する。これは血小板及び線維芽細胞ではコラーゲン受容体として働くことができるが、内皮及び上皮細胞では、コラーゲンとラミニン受容体の双方として働くことができる。

40

【0005】

2 1 インテグリンは、インテグリンのファミリーの 2 インテグリンサブユニット、及び インテグリンのファミリーに起源する 1 インテグリンサブユニットから構成される分子である。2 及び 1 インテグリンの配列は、当技術分野において知られており、例えば、非特許文献 1 及び 2 中に公表されている。参考例配列が図 9 に示されており

50

、更なる配列を、例えば、ホモ・サピエンス (homo sapiens) 2 及び 1 インテグリンに対する (以下を参照されたい)、NCBI アクセション番号、NP_002194、NM_002203、NM_002211、NP_002202 (1 インテグリンアイソフォーム 1A) のもとで、米国国立バイオテクノロジーセンター (NCBI) データベースから検索することができる。

【0006】

非ヒト起源 (例えば、げっ歯類 - マウス、ラットなど - 類人猿又はその他) の配列と同様に、選択的スプライシング変異、アイソフォームは、当技術分野において知られており、それらが少なくとも 1 つの 2 又は 1 インテグリンの知られている機能を示す限り、可能性のある代替的实施態様に相当する。

10

【0007】

2 サブユニットは、しばしば I (すなわち、挿入) - ドメインと呼ばれている、アミノ末端近くに位置しているおよそ 200 アミノ酸ドメインを含むインテグリン サブユニットのサブセットのメンバーである。2 及びインテグリンサブユニット I - ドメインを含む、多くの I - ドメインは、更にカチオン結合部位、金属イオン依存性接着部位 (MIDAS) モチーフを含んでいる。2 インテグリン I - ドメインの構造キャラクタリゼーションが、例えば、非特許文献 3 中に公表されている。I - ドメインは、リガンド結合において重要な決定因子である。ヒト 2 インテグリン I - ドメインのアミノ酸配列は、図 9 から入手することができる。これについては 2 インテグリン配列 (配列番号 20) 中でマークがつけられている。

20

【0008】

この 2 1 インテグリン (最晩期抗原 2 ; VLA - 2) は、血小板、血管内皮細胞、上皮細胞、活性化単球 / マクロファージ、線維芽細胞、白血球、リンパ球、活性化好中球、及びマスト細胞を含む種々の細胞種で発現される。2 1 の自然的リガンドは、コラーゲン及びラミニンを含み、その双方とも細胞外マトリックス内に見出される。2 1 インテグリンは、サイトカイン発現の増加及び増殖をもたらす、コラーゲン誘発血小板凝集、コラーゲン上の細胞移動、コラーゲン線維の細胞依存型再組織化、並びにコラーゲン依存性細胞応答、T 細胞、マスト細胞及び好中球の機能の局面、遅延型過敏・接触過敏症 (delayed type hypersensitivity contact hypersensitivity) 及びコラーゲン誘発関節炎の局面、乳腺管形態形成、上皮の創傷治癒、並びに VEGF 誘導血管新生に関連するプロセスを含む、いくつかの生物学的及び病理学的プロセスに関与している。

30

【0009】

血小板は通常、不活性な静止状態で血中を循環する。しかしながら、これらは損傷部位では広範囲なアゴニストに迅速に应答する状態になっている。刺激によって、それらは形態変化を受け、そして、フィブリノゲン及び von Willebrand 因子 (vWf)、他の血小板、及び血管壁の内皮ライニングなどの血漿タンパク質と非常に反応性に富むようになる。こうした相互作用はすべて、協力して、止血のフィブリン血小板血栓を迅速に形成することが容易になる (非特許文献 4)。リガンドに結合すると、血小板受容体は、アウトサイド・インシグナル経路に伝達し、該経路は次に、血小板フィブリノゲン受容体、IIb 3 インテグリンのような、血小板凝集をもたらす二次受容体 (secondary receptors) の活性化をもたらす、インサイド・アウトシグナル伝達のトリガーとなる。血小板のわずかの活性化でも、血小板血栓应答、血小板減少、及び出血性合併症を生じさせる。

40

【0010】

2 インテグリンは、血小板上で発現される唯一のコラーゲン結合インテグリンであり、そして血小板吸着においてコラーゲン及び止血にある種の役割を果たすのに関与している (非特許文献 5 ; 6 ; 7)。それ故、アルファ 2 インテグリン機能を不活性化することが、血小板凝集に否定的に介入するために望ましいであろう。そうした 1 つの阻害が、例えば、インテグリンを不活性な状態に抑え込むアロステリックな阻害になるであろう。

【0011】

50

インテグリン/リガンド相互作用によって、白血球の炎症組織への血管外遊出が容易になり（非特許文献 8；9；10）、そして炎症部位における炎症誘発性細胞の移動、動員及び活性化を含む、炎症性刺激に応答して組織中に循環することに起因する白血球の初期の血管外遊出の後の、下流の事象において役割を演じている（非特許文献 11）。

【0012】

2 インテグリンをブロックすると、関節リウマチのマウスモデル及び炎症性腸疾患モデルにおいて遅延型過敏性反応及び有効性に対して影響を示すこと（非特許文献 12；13）、そしてインビトロにおける内皮細胞増殖及び移動を減衰させること（非特許文献 14）が報告されており、2 インテグリンをブロックすることは、種々の癌で観察されるような、異常又は正常より高い血管新生を防止/阻害しうることを示唆している。更に、ラットの結腸直腸癌手術モデルにおいて 2 インテグリンの阻害は、有効な抗転移剤であることが判明した（非特許文献 15）。結腸直腸がん細胞の分化系列決定（lineage commitment）はまた、悪性の表現型から移行しうる（非特許文献 16）。2 インテグリンは、膵臓癌における悪性表現型を媒介するとみられるので（非特許文献 17、この種の浸潤型癌における治療的アプローチのこの標的としての有効性が実証されている。更に、2 1 インテグリンは、前立腺癌の進行においてスフィンゴ糖脂質と相互作用し、この相互作用をブロックすれば、この種の癌のための治療的使用に有用であろうということが示唆されている（非特許文献 18）。多発性硬化症（MS）のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）において、この疾患の発病直後に CNS の臨床的症状及び炎症が抑制されることを考慮すると、2 インテグリンは、抗-2 抗体を用いる処置として重要な役割を演じていると思われる（非特許文献 19）。抗-2 抗体の治療的に有益な作用のメカニズムは、2 1 インテグリンと C1q 補体タンパク質の相互作用を阻害することによるものである可能性が最も高い。この相互作用は、マスト細胞脱顆粒及びマスト細胞活性化における第一ステップであり、これは MS、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎のような自己免疫及び炎症性疾患に関連している（非特許文献 20）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献 1】Takada and Hemler J. Cell Biol. 109(1):397-407, 1989

【非特許文献 2】Argraves, W.S, J. Cell. Biol. Sep 105(3): 1183-90 (1987)

【非特許文献 3】Dickeson et. al., J. Biol. Chemistry, 272, 7661-7668 (1997)

【非特許文献 4】Cramer, 2002 in Hemostasis and Thrombosis, 4th edition

【非特許文献 5】Santoro et al., Thromb. Haemost. 74:813-821 (1995)

【非特許文献 6】Vanhoorelbeke et al., Curr Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disorders. 3(2): 125-40 (2003)

【非特許文献 7】Sarratt et al., Blood 106(4): 1268-1277 (2005)

【非特許文献 8】Jackson et al., J. Med. Chem. 40:3359-3368 (1997);

【非特許文献 9】Gadek et al., Science 295(5557):1086-9 (2002),

【非特許文献 10】Sircar et al., Bioorg. Med. Chem. 10:2051-2066 (2002)

【非特許文献 11】Eble J. A., Curr Pharm Des. 11(7):867-880 (2005)

【非特許文献 12】Kriegelstein et al., J. Clin. Invest. 110(12):1773-82 (2002)

【非特許文献 13】de Fougerolles et al., J. Clin. Invest. 105:721-720 (2000)

【非特許文献 14】Senger et al., Am. J. Pathol. 160(1):195-204 (2002)

【非特許文献 15】van der Bji et al, Hepatology 47(2): 532-543 (2008)

【非特許文献 16】Kirkland et al J Biol Chem 283(41): 27612-27619 (2008)

【非特許文献 17】Grzesiak and Bouvet, Br J Cancer 94: 1311-1319 (2006)

【非特許文献 18】van Slambrouck et al., Int J Onco 35: 693-699 (2009)

【非特許文献 19】Tsunoda et al Brain Pathol 17:45-55 (2007)

【非特許文献 20】McCall-Culbreath et al Blood 111(3562-3570) 2008

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

従って、 $\alpha 2$ インテグリンは、関心を起こさせる医薬標的である。インテグリンは、特異的な阻害剤の開発にとって困難な標的であるので、多くの異なる可能性のある治療的適応症を考慮すると、 $\alpha 2$ インテグリン関連疾患の処置に使用できる $\alpha 2$ インテグリンに結合する代替的阻害剤、特に現存している $\alpha 2$ インテグリン阻害剤と比較して若干異なった特性を示すアルファ $\alpha 2$ インテグリンの阻害剤のニーズがある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

発明の概要

この発明は、処置、予防又は診断に使用するための、 $\alpha 2$ インテグリン抗体、抗原結合性フラグメント及び他の結合分子、この結合分子をコードする1つ又はそれより多い核酸、結合分子を作製する組み換え細胞、この結合分子を作製する方法、医薬として使用するためのこの結合分子又は核酸（複数を含む）を含んでなる医薬組成物、 $\alpha 2$ インテグリンを検出する方法及びスクリーニング方法に関する。

【0016】

この目的を達成するために、 $\alpha 2$ インテグリンに対するモノクローナル抗体が作製され、そしてその特性の有無を試験した。これは、実施例中に記載されているような有利な特性を提供する。特に、この抗 $\alpha 2$ インテグリン抗体及びその一価のフラグメント又は誘導体は、結合定数、交差反応性、ドメインマッピング及びインビトロ機能性データを含む、一連の実験データによって特徴付けられた。

【0017】

このモノクローナル抗体(mAb)が、 $\alpha 2$ インテグリンのI-ドメインに、nMレベルの親和性で結合し、この結合は、同様にアルファ $\alpha 2$ インテグリンI-ドメインを標的とする、技術水準のコンパレーター抗体(comparator antibody)によって結合するエピトープとは異なるI-ドメイン内のエピトープで起こることが明らかであることが見出された。この発明による抗体(IgG4 mAb, Fab)の操作された分子はすべて、ピアコアによる実験(Biacore experiments)において、同程度のオン及びオフ速度(on- and off-rates)を示す。それらは、関連する種に起源する血小板を用いて試験したところ、霊長類の $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンと交差反応性を示したのに対して、一方マウス、ラット、イヌ、モルモット、又はウサギの $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンに対しては、交差反応性は検出されなかった。

【0018】

試験分子は、組み換え $\alpha 2$ インテグリンのインビトロでのコラーゲンとの相互作用を低いnMレベルのIC₅₀値で阻害する。コラーゲンの阻害に加えて、抗 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンmAb又はFabフラグメントは、単離したヒト血小板及びヒト多血小板血漿の双方において、静止状態で、コラーゲンへの血小板粘着を阻害することができる。それらはまた、コラーゲンをコートした表面上で流動状態下の血栓形成を阻害することができる。コラーゲン結合をブロックすることができ、従ってコラーゲンへの血小板粘着を防止することは、血栓形成における最も初期のステップの1つである。

【0019】

最後に、mAbに使用された約30人のドナーにおいて観察されたGPIIb/IIIaの活性化又はP-セレクチンの表面発現の増加がなかったため、mAb又はFabは、血小板活性化を引き起こさなかった。従って、この発明は、一価の抗体、抗体フラグメント又は誘導体、並びに下記に列挙されているような $\alpha 2$ インテグリン関連疾患の処置のための研究、診断及び治療剤を製造するためのそれらの使用を提供する；特定の例としては、血栓症、他の血管疾患、癌及び血管新生の病理学的帰結、多発性硬化症などの自己炎症性疾患が挙げられる。

【0020】

当業者に知られているように、抗体の結合特性は、可変ドメインによって媒介される。

10

20

30

40

50

抗原に結合する場合には、重鎖に起源する可変ドメイン及び軽鎖に起源する共作用可変ドメインが通例、抗体に存在し、共作用を可能にするために配置される。この可変ドメインはまた、FV領域とも呼ばれる。より詳細には、軽鎖(VL)及び重鎖(VH)上にそれぞれ3つある可変ループが、抗原に結合する場合に関与している。こうしたループは、相補性決定領域(CDR)と呼ばれており、VLの場合のLCDR1、LCDR2及びLCDR3、そしてVHの場合のHCDR1、HCDR2及びHCDR3がある。重鎖に起源する可変ドメインの種々の異なった配置、及び軽鎖に起源する共作用可変ドメインは、当技術分野において知られている。それ故、重鎖に起源する1つ又はそれより多い適切な可変ドメイン、及び軽鎖に起源する1つ又はそれより多い共作用可変ドメインを特定することが重要であった。シーケンスアライメントによって、重鎖及び軽鎖のCDRは、上記に特定された2インテグリン抗体と同定された。

10

【0021】

第一の局面では、この発明は、ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記ペプチド又はペプチド複合体、抗体又はフラグメントは、ヒト2インテグリンのI-ドメインに特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントは、重鎖可変領域(VH)ドメイン及び軽鎖可変領域(VL)ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、非ヒト霊長類(non-human primate)2インテグリンと交差反応するが、非霊長類(non-primate)2インテグリンとは交差反応しない、前記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。

20

【0022】

第二の局面では、この発明は、ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記ペプチド又はペプチド複合体、抗体又はフラグメントは、ヒト2インテグリンのI-ドメインに特異的に結合し、前記抗体は、重鎖可変領域(VH)ドメイン及び軽鎖可変領域(VL)ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、参照抗体のエピトープとの結合について参照抗体と競合し、前記参照抗体は、アクセッション番号DSMZ23944にてDSMZに寄託されているプラスミドによってコードされる軽鎖、及び(i)アクセッション番号DSMZ23946にてDSMZに寄託されているプラスミド、又は(ii)アクセッション番号DSMZ23945にてDSMZに寄託されているプラスミドのいずれかによってコードされている重鎖を含んでなる、前記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。

30

【0023】

第三の局面では、この発明は、1つ又はそれより多い下記のコンポーネントa)~f) :

a) LCDR1 [ここで、LDR1は、RASESVESYGNSFIY(配列番号6(SEQ ID NO:6))又はその機能的に活性な変異体である]、

b) LCDR2 [ここで、LDR2は、LASNLAS(配列番号7)又はその機能的に活性な変異体である]、

c) LCDR3 [ここで、LDR3は、QQNNEDPYT(配列番号8)又はその機能的に活性な変異体である]、

d) HCDR1 [ここで、HDR1は、GYTFTSYWMN(配列番号3)又はその機能的に活性な変異体である]、

e) HCDR2 [ここで、HDR2は、RIDPSDSETHYNQKFK(配列番号4)又はその機能的に活性な変異体である]、及び

f) HCDR3 [ここで、HDR3は、VGRGYFDY(配列番号5)又はその機能的に活性な変異体である]

を含んでなるペプチド又はペプチド複合体であって、

そして上記において、1つ又はそれより多いコンポーネントa)~f)は、ペプチド又はペプチド複合体の2インテグリンへの結合を可能にするように配置されている、前記ペ

40

50

プチド又はペプチド複合体に関する。

【0024】

第四の局面では、この発明は、2インテグリン関連障害若しくは疾患の処置、予防又は診断に使用するための上記ペプチド又はペプチド複合体に関する。

【0025】

第五の局面では、この発明は、この発明のペプチド又はペプチド複合体をコードする1つ又はそれより多い核酸に関する。

【0026】

第六の局面では、この発明は、この発明の核酸の1つを異種発現 (heterologously expressing) する細胞に関する。

【0027】

第七の局面では、この発明は、この発明による細胞を、このペプチド又はペプチド複合体の発現を可能にする条件下にて培養し、そして所望によりペプチド又はペプチド複合体を宿主細胞から回収することを含んでなる、この発明のペプチド又はペプチド複合体を製する方法に関する。

【0028】

第八の局面では、この発明は、医薬として使用するための、この発明の少なくとも1つのペプチド又はペプチド複合体、及び/又はこの発明の少なくとも1つの核酸を含んでなる医薬組成物に関する。

【0029】

第九の局面では、この発明は、2インテグリンの変化に関連する疾患を診断する方法であって、その方法が、

a) 2インテグリンを含むサンプルを請求項1~3のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体と接触させることと；及び

b) 2インテグリンの、このペプチド又はペプチド複合体への結合を検出することと；及び

c) 工程b)の結合を参照と比較することを含んでなり、上記において、参照と比較してサンプル中の2インテグリンの結合の変化が、疾患の存在を示す、前記方法に関する。

【0030】

第十の局面では、この発明は、以下：

a) 包装材料、

b) 請求項1~3のいずれか1項に記載のペプチド又はペプチド複合体又はその製薬学的に許容される塩、

c) ラベル又はパッケージインサート

を含んでなる製品であって、

前記インサートは前記包装材料の中に含まれ、

前記ペプチド又はペプチド複合体が疾患又は障害、特に2インテグリン関連疾患・障害の処置に有効であることを表示している、前記製品に関する。

【0031】

第十一の局面では、この発明は、2インテグリン関連障害若しくは疾患を診断するための診断キットであって、該キットが、この発明のペプチド又はペプチド複合体及び適切な包装、及び場合により、2インテグリンを検出する際に前記ペプチド又はペプチド複合体を使用するための適切な使用説明書を含んでなる、前記キットに関する。

【0032】

第十二の局面では、この発明は、この発明の1つ又はそれより多いペプチド又はペプチド複合体及び/又はこの発明の1つ又はそれより多い核酸又はこの発明の医薬組成物の1つを使用する、2インテグリン関連障害若しくは疾患の処置又は診断方法に関する。

【0033】

10

20

30

40

50

第十三の局面では、この発明は、 $\alpha 2$ インテグリンの変化に関連する疾患の診断方法であって、その方法が、

- a) 個体から取得したサンプルをこの発明のペプチド又はペプチド複合体と接触させることと；及び
 - b) $\alpha 2$ インテグリンのペプチド又はペプチド複合体への結合を検出することと；及び
 - c) 工程 b) の結合を、1つ又はそれより多い参照サンプル中の $\alpha 2$ インテグリンのペプチド又はペプチド複合体への結合と比較することを含んでなり、
- 上記において、1つ又はそれより多い参照サンプル中で検出された結合と比較して取得したサンプル中の結合の変化が、疾患を表すことを特徴とする、前記方法に関する。

【0034】

いくつかの実施態様では、この発明は、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントは、ヒト $\alpha 2$ インテグリンの I - ドメインと特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントは、重鎖可変領域 (VH) ドメイン及び軽鎖可変領域 (VL) ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、非ヒト霊長類 $\alpha 2$ インテグリンと交差反応するが、非霊長類とは $\alpha 2$ インテグリンとは交差反応しない、前記単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。

10

【0035】

他の実施態様では、この発明は、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体は、ヒト $\alpha 2$ インテグリンの I - ドメインと特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントは、重鎖可変領域 (VH) ドメイン及び軽鎖可変領域 (VL) ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、参照抗体のエピトープとの結合について参照抗体と競合し、前記参照抗体は、アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 4 にて D S M Z に寄託されているプラスミドによってコードされる軽鎖、及び (i) アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 6 にて D S M Z に寄託されているプラスミド、又は (i i) アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 5 にて D S M Z に寄託されているプラスミドのいずれかによってコードされている重鎖を含んでなる、前記単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。

20

【0036】

一実施態様では、前記抗体又はフラグメントは、ヒト $\alpha 2$ インテグリンの I - ドメインに n M レベルの結合親和性で特異的に結合する。別の実施態様では、前記抗体又はフラグメントは、インビトロでヒト $\alpha 2$ インテグリンのコラーゲンとの相互作用を阻害し、その結果、前記血小板と前記コラーゲンの粘着による血小板の活性化を阻害する。

30

【0037】

一実施態様では、前記重鎖可変領域ドメインは、配列番号 5 の重鎖 H C D R 3 を含んでなる。別の実施態様では、前記重鎖可変領域ドメインは、配列番号 3 (H C D R 1)、配列番号 4 (H C D R 2)、及び配列番号 5 (H C D R 3) の重鎖 C D R、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる。一実施態様では、H C D R 2 の機能的に活性な変異体 (バリエーション: variant) は、6 位のアミノ酸での A s p G l u の変異を含んでなる。

40

【0038】

一実施態様では、この軽鎖可変領域ドメインは、配列番号 8 の軽鎖 L C D R 3 を含んでなる。別の実施態様では、この軽鎖可変領域ドメインは、配列番号 6 (L C D R 1)、配列番号 7 (L C D R 2)、及び配列番号 8 (L C D R 3) の軽鎖 C D R、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる。一実施態様では、L C D R 1 の機能的に活性な変異体は、11 位のアミノ酸での A s n G l n の変異を含んでなる。

【0039】

一実施態様では、重鎖可変領域 (VH) ドメインは、配列番号 2 の VH 配列に対して、少なくとも 90%、95%、97% 又は 99% の配列同一性を有している。別の実施態様では、前記重鎖可変領域 (VH) ドメインは、配列番号 2 の配列又はその機能的に活性な変異体 (functionally active thereof) を含んでなる。

50

【0040】

一実施態様では、軽鎖可変領域（VL）ドメインは、配列番号1のVL配列に対して、少なくとも90%、95%、97%又は99%の配列同一性を有する。別の実施態様では、前記軽鎖可変領域（VL）ドメインは、配列番号1の配列又はその機能的に活性な変異体（functionally active thereof）を含んでなる。

【0041】

一実施態様では、重鎖可変領域（VH）ドメインは、H5、H7、H11、H12、H17、H20、H38、H40、H43、H55、H61、H65、H66、H67、H76、H81、H82、H87、H91、H93、H112、H113及びH116から成る群より選択される位置における1つ又はそれより多いアミノ酸置換を含んでなる。一実施態様では、この1つ又はそれより多いアミノ酸置換は、5His Val、7Pro Ser、11Leu Val、12Val Lys、17Pro Ser、20Leu Val、38Lys Arg、40Arg Ala、43Arg Gln、55Asp Glu、61Asn Ala、65Lys Gln、66Asp Gly、67Lys Arg、76Ser Thr、81Ile Met、82Gln Glu、87Thr Arg、91Ser Thr、93Val Lys、112Thr Leu、113Leu Val及び116Ser Valから成る群より選択される。

10

【0042】

一実施態様では、軽鎖可変領域（VL）ドメインは、L9、L12、L15、L22、L34、L46、L47、L80、L83、L85、L87、及びL89から成る群より選択される位置における1つ又はそれより多いアミノ酸置換を含んでなる。一実施態様では、この1つ又はそれより多いアミノ酸置換は、9Ala Ser、12Ala Ser、15Leu Val、15Leu Pro、22Ser Thr、34Asn Gln、46Gln Lys、47Ala Pro、80Asp Asn、83Glu Gln、85Asp Glu、87Ala Thr及び89Thr Asnから成る群より選択される。

20

【0043】

一実施態様では、重鎖可変領域（VH）ドメインは、配列番号38（HC1）、配列番号39（HC2）、配列番号40（HC3）、配列番号41（HC4）、配列番号42（HC5）、配列番号43（HC6）、及び配列番号44（HC7）から成る群より選択されるVH配列に対して、少なくとも90%、95%、97%又は99%の配列同一性を有する。別の実施態様では、重鎖可変領域（VH）ドメインは、配列番号38（HC1）、配列番号39（HC2）、配列番号40（HC3）、配列番号41（HC4）、配列番号42（HC5）、配列番号43（HC6）、及び配列番号44（HC7）から成る群より選択されるVH配列を含んでなる。

30

【0044】

一実施態様では、軽鎖可変領域（VL）ドメインは、配列番号33（LC1）、配列番号34（LC2）、配列番号35（LC3）、配列番号36（LC4）、及び配列番号37（LC5）から成る群より選択されるVL配列に対して、少なくとも90%、95%、97%又は99%の配列同一性を有する。別の実施態様では、軽鎖可変領域（VL）ドメインは、配列番号33（LC1）、配列番号34（LC2）、配列番号35（LC3）、配列番号36（LC4）、及び配列番号37（LC5）から成る群より選択されるVL配列を含んでなる。

40

【0045】

一実施態様では、抗体、又はその結合部分は、キメラ抗体又はヒト化抗体である。別の実施態様では、抗原結合部分は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィドにより連結されたFv、scFv、及び(scFv)₂から成る群より選択される。別の実施態様では、抗体又は結合部分は、多（重）特異性抗体（multispecific antibody）、デュアル特異性抗体（dual specific antibody）、アイソタイプ抗体（isotype antibody）、デュアル可変ドメイン抗体（dual variable domain antibody）及び二（重）特異

50

的抗体 (bispecific antibody) から成る群より選択される。別の実施態様では、抗体又は結合部分は、ヒト I g M 定常ドメイン、ヒト I g G 1 定常ドメイン、ヒト I g G 2 定常ドメイン、ヒト I g G 3 定常ドメイン、ドメイン、ヒト I g G 4 定常ドメイン、ヒト I g E 定常ドメイン、及びヒト I g A 定常ドメインから成る群より選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体又は結合部分は、ヒト I g G 4 定常ドメインを含んでなる。

【 0 0 4 6 】

別の局面では、本発明は、本発明の抗体又は抗原結合部分のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。別の局面では、本発明は、この核酸を含んでなる組み換え発現ベクターを提供する。別の局面では、本発明は、組み換え発現ベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。別の局面では、本発明は、抗体又は抗原結合性フラグメントを作製する方法であって、抗体が宿主細胞によって作製されるような条件下にて宿主細胞を培養することを含んでなる、前記方法を提供する。

10

【 0 0 4 7 】

別の局面では、本発明は、この抗体、又は抗原結合部分と、1つ又はそれより多い製薬学的に許容される担体を含んでなる医薬組成物を提供する。別の局面では、本発明は、2 インテグリン関連障害若しくは疾患を処置し、予防し、又は診断する方法であって、その方法が、当該医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含んでなる、前記方法を提供する。一実施態様では、この 2 インテグリン関連疾患若しくは障害は、血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含む癌、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、グラフティングに対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (S L E)、多発性硬化症、レイノー症候群、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、及び炎症反応を誘発する感染症から成る群より選択される。別の実施態様では、この 2 インテグリン関連疾患若しくは障害は、急性冠動脈症候群、経皮的冠動脈インターベンション、虚血性脳卒中、頸動脈狭窄又は末梢動脈閉塞性疾患から成る群より選択される。

20

【 0 0 4 8 】

本発明の詳細な説明
定義

30

この発明を下記に詳細に述べる前に、この発明は、本明細書中に述べられている具体的な方法、プロトコル及び試薬に限定されることがない(こうしたものは変化しうるからである)ことが理解されるべきである。また、本明細書中で使用されている用語は、単に具体的な実施態様を述べることを目的にしているにすぎないものであり、そしてこの発明の範囲を制限することを意図しているものではなく、もっぱら添付した特許請求の範囲に限定して制限されるであろうことが理解されるべきである。別途明記しない限り、本明細書中で使用されている技術的及び科学的用語はすべて、通例、この発明が属している技術分野における当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。

【 0 0 4 9 】

好ましくは、本明細書中で使用されている用語は、“バイオテクノロジー用語のマルチリンガル辞典：(I U P A C 勧告) (A multilingual glossary of biotechnological terms) : (IUPAC Recommendations) ”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. 及び Koelbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland) 中の記載と同様に定義される。

40

【 0 0 5 0 】

この明細書および下記の特許請求の範囲を通して、文脈上別の解釈をする必要のある場合を除き、語“含んでなる (comprise)”、並びに“含んでなる (comprises)”、“含んでなる (comprising)”などのその変形形態は、指定された1つの整数若しくはステップ (step) 又は一群の整数若しくはステップを包含することを意味するが、それ以外の整数若しくはステップ又は一群の整数又はステップを除外することを意味しているものでは

50

ないことは理解されるところである。

【0051】

いくつかのドキュメント（例えば：特許、特許出願、科学出版物、製造業者の仕様書、使用説明書、ジェンバンクアクセッション番号シーケンスサブミッション（GenBank Accession Number sequence submissions）など）が、この明細書のテキストの全体を通して引用されている。先行発明を根拠にしてこうした開示よりも本発明のほうが前であるという権利がないということを本明細書中で承認したものであるといかなる場合でも解釈されてはならない。本明細書中で引用されているいくつかのドキュメントは、“参照によって組み込まれる（incorporated by reference）”ものとして特徴づけられている。こうした組み込まれた参照の定義又は教示と、この明細書中で説明されている定義又は教示の間で矛盾が存在した場合には、この明細書のテキストが優先される。

10

【0052】

配列：本明細書中で言及している配列はすべて、全内容及び開示と共に、添付の配列表に開示されており、該配列表は本明細書の一部である。

【0053】

用語“約（about）”は、数値と関連して使用される際には、表示されている数値と比較して5%小さい下限を有し、そして表示されている数値と比較して5%大きい上限を有する範囲内の数値を包含することを意図している。

【0054】

本明細書中で使用される際には、用語“アルファ2インテグリン（alpha 2 integrin）”又は“a2インテグリン（a2 integrin）”とは、当技術分野において知られているアルファ2インテグリン、好ましくはヒトアルファ2インテグリン、特に、配列番号21で示される核酸配列、及び配列番号20のアミノ酸配列を有するヒトアルファ2インテグリン、又はその生物学的に活性なフラグメントを意味する。用語“I-ドメイン（I domain）”とは、アルファ2インテグリンの一部を意味し、これは配列番号20の中で下線が引かれており、そしてボールド体でタイプされている。

20

【0055】

用語“特異的に結合する（specifically binds）”、“特異的結合（specific binding）”などは、このペプチド又はペプチド複合体、例えば、抗体又はその抗原結合フラグメントが、生理学的条件下にて比較的安定である、抗原との複合体を形成する。特異的結合は、多くとも（at least）約 1×10^{-6} M以下（例えば、より小さい K_D はより強い結合を示す）の平衡解離定数によって特徴付けられうる。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定する方法は、当技術分野において周知であり、そして例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などを含む。しかしながら、アルファ2インテグリンに特異的に結合する単離された抗体は、他の種に起源するアルファ2インテグリン分子などの他の抗原と交差反応性を示しうる。例えば、ある種の実施態様では、本発明のアルファ2インテグリン-特異的抗体は、ヒト及び非ヒト霊長類双方のアルファ2インテグリンに非特異性抗原（例えば、非霊長類アルファ2インテグリン）に対するその親和性と比較して少なくとも2倍高い親和性で結合する。更に、アルファ2インテグリン及び1つ又はそれより多い更なる抗原に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性）については、本明細書中で使用される際には、その場合でも、アルファ2インテグリンに“特異的に結合する（specifically bind）”抗体であると見なされる。

30

40

【0056】

本明細書中で使用される際には、用語“ K_D ”は、特定のペプチド/ペプチド複合体と標的分子、又は抗体と抗原の相互作用の平衡解離定数を意味することを意図している。平衡解離定数は通例、“mol/L”（“M”と短縮）の形で測定される。

【0057】

用語“スローオフレート（slow off rate）”、“ K_{off} ”又は“kd”では、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE（商標）によって測定して、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ より小さい、好ましくは、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ より小さい速度定数でアルファ2インテグリンから解離する

50

ペプチド/ペプチド複合体又は抗体を意味する。

【0058】

用語“高親和性 (high affinity)”抗体とは、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE (商標)又は溶液親和性ELISAで測定して、少なくとも 10^{-10} M; 好ましくは、 10^{-11} M; 更により好ましくは、 10^{-12} Mのヒトアルファ2インテグリンに結合親和性を有するそうした mAb を意味する。

【0059】

本明細書中で使用される用語“表面プラズモン共鳴 (surface Plasmon resonance)”は、例えば、BIACORE (商標)システム (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.) を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度変化の検出により、リアルタイム生体特異的相互作用の解析を可能にする光学現象を意味する。

10

【0060】

抗原決定基とも呼ばれている“エピトープ (epitope)”とは、免疫システムによって、具体的には、抗体、B細胞、又はT細胞によって認識される抗原の領域を意味する。本明細書中で使用される際には、“エピトープ”は、本明細書中に述べられている抗体又はその抗原結合性フラグメントに結合することができる抗原の一部である。これに関連して、用語“結合 (binding)”は、好ましくは、本明細書中に定義されている“特異的結合 (specific binding)”に関する。エピトープは通例、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基などの分子の化学的活性表面系列から成り、特異的3次元構造特性、及び/又は特異的荷電特性を有しうる。コンフォメーションエピトープ及び非コンフォメーションエピトープは、変性溶媒の存在下において前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点において区別されうる。

20

【0061】

“パラトープ (paratope)”は、エピトープに特異的に結合する抗体の一部である。

【0062】

本明細書中で使用される際には、用語“抗体 (antibody)”とは、ジスルフィド結合によって相互に連結した4つのポリペプチド鎖、2つの重 (H) 鎖及び2つの軽 (L) 鎖から構成される免疫グロブリン分子を意味することを意図している。用語“抗体 (antibody)”はまた、下記に述べられている、抗体、具体的には、本明細書中に述べられている抗体、例えば、原核生物において発現される抗体、非グリコシル化抗体並びに任意の抗原結合性抗体フラグメント及び誘導体のすべての組み換え形態を含む。各重鎖は、重鎖可変領域 (“H C V R”又は“V H”)及び重鎖定常領域 (C H 1、C H 2及びC H 3ドメインから構成される)から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (“L C V R”又は“V L”)及び軽鎖定常領域 (C L)から構成される。このV H及びV L領域は、フレームワーク領域 (F R)と呼ばれるより保存されている領域が組み入れられている、相補性決定領域 (C D R)と呼ばれる超可変領域に更に細分されうる。各V H及びV Lは、3つのC D R及び4つのF Rから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置されている: F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫システムの種々の細胞 (例えば、エフェクター細胞)及び古典的な補体システムの最初のコンポーネント (C 1 q)を含む、免疫グロブリンの宿主組織又は因子への結合を媒介することができる。

30

40

【0063】

この発明に関しては、用語「アルファ2抗体」、「a2抗体」、「2抗体」、「アルファ2インテグリン抗体」、「a2インテグリン抗体」、「2インテグリン抗体」は、同意語として使用され、そして、好ましくは、阻害性、すなわち、抗 (アルファ2抗体、a2抗体、2抗体、アルファ2インテグリン抗体、a2インテグリン抗体、2インテグリン抗体)を意味している。

【0064】

1つ又はそれより多いC D R残基の置換又は1つ又はそれより多いC D Rの脱落もまた

50

可能である。1つ又は2つのCDRが結合のために省くことができる抗体は、科学文献に記載されている。Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139)は、公表された結晶構造に基づいて、抗体とそれらの抗原間の接触領域を解析し、CDR残基の約1/5～1/3だけが実際に抗原と接触していると結論した。Padlanはまた、1つ又は2つのCDRが、抗原と接触するアミノ酸を持たない多くの抗体を見出した(Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428も参照)。

【0065】

抗原と接触していないCDR残基は、Chothia CDR外にあるKabat CDRの領域から、分子モデリングにより及び/又は経験的に、以前の研究(例えば、CDRH2中の残基H60～H65は頻繁には必要とされない)に基づいて同定することができる。CDR又はその残基が脱落している場合、それは通例、別のヒト抗体配列又はこのような配列のコンセンサス中で相当する位置を占有するアミノ酸で置換される。CDR内の置換位置及び置換するアミノ酸はまた、経験的に選択することもできる。経験的置換は保存的置換であっても、それとも非保存的置換であってもよい。

【0066】

本明細書中で使用される際には、用語、抗体の“抗原結合性フラグメント(antigen-binding fragment)”(又は単に“結合部分(binding portion)”)とは、アルファ2インテグリンに特異的に結合する能力を保持する1つ又はそれより多い抗体のフラグメントを意味する。抗体の抗原結合性機能は、全長抗体フラグメントによって行われうることが示されている。抗体の用語“抗原結合性フラグメント(antigen-binding fragment)”内に包含される結合性フラグメントの例には、(i)VL、VH、CL及びCHドメインから成る一価のフラグメントであるFabフラグメント；(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価のフラグメントであるF(ab')₂フラグメント；(iii)VH及びCHドメインから成るFdフラグメント；(iv)抗体の単一アーム(single arm)のVL及びVHドメインから成るFvフラグメント、(v)VHドメインから成るdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)；(vi)単離された相補性決定領域(CDR)、並びに(vii)場合により合成リンカーによって連結されていることもありうる2つ又はそれより多い単離されたCDRの組み合わせが含まれる。更に、Fvフラグメントの2つのドメイン、VL及びVHは別個の遺伝子によりコードされているが、それらは組み換え方法を使用して、合成リンカーにより連結することができ、該合成リンカーによって、VL及びVH領域がペアとなって一価分子を形成する1つのタンパク質鎖(単鎖Fv(scFv))と呼ばれている；例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426；及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883参照)としてそれらが作製されることが可能となる。こうした単鎖抗体もまた、抗体の用語“抗原結合性フラグメント(antigen-binding fragment)”内に包含されていることが意図されている。更なる例は、(i)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合された結合ドメインポリペプチド、(ii)ヒンジ領域に融合された免疫グロブリンの重鎖CH2定常領域、及び(iii)CH2定常領域に融合された免疫グロブリンの重鎖CH3定常領域を含んでなる結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である。結合ドメインポリペプチドは、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域でありうる。結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、更にUS 2003/0118592及びUS 2003/0133939中に開示されている。こうした抗体フラグメントは、当技術分野における当業者に知られている従来から行われている手法を用いて得られ、そしてフラグメントがインタクト抗体であるのと同様の方法で、有用性の有無がスクリーニングされる。“抗原結合性フラグメント(antigen-binding fragment)”の更なる例には、いわゆるマイクロ抗体があり、該マイクロ抗体は、1つのCDR(single CDR)から誘導される。例えば、Heapらは、HIV-1のgp120エンベロプグリコプロテインを対象とする抗体の重鎖CDR3から誘導される17アミノ酸残基マイクロ抗体を記載している(Heap CJ et al. (2005) J. Gen. Virol. 86:1791-1800)。他の例には、好ましくは、同属フレームワーク領域(cognate framework regions)

10

20

30

40

50

によって、互いに融合した2つ又はそれより多いCDR領域を含んでなる小分子擬似抗体が含まれる。同属VHFR2によって連結されたVHCDR1及びVLCDR3を含んでなる、こうした小分子擬似抗体は、によって記載されているQiu et al. (Qiu X-Q, et al. (2007) Nature biotechnology 25(8):921-929)。

【0067】

従って、本明細書中で使用される際には、用語“抗体又はその抗原結合性フラグメント (antibody or antigen-binding fragment thereof)”とは、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を意味する。

【0068】

本発明において使用できる抗体及びその抗原結合性フラグメントは、鳥類及び哺乳類を含む任意の動物に起源しうる。好ましくは、抗体又はフラグメントは、ヒト、チンパンジー、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、モルモット、又はウサギ）、ニワトリ、七面鳥、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ウシ、ウマ、ロバ、ネコ、又はイヌ起源である。抗体は、ヒト又はマウス起源のものであることが特に好ましい。本発明の抗体はまた、1つの種、好ましくは、ヒト由来の抗体定常領域が、別の種、例えば、マウス由来である抗原結合部位と組み合わされるキメラ分子を含む。更に、本発明の抗体は、非ヒト種（例えば、マウスから）由来の抗体の抗原結合部位がヒト起源の定常及びフレームワーク領域と組み合わされるヒト化分子を含む。

【0069】

本明細書中で例示されているように、本発明の抗体は、抗体を発現するハイブリドーマから直接得ることができ、あるいは宿主細胞（例えば、CHO細胞、又はリンパ球細胞）中にクローニングし、そして組み換え技術によって発現させることができる。宿主細胞の更なる例には、大腸菌 (E.coli) などの微生物、及び酵母などの真菌がある。あるいは、それらはトランスジェニック非ヒト動物又は植物で組み換え技術によって作製することができる。

【0070】

用語“キメラ抗体 (chimeric antibody)”とは、重鎖及び軽鎖のそれぞれのアミノ酸配列の一部が、特定の種に由来するか、又は特定のクラスに属する抗体の対応する配列と相同であるが、残りのセグメントの鎖は別の種又は部類における対応する配列と相同である、そうした抗体を意味する。通例、軽鎖及び重鎖双方の可変領域は、哺乳類の1種に由来する抗体の可変領域を模倣するが、定常部分は別のものに由来する抗体の配列と相同である。こうしたキメラ型の1つの明白な利点は、この可変領域が非ヒト宿主生物からの容易に利用可能なB細胞又はハイブリドーマを、例えば、ヒト細胞の調製物から誘導される定常領域と組み合わせて用い、現在知られている源から好都合にも誘導することができるということである。この可変可変領域は、調製が容易であるという利点を有しており、そしてその特異性はその源に影響を受けず、この定常領域がヒトであるということは、この抗体を注入されたときに、非ヒト源からの定常領域と比較してヒト対象からの免疫応答を引き出す可能性が高くない。しかしながら、定義ではこうした特定の例には限定されない。

【0071】

用語“ヒト化 (ヒト型化) 抗体 (humanized antibody)”は、非ヒト種からの免疫グロブリンから実質的に誘導される抗原結合部位を有する分子であって、この分子の残りの免疫グロブリン構造は、ヒト免疫グロブリン構造の及び/又は配列に基づいている分子を意味する。この抗原結合部位は、定常ドメインに融合した完全可変ドメインを含む場合もあり、あるいはその可変ドメイン内の適切なフレームワーク領域にグラフィングされた相補性決定領域 (CDR) のみを含む場合もある。抗原結合部位は、野生型である場合もあり、または1つ又はそれより多いアミノ酸置換によって修飾されている、例えば、ヒト免疫グロブリンに更によりそっくり類似するように修飾されている場合もある。ヒト化抗体の一部の形態は、CDR配列をすべて保存する（例えば、マウス抗体に起源する6つCD

10

20

30

40

50

Rすべてを含むヒト化マウス抗体)。他の形態は、オリジナル抗体に対して変更されている1つ又はそれより多いCDRを有する。

【0072】

ヒト化抗体の場合の種々の方法は当業者に知られており、Almagro及びFranssonによってレビューされており、その内容は、全体として引用によって本明細書中に組み込まれる(Almagro JC and Fransson J (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633)。Almagro及びFranssonは、合理的なアプローチと経験的アプローチを区別している。合理的なアプローチは、操作設計抗体のわずかな変異体(variants)を作製し、そしてそれらの結合、又は他の関心のある特性を評価することによって特徴づけられる。設計された変異体が予測結果を生みださない場合には、新たな設計サイクル及び結合評価が開始される。合理的なアプローチには、CDRグラフィティング、再表面化(Resurfacing)、超ヒト化(Superhumanization)、及びヒトストリング内容最適化(Human String Content Optimization)が含まれる。それに引き換え、経験的アプローチは、ヒト化変異体の大規模ライブラリーの作成、及び豊富なテクノロジー又はハイスループットスクリーニングを用いる最も良いクローンの選択に基づいている。従って、経験的アプローチは、抗体変異体の広いスペース全体をサーチすることができる信頼できる選択及び/又はスクリーニングシステムに依存している。ファージディスプレイ及びリボソームディスプレイなどのインビトロディスプレイテクノロジーによって、こうした要件が実現され、当業者に周知である。経験的アプローチには、FRライブラリー、セレクションガイド(Guided selection)、フレームワークシャuffling(Framework-shuffling)及びヒューマニアリング(Humanizing)が含まれる。

10

20

【0073】

本明細書中で使用される際には、用語“ヒト抗体(human antibody)”は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことを意図している。本発明のヒトmAbは、例えば、CDR、特にCDR3において、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含むことができる(例えばインビトロでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発またはインビボでの体細胞変異によって誘導される変異体)。しかしながら、本明細書中で使用される際には、用語“ヒト抗体(human antibody)”は、別の哺乳類種(例えば、マウス)の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトFR配列にグラフィティングされたmAbを含むことは意図していない。本発明のヒト抗体は、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、又は例えば、Kucherlapati及びJakobovitsによる米国特許第5,939,598号中に記載されているような、内因性免疫グロブリンを発現しないが、1つ又はそれより多いヒト免疫グロブリンを産生するトランスジェニック動物から単離された抗体を含む。

30

【0074】

本明細書中で使用される際には、用語“モノクローナル抗体(monoclonal antibody)”とは、単一の分子構成物の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。一実施態様では、このモノクローナル抗体は、非ヒト動物、例えば、マウスから得られる、不死化細胞と融合したB細胞を含むハイブリドーマによって作製される。

40

【0075】

本明細書中で使用される際には、用語“組み換え抗体(recombinant antibody)”とは、組み換え手段によって調製され、発現され、作製され又は単離されるすべての抗体、例えば(a)免疫グロブリン遺伝子におけるトランスジェニック動物またはトランスクロモソーマル(transchromosomal)動物(例えばマウス)あるいはそれから調製されるハイブリドーマから単離される抗体、(b)形質転換されることで抗体を発現する宿主細胞、例えばトランスフェクトマ(transfectoma)から単離される抗体、(c)組換えられたコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体、及び(d)免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む他の任意の手段により調製、発現、作製または単離される抗体を含む。

50

【 0 0 7 6 】

本明細書中で使用される際には、用語 “トランスフェクトーマ (transfectoma)” は、CHO細胞、NS/O細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、植物細胞、又は酵母細胞を含む真菌などの抗体を発現する組換え真核生物宿主細胞を含む。

【 0 0 7 7 】

本明細書中で使用される際には、“異種抗体 (heterologous antibody)” は、こうした抗体を産生するトランスジェニック生物に関して定義される。この用語は、トランスジェニック生物から構成されない生物において見出されるものに相当するアミノ酸配列又はコード核酸配列を有し、一般にそのトランスジェニック生物以外の種に由来する抗体を意味する。

10

【 0 0 7 8 】

本明細書中で使用される際には、“ヘテロハイブリッド抗体 (heterohybrid antibody)” は、異なる生物起源の軽鎖と重鎖を有する抗体を意味する。例えば、マウス軽鎖と結合したヒト重鎖を有する抗体はヘテロハイブリッド抗体である。

【 0 0 7 9 】

従って、この発明において使用するのに適切な “抗体及びその抗原結合性フラグメント (antibodies and antigen-binding fragments thereof)” には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一価抗体、二特異性抗体、ヘテロコンジュゲート (heteroconjugate) 抗体、多特異性抗体、組み換え抗体、異種抗体、ヘテロハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体 (特に、CDRグラフティング)、脱免疫化 (deimmunized) 抗体又はヒト抗体、Fabフラグメント、Fab' フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーによって作製されるフラグメント、Fd、Fv、ジスルフィドにより連結されたFvs (dsFv)、一本鎖抗体 (例えば、scFv)、ダイアボディ (diabodies) 又はテトラボディ (tetrabodies) (Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(14), 6444-6448)、ナノボディ (nanobodies) (単ドメイン抗体とも呼ばれている)、抗イデオタイプ (抗Id) 抗体 (例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、及び上記のもののいずれかのエピトープ結合フラグメントが含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 8 0 】

本明細書中に述べられている抗体は、好ましくは単離されている。本明細書中で使用される際には、“単離された抗体 (isolated antibody)” は、種々の抗原特異性を有する他のmAbを実質的に含まない抗体を意味することを意図している (例えば、アルファ2インテグリンに特異的に結合する単離された抗体は、アルファインテグリン以外の抗原に特異的に結合するmAbを実質的に含まない)。しかしながら、アルファ2インテグリンに特異的に結合する単離された抗体は、他の種に起源するアルファ2インテグリン分子のような他の抗原と交差反応を有する場合もありうる。

30

【 0 0 8 1 】

本明細書中で使用される際には、用語 “アルファ2インテグリンの生物学的機能又は機能 (biological function or function of alpha 2 integrin)” は、同意語として使用され、そして以下のようなアルファ2インテグリンのいずれかの機能を意味するが、それらに限定されない：ベータ1インテグリンとの結合及びベータ1インテグリンと複合体の形成、コラーゲン、ラミニンとの結合のような知られているリガンドのいずれかとの結合、コラーゲン誘導性血小板凝集、血栓応答の惹起、血小板減少、コラーゲン上の細胞移動 (cell migration on collagen)、コラーゲン繊維の細胞依存性再組織化 (cell-dependent reorganization of collagen fibers)、サイトカイン発現及び増殖の増加をもたらすコラーゲン依存性細胞応答 (collagen-dependent cellular responses resulting in increases in cytokine expression and proliferation)、T細胞のアルファ2インテグリン又はコラーゲン依存性側面、マスト細胞又は好中球機能、遅延型過敏症のアルファ2インテグリン又はコラーゲン依存性側面 (collagen-dependent aspects of delayed type hypersensitivity)、接触過敏症のアルファ2インテグリン又はコラーゲン依存性側面 (col

40

50

lagen-dependent aspects of contact hypersensitivity)、コラーゲン誘導性関節炎、乳腺腺管形態形成 (mammary gland ductal morphogenesis)、表皮性創傷治癒、及び VEGF 誘導性血管新生に関連するプロセス。

【0082】

本明細書中で使用される際には、“アルファ2インテグリンアンタゴニスト (alpha 2 integrin antagonist)”とは、アルファ2インテグリンの少なくとも1つの生物学的活性、好ましくは、血液血小板、血管内皮細胞、上皮細胞、活性化単球/マクロファージ、線維芽細胞、白血球、リンパ球、活性化好中球及び/又はマスト細胞 (特に化学量論量で使用される際)上に存在するアルファ2インテグリンの活性を阻害する化合物を意味する。この発明の好ましいアルファ2アンタゴニストは、中和抗体である。

10

【0083】

本明細書中で使用される際には、“中和抗体 (neutralizing antibody)” (又は“アルファ2インテグリン活性を中和する抗体 (antibody that neutralizes alpha 2 integrin activity)”)は、そのアルファ2インテグリンへの結合が、アルファ2インテグリンの少なくとも1つの生物学的活性の阻害をもたらす、好ましくは、アルファ2インテグリンの血小板を活性化する活性を阻害する、抗体を意味することを意図している。アルファ2インテグリンの生物学的活性のこの阻害は、当技術分野において知られているいくつかの標準的なインビトロ又はインビボアッセイのうちの1つ又は複数により、アルファ2インテグリン生物学的活性の1つ又はそれより多いインジケータを測定することによって評価することができる。こうしたアッセイの例は、例えば、この発明の実施例に記載されている。

20

【0084】

アルファ2インテグリンは、上記に列挙したような機能を有しているので、アルファ2インテグリンの活性は、血小板活性の増加に関連するようないくつかの疾患に作用を有する。従って、アルファ2インテグリンを標的とし、又は抗アルファ2インテグリン抗体を中和する阻害性ペプチド又はペプチド複合体、又はその抗原結合性フラグメントなどのアルファ2インテグリンアンタゴニストは、血小板活性などのアルファ2インテグリンの作用を減少させ、又は阻害するのに有用である。それ故、アルファ2インテグリンアンタゴニストは、血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含む癌、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植に対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性硬化症、レイノー症候群、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、及び炎症反応を誘発する感染症を含む (これらには限定されない)、いくつかのそうした疾患を軽減し、改善し、抑制し、又は予防するために有用である。

30

【0085】

特定の実施態様では、本明細書中で述べられている抗アルファ2インテグリン抗体又はその抗原結合性フラグメントは、サイトトキシン、化学療法剤、免疫抑制剤又は放射性同位体などの治療モイエティ (“イムノコンジュゲート (immunoconjugate)”)にコンジュゲートすることができる。

40

【0086】

“保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)”とは、アミノ酸残基が類似の化学特性 (例えば、電荷又は疎水性)を持つ側鎖 (R基)を有する別のアミノ酸残基によって置換されることである。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。2つ又はそれより多いアミノ酸配列が互いに保存的置換によって異なる場合には、類似性のパーセント又は程度は、置換の保存的性質を修正するために上方調整されうる。この調整手段は、当技術分野の当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307- 331を参照されたい。類似の化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸のグループの例には、以下が含まれる：

1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン；

50

- 2) 脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン；
- 3) アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン；
- 4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；
- 5) 塩基性側鎖：リシン、アルギニン、及びヒスチジン；
- 6) 酸性側鎖：アスパルギン酸（アスパルテート：aspartate）及びグルタミン酸（グルタメート：glutamate）、及び
- 7) 硫黄含有側鎖：システイン及びメチオニン。

【0087】

好ましい保存的アミノ酸置換基は以下である：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（グルタメート：glutamate） - アスパルギン酸（アスパルテート：aspartate）、及びアスパラギン - グルタミン。あるいは保存的置換（conservative replacement）は、Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45中に開示されているP A M 2 5 0対数尤度行列において正の値を有する任意の変化である。“中等度に保存的（moderately conservative）”置換は、P A M 2 5 0対数尤度行列において負でない値を有する任意の変化である。知られている遺伝コード、及び組み換え及び合成DNA手法を考慮すると、熟練した科学者であれば、容易に保存的なアミノ酸変異体をコードするDNAを構築することができる。

10

【0088】

本明細書中で使用される際には、“非保存的置換（non-conservative substitutions）”又は“非保存的アミノ酸交換（non-conservative amino acid exchanges）”は、上記に示した7つの標準的アミノ酸グループ、1) ~ 7)の異なるグループ中に列挙されている別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。

20

【0089】

核酸又はそのフラグメントに言及する際に、用語“実質的同一性（substantial identity）”又は“実質的に同一な（substantially identical）”とは、適切なヌクレオチドの挿入又は欠失を別の核酸（又はその相補鎖）と最適にアライメントするとき、下記に議論されているように、FASTA、BLAST又はGAPなどの配列同一性の周知のアルゴリズムによって測定して、ヌクレオチド塩基の少なくとも約90%、そしてより好ましくは、少なくとも約95%、96%、97%、98%又は99%のヌクレオチド配列同一性があることを示す。

30

【0090】

ポリペプチドに適用される際には、用語“実質的類似性（substantial similarity）”又は“実質的に類似な（substantially similar）”とは、例えば、デフォルトギャップウェイト（default gap weights）を用いてプログラムGAP又はBESTFITによって最適にアライメントされるとき、2つのペプチド配列は、少なくとも90%の配列同一性、更により好ましくは、少なくとも95%、98%又は99%の配列同一性を分かち合う。好ましくは、同一ではない残基部分は、保存的アミノ酸置換によって異なる。

【0091】

ポリペプチドの場合の配列類似性は通例、配列解析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む、種々の置換、欠失及び他の改変に割り当てられた類似性の基準を用いて類似配列をマッチングさせる。例えば、GCGソフトウェアは、密接に関連するポリペプチド、例えば、異なる生物種に起源するか、あるいは野生型タンパク質とそのミュテイン（mutein）の間の相同ポリペプチドの間の配列相同性又は配列同一性を決定するためにデフォルトパラメーターを用いて使用しうるGAP及びBESTFITなどのプログラムを含む。例えば、GCG Version 6.1を参照。ポリペプチド配列はまた、FASTAを用いてデフォルト又は推奨されるパラメーターと比較することができる；GCG Version 6.1.FASTAのプログラム（例えば、FASTA 2及びFASTA 3）によって、クエリー（query）及びサーチ配列（Pearson (2000) 前掲）間のベストオーバーラップ（best overlap）領域のアライメント（alignment）及び配列同一性パーセントが可能となる。本発明の配列を異なる生物に起源する多くの数の

40

50

配列を含むデータベースと比較する際に、別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメーターを用いるコンピュータプログラム B L A S T、特に B L A S T P 又は T B L A S T N である。例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410 及び (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402 参照。これら双方は引用によって本明細書中に組み込まれる。

【0092】

配列同一性のパーセンテージがこの出願中で言及されているときには、こうしたパーセンテージは、別途具体的に指示されない限り、より長い配列の全長に関して算出される。より長い配列の全長に関するこうした算出は、核酸配列及びポリペプチド配列の双方に適用される。

【0093】

本明細書中で使用される際には、疾患又は障害を(の)“処置する(treat)”、“処置すること(treating)”又は“処置(treatment)”とは、下記の1つ又は複数を作成することを意味する：(a)該障害の重症度及び/又は期間を減少させること、(b)処置される該障害(複数を含む)に特徴的な症状の発症を制限又は予防すること、(c)処置される該障害(複数を含む)に特徴的な症状の悪化を阻止すること、(d)該障害(複数を含む)を過去に有していた患者における該障害(複数を含む)の再発を制限又は予防すること、及び(e)過去に該障害(複数を含む)の症状を示した患者における症状の再発を制限又は予防すること。

【0094】

本明細書中で使用される際には、疾患又は障害を(の)“予防する(prevent)”、“予防すること(preventing)”、“予防(prevention)”、又は“予防(prophylaxis)”とは、障害が対象で発症することを予防することを意味する。

【0095】

本明細書中で使用される際には、表現“投与する(is for administration)”及び“投与する(is to be administered)”とは、“投与する準備ができている(is prepared to be administered)”と同じ意味を有する。換言すれば、活性な化合物を“投与する(is for administration)”という記述は、前記の活性化化合物を製剤化し、そして前記活性化化合物が、その治療活性を発揮することができるような投与量に作り上げられているというように理解されなければならない。

【0096】

用語“治療的に有効な量(therapeutically effective amount)”又は“治療量(therapeutic amount)”は、研究者、獣医、医師、又は他の臨床家によって求められている、組織、システム、動物又はヒトの生物学的又は医学的応答を引き出す薬物又は医薬の量を意味することを意図している。用語“予防的に有効な量(prophylactically effective amount)”は、研究者、獣医、医師、又は他の臨床家によって求められている、組織、システム、動物又はヒトにおいて予防しようとする生物学的又は医学的事象の発生のリスクを予防し、又は減少させる医薬の量を意味することを意図している。特に、患者が受ける投与量は、好ましくは、血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含む癌、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植に対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、レイノー症候群、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、及び炎症反応を誘発する感染症から成る群より選択される、 $\alpha 2$ インテグリン関連疾患又は障害の予防的又は治療的治療(予防、改善又は治療)を可能にするために、アルファ2インテグリン作用の阻害を示すのに十分なペプチド又はペプチド複合体の量を選択することができる。

【0097】

本明細書中で使用される際には、“患者(patient)”とは、本明細書中に述べられている抗体及びその抗原結合性フラグメントでの処置から利益を得る任意の哺乳動物又は鳥を意味する。好ましくは、“患者(patient)”は、実験動物(例えば、マウス又はラッ

10

20

30

40

50

ト)、家畜動物(例えば、モルモット、ウサギ、ニワトリ、七面鳥、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ウシ、ウマ、ロバ、ネコ又はイヌを含む)、又はチンパンジー、及びヒトを含む霊長類から成る群から選択される。“患者(patient)”はヒトであることが特に好ましい。

【0098】

“製薬学的に許容可能な(Pharmaceutically acceptable)”とは、連邦政府若しくは州政府の監督機関により承認されていること、あるいは米国薬局方(United States Pharmacopeia-33/National Formulary-28 Reissue, published by the United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville Md., publication date: April 2010)、又は動物における、より具体的にはヒトにおける使用のための他の一般的に認められた薬局方にリストされていることを意味する。

10

【0099】

本発明の治療方法によって処置可能な具体的な対象集団には、アルファ2インテグリン活性化変異(機能獲得型変異(gain of function mutations)、“GOF”)の治療に適応される対象、好ましくは、血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含む癌、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植に対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、レイノー症候群、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、及び炎症反応を誘発する感染症から成る群より選択される、2インテグリン関連疾患又は障害に罹患している対象が含まれる。

20

【0100】

本発明の実施態様

次にこの発明を更に述べることになる。下記の部分では、本発明の種々の局面をより詳細に明らかにする。こうして明らかにしたそれぞれの局面は、明らかにそうではないという指示がない限り、任意の他の局面又は他の複数の局面と組み合わせることができる。具体的には、好ましい、あるいは有利であると指摘されたどんな特性も、明らかにそうではないという指示がない限り、好ましい、あるいは有利であると指摘された任意の他の特性又は他の複数の特性と組み合わせることができる。

【0101】

従って、この発明の第一の局面は、ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記ペプチド又はペプチド複合体、抗体又はフラグメントは、ヒト2インテグリンのI-ドメインに特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントは、重鎖可変領域(VH)ドメイン及び軽鎖可変領域(VL)ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、非ヒト霊長類2インテグリンと交差反応するが、非霊長類2インテグリンとは交差反応しない、前記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。

30

【0102】

この発明の第二の局面は、ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記ペプチド又はペプチド複合体、抗体又はフラグメントは、ヒト2インテグリンのI-ドメインに特異的に結合し、前記抗体は、重鎖可変領域(VH)ドメイン及び軽鎖可変領域(VL)ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、参照抗体のエピトープとの結合について参照抗体と競合し、前記参照抗体は、アクセッション番号DSM23944にてDSMZに寄託されているプラスミドによってコードされる軽鎖、及び(i)アクセッション番号DSM23946にてDSMZに寄託されているプラスミド、又は(ii)アクセッション番号DSM23945にてDSMZに寄託されているプラスミドのいずれかによってコードされている重鎖を含んでなる、前記ペプチド又はペプチド複合体、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。

40

50

【0103】

第三の局面では、この発明は、ペプチド又はペプチド複合体が、1つ又はそれより多い下記のコンポーネント a) ~ f) :

a) L C D R 1 [ここで、L C D R 1 は、R A S E S V E S Y G N S F I Y (配列番号 6) 又はその機能的に活性化変異体である]、

b) L C D R 2 [ここで、L C D R 2 は、L A S N L A S (配列番号 7) 又はその機能的に活性化変異体である]、

c) L C D R 3 [ここで、L C D R 3 は、Q Q N N E D P Y T (配列番号 8) 又はその機能的に活性化変異体である]、

d) H C D R 1 [ここで、H C D R 1 は、G Y T F T S Y W M N (配列番号 3) 又はその機能的に活性化変異体である]、

e) H C D R 2 [ここで、H C D R 2 は、R I D P S D S E T H Y N Q K F K (配列番号 4) 又はその機能的に活性化変異体である]、及び

f) H C D R 3 [ここで、H C D R 3 は、V G R G Y F D Y (配列番号 5) 又はその機能的に活性化変異体である]

を含んでなるペプチド又はペプチド複合体であって、

そして上記において、1つ又はそれより多いコンポーネント a) ~ f) は、ペプチド又はペプチド複合体の 2 インテグリン又はヘテロダイマー 2 1 インテグリンへの結合を可能にするように配置されている、前記ペプチド又はペプチド複合体に関する。

【0104】

第四の局面では、この発明は、2 インテグリン関連障害若しくは疾患の処置、予防又は診断に使用するための上記ペプチド又はペプチド複合体に関する。

【0105】

配列番号 6 ~ 8 の配列は、解析された抗体の軽鎖の C D R であり、そして配列番号 3 ~ 5 の配列は、解析された抗体の重鎖の C D R である (これはシーケンス解析によって決定された)。この発明のもとでは、このペプチド又はペプチド複合体は、上記の軽鎖 C D R のうちの 1 つ又はその機能的に活性化変異体及び / 又は重鎖 C D R のうちの 1 つ又はその機能的に活性化変異体を含んでなる。例としては、上記の H C D R のうちの 1 つ又は 2 つ又は 3 つ及び / 又は上記の L C D R のうちの 1 つ又は 2 つ又は 3 つを、考えられる任意の組み合わせで含んでなるペプチド又はペプチド複合体が挙げられる。この発明の一実施態様は、3 つの L C D R 及び 3 つの H C D R を含んでなるペプチド又はペプチド複合体であり、上記において、それらのうち少なくとも 1 つは、上記の a) ~ f) の C D R の 1 つである。

【0106】

この発明の文脈では、用語「L C D R」及び「L D R」は、同意語として用いられる。同じことが、用語「H C D R」及び「H D R」にも適用される。

【0107】

上記 C D R が適切な方法で配置されている場合には、この配置により、2 インテグリンへの特異的な結合が可能となる。抗原の結合を可能にする C D R の適切な配置は、当技術分野において知られている。種々の異なった抗体フォーマット又は結合パラメータのフォーマットが開発されており、あるいはこれまで特定されてきた。こうした適切な配置、又は他の適切な配置は、このフォーマット又は配置が 2 インテグリンとの特異的な結合を可能にする限り、いずれもこの発明のポリペプチド又はポリペプチド複合体の場合に使用することができる。

【0108】

上記の複数の配列番号によって定義されている C D R 配列、又はその変異体は、1 つの (ポリ) ペプチド鎖又はポリペプチド又はペプチド複合体中に配置することができる。それらが 1 つの (ポリ) ペプチド鎖中に配置される場合には、配列は、例えば、融合タンパク質のように、1 つ又はそれより多いリンカー配列、好ましくは、ペプチドリンカーによって接続することができる。一実施態様によれば、当技術分野において知られているよう

10

20

30

40

50

に、それらは自然的又は人工的な抗体スカフォールド又はフレームワークに組み込まれることができる。自然的抗体の場合には、CDRは、可変ドメイン内に保存的フレームワーク領域によって支えられている。このフレームワークは、下記でより詳細に述べられる、例えば、Fab、1本鎖抗体などのように、人工抗体を得るために改変することができる。

【0109】

CDRが、ペプチド複合体中に配置されている場合には、2つ又はそれより多い(ポリ)ペプチドは、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、及び疎水性相互作用を含む、非共有結合によって互いに結合する。

【0110】

ペプチドは、直線鎖中に配置された2つ又はそれより多い - アミノ酸で作製される有機化合物である。このアミノ酸は、隣接するアミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基の間でのペプチド結合によって互いに結合する。一般的に、遺伝子コードによって、20種の標準アミノ酸が指定されている。合成の後又は間でも、タンパク質中の残基は、翻訳後修飾によって化学的に修飾することができ、それによって物理的及び化学的特性、折り畳み型構造、安定性、活性、そして最終的にはタンパク質の機能が変化する。この発明の種々の局面に応じてペプチドは、それらが 2 インテグリンに結合することができる限り、修飾されていてもよいし、それとも修飾されていなくてもよい。

【0111】

当技術分野では、用語“ポリペプチド (polypeptide)”とは、ポリペプチド鎖を形成するように直線状態にペプチド結合によって互いに結合した、約20、約25、約30又はそれより多いアミノ酸を含んでなる分子を意味する。少なくとも2個のアミノ酸を含むこの種のより短い分子は一般的に、ペプチドと呼ばれている。用語“タンパク質 (protein)”とは通例、1つ又はそれより多いポリペプチド鎖を含む分子を意味する。この発明の文脈では、用語「ペプチド (peptide)」、「ポリペプチド (polypeptide)」及び「タンパク質 (protein)」は、同意語として使用される。

【0112】

この発明の文脈では、この発明の種々の局面に応じて、用語“ペプチド (peptide)”又は“ポリペプチド (polypeptide)”は、上記に定義されているペプチド又はポリペプチドを意味し、そして用語“ペプチド複合体 (peptide complex)”とは、上記に定義されている1つ又はそれより多いペプチド及び/又はポリペプチド(例えば、本発明の抗体、抗原結合性フラグメント及び他の結合分子)を含む分子複合体を意味する。

【0113】

本明細書中に定義されているようなペプチド及びそのペプチド複合体は、2 インテグリン抗原を選択的に認識し、そして2 インテグリン抗原に特異的に結合する。この発明の文脈では、用語“2 インテグリンとの特異的結合 (specific binding to 2 integrin)”とは、本発明によってペプチド又はペプチド複合体が、2 インテグリンに、又は2 インテグリンE - ドメインに、又は任意の他のポリペプチドとの複合体(例えば、別のインテグリンサブユニットとのヘテロダイマー複合体、例えば、2 1 インテグリン複合体)中の2 インテグリンに特異的に結合することができることを意味する。好ましい実施態様では、この発明のペプチド又はペプチド複合体は、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントを含んでなるか、あるいは単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントから成るか、あるいは単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントである。

【0114】

本明細書中における用語“選択的 (selective)”又は“特異的 (specific)”の使用は、本発明によるペプチド又はペプチド複合体の結合特性を述べるために使用されるときには、開示されたペプチド又はペプチド複合体が、ペプチド/複合体が2 インテグリン特異的結合部分に更なる、異なる特異性を付与するように補完されている(例えば、分子が、2つの機能(そのうちの少なくとも1つは、2 インテグリンに特異的に結合するこ

10

20

30

40

50

とである)を結びつけ、又は生じさせるように設計されている二特異性(bispecific)若しくは二機能性分子の場合であるような)そうした特定の例の場合を除いて、 $\alpha 2$ インテグリン以外とは顕著な結合を示さない事実を意味する。特定の実施態様では、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト $\alpha 2$ インテグリンに多くとも 1.2×10^{-6} (at least 1.2×10^{-6})の K_D で結合する。特定の実施態様では、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、 $5 \times 1 / 10^7$ 以上(5×10^{-7} or more)、 $2 \times 1 / 10^7$ 以上(2×10^{-7} or more)、又は $1 \times 1 / 10^7$ 以上(1×10^{-7} or more)の K_D でヒト $\alpha 2$ インテグリンに結合する。更なる実施態様では、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト $\alpha 2$ インテグリンに $1 \times 1 / 10^8$ 以上(1×10^{-8} or more)の K_D で結合する。他の実施態様では、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト $\alpha 2$ インテグリンに $5 \times 1 / 10^9$ (1×10^{-9} or more)以上又は $1 \times 1 / 10^9$ 以上(1×10^{-9} or more)の K_D で結合する。更なる実施態様では、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト $\alpha 2$ インテグリンに $2 \times 1 / 10^{10}$ 以上(2×10^{-10} or more)の K_D で結合する。特定の実施態様では、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、上記の K_D では他のタンパク質に結合しない。他の実施態様では、この $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、非特異的抗原に対するその親和性と比較して少なくとも2倍の親和性で $\alpha 2$ インテグリン(例えば、ヒト及び/又は非ヒト霊長類 $\alpha 2$ インテグリン)に結合する。

【0115】

K_D は、 k_d (特定の結合する分子-標的タンパク質相互作用の解離速度; k_{off} とも呼ばれる)の k_a (特定の結合する分子-標的タンパク質相互作用の結合速度; k_{on} とも呼ばれる)に対する比率(すなわち、 k_d / k_a は、モル濃度(M)として表現される)から得られる解離定数に関する。 K_D 値は、当技術分野において十分確立した方法を用いて決定することができる。結合分子の K_D を決定する好ましい方法は、実施例1D中に記載されている。

【0116】

$\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、用量依存的に $\alpha 2$ インテグリン/リガンド相互作用を阻害することが判明されている(図2及び実施例参照)。従って、 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、コラーゲンの $\alpha 2$ インテグリンへの結合を弱めるそれらの能力によって特徴付けることができる。 $\alpha 2$ インテグリン特異的ペプチド又はその複合体のいずれかによる阻害の程度は、対照と統計的に比較して定量的に測定することができ、あるいは当技術分野において利用可能な任意の代替方法によって定量的に測定することができる。特定の実施態様では、この阻害は、約10%以上の阻害である。他の実施態様では、この阻害は、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、あるいは95%以上である。

【0117】

このペプチド又はペプチド複合体はまた、上記配列の機能的に活性な変異体を含むことができる。本発明のペプチド又はペプチド複合体の機能的に活性な変異体は、 $\alpha 2$ インテグリンに結合する能力、そして場合により $\alpha 2$ インテグリンを阻害する能力を含めて、完全ペプチド(complete peptide)によって示されるものと同様な生物活性を有することによって特徴付けられる。この発明の文脈ではこの変異体は、変異体の活性(例えば、結合活性、場合により K_D として表現される)が、配列の変更のないペプチド/複合体の活性の10%以上、25%以上、50%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、あるいは99%以上に達する場合に、機能的に活性である。 $\alpha 2$ インテグリンへの結合活性を決定する適切な方法は、実施例中に記載されている。機能的に活性な変異体は、限定された数のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入によって得ることができる。

【0118】

この発明の好ましい実施態様では、本発明のペプチド又はペプチド複合体は、1つ又はそれより多い以下の特性によって更に特徴付けられる:

(i) a) ~ c)の1つ、2つ又は3つのコンポーネントが、軽鎖(VL)の可変ドメイ

10

20

30

40

50

ン中に含まれ、

(i i) d) ~ f) の 1 つ、 2 つ 又 は 3 つ の コ ン ポ ー ネ ン ト が、 重 鎖 (V H) の 可 変 ド メ イ ン 中 に 含 ま れ、

(i i i) ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 複 合 体 は 抗 体 で あり、

(i v) ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 複 合 体 は、 F a b、 F a b'、 F (a b')₂、 F v、 ジ ス ル フ ィ ド 連 結 F v、 s c F v、 (s c F v)₂、 二 特 異 性 抗 体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y)、 多 特 異 性 抗 体 (m u l t i s p e c i f i c a n t i b o d y)、 ダ イ ア ボ デ ィ、 ト リ ア ボ デ ィ、 テ ト ラ ボ デ ィ 又 は ミ ニ ボ デ ィ、 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体、 キ メ ラ 抗 体 又 は ヒ ト 化 抗 体 で あり、

(v) ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 複 合 体 は、 ヒ ト I g M 定 常 ド メ イ ン、 ヒ ト I g G 1 定 常 ド メ イ ン、 ヒ ト I g G 2 定 常 ド メ イ ン、 ヒ ト I g G 3 定 常 ド メ イ ン、 ド メ イ ン、 ヒ ト I g G 4 定 常 ド メ イ ン、 ヒ ト I g E 定 常 ド メ イ ン、 及 び ヒ ト I g A 定 常 ド メ イ ン か ら 成 る 群 よ り 選 択 さ れ る 重 鎖 免 疫 グ ロ ブ リ ン 定 常 ド メ イ ン を 含 ん で な り、

(v i) 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体 は、 配 列 番 号 3 ~ 8 の い ず れ か の ア ミ ノ 酸 配 列 の 6 0 % 以 上、 7 0 % 以 上、 8 0 % 以 上、 9 0 % 以 上、 9 5 % 以 上、 あ る い は 9 9 % 以 上 か ら 成 る、 機 能 的 に 活 性 な フ ラ グ メ ン ト で あり、

(v i i) 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体 は、 配 列 番 号 3 ~ 8 の い ず れ か の ア ミ ノ 酸 配 列 に 対 し て、 6 0 % 以 上、 7 0 % 以 上、 8 0 % 以 上、 9 0 % 以 上、 9 5 % 以 上、 あ る い は 9 9 % 以 上 の 配 列 同 一 性 を 有 す る 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体 で あり、 特 に、 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体 は、 1 つ 又 は そ れ よ り 多 い 保 存 的 ア ミ ノ 酸 置 換 に よ っ て 配 列 番 号 3 ~ 8 の い ず れ か の ア ミ ノ 酸 配 列 か ら 誘 導 さ れ、

(v i i i) ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 複 合 体 は、

- 配 列 番 号 1、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び / 又 は
 - 配 列 番 号 2、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び / 又 は
 - 配 列 番 号 9、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び / 又 は
 - 配 列 番 号 1 0、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び / 又 は
 - 配 列 番 号 1 1、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び / 又 は、
- の ア ミ ノ 酸 配 列 を 含 ん で な り、

(i x) ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 複 合 体 は、

- 配 列 番 号 9、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び
 - 配 列 番 号 1 0、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び
 - 場 合 に よ り、 5 0 個 以 下 の 付 加 ア ミ ノ 酸 残 基 (a d d i t i o n a l a m i n o a c i d r e s i d u e (s))、 1 ~ 4 0 個、 1 ~ 3 0 個、 1 ~ 2 5 個、 1 ~ 1 5 個、 1 ~ 1 0 個、 又 は 5 個、 4 個、 3 個、 2 個、 又 は 1 個 の 付 加 ア ミ ノ 酸 残 基
- よ り な る ア ミ ノ 酸 配 列 で 構 成 さ れ、

(x) ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 複 合 体 は、

- 配 列 番 号 9、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び
 - 配 列 番 号 1 1、 又 は そ の 機 能 的 に 活 性 な 変 異 体、 及 び
 - 場 合 に よ り、 5 0 個 以 下 の 付 加 ア ミ ノ 酸 残 基、 1 ~ 4 0 個、 1 ~ 3 0 個、 1 ~ 2 5 個、 1 ~ 1 5 個、 1 ~ 1 0 個、 又 は 5 個、 4 個、 3 個、 2 個、 又 は 1 個 の 付 加 ア ミ ノ 酸 残 基
- よ り な る ア ミ ノ 酸 配 列 で 構 成 さ れ る。

【 0 1 1 9 】

配 列 番 号 1 及 び 2 は、 図 5 か ら 得 る こ と が で き る： そ れ ぞ れ、 配 列 番 号 1 は、 2 イ ン テ グ リ ン 抗 体 可 変 軽 鎖 の ア ミ ノ 酸 配 列 で あり、 配 列 番 号 2 は、 可 変 重 鎖 の ア ミ ノ 酸 配 列 で あ る。

【 0 1 2 0 】

配 列 番 号 9、 1 0 及 び 1 1 は、 図 7 か ら 得 る こ と が で き る： 配 列 番 号 9 は、 I g G 4 フ ォ ー マ ッ ト と し て 作 製 さ れ た 抗 体 の キ メ ラ 軽 鎖 の ア ミ ノ 酸 配 列 (C D R は ア ン ダ ー ラ イ ン さ れ て い る) で あり、 配 列 番 号 1 0 は、 I g G 4 フ ォ ー マ ッ ト と し て 作 製 さ れ た 抗 体 の キ メ ラ 重 鎖 の ア ミ ノ 酸 配 列 (C D R は ア ン ダ ー ラ イ ン さ れ て い る) で あり、 そ し て 配 列 番 号 1 1 は、 6 x h i s タ グ を 加 え た F a b フ ォ ー マ ッ ト 中 の キ メ ラ 重 鎖 の ア ミ ノ 酸 配 列 で あ

10

20

30

40

50

る。定常領域は、ヒト配列バックボーン（実施例参照）に由来した。本発明はまた、his タグのない抗体コンストラクト又はフラグメント、ペプチド又はポリペプチド複合体のいずれかに関する。

【0121】

一実施態様によれば、HC及びLCの可変ドメインは、それぞれの定常領域に結合し、そしてキメラHC又はLCコンストラクトを形成する。特定実施態様は、IGKCタンパク質（例えば、配列番号9など）の定常領域と融合したキメラ 2 インテグリン抗体LC可変領域、IGHG4（例えば、配列番号10など）の定常領域と融合したキメラ 2 インテグリン抗体HC可変領域、又はIGHG1（例えば、配列番号11など）の定常領域CH1ドメインと融合したキメラ 2 インテグリン抗体HC可変領域である。

10

【0122】

上記に詳述したように、コンポーネントa)~c) (LC CDR)及びd)~f) (HC CDR)は、それぞれ、作製され、そして試験されたモノクローナル抗体の軽鎖(VL)の可変ドメイン、及び重鎖(VH)の可変ドメインをシーケンシングすることによって得られた。従って、これらは、同一のものに含まれる。これは、任意の自然的に発生するVL又はVHフレームワークであってもよいし、それとも人工的なVL又はVHフレームワークであってもよい。この発明の一実施態様では、1つ又はそれより多いCDR (LC DR 1、LC DR 2、LC DR 3、HC DR 1、HC DR 2及びHC DR 3)は、優勢可変ドメイン (prevailing variable domain)、すなわち、VLのフレームワーク中のLC DR 1、LC DR 2及びLC DR 3、並びにVHのフレームワーク中のHC DR 1、HC DR 2及びHC DR 3のフレームワーク中に配置される。このことは、上記に述べられているようないずれかの適切な方法によって (配列番号1及び2参照) 特定されるようなCDRを単独、一緒に、あるいはそれらを任意に組み合わせ、所定の近隣域 (shown neighborhood) から除去し、そして別の (第二の) 可変ドメインのフレームワークに移動させ、その結果第二の可変ドメインのCDRを置き換えることができる。種々の可変ドメイン又は抗体配列が当技術分野において知られており、この目的のために使用することができる。例えば、その中に関心対象のCDRを挿入する可変ドメインは、生殖細胞系 (germ-line) 又は再配置されたヒト可変ドメインから得ることができる。可変ドメインはまた、合成的に作製することができる。このCDR領域は、組み換えDNA技術を用いてそれぞれの可変ドメインに導入することができる。こうしたことを達成することができる

1つの手段は、Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783中に記載されている。重鎖可変ドメインは、軽鎖可変ドメインとペアリングして、抗原結合部位を提示することができる。これに加えて、独立領域 (例えば、可変重鎖ドメイン単独) は、抗原に結合するのに使用することができる。

20

30

【0123】

前のパラグラフ中で述べられているCDRグラフティングによって作製された人工的に作製された軽鎖又は重鎖と、上記に述べられている重鎖又は軽鎖キメラの組み合わせもまた、それらが 2 インテグリン結合特異性を示す限り、ありうることである。

【0124】

この発明のペプチド又はペプチド複合体は、グリコシル化することができる。タンパク質のグリコシル化及びその生理学的作用は、当技術分野において知られている。オリゴ糖コンポーネントは、物理学的安定性、プロテアーゼアタックに対する抵抗性 (resistance to protease attack)、免疫系との相互作用、薬物動態、及び特異的な生物活性を含む、治療的糖タンパク質の有効性に関連する特性に有意に (肯定的に、あるいは否定的に) 影響を及ぼしうる。グリコシル化タンパク質の発現の場合には、哺乳類宿主細胞が、当技術分野において一般的に使用されている (Cumming et al., 1991, Glycobiology 1: 115-130; Jenkins et al., 1996, Nature Biotechn. 14: 975-981)。こうした例としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、NSO-及びSP2/0-マウスミエロマ細胞が挙げられる。遺伝子導入動物に起源するグリコシル化タンパク質の作製もまた公表されている (Jenkins et al., 1996, 上記参照

40

50

)。更に、操作された組み換え宿主細胞の異種発現/過剰発現しているグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子も当技術分野において知られている (Bailey, 1991, Science 252: 1668-1675)。WO 9954342 (A1) では、改善された機能を有すると報告されている分岐型 G I c N A c を持つ N 結合型オリゴ糖 (N-linked oligosaccharides) 複合体を増加させる一連の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ活性を発現する宿主細胞を用いて、グリコシル化タンパク質の生成方法が開示されている。

【0125】

この発明の一実施態様によれば、このペプチド又はペプチド複合体は、この発明によるペプチド又はペプチド複合体と同一でない1つ又はそれより多い分子 (更なるモイエティ) に結合することができ、この複合体全体は “コンジュゲート (conjugate)” である。更なるモイエティの例は、例えば、ペプチド又はペプチド複合体、核酸 (例えば、オリゴヌクレオチド、又はRNA分子、(例えば、RNAi))、又は有機 (小) 分子、放射性モイエティのような1つ又はそれより多い更なる生体分子を含んでなる。こうした更なるモイエティは、それら自体、例えば、細胞傷害性、治療活性、免疫抑制活性などの機能を有しうるか、あるいはそれらは他の理由でコンジュゲート全体に有益でありうる (例えば、コンジュゲートの安定性の改善又は低下など)。この発明は、1つ又はそれより多い更なるモイエティにコンジュゲートされたペプチド又はペプチド複合体を含有する。このペプチド又はペプチド複合体が抗体、そのフラグメントの誘導体である場合には、このコンジュゲートは、イムノコンジュゲート (immunoconjugate) である。イムノコンジュゲートの例は、当技術分野において知られており (例えば、WO 05/103081 参照)、例えば、1つ又はそれより多い化学療法物質、プロドラッグ、サイトトキシン、放射性同位体又は放射性ヌクレオチド、免疫抑制モイエティ、治療的オリゴヌクレオチド、阻害剂的RNA (RNAi) がある。

【0126】

一実施態様によれば、このペプチド又はペプチド複合体は抗体である。自然的に発生する抗体は、免疫グロブリンとも呼ばれている、基本構造を共有する球状血漿タンパク質 (約150 kDa) である。それらはアミノ酸残基に付加された糖鎖を有しているので、それらは糖タンパク質である。それぞれの抗体の基本的な機能単位は、免疫グロブリン (Ig) モノマー (1つのIg単位のみを含む) であり; 分泌型抗体はまた、IgAの場合のように2つのIg単位を持つダイマー、硬骨魚IgMのように4つのIg単位を持つテトラマー、又は哺乳類のIgMのように5つのIg単位を持つペンタマーでありうる。この発明では、適切なフォーマットの例には、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMと呼ばれる抗体アイソタイプを含む、自然的に発生する抗体のフォーマットが含まれる。

【0127】

Igモノマーは、4つのポリペプチド鎖; システイン残基間でのジスルフィド結合によって連結されている2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖から成る “Y” 型分子である。それぞれの重鎖は、約440アミノ酸長であり; それぞれの軽鎖は、約220アミノ酸長である。重鎖及び軽鎖はそれぞれ、それらの折り畳み構造を安定化させる鎖間ジスルフィド結合を含む。それぞれの鎖は、Igドメインと呼ばれる構造ドメインから構成されている。こうしたドメインは、約70~110アミノ酸を含み、それらの大きさ及び機能に応じて異なったカテゴリーに分類される (例えば、可変部、すなわちV、及び定常部、すなわちC)。それらは、特徴的な免疫グロブリン折り畳み構造を有し、その中で2つのシートは、保存されたシステインと他の荷電されたアミノ酸の間の相互作用によって合わさって、“サンドイッチ (sandwich)” 型を形成している。

【0128】

、 、 、 及び μ で表示される5種類の哺乳類のIg重鎖がある。存在している重鎖の種類によって、抗体のアイソタイプが決められる; こうした鎖は、それぞれ、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM抗体に見出される。

【0129】

異なる重鎖は、大きさ及び組成の点で異なる; 及び は、約450アミノ酸を含み、

は、約500アミノ酸を含み、一方 μ 及び δ は、約550アミノ酸を有する。それぞれの重鎖は、2つの領域、定常領域(C_H)及び可変領域(V_H)を有する。1つの種では、この定常領域は、同じアイソタイプの抗体においてはすべて、本質的に同一であるが、異なるアイソタイプの抗体においては異なる。重鎖 γ 及び δ は、3つのタンDEM Igドメインから構成されている定常領域、そしてフレキシビリティの付加のためのヒンジ領域を有する；重鎖 μ 及び δ は、4つの免疫グロブリンドメインから構成される定常領域を有する。重鎖の可変領域は、異なるB細胞によって産生される抗体は異なるが、1つのB細胞、あるいはB細胞クローンによって産生される抗体はすべて同じである。それぞれの重鎖の可変領域は、約110アミノ酸長であり、そして1つのIgドメインから構成されている。

10

【0130】

哺乳類では、 μ 及び δ と称される2種類の免疫グロブリンの軽鎖がある。軽鎖は、2つの連続するドメインを有する：1つは、定常ドメイン(C_L)であり、そして1つは可変ドメイン(V_L)である。軽鎖のおよその長さは、211~217アミノ酸である。それぞれの抗体は、常に同一である2つの軽鎖を含んでいる；哺乳類の1つの抗体については、 μ 又は δ である軽鎖の種類のみが存在している。鎖のような軽鎖の他の種類は、軟骨魚類及び硬骨魚類のような下等脊椎動物において見出されている。

【0131】

自然的に発生する抗体に加えて、抗体フラグメントを含む人工的抗体フォーマットが開発されている。それらの一部について、下記に述べられている。しかしながら、上記のポリペプチド(複数を含む)を含んで成るか、あるいはそれから成り、そして2インテグリンとの特異的結合を可能にする他の抗体フォーマットはいずれもまた、この発明によって包含されている。

20

【0132】

すべての抗体の全体的な構造は非常に類似しているが、所与の抗体のユニークな特性は、上記に詳述されているように可変(V)領域によって決定される。より具体的には、それぞれ、軽鎖(V_L)に3つの可変ループがあり、そして重鎖(V_H)にも3つの可変ループがあり、この可変ループが、抗原に対して結合する働きをしており、すなわち、その抗原特異性の要因となっている。こうしたループは、相補性決定領域(CDR)と呼ばれている。 V_H 及び V_L ドメインの双方に起源する CDR が抗原結合部位に寄与しているので、最終的な抗原特異性を決定しているのは、重鎖及び軽鎖の組み合わせであって、どちらか単独ではない。

30

【0133】

従って、本明細書中で使用される際には、用語“抗体(antibody)”とは、自然的に発生する抗体に構造類似性を有し、2インテグリンと特異的に結合することができるあらゆるポリペプチドを意味し、上記において、結合特異性は、配列番号3~8の CDR によって決定される。それゆえ、“抗体(antibody)”は、2インテグリンとの特異的結合を有する、抗原結合性フラグメント(抗体構造から物理的に又は概念的に誘導されるフラグメント)、前記いずれかの誘導體、キメラ分子、別のポリペプチドと前記いずれかとの融合、あるいは2インテグリンに選択的に結合し、そして場合により2インテグリンの機能を阻害するあらゆる代替的構造/組成を含む(これらには限定されない)、免疫グロブリン誘導構造(immunoglobulin-derived structure)を意味することを意図している。この抗体は、少なくとも1つの抗原結合性フラグメントを含んでなる任意のポリペプチドでありうる。抗原結合性フラグメントは、少なくとも、重鎖の可変ドメイン及び軽鎖の可変ドメインから成り、双方のドメインが一緒になって特異的抗原に結合することができるように配置されている。

40

【0134】

“完全長(Full length)”又は“完全(complete)”抗体とは、ジスルフィド結合によって相互に連結されている2つの重(H)鎖と2つの軽(L)鎖を含んでなるタンパク質を意味し、これは以下を含んでなる：(1)重鎖に関しては、可変領域及び3つのドメ

50

イン、C H 1、C H 2 及び C H 3 を含んでなる重鎖定常領域；並びに（ 2 ）軽鎖に関しては、軽鎖可変領域と1つのドメイン、C L を含んでなる軽鎖定常領域。用語“完全抗体（complete antibody）”に関しては、それぞれのドメインが、全ドメイン構造は変化させない変異、欠失、又は挿入などのようなその更なる改変を含みうるとしても、自然的に発生する抗体（すなわち、3つ又は4つの定常ドメインの重鎖、及び1つの定常ドメインの軽鎖、並びにそれぞれの可変ドメインを含んでなる）の通例の全ドメイン構造を有する、あらゆる抗体を意味している。

【 0 1 3 5 】

“抗体フラグメント（antibody fragment）”はまた、上記に定義されているような少なくとも1つの抗原結合性フラグメントを含み、このフラグメントが誘導される完全抗体と本質的に同じ機能及び特異性を示す。パパインで限定タンパク分解（limited proteolytic digestion）すると、I g プロトタイプが3つのフラグメントに開裂される。2つの同一のアミノ末端フラグメント（それぞれは、1つの全L鎖と、およそ半分のH鎖を含む）は、抗原結合性フラグメント（F a b）である。第三のフラグメント（それらは、大きさは似ているが、鎖間ジスルフィド結合を含む、双方の重鎖の半分でありカルボキシル末端を含む）は、結晶化が可能であるフラグメント（F c）である。このF c は、炭水化物、補体結合及びF c R 結合部位を含む。限定ペプシン分解すると、F a b 片とヒンジ領域の双方を含む1つのF（a b'）₂フラグメントが生じ、これには、H - H 鎖間ジスルフィド結合が含まれる。F（a b'）₂は抗原結合に対して二価である。F（a b'）₂のジスルフィド結合は、F a b' を得るために開裂されうる。更に、重鎖及び軽鎖の可変領域は融合して一緒になり1本鎖可変フラグメント（s c F v）を形成することができる。

【 0 1 3 6 】

初代（first generation）のフルサイズ抗体がいくつかの問題が提示されたときには、第二世代の抗体（second generation antibodies）の多くは、抗体のフラグメントだけを含んでいる。可変ドメイン（F v s）は、1つのV L 及び1つのV H から成るインタクトな（intact）抗原結合ドメインを含む最も小さいフラグメントである。結合ドメインだけを含むこうしたフラグメントは、酵素的アプローチ、又は関連する遺伝子フラグメント（例えば、バクテリア中及び真核細胞中の）の発現によって生成することができる。種々のアプローチを使用することができ、例えば、F v フラグメントだけ、又はF v と最初の定常ドメインを含む“Y”の上腕の1つを含んでなる‘F a b’フラグメントを使用することができる。こうしたフラグメントは通例、1本鎖F v（s c F v）の生成をもたらす2つの鎖間のポリペプチド連結を導入することによって安定化される。あるいは、ジスルフィド連結F v（d s F v）フラグメントを使用することができる。フラグメント結合ドメインは、全長抗体を作製するために任意の定常ドメインと連結させるか、あるいは、他のタンパク質及びポリペプチドと融合することができる。

【 0 1 3 7 】

組み換え抗体フラグメントは、1本鎖F v（s c F v）フラグメントである。一般的に、これはその抗原に対して高親和性を有し、種々の宿主中で発現することができる。こうした及び他の特性によって、s c F v フラグメントは、医薬において適用可能になるのみならず、更に生物工学的適用を可能にする。上記に詳述した如く、s c F v フラグメントでは、V H 及びV L ドメインは、親水性及びフレキシブルなペプチドリンカーで結合され、それによって発現及び折り畳み構造の有効性が改善される。通例、約15アミノ酸のリンカーが使用され、それらのうち、（G l y₄S e r）₃リンカーが最も頻繁に使用されている。s c F v 分子は、使用されるリンカーに応じて、容易にタンパク質分解で分解されうる。遺伝子操作手法の発展と共に、こうした制限が実際には、機能及び安定性の改善にフォーカスした研究によって解消されうる。実例としては、V H - V L ダイマーが、鎖間ジスルフィド結合によって安定化される、ジスルフィドによって安定化された（又はジスルフィド連結）F v フラグメントの生成がある。システインは、V L 及びV H ドメイン間の接触面で導入され、その結果2つのドメインが一緒になるジスルフィド架橋を形成する。

。

10

20

30

40

50

【0138】

s c F v s の解離によって、モノマー s c F v s がもたらされ、これはダイマー（ダイアポディ又は $(s c F v)_2$ ）、トリマー（トリアポディ）、又はタンダブ（TandAbs）、及びフレキシポディ（Flexibodies）のようなより大きい複合体化することができる。

【0139】

2つの結合ドメインを有する抗体は、シンプルな（simple）ポリペプチド連結（s c F v）₂を有する2つのs c F vの結合を通して、あるいは2つのモノマーの二量体化（ダイアポディ）を通して生成することができる。最もシンプルな設計は、2つの機能的抗原結合ドメインを有するダイアポディであり、これは、同じもの、類似のもの（二価のダイアポディ）でありうるか、あるいは異なる抗原に対する特異性（二特異性ダイアポディ）を有しうる。こうした二特異性抗体によって、例えば、新規なエフェクター機能（例えば、細胞傷害性T細胞）を標的細胞に動員することが可能になり、このことによってそれらが医学における応用に非常に有用になる。

10

【0140】

最近になって、重鎖の4つの可変ドメイン及び軽鎖の4つの可変ドメインを含む抗体フォーマットが開発されている。こうした例としては、四価の二特異性抗体が挙げられる（タンダブ及びフレキシポディ, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, Germany）。二特異性ダイアポディとは対照的に、二特異性タンダブは、たった1つのポリペプチドを含んで成るホモダイマーである。フレキシポディは、細胞表面上で互いにかなり離れている2つの分子を結合させるための高度のフレキシビリティを有する多価分子をもたらすことになるダイアポディマルチマーモチーフとs c F vの組み合わせである。2つより多い機能的抗原結合ドメインが存在し、そしてそれらが異なる抗原に対する特異性を有する場合には、この抗体は、多特異性（multispecific）である。

20

【0141】

F v、s c F v、ダイアポディ分子又はドメイン抗体（Domantis）を含む（これらに限定されない）、いくつかの抗体分子は、V_H及びV_Lドメインを並べる（line）ためにジスルフィド架橋を組み込むことによって安定化することができる。二特異性抗体は、従来から行なわれている技術を用いて生成することができ、その中で具体的な方法としては、化学的に、あるいはハイブリッドであるハイブリドーマから生成することが含まれ、他の技術としては、B i T E™テクノロジー（ペプチドリンカーを用いて異なる特異性の抗原結合領域を処理する分子）及び、ノブ-インツ-ホールエンジニアリング（knobs-into-holes engineering）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0142】

好ましくは、この抗体は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド連結F v、s c F v、(s c F v)₂、二特異性抗体、多特異性抗体、ダイアポディ、トリアポディ、テトラポディ又はミニポディでありうる。

【0143】

一実施態様では、この抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体である。モノクローナル抗体は、それらは1個の親細胞の全てのクローンである1種類の免疫細胞によって産生されるので同一である単一特異性抗体である。キメラ抗体は、1種類の免疫グロブリンの少なくとも1つの領域が別の種類の免疫グロブリンの別の領域に融合している抗体であり、これは、その免疫原性を減少させるために遺伝子操作の手段によって行なわれる。例えば、マウスのV_L及びV_H領域を、ヒト免疫グロブリンの残存部分に融合させることができる。キメラ抗体の特定の種類は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、非ヒト抗体のC D RをコードするD N Aをヒト抗体生成D N Aと（又は反対に）融合させることによって生成される。次いでこの結果生じたD N Aコンストラクトは通例、C D Rだけが非ヒトであるので、非ヒト親抗体（non-human parenteral antibody）、あるいはキメラ抗体と同様に免疫原性ではない抗体を発現させ、作製するために使用することができる。

40

【0144】

50

この発明の異なる局面の一実施態様によれば、ヒト又はヒト化抗体、あるいはそのフラグメントを使用することができる。従って、このペプチド又はペプチド複合体は、以下から成る群より選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含みうる：ヒトIgM定常ドメイン、ヒトIgG1定常ドメイン、ヒトIgG2定常ドメイン、ヒトIgG3定常ドメイン、ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、ヒトIgE定常ドメイン、及びヒトIgA定常ドメイン。本発明の文脈では、この抗 2 インテグリン抗体は、WO 2009/032661中に以前に記載されている方法を用いてヒト化されているが、当技術分野において知られている任意の適切なヒト化方法を使用することができる。

【0145】

上記に詳述したように、このCDRはまた、特許請求の範囲で特定化されている任意のCDRの機能的に活性な変異体でありうる。一実施態様では、この機能的に活性な変異体は、配列番号3～8のいずれかの90%以上のアミノ酸配列から成る機能的に活性なフラグメントである。あるいは、この機能的に活性な変異体は、配列番号3～8のいずれかのアミノ酸配列に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%若しくは95%以上の配列同一性を有する機能的に活性な変異体であり、特に、上記において、機能的に活性な変異体は、1つ又はそれより多い保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution) によって、配列番号3～8のいずれかのアミノ酸配列から誘導される(下記参照)。

【0146】

この発明の異なる局面の一実施態様では、このペプチド又はペプチド複合体は、
 - 配列番号1、又はその機能的に活性な変異体、及び/又は
 - 配列番号2、又はその機能的に活性な変異体、及び/又は
 - 配列番号9、又はその機能的に活性な変異体、及び/又は
 - 配列番号10、又はその機能的に活性な変異体、及び/又は
 - 配列番号11、又はその機能的に活性な変異体
 のアミノ酸配列を含んでなる。

【0147】

あるいは、このペプチド又はペプチド複合体は、
 - 配列番号9、又はその機能的に活性な変異体、及び
 - 配列番号10、又はその機能的に活性な変異体、及び
 - 場合により、50個の付加アミノ酸残基、又は1～40個、1～30個、1～25個、1～15個、1～10個、1個、又は2個、3個、4個、又は5個の付加アミノ酸残基よりなるアミノ酸配列で構成される。

【0148】

あるいは、このペプチド又はペプチド複合体は、
 - 配列番号9、又はその機能的に活性な変異体、及び
 - 配列番号11、又はその機能的に活性な変異体、及び
 - 場合により、50個の付加アミノ酸残基、又は1～40個、1～30個、1～25個、1～15個、1～10個、1個、又は2個、3個、4個、又は5個の付加アミノ酸残基よりなるアミノ酸配列で構成される。

【0149】

この機能的に活性な変異体は、配列番号1又は配列番号2又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号11の配列のいずれかから、1つ又はそれより多い欠失によって誘導されることによって特徴付けられるフラグメントでありうる。この欠失(複数を含む)は、C末端であってもよいし、N末端であってもよいし、及び/又はその中間内部(internally)であってもよい。このフラグメントは、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個又は10個のような10個以下の欠失によって、あるいは1個、2個、3個、4個又は5個のような5個以下の欠失によって、あるいは1個、2個又は3個のような3個以下の欠失によって、あるいは1個又は2個のような2個以下の欠失によって、あるいは1個の欠失によって得ることができる。本発明の機能的に活性なフラグメン

トは、 α 2 インテグリン及び/又は α 2 β 1 インテグリンに結合することができること、及び場合により α 2 及び/又は α 2 β 1 インテグリンを阻害することができることを含む、完全タンパク質によって示されるのと同様な生物活性を有することによって特徴付けられる。フラグメントの活性が、配列の変更のないアミノ酸配列の10%以上、好ましくは25%以上、より好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、又は最も好ましくは99%以上の活性に達する場合には、この発明の文脈では抗原のフラグメントは機能的に活性である。 α 2 β 1 インテグリンに対する結合活性を決定する適切な方法は、実施例、特に実施例1D中に述べられている。

【0150】

この変異体は、配列番号1又は配列番号2又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号11の配列のいずれかから、欠失(複数を含む)、付加(複数を含む)及び/又は置換(複数を含む)を含む1つ又はそれより多いアミノ酸修飾によって誘導されることによって特徴付けられうる。この修飾(複数を含む)は、C末端であってもよいし、N末端であってもよいし、及び/又はその中間内部であってもよい。このフラグメントは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個又は10個のような10個以下の欠失によって、あるいは1個、2個、3個、4個又は5個のような5個以下の欠失によって、あるいは1個、2個又は3個のような3個以下の欠失によって、あるいは1個又は2個のような2個以下の欠失によって、あるいは1個の欠失によって得ることができる。本発明の機能的に活性な変異体は、 α 2 インテグリン及び/又は α 2 β 1 インテグリンに結合することができること、及び場合により α 2 及び/又は α 2 β 1 インテグリンを阻害することができることを含む、完全タンパク質によって示されるのと同様な生物活性を有することによって特徴付けられる。この変異体の活性が、配列の変更のないアミノ酸配列の10%以上、好ましくは25%以上、より好ましくは50%以上、更により好ましくは70%以上、更により好ましくは80%以上、とりわけ90%以上、特に95%以上、最も好ましくは99%以上の活性に達する場合には、この発明の文脈ではこの変異体は機能的に活性である。

【0151】

($i \times$ 、 x 又は $x i$)の場合の付加アミノ酸は、C末端であってもよいし、N末端であってもよいし、及び/又はその中間内部に位置していてもよい。一実施態様によれば、50個以下の付加、又は40個以下、又は30個以下、又は20個以下の付加又は10個以下の付加(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個又は10個)、あるいは5個以下の付加(例えば、1個、2個、3個、4個又は5個)、あるいは3個以下の付加(例えば、1個、2個又は3個)、あるいは2個以下(例えば、1個または2個)、あるいはただ1個の付加がある。

【0152】

付加アミノ酸残基(複数を含む)は、任意のアミノ酸でありえ、該アミノ酸は、自然的に発生する、及びそうではない、L-及び/又はD-アミノ酸でありうる。好ましくは、このアミノ酸は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン又はチロシンなどの任意の自然的に発生するアミノ酸である。

【0153】

このアミノ酸はまた、修飾されていてもよいし、それとも特殊なアミノ酸(unusual amino acid)であってもよい。こうしたものの例としては、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、 α -アラニン、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン(N-ethylglycine m N-ethylasparagine)、ヒドロキシリシン、アロ-ヒドロキシリシン(allo-hydroxylys

10

20

30

40

50

ine)、3-ヒドロキシプロロイン(3-hydroxyproloine)、4-ヒドロキシプロロイン(4-hydroxyproloine)、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリシン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン又はオルニチンがある。これに加えて、アミノ酸は、翻訳後修飾などの修飾を付されていてもよい。修飾の例としては、アセチル化、アミド化、ブロッキング(blocking)、ホルミル化、 α -カルボキシグルタミン酸ヒドロキシル化、グリコシル化、メチル化、リン酸化、及び硫酸化が含まれる。1つより多い更なるアミノ酸残基又は非相同アミノ酸残基がペプチドに存在する場合、これらのアミノ酸残基は同じでもよく、それとも互いに異なってもよい。

【0154】

配列同一性のパーセンテージは、例えば、シーケンスアライメントによって決定することができる。比較のための配列のアライメントの方法は、当技術分野において周知である。種々のプログラム及びアライメントアルゴリズムについては、例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981 又は Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. US. A. 85: 2444, 1988中に記載されている。

【0155】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990) が、シーケンス解析プログラム、blastp、blastn、blastx、tblastn及びtblastxと接続して使用するために、国立生物工学情報センター(the National Center for Biotechnology Information) (NCBI, Bethesda, MD) を含めて、及びインターネットによって、いくつかの供給源から利用可能である。配列番号1~8の配列のいずれかの変異体は通例、ギャップblastpをデフォルトパラメーターに設定して、NCBI Blast 2.0を用いて特徴付けられる。少なくとも30アミノ酸のアミノ酸配列の比較のために、Blast2配列機能が、デフォルトBLOSUM62マトリックスをデフォルトパラメーターに設定して用いて使用される(ギャップの存在はコスト11、及び残基ギャップ当たりはコスト1)。短いペプチド(約30アミノ酸よりも少ない)をアライメントするときには、アライメントは、PAM30マトリックスをデフォルトパラメーターに設定して使用して(オープンギャップ9、エクステンションギャップ1ペナルティー)、Blast2配列機能を用いて行なわれる。15アミノ酸以下のような短いウィンドウにわたる配列同一性を決定する方法は、国立生物工学情報センター(the National Center for Biotechnology Information) in Bethesda, Marylandにより維持されるウェブサイト中に記載されている。

【0156】

この発明の異なる局面の別の実施態様では、上記に定義されているような機能的に活性な変異体は、前記配列のいずれかの、配列番号1又は配列番号2又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号11のいずれかのアミノ酸配列から1つ又はそれより多い保存的アミノ酸置換によって誘導される。

【0157】

保存的アミノ酸置換は、当技術分野における当業者であれば理解しているように、アミノ酸残基を類似又はより好ましい(意図している目的のため)機能及び/又は化学特性を付与するものに置き換える置換である。例えば、保存的アミノ酸置換はしばしば、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。こうしたファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、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)、分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が含まれる。こうした修飾は、たとえそれらがそうした特性を改善しようとしても、ポリペプチド(複合体)の結合又は機能的阻害特性を顕著に減少させるか、ある

10

20

30

40

50

いは変化させるようには設計されない。置換される目的は、重大ではないが、分子の構造、分子の荷電又は疎水性、あるいは分子の大きさを維持し、又は強化することが可能なよりよいものに残基を置換すること（但し、これら決して限定されない）を含みうる。例えば、より少ない所望の残基を同じ極性又は荷電のものに単に置換することを所望することができる。こうした修飾は、当技術分野において知られている部位特異的変異導入（site-directed mutagenesis）及びPCRを介した変異誘発（PCR-mediated mutagenesis）などの標準的な手法によって導入することができる。当技術分野における当業者が保存的アミノ酸置換を達成する1つの具体的手段は、アラニンスキャニング変異導入法（alanine scanning mutagenesis）である。次いで変化したポリペプチドを、当技術分野において利用可能な、又は実施例に述べられている機能的アッセイを用いて機能が維持されているか、あるいはよりよくなっているかどうかを試験する。この発明のより好ましい実施態様では、配列番号1又は配列番号2又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号20のいずれかの配列における保存的置換の数は、20、19、18、17、16、15、14、13、12又は11のように20以下、好ましくは、10、9、8、7又は6のように10以下、とりわけ、5、4、3のように5以下、特に2又は1である。

10

【0158】

この発明の異なる局面の更に別の実施態様では、このペプチド又はペプチド複合体は、下記の1つ又はそれより多い機能的に活性な変異体を含んでなる：

- 上記において、LDR1の機能的に活性な変異体は、11位のアミノ酸での変異（mutation）、特に、11Asn Glnを含んでなり；

20

- 上記において、HDR2の機能的に活性な変異体は、6位のアミノ酸での変異、特に、6Asp Gluを含んでなり；

- 上記において、配列番号1の機能的に活性な変異体は、好ましくは、9Ala Ser、12Ala Ser、15Leu Val、15Leu Pro、22Ser Thr、34Asn Gln、46Gln Lys、47Ala Pro、80Asp Asn、83Glu Gln、85Asp Glu、87Ala Thr及び89Thr Asnから成る群より選択される、9位、12位、15位、22位、34位、46位、47位、80位、83位、85位、87位及び/又は89位のアミノ酸での1つ又はそれより多い変異を含んでなり、

30

【0159】

又は上記において、配列番号1の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり（LC1）；すなわち、9Ala Ser、又は15Leu Val、又は46Gln Lys、又は83Glu Gln、又は9Ala Ser及び15Leu Val、又は9Ala Ser及び46Gln Lys、又は9Ala Ser及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び46Gln Lys、又は15Leu Val及び83Glu Gln、又は46Gln Lys及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び46Gln Lys、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は表5のLC1：9Ala Ser及び15Leu Val及び46Gln Lys及び83Glu Gln、

40

【0160】

又は上記において配列番号1の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり（LC2）、すなわち、9Ala Ser、又は15Leu Val、又は34Asn Gln、又は46Gln Lys、又は83Glu Gln、又は9Ala Ser及び15Leu Val、又は9Ala Ser及び34Asn Gln、又は9Ala Ser及び46Gln Lys、又は9Ala Ser及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び34Asn Gln、又は15Leu Val及び46Gln Lys、又は15Leu Val及び83Glu Gln、又は34Asn Gln及び46Gln Lys、又は34Asn Gln及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び

50

15 Leu Val 及び 34 Asn Gln、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 46 Gln Lys、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys、又は 9 Ala Ser 及び 34 Asn Gln 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、又は 15 Leu Val 及び 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys、又は 15 Leu Val 及び 34 Asn Gln 及び 83 Glu Gln、又は 15 Leu Val 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、又は 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 34 Asn Gln 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、又は 15 Leu Val 及び 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、又は表 5 の LC2 : 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 34 Asn Gln 及び 46 Gln Lys 及び 83 Glu Gln、

【0161】

又は上記において、配列番号 1 の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり (LC3) ; すなわち、9 Ala Ser、又は 12 Ala Ser、又は 15 Leu Val、又は 83 Glu Gln、又は 85 Asp Glu、又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val、又は 9 Ala Ser 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 85 Asp Glu、又は 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val、又は 12 Ala Ser 及び 83 Glu Gln、又は 12 Ala Ser 及び 85 Asp Glu、又は 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln、又は 15 Leu Val 及び 85 Asp Glu、又は 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu 又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val、又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser 及び 85 Asp Glu、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 85 Asp Glu、又は 9 Ala Ser 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、又は 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln、又は 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 85 Asp Glu、又は 12 Ala Ser 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、又は 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、又は 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、又は表 5 に基づく (LC3) : 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val 及び 83 Glu Gln 及び 85 Asp Glu、

【0162】

又は上記において、配列番号 1 の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり (LC4) ; すなわち、9 Ala Ser、又は 12 Ala Ser、又は 15 Leu Val、又は 34 Asn Gln、又は 83 Glu Gln、又は 85 Asp Glu、又は 9 Ala Ser 及び 12 Ala Ser、又は 9 Ala Ser 及び 15 Leu Val、又は 9 Ala Ser 及び 34 Asn Gln、又は 9 Ala Ser 及び 83 Glu Gln、又は 9 Ala Ser 及び 85 Asp Glu、又は 12 Ala Ser 及び 15 Leu Val、又は 12 Ala Ser 及び 34 Asn Gln、又は 12 Ala Ser 及び 83 Glu Gln、又は 12 Ala Ser 及び 85 Asp Glu、

10

20

30

40

50

又は15Leu Val及び34Asn Gln、又は15Leu Val及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び85Asp Glu、又は34Asn Gln
 及び83Glu Gln、又は34Asn Gln及び85Asp Glu、又は83Glu Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及
 び15Leu Val、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び34Asn Gln、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び83Glu Gln、又は9
 Ala Ser及び12Ala Ser及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln、又は9Ala Ser及び15Leu
 Val及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び34Asn Gln及び83Glu Gl
 n、又は9Ala Ser及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は12Ala Ser及
 び15Leu Val及び34Asn Gln、又は12Ala Ser及び15Leu Val及び83Glu Gln、又は12Ala Ser及び15Leu Val及び
 85Asp Glu、又は12Ala Ser及び34Asn Gln及び83Glu Gln又は12Ala Ser及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は1
 2Ala Ser及び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び34
 Asn Gln及び85Asp Glu、又は15Leu Val及び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は34Asn Gln及び83Glu Gln及び85A
 sp Glu、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び15Leu Val及
 び34Asn Gln、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び15Leu Val及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び15
 Leu Val及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び12Ala Ser
 及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び1
 2Ala Ser及び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は9Al
 a Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び15Leu Val及び83Glu Gln
 及び85Asp Glu、又は12Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は12Ala Ser及び15Leu Val及
 び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は12Ala Ser及び34Asn Gln及び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び1
 2Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gl
 n、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び12Ala Ser及
 び34Asn Gln及び83Glu Gln及び85Asp Glu、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又は12Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln
 及び83Glu Gln及び85Asp Glu又は表5に基づく(LC4)：9Ala Ser及び12Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び8
 3Glu Gln及び85Asp Glu、

【0163】

又は上記において、配列番号1の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(LC5)；すなわち、15Leu Pro、22Ser Thr、47Ala Pro、80Asp Asn、87Ala Thr、89Thr Asn、又は15Leu Pro及び22Ser Thr、又は15Leu Pro及び47Ala Pro又は15Le

u Pro及び80 Asp Asn、又は15 Leu Pro及び87 Ala Thr、
 又は15 Leu Pro及び89 Thr Asn、又は22 Ser Thr及び47 Ala
 Pro、又は22 Ser Thr及び80 Asp Asn、又は22 Ser Thr
 及び87 Ala Thr、又は22 Ser Thr及び89 Thr Asn、又は47 Ala
 Pro及び80 Asp Asn、又は47 Ala Pro及び87 Ala Thr
 、又は47 Ala Pro及び89 Thr Asn、又は80 Asp Asn及び87 Ala
 Thr、又は80 Asp Asn及び89 Thr Asn、又は87 Ala Thr
 r及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び47 Ala
 Pro、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び80 Asp Asn
 、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び87 Ala Thr、又は15 Leu
 Pro及び22 Ser Thr及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro
 及び47 Ala Pro及び80 Asp Asn、又は15 Leu Pro及び47 Ala
 Pro及び87 Ala Thr、又は15 Leu Pro及び47 Ala Pro及び
 及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala
 Thr、又は15 Leu Pro及び80 Asp Asn及び89 Thr Asn、又は
 は15 Leu Pro及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は22 Ser
 Thr及び47 Ala Pro及び80 Asp Asn、又は22 Ser Thr及び
 47 Ala Pro及び87 Ala Thr、又は22 Ser Thr及び47 Ala
 Pro及び89 Thr Asn、又は22 Ser Thr及び80 Asp Asn及び8
 7 Ala Thr、又は22 Ser Thr及び80 Asp Asn及び89 Thr A
 sn、又は22 Ser Thr及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は4
 7 Ala Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr、又は47 Ala P
 ro及び80 Asp Asn及び89 Thr Asn、又は47 Ala Pro及び87
 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は80 Asp Asn及び87 Ala Th
 r及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び47 A
 la Pro及び80 Asp Asn、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr
 及び47 Ala Pro及び87 Ala Thr、又は15 Leu Pro及び22 Se
 r Thr及び47 Ala Pro及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及
 び22 Ser Thr及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr、又は15 Leu
 Pro及び22 Ser Thr及び80 Asp Asn及び89 Thr Asn、又は
 15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び87 Ala Thr及び89 Thr A
 sn、又は15 Leu Pro及び47 Ala Pro及び80 Asp Asn及び87
 Ala Thr、又は15 Leu Pro及び47 Ala Pro及び80 Asp As
 n及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び47 Ala Pro及び87 A
 la Thr及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び80 Asp Asn
 及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は22 Ser Thr及び47 Al
 a Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr、又は22 Ser Thr及
 び47 Ala Pro及び80 Asp Asn及び89 Thr Asn、又は22 Ser
 Thr及び47 Ala Pro及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は
 22 Ser Thr及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr及び89 Thr A
 sn、又は47 Ala Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr及び89
 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び47 Ala Pr
 o及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr、又は15 Leu Pro及び22 S
 er Thr及び47 Ala Pro及び80 Asp Asn及び89 Thr Asn、
 又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び47 Ala Pro及び87 Ala
 Thr及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び
 80 Asp Asn及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は15 Leu
 Pro及び47 Ala Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr及び89
 Thr Asn、又は22 Ser Thr及び47 Ala Pro及び80 Asp As
 n及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、又は表5に基づいて(LC5)：1

10
 20
 30
 40
 50

5 Leu Pro及び22 Ser Thr及び47 Ala Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr及び89 Thr Asn、及び/又は

【0164】

上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、特に、5 His Val、7 Pro Ser、11 Leu Val、12 Val Lys、17 Pro Ser、20 Leu Val、38 Lys Arg、40 Arg Ala、43 Arg Gln、55 Asp Glu、61 Asn Ala、65 Lys Gln、66 Asp Gly、67 Lys Arg、76 Ser Thr、81 Ile Met、82 Gln Glu、87 Thr Arg、91 Ser Thr、93 Val Lys、112 Thr Leu、113 Leu Val及び116 Ser Valから成る群より選択される、5位、7位、11位、12位、17位、20位、38位、40位、43位、55位、61位、65位、66位、67位、76位、81位、82位、87位、91位、93位、112位、113位及び/又は116位のアミノ酸での1つ又はそれより多い変異を含んでなり、

10

【0165】

又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(HC1)；すなわち、43 Arg Gln、又は67 Lys Arg、又は116 Ser Val、又は43 Arg Gln及び67 Lys Arg、又は43 Arg Gln及び116 Ser Val、又は67 Lys Arg及び116 Ser Val、又は表6に基づいて(HC1)：43 Arg Gln及び67 Lys Arg及び116 Ser Val、

20

【0166】

又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(HC2)；43 Arg Gln、又は55 Asp Glu、又は67 Lys Arg、又は116 Ser Val、又は43 Arg Gln及び55 Asp Glu、又は43 Arg Gln及び67 Lys Arg、又は43 Arg Gln及び116 Ser Val、又は55 Asp Glu及び67 Lys Arg、又は55 Asp Glu及び116 Ser Val、又は67 Lys Arg及び116 Ser Val、又は43 Arg Gln及び55 Asp Glu及び67 Lys Arg、又は43 Arg Gln及び55 Asp Glu及び116 Ser Val、又は43 Arg Gln及び67 Lys Arg及び116 Ser Val、又は55 Asp Glu及び67 Lys Arg及び116 Ser Val、又は表6に基づいて(HC2)：43 Arg Gln及び55 Asp Glu及び67 Lys Arg及び116 Ser Val、

30

【0167】

又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(HC3)；すなわち、17 Pro Ser、又は116 Ser Val、又は表6に基づいて(HC3)：17 Pro Ser及び116 Ser Val、

又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(HC4)；すなわち、17 Pro Ser、又は93 Val Lys、又は116 Ser Val又は17 Pro Ser及び93 Val Lys、又は17 Pro Ser及び116 Ser Val、又は93 Val Lys及び116 Ser Val、又は表6に基づいて(HC4)：17 Pro Ser及び93 Val Lys及び116 Ser Val、

40

又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(HC5)；すなわち、17 Pro Ser、又は55 Asp Glu、又は116 Ser Val又は17 Pro Ser及び55 Asp Glu、又は17 Pro Ser及び116 Ser Val、又は55 Asp Glu及び116 Ser Val、又は表6に基づいて(HC5)：17 Pro Ser及び55 Asp Glu及び116 Ser Val、

【0168】

50

又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、下記の変異を含んでなり(HC6);すなわち、12Val Lys、又は55Asp Glu、又は93Val Lys、又は116Ser Val、又は12Val Lys及び55Asp Glu、又は12Val Lys及び93Val Lys、又は12Val Lys及び116Ser Val、又は55Asp Glu及び93Val Lys、又は55Asp Glu及び116Ser Val、又は93Val Lys及び116Ser Val、又は12Val Lys及び55Asp Glu及び93Val Lys、又は12Val Lys及び55Asp Glu及び116Ser Val、又は12Val Lys及び93Val Lys及び116Ser Val、又は表6に基づいて(HC6):12Val Lys

10

及び55Asp Glu及び93Val Lys及び116Ser Val、
 又は上記において、配列番号2の機能的に活性な変異体は、以下の変異のうち、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個又は全てを含んでなる(HC6);5His Val、7Pro Ser、11Leu Val、12Val Lys、17Pro Ser、20Leu Val、38Lys Arg、40Arg Ala、43Arg Gln、61Asn Ala、65Lys Gln、66Asp Gly、67Lys Arg、76Ser Thr、81Ile Met、82Gln Glu、87Thr Arg、91Ser Thr、112Thr Leu、113Leu Val。

20

【0169】

こうした所定位置及び変異が、表4、5及び6に関連して実施例中に述べられている留意事項に基づいて導入された。たった1つだけの変異であってもよいし、それともこうした変異の組み合わせ(特に、表4、5及び6に述べられている組み合わせのいずれか)であってもよい。更に、このペプチド又はペプチド複合体は、上記に列挙される軽鎖変異体の1つ(one of the variant light chains)と、上記に列挙される重鎖変異体の1つ又は複数とが一緒に存在する、1つ又はそれより多い変異を含むことができ、例えば、以下の変異/機能的変異体の組み合わせの1つを含んでなるか、あるいはそれらから成る:LC1及びHC1、LC1及びHC2、LC1及びHC3、LC1及びHC4、LC1及びHC5、LC1及びHC6、LC1及びHC7、LC2及びHC1、LC2及びHC2、LC2及びHC3、LC2及びHC4、LC2及びHC5、LC2及びHC6、LC2及びHC7、LC3及びHC1、LC3及びHC2、LC3及びHC3、LC3及びHC4、LC3及びHC5、LC3及びHC6、LC3及びHC7、LC4及びHC1、LC4及びHC2、LC4及びHC3、LC4及びHC4、LC4及びHC5、LC4及びHC6、LC4及びHC7、LC5及びHC1、LC5及びHC2、LC5及びHC3、LC5及びHC4、LC5及びHC5、LC5及びHC6、LC5及びHC7。

30

【0170】

これに加えて、例えば、本発明のペプチド又はペプチド複合体の検出又は精製のためにマーカーを加えることが望ましい場合もありうる。適切なマーカーには、タグ(例えば、6His(又はHexaHis)タグ、7His、8His、GlyGlyGlyGlySer、(GlyGlyGlyGlySer)₂Strepタグ、HAタグ、c-mycタグ又はグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タグ)、蛍光マーカー(例えば、FITC、フルオレセイン、ローダミン、Cy色素又はアレクサ(Alexa))、酵素標識(例えば、ペニシリナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ)、放射性標識(例えば、³H、³²P、³⁵S、¹²⁵I又は¹⁴C)が含まれるがこれらに限定されない。更に、このポリペプチド(複合体)は、支持体に加えてもよく、該支持体は、特にアレイ、ビーズ(例えば、ガラス又は磁気)、ファイバー、フィルムなどの固体の支持体である。当業者であれば、適切な更なるコンポーネントを選択することによって、この発明のポリペプチド又はポリペプチド複合体を含んでなる結合分子、及び更なるコンポーネントを意図する使用に適合させることができるであろう。

40

【0171】

50

この発明の別の実施態様によれば、このペプチド又はペプチド複合体は、1つ又はそれより多い以下の特性を示す：A～E（すなわち、A、又はB、又はC、又はD、又はE、又はA及びB、又はA及びC、又はA及びD、又はA及びE、又はB及びC、又はB及びD、又はB及びE、又はC及びD、又はC及びE、又はA及びB及びC、又はA及びB及びD、又はA及びB及びE、又はA及びC及びD、又はA及びC及びE、又はA及びD及びE、又はB及びC及びD、又はB及びC及びE、又はB及びD及びE、又はA及びB及びC及びD、又はA及びB及びC及びE、又はA及びC及びD及びE、又はB及びC及びD及びE、又はA及びB及びC及びE）：

A) 表11に提示されているデータに基づく速度論的結合定数 (kinetic binding constants) (表面プラズモン共鳴によって決定される、例えば、Biacoreによって)、

B) 以下のような軽鎖の分子の質量 (molecular mass) : 23.73 ± 0.05 kDa 又は 23.73 kDa (LC1)、又は 23.74 ± 0.05 kDa 又は 23.7 kDa (LC2)、又は 23.75 ± 0.05 kDa 又は 23.8 kDa (LC3)、又は 23.77 ± 0.05 kDa 又は 23.77 kDa (LC4)、又は 23.79 ± 0.05 kDa 又は 23.79 kDa (LC5)、 50.31 ± 0.05 kDa

及び/又は以下のような重鎖の分子の質量 : 50.31 kDa (HC1)、又は 50.33 ± 0.05 kDa、又は 50.33 kDa (HC2)、又は 50.30 ± 0.05 kDa 又は 50.30 kDa (HC3)、又は 50.33 ± 0.05 kDa 又は 50.33 kDa (HC4)、又は 50.32 ± 0.05 kDa 又は 50.32 kDa (HC5)、又は 50.35 ± 0.05 kDa 又は 50.35 kDa (HC6)、

又は 50.19 ± 0.05 kDa 又は 50.19 kDa (HC7)、C) 静的状態下にて決定された、 < 0.1 、 < 0.09 、 < 0.08 、 < 0.07 、 < 0.06 、 < 0.05 、 < 0.04 、 < 0.03 、 < 0.02 又は < 0.01 の $IC_{50} \mu g/ml$ 値を有する洗浄したヒト血小板のコラーゲンへの結合の阻害、

D) 静的状態下にて決定された、 < 0.3 、 < 0.2 、 < 0.1 、 < 0.15 、 < 0.14 又は < 0.13 の $IC_{50} \mu g/ml$ 値を有する多血小板血漿に由来するヒト血小板のコラーゲンへの結合の阻害、

E) < 10 、 < 9 、 < 8 、 < 7 、 < 6 、 < 5 、 < 4 、 < 3 、 < 2.5 、 < 2 、 < 1.5 、 < 1 又は $< 0.5\%$ のサイズ排除クロマトグラフィーによって決定される凝集パーセンテージ。

【0172】

第五の局面では、この発明は、この発明によるペプチド又はペプチド複合体をコードする1つ又はそれより多い核酸に関する。

【0173】

この発明の核酸分子は、mRNA又はcRNAなどのRNAの形態であってもよいし、それとも、例えば、cDNA及びゲノムDNA（例えば、クローニングによって得られるか、あるいは化学合成手法によるか、又はその組み合わせによって作製される）を含む、DNAの形態であってもよい。DNAは、3本鎖であってもよいし、あるいは2本鎖であってもよいし、あるいは1本鎖であってもよい。1本鎖DNAは、センス鎖とも呼ばれるコード鎖であってもよいし、それともアンチセンス鎖とも呼ばれるノンコード鎖であってもよい。本明細書中で使用される際には、核酸分子とは、とりわけ、1本鎖及び2本鎖DNA、1本鎖及び2本鎖RNAの混合であるDNA、及び1本鎖及び2本鎖領域の混合であるRNA、DNA及びRNAを含むハイブリッド分子（これは、1本鎖、あるいはより普通には、2本鎖又は3本鎖、又は1本鎖及び2本鎖領域の混合でありうる）を意味する。これに加えて、本明細書中で使用される際には、核酸分子は、RNA又はDNA、又はRNA及びDNAの双方を含む3本鎖領域を意味する。

【0174】

これに加えて、この核酸は、1つ又はそれより多い修飾塩基を含みうる。こうした核酸はまた、例えば、生理学的環境においてこうした分子の安定性及び半減期を増加させるた

10

20

30

40

50

めのリボースリン酸バックボーンの修飾を含みうる。すなわち、安定性又は他の理由のために修飾されたバックボーンを有するDNA（複数を含む）又はRNA（複数を含む）は、その特性が本明細書中で意図されているような“核酸分子（nucleic acid molecule）”である。更に、稀な塩基（2つの例を挙げれば、イノシンのような稀な塩基、又はトリチル化塩基のような修飾された塩基）を含むDNA（複数を含む）又はRNA（複数を含む）が、この発明に関連する核酸分子である。当技術分野における当業者に知られている多くの有用な目的に役立つ極めて多種の修飾がDNA及びRNAになされていることは理解されるところであろう。本明細書中で使用される際には、用語「核酸分子」は、こうした化学的、酵素的、又は代謝的に修飾された核酸分子の形態、並びに、とりわけ、単純型細胞及び複雑型細胞（simple and complex cells）を含む、ウイルス及び細胞のDNA及びRNA特性の化学的形態を包含する。例えば、核酸によってコードされるポリペプチドに作用しないヌクレオチド置換がなされることができ、従って、上記に定義されているような抗原又はフラグメント又はその機能的に活性な変異体をコードするあらゆる核酸分子がこの発明によって包含される。

10

【0175】

更に、フラグメント又はその機能的に活性な変異体を含む、本発明の1つ又はそれより多いポリペプチドをコードする核酸分子のいずれも、標準的なクローニング手法などの標準的手法を用いて、任意の所望の制御配列、リーダー配列、異種マーカ配列又は異種コード配列（heterologous coding sequence）に機能的に連結されて、融合タンパク質を作製することができる。

20

【0176】

本発明の核酸は通常、インビトロ、又は培養液中の細胞内で作り出すことができ、一般的には、核酸を作製するための、エンドヌクレアーゼ及び/又はエクソヌクレアーゼ及び/又はポリメラーゼ及び/又はリガーゼ及び/又はリコンビナーゼ又は当業者に知られている他の方法による核酸の操作手段による。

【0177】

この発明の異なる局面の別の実施態様では、核酸（複数を含む）は、ベクター内に配置される。ベクターは更に、それが宿主細胞中で複製されることを可能にする、複製開始点などの核酸配列、1つ又はそれより多い治療遺伝子、及び/又は選択可能なマーカ遺伝子、及び当技術分野で知られている、転写、翻訳及び/又はコードされたタンパク質の分泌を指示している制御因子のような他の遺伝因子を含むことができる。このベクターは、細胞を形質導入し、形質転換し、又は感染させるために使用することができ、その結果、その細胞に固有のもの以外の核酸及び/又はタンパク質を細胞に発現させることができる。このベクターは所望により、核酸を細胞内に入れることを達成させるのに役立つ、ウイルス粒子、リポソーム、被覆タンパク質（protein coating）などの材料を含む。標準的な分子生物学手法によるタンパク質発現のための適切な発現ベクターの数多い種類が、当技術分野において知られている。こうしたベクターは、昆虫、例えば、バキュロウイルス発現、又は酵母、真菌、バクテリア又はウイルス発現系を含む、従来から使用されているベクターの種類の中から選択される。それらの数多い種類が当技術分野において知られているが、他の適切な発現ベクターもまた、この目的のために使用することができる。こうした発現ベクターを得る方法は、周知である（例えば、Sambrook et al, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) 参照）。一実施態様では、このベクターは、ウイルスベクターである。ウイルスベクターには、レトロウイルスベクター及びアデノウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0178】

この方法によってトランスフェクションするための適切な宿主細胞又は細胞株は、細菌細胞を含む。例えば、大腸菌（*E. coli*）の種々の株が生物学の分野において宿主細胞として周知である。パチルス・サブティリス（*B. subtilis*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、ストレプトマイセス属（*Streptomyces*）、及び他の桿菌などの種々の株もまた

50

、この方法に使用されうる。当技術分野における当業者に知られている酵母細胞の多くの株もまた、この発明のペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。他の真菌細胞又はスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞のような昆虫細胞もまた、発現系として使用されうる。あるいは、ヒト293細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、サルCOS-1細胞株、又はSwissマウス、BALB/cマウス、若しくはNIHマウスに由来するマウス3T3細胞などの哺乳動物細胞が使用されうる。更に他の適切な宿主細胞、並びにトランスフェクション、培養、増幅、スクリーニング、生成、及び精製のための方法が、当技術分野において知られている。

【0179】

この発明の異なる局面の一実施態様では、ハイブリドーマ細胞株、周知の従来から行なわれている手法によって作製される望ましいモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞株を使用することができる。この発明の関連では、このハイブリドーマ細胞は、2インテグリン、特に21インテグリンに特異的に結合する抗体を作製することができる。このハイブリドーマ細胞は、正常活性化された、抗体を産生するB細胞をミエローマ細胞と融合することによって作製することができる。具体的には、このハイブリドーマ細胞は、次のように作製することができる：B細胞を、関連の抗原で負荷された動物の脾臓から除去する。次いでこうしたB細胞を、培養液中で無限に増殖することができるミエローマ腫瘍細胞と融合する。この融合は、細胞膜をより透過性にするによって行なわれる。この融合されたハイブリッド細胞 (ハイブリドーマと呼ばれる) は、癌細胞であるので、急速に、かつ無限に増殖し、大量の所望の抗体を作製する。これを選抜し、次に限界希釈によってクローニングする。インターロイキン-6 (例えば、ブライクローン (briclone)) を含む補充培地が通例、この工程に必須である。選抜は、選択培地、具体的には、1倍濃度HAT (1X concentration HAT) を含む培地中の新たに融合したプライマリーハイブリドーマ細胞をおよそ10~14日間培養することによって行なわれる。HATを使用した後、培地を含むHTを使用することが望ましいことがしばしばである。クローニングは、ポジティブプライマリーハイブリドーマ細胞の同定後に行なわれる。

【0180】

本発明のペプチド又はペプチド複合体は、適切な宿主細胞中、本発明の核酸を発現させることによって作製することができる。従って、別の局面では、この発明は、本発明によるペプチド又はペプチド複合体を作製する方法であって、本発明の核酸 (複数を含む) を含む宿主細胞を、抗体の発現を可能にする条件下にて培養すること、及び所望により宿主細胞からペプチド又はペプチド複合体を回収することを含んでなる、前記方法に関する。

【0181】

この場合、宿主細胞を、例えば、従来から行なわれている、転写調節配列の制御下にて本発明の核酸を含む少なくとも1つの発現ベクターを用いるエレクトロポレーションなどの手段によって形質導入することができる。次いでこの形質導入又は形質転換した宿主細胞を、タンパク質の発現を可能にする条件下にて培養する。発現されたタンパク質を回収し、単離し、そして所望により、当技術分野における当業者に知られている適切な手段によって細胞から (又は細胞外に発現されている場合には、培養培地から) 精製する。例えば、このタンパク質を細胞溶解後、可溶性態で分離するか、あるいは公知の手法 (例えば、グアニジクロリド中) を用いて抽出する。所望であれば、本発明のポリペプチド (複数を含む) を融合タンパク質として作製する。こうした融合タンパク質は、上記に述べられているものである。あるいは、例えば、選択された宿主細胞中でタンパク質の発現を高めるために、あるいは精製を改善するために、融合タンパク質を作製することが望ましい場合もありうる。この発明のポリペプチドを含んでなる分子は、更に種々の従来から行なわれている方法のいずれかを用いて精製することができ、こうした方法には、HPLC、FPLCなどを使用する液体クロマトグラフィー (例えば、順相又は逆相) ; アフィニティークロマトグラフィー (例えば、無機リガンド又はモノクローナル抗体を用いて) ; サイズ排除クロマトグラフィー ; 固定化金属キレートクロマトグラフィー (immobilized metal chelate chromatography) ; ゲル電気泳動などがある (但し、これらに限定されない

10

20

30

40

50

）。当技術分野における当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく最も適切な分離及び精製手法を選択することができる。こうした精製によって、微生物の他のタンパク質物質及び非タンパク質物質を実質的に含まない形態で抗原が提供される。

【0182】

適切な宿主細胞は、例えば、多細胞生物に由来する真核細胞又は細胞株（上記に定義されているような、例えば、CHO細胞又はBHK細胞）、酵母のような真核単細胞生物（例えば、分裂酵母（*s.pombe*）又は出芽酵母（*s.cerevisiae*））又は、大腸菌などの原核細胞である。非常に多くの適切な宿主細胞が、当技術分野において知られている。

【0183】

この発明の異なる局面の一実施態様は、ペプチド又はペプチド複合体が前記細胞/宿主細胞によって異種発現される、ペプチド又はペプチド複合体を作製する組み換え細胞に関する。ペプチド又はタンパク質（本明細書ではまた：ペプチド又はペプチド複合体）の異種発現は、この組み換え細胞が自然的にはこのペプチド又はタンパク質又はペプチド複合体を発現しない細胞から誘導されるということの意味し、そして該組み換え細胞は、改変されて（例えば、形質導入されるか、あるいは形質転換されている）おり、その結果そうしたものを発現する；例えば、抗体又はそのフラグメントのような前記ペプチド又はペプチド複合体の前記細胞によって発現を可能にする核酸（例えば、ペプチド又はペプチド複合体をコードするインサートを持っている人工的核酸コンストラクト（ベクター））を担持している。この組み換え細胞は、上記に定義されているような真核及び原核生物細胞を含めて、あらゆる細胞、細胞株又は宿主細胞から誘導されることができる。

10

20

【0184】

従って、この発明の第六の局面は、この発明の核酸の1つを異種発現する細胞に関する。

【0185】

第七の局面では、この発明は、この発明のペプチド又はペプチド複合体を作製する方法であって、前記ペプチド又はペプチド複合体の発現を可能にする条件下にて、この発明による細胞を培養すること、及び所望により宿主細胞から前記ペプチド又はペプチド複合体を回収することを含んでなる、前記方法に関する。

【0186】

この発明の第八の局面は、医薬として使用するために、少なくとも1つのペプチド又はペプチド複合体、又は本発明によるペプチド又はペプチド複合体を含むコンジュゲート、及び/又は本発明による少なくとも1つの核酸を含んでなる組成物に関する。

30

【0187】

この発明の（医薬）組成物は、更に製薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を包含することができる。この発明において有用な製薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤は、従来から使用されているものであり、緩衝剤、安定化剤、希釈剤、保存剤、及び可溶化剤を含むことができる。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)において、本明細書中で開示されているポリペプチド/核酸の医薬送達に適切な組成物及び製剤が記載されている。この医薬組成物中の活性成分（ポリペプチド又は核酸）の含有量は、それが処置すること又は予防することに有用である限り限定されることはないが、好ましくは、全組成物に対して0.0000001~10%（重量）を含む。

40

【0188】

一般的に、担体又は賦形剤の性質は、使用される具体的な投与方式に左右されるであろう。例えば、非経口製剤は通例、ビヒクルとしての水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水溶性デキストロース、グリセロールなどの薬学的に、及び生理学的に許容される液体を含めて、注入可能な液体を含む。固体組成物（例えば、粉末剤、ピル、錠剤、又はカプセル形態）の場合には、従来から使用されている非毒性固体担体は、例えば、医薬グレードのマニトール、乳糖、スターチ、又はステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中性な担体に加えて、投与される医薬組成物は、少量の非毒性補助物質、例えば、

50

湿潤剤又は乳化剤、保存剤、及びpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウム又はソルビタンモノラウレートを含むことができる。

【0189】

一般的に、適切な量の薬学的に許容される塩が担体中で製剤を等張にするために用いられる。担体の例としては、生理食塩水、リンゲル溶液及びデキストロス溶液が含まれるが、それらに限定されない。好ましくは、許容される賦形剤、担体、又は安定化剤は、好ましくは、使用される投与量及び濃度において非毒性であり、以下のものが含まれる：クエン酸塩、リン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；塩を形成する対イオン、例えば、ナトリウム及びカリウム；低分子量（>10のアミノ酸残基）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、又はゼラチン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；ヒスチジン、グルタミン、リシン、アスパラギン、アルギニン、又はグリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む炭水化物；単糖類；二糖類；他の糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；キレート剤、例えば、EDTA；非イオン性界面活性剤、例えば、ツイーン、プルロニック又はポリエチレングリコール；メチオニン、アルコール酸及びトコフェロールを含む抗酸化剤；及び/又は保存剤、例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコール又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルパラベン又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール。

10

20

【0190】

この医薬組成物は、本発明の少なくとも1つのペプチド、ペプチド複合体又は核酸を含む；しかしながら、これはまた、本発明の1つ又はそれより多い異なるペプチド及び/又はペプチド複合体及び/又は核酸を含むカクテル（すなわち、単純な混合物）を含むことができる。この発明のペプチド（複数を含む）又はペプチド複合体（複数を含む）はまた、製薬学的に許容される塩の形態で使用することができる。この発明のペプチドと塩を形成することができる適切な酸及び塩基は、当技術分野における当業者に周知であり、無機及び有機の酸及び塩基を含む。

【0191】

好ましくは、この医薬組成物は、2インテグリン関連疾患若しくは障害を処置し、又は予防するために使用することができる。この発明の文脈では、2インテグリン関連疾患若しくは障害とは、1つ又はそれより多い2インテグリン機能又は活性に關与している、1つ又はそれより多い2インテグリン機能又は活性によって引き起こされる、1つ又はそれより多い2インテグリン機能又は活性が引き起こす一因となる、又は1つ又はそれより多い2インテグリン機能又は活性によって侵されるいずれかの好ましからざる体の状態として理解されうる。こうした例としては、コラーゲン媒介性の細胞増殖の増大又は異常、又はサイトカインの分泌などの2インテグリンが媒介する異常な細胞反応が關与するシグナル伝達経路又はプロセスが含まれ、その結果、例えば、血管新生、炎症性状態、又は創傷治癒障害に至る。具体的な例としては、以下が含まれるが、これらに限定されない：血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含む癌、膵臓癌、大腸癌、例えば、大腸癌から他の器官（例えば、肺及び肝臓）への転移性拡大、及びメラノーマ、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植に対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、レイノー症候群、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、アテローム性動脈硬化症、及び炎症反応を誘発する感染症。

30

40

【0192】

この発明の1つの実施態様では、この医薬組成物は、血管疾患及び/又は血栓症を処置する、又は予防するため、具体的には、例えば、急性冠動脈症候群、経皮的冠動脈インターベンション、虚血性脳卒中、頸動脈狭窄又は末梢動脈閉塞性疾患のようないくつかの臨

50

床的適応疾患の処置に使用することができる。

【0193】

この発明の関連では、処置又は予防は、処置（すなわち、疾患状態又は障害を減少させるか、又は消失させるため、あるいは疾患状態又は障害がまだ露呈していない個体における、疾患状態又は障害の発現を防止するか、又は遅延させるため）が必要なあらゆる動物（非ヒト又はヒト、特にヒト、家畜又はペット動物などの哺乳類）に作用することができる。

【0194】

2 1 インテグリンは、血栓症の処置又は予防における注目に値する標的である。
 2 1 ノックアウトマウスを用いるインビボ試験によって、血栓の形成の減少、及び動脈血栓症モデルの閉塞までの時間の増加、並びに尻尾出血時間の延長が示された。2 インテグリン欠損及び多形型に関する臨床試験では、患者は、軽度から重度の出血障害及び血小板の正常に機能しないコラーゲン反応を示した。多形型は、2 1 の発現の増加をもたらし、その結果、< 62 の年齢の個体において致命的ではない心筋梗塞に対する非依存性危険因子、< 50 の年齢の患者において卒中発作の危険の増加、そしてII型糖尿病において糖尿病性網膜症の発症に対する危険の増加を引き起こした。更に、血小板及び2 インテグリンは、血管新生、腫瘍の進行/転移に関与している。従って、癌は更なる関心対象の治療分野である。2 インテグリンを阻害することによって、インビトロにおけるストロマ腫瘍浸潤に拮抗し、そして特に、インテグリン - ECM / 2 インテグリン媒介I型コラーゲン粘着 (Integrin-ECM/ 2 integrin-mediated type I collagen adhesion) は、インビトロにおける膵臓癌における悪性表現型の進展に関与していることが示されている。インビボでは、抗 2 拮抗性 mAb (anti- 2 antagonistic mAbs) は、ラットモデルにおける手術によって誘発される肝臓転移の拡大を防止し、多能性ヒト結腸直腸癌細胞の分化を阻害し、そしてヒト扁平上皮癌異種移植片 (human squamous cell carcinoma xenografts) の増殖及び血管新生を抑制する。

【0195】

結腸直腸癌の場合には、原発性結腸直腸癌の除去は、逆説的ではあるが、転移発症の危険性を増加させるということが示されているが、その理由としては、事例証拠蓄積によって外科的損傷が腫瘍増殖を刺激しうることが示唆されている。手術の間の原発性腫瘍の操作によって、複雑な細胞変化の必要性を解消する腫瘍細胞離脱がもたらされる。加えて、手術損傷によって内皮下ECMの曝露が誘発され、その結果、通例発現されるインテグリンを介する結合を容易にし、腫瘍細胞接着が促進される。動物モデルでは、腫瘍細胞上の2 インテグリンをブロックすると、手術によって誘発された接着が完全に消失され、そして腹部手術の後、肝臓転移の進展した結果が完全に前の状態に回復した。

【0196】

膵臓癌の場合には、最新の治療はしばしば、それが生命をたった4ヶ月延長するだけなので、不十分である。特に、インテグリン - ECM 及び 2 1 - インテグリン媒介I型コラーゲン粘着は、インビトロにおいて膵臓癌の悪性の表現型に関与している。mAbのような2 1 インテグリン機能の阻害剤を用いる動物モデルにおける試験が、正式に認可され、そして膵臓癌の処置における治療的有効性の有無が評価されるべきである。

【0197】

こうした知見に基づいて、2 及び / 又は a 2 1 インテグリンを機能的にブロックすることによって、注目に値する治療機会（特に結腸直腸癌及び膵臓癌に対して）が提供されうる。

【0198】

この発明の第九の局面は、2 インテグリン発現の変化に関連する疾患を診断する方法であって、

その方法が、

a) 2 インテグリンを含む対象からのサンプルを、本発明のペプチド又はペプチド複合体と接触させることと；

10

20

30

40

50

b) 2 インテグリンの、このペプチド又はペプチド複合体への結合を検出することと；及び

c) 工程 b) の結合を参照と比較することを含んでなり、上記において、参照と比較してサンプル中の 2 インテグリンの結合の変化が、疾患の存在を示す、前記方法に関する。この結合の変化は、工程 b で参照サンプルと比較して検出し、例えば、シグナルの変化（すなわち、シグナルの増加又は減少）によって特定される。

【0199】

この発明のペプチド（複合体）はまた、診断アッセイのために使用することができる。上記に詳述したように 2 インテグリン及び / 又はその変異体（mutations）の発現の変化は、特定の疾患に関連しうる。従って、このペプチド（複合体）は、2 インテグリンへの結合を決定するために使用することができる。コントロール又は参照と比較して結合（量的に又は質的に）が変化する場合には、このことによって疾患の存在を示すことができる。

【0200】

従って、この発明の別の局面は、2 インテグリンの変化に関連する疾患を診断する方法であって、その方法が、

a) 個体の取得されたサンプルを、この発明のペプチド又はペプチド複合体と接触させることと；及び

b) 2 インテグリンの、このペプチド又はペプチド複合体への結合を検出することと；及び

c) 工程 b) の結合を、1 つ又はそれより多い参照サンプルにおけるペプチド又はペプチド複合体への 2 インテグリンの結合と比較することを含んでなり、上記において、1 つ又はそれより多い参照サンプルにおいて検出される結合と比較して、取得されたサンプルにおける結合の変化が、疾患を示す、前記方法に関する。

【0201】

一般的に、対象から得られる試験サンプルは、2 インテグリンに特異的に結合する本発明のペプチド（複合体）と接触させることができる。所望により、このペプチド（複合体）は、この抗体を試験サンプルと接触させる前に、固体支持体に固定し、複合体の洗浄及びその後の単離を容易にすることができる。固体支持体の例には、例えば、マイクロタイタプレート、ガラス顕微鏡スライド、又はカバースリップ、スティック、ピース、又はマイクロピースの形態の、ガラス又はプラスチックが含まれる。

【0202】

サンプルを抗体と共にインキュートした後、この混合物を洗浄し、そして形成されたペプチド（複合体） / 2 インテグリン / 複合体を検出することができる。このことは、洗浄した混合物を検出試薬と共にインキュベートすることによって達成することができる。この検出試薬は、検出可能な標識を使用することによってなされうる。種々の標識及び検出方法が当業者によって知られている。検出可能な標識に関しては、当技術分野において知られている任意の検出可能な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、および ^{33}P など）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース 6 - リン酸デヒドロゲナーゼなど）、化学発光標識（例えば、アクリジニウムエステル、アクリジニウムチオエステル、アクリジニウムスルホンアミド、フェナントリジニウムエステル、ルミナル、イソルミノールなど）、蛍光標識（例えば、フルオレセイン（例えば、5 - フルオレセイン、6 - カルボキシフルオレセイン、3'6 - カルボキシフルオレセイン、5(6) - カルボキシフルオレセイン、6 - ヘキサクロロフルオレセイン、6 - テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）、ローダミン、フィコピリプロテイン、R - フィコエリスリン、量子ドット（例えば、硫化亜鉛でキャップされたセレン化カドミウム）、温度測定標識（thermometric label）、タグ（上記に定義され

10

20

30

40

50

ているような)又は免疫-ポリメラーゼ連鎖反応標識でありうる。

【0203】

アッセイを通して、インキュベーション及び/又は洗浄工程は、試薬のそれぞれの組み合わせの後に必要でありうる。インキュベーション工程は、約5秒から数時間、好ましくは、約5分から約24時間に至るまで変化しうる。しかしながら、このインキュベーション時間は、アッセイフォーマット、バイオマーカー(抗原)、溶液量、濃度などによって左右されるであろう。通例、このアッセイは、周囲温度で行なわれるが、それらは10~40のような温度範囲にわたって行なわれうる。

【0204】

便宜上、このペプチド(複合体)は、キットの形態で提供することができ、該キットは、診断アッセイを行なうことを含む、例えば、使用指示書を含む所定量の試薬のパッケージされた組み合わせである。このペプチド(複合体)が酵素で標識されている場合には、このキットは酵素が必要とする基質及びコファクター(例えば、検出可能な発色団、又はフルオロフォアを提供する基質前駆体)を含むであろう。他の添加剤としては、例えば、安定化剤、バッファー(例えば、ブロックバッファー(block buffer)又はライシスバッファー(lysis buffer))などをキットの中に入れることができる。このキットで提供される種々の試薬の相対量は、広範囲に変化することができ、例えば、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度が提供される。この試薬は、溶解すると適切な濃度を有する試薬溶液を提供することになる、例えば、賦形剤を含む、乾燥粉末、通例、凍結乾燥として提供されうる。

【0205】

参照は、健常対象からのサンプルであってもよいし、それとも健常対象集団で決定されてもよい:あるいは、これは公知の参照値でありうる。当技術分野における当業者であれば、2つの値が互いに有意に異なっているかどうかを評価する統計的手順(例えば、チューデントのt検定又はカイ二乗検定)を知っている。更に、当業者であれば適切なコントロールを選択する方法を知っている。

【0206】

用語“対象からのサンプル(sample from a subject)”及び“試験サンプル(test sample)”は、すべての生体液、所与の対象、特にヒトから分離された排出物及び組織に関連する。この発明の文脈では、こうしたサンプルには、血液、血清、血漿、乳頭吸引液、尿、精液(semen)、精液(seminal fluid)、精漿、前立腺液、排泄物、涙、唾液、汗、生検(biopsy)、腹水、脳脊髄液、母乳、リンパ液、気管支及び他の洗浄サンプル、又は組織抽出サンプルが含まれるが、これらに限定されない。この発明の関連では、通例、血液サンプルが使用のための好ましい試験サンプルである。

【0207】

第十の局面では、この発明は、以下:

- a) 包装材料(例えば、ペプチド又はペプチド複合体のための1つ又はそれより多い容器、及びラベル又はパッケージインサート)
- b) この発明のペプチド又はペプチド複合体又はその製薬学的に許容される塩、
- c) ラベル(例えば、書面情報及び/又はバーコード及び/又は他のあらゆる種類の情報を含む)、又はパッケージインサート(すなわち、チップ、リーフレット、ブックレットなどのあらゆる種類のデータキャリア)

を含んでなる製品であって、

前記パッケージ材料の中に含まれている前記インサートは、本明細書中で定義されているように、前記ペプチド又はペプチド複合体が疾患又は障害、特に2インテグリン関連疾患・障害の処置に有効であることを表示している、前記製品に関する。

【0208】

第十一の局面では、この発明は、2インテグリン関連障害若しくは疾患の診断のための診断キットであって、該キットが、この発明のペプチド又はペプチド複合体及び適切な包装、及び場合により、2インテグリンの検出の際に前記ペプチド又はペプチド複合体

を使用するための適切な使用説明書を含んでなる、前記診断キットに関する。

【0209】

この発明の第九の局面による診断キットは、第九の局面において定義されているようなコンポーネントを少なくとも含み、そして所望により、1つ又はそれより多い更なるコンポーネント（例えば、サンプル中のアルファ2インテグリンの検出を行なうのに必要、又は適切なバッファー及び他の試薬、又は所与の疾患のアルファ2インテグリン又は他のマーカーを検出する他の手段、又はネガティブ/ポジティブスタンダード、1つ又はそれより多い適切な容器内に適切に含まれているアルファ2インテグリン（ペプチド/ペプチド複合体）複合体を検出し、及び/又は視覚化し、及び/又は定量化するための1つ又はそれより多い二次抗体（適切に標識されている））を含んでなり、前記コンポーネントは、好ましくは、空間的にまとめられたユニットが一緒になり、そして2インテグリン関連障害若しくは疾患の診断において使用することが意図されている、製品である。

10

【0210】

第九の局面の一実施態様によれば、このキットは更に、この発明の第七又は第十一の局面及びその実施態様のいずれか1つによる方法のための使用指示書を含むデータキャリアを含んでなる。

【0211】

第十二の局面では、この発明は、この発明の1つ又はそれより多いペプチド又はペプチド複合体及び/又は1つ又はそれより多い核酸を使用する、2インテグリン関連障害若しくは疾患の処置又は診断方法に関する。

20

【0212】

従って、この発明の局面は、2インテグリンの変化に関連する疾患を診断する方法であって、

その方法が、

a) 個体の取得されたサンプルを、この発明のペプチド又はペプチド複合体と接触させることと；及び

b) 2インテグリンの、このペプチド又はペプチド複合体への結合を検出し、及び/又は定量化することと；及び

c) 工程b)の結合を、1つ又はそれより多い参照サンプル中の2インテグリンのペプチド又はペプチド複合体への結合と比較することを含んでなり、

30

上記において、1つ又はそれより多い参照サンプル中で検出される結合と比較して、取得されたサンプルにおける結合の変化が、疾患の存在を示す、前記方法に関する。この結合は、公知の方法を用いて親和性（例えば、KD、Koff、Kon比）の観点から、あるいは単に、例えば、参照サンプルのものと比較して、ペプチド/ペプチド複合体に対する標識抗体によってもたらされる、ペプチド/ペプチド-複合体-アルファ2インテグリン複合体のシグナル（強度）によって検出又は定量化されうる。

【0213】

特に、この発明の文脈における“参照個体（reference individual）”、“参照サンプル（reference sample）”又は“参照値（reference value）”の文脈における用語“参照（reference）”とは、ある種の（健常な）状態、疾患などについて特徴的、又は代表的である比較の対象又は標準物を意味する。すなわち、参照値は、ある種の状態（例えば、疾患状態又は健常状態）に典型的であるパラメーター（例えば、ある種のインジケータ/バイオマーカー分子の発現レベル）の標準的な値であり、参照個体は、比較のために選択され、そしてある種の健常状態又は疾患を有する個体であり、参照サンプルは、例えば、参照個体に起源するサンプル、あるいは疾患状態又は健常状態に典型的である、ある種のインジケータ又はバイオマーカーの特徴的なレベルを有する人工的なサンプルでありうる。

40

【0214】

本明細書中で使用される際には、用語“参照サンプル（reference sample）”とは、関心対象サンプルと実質的に同一の方法で解析され、その情報を関心対象サンプルの情報と

50

比較するサンプルを意味する。その結果、参照サンプルによって、関心対象サンプルから得られた情報の評価を可能にする標準物が提供される。

【0215】

参照サンプルは、健常又は正常組織、器官又は個体から誘導することができ、その結果、組織、器官又は個体の健常状態の標準物が提供される。正常な参照サンプルの状態と関心対象サンプルの状態の違いによって、疾患の発症のリスク、あるいはその存在、あるいはそうした疾患又は障害の更なる進行を示すことが可能である。

【0216】

参照サンプルは、異常又は疾患組織、器官又は個体から誘導され、それによって組織、器官又は個体の疾患状態の標準物が提供されうる。異常な参照サンプルの状態と、関心対象サンプルの状態の違いによって、疾患の発症のリスクが低いこと、あるいは、そうした疾患又は障害が存在しないこと、又は改善されることを示すことができる。

10

【0217】

参照サンプルはまた、関心対象サンプル（先のより早い時点で取得された）と同じ組織、器官、又は個体から誘導されうる。先に取得された参照サンプルの状態と、関心対象サンプルの状態の違いによって、疾患の進行、すなわち、経時的に疾患が改善されているか、又は悪化しているかを示すことができる。参照サンプルの取得と、関心対象サンプルの取得の間に期間が経過した場合には、参照サンプルは、先のより早い時点又はその後のより遅い時点で取得した。こうした期間は、年（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100年）、月（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12月）、週（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8週）、日（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500日）、時間（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間）、分（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60分）、又は秒（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60秒）を表すことができる。

20

【0218】

疼痛の状態またはステージについて代表的な参照サンプルは、例えば、本明細書中で定義されているような、すなわち、アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患と診断されうる障害又は疾患に罹患していることが知られているコントロール対象に起源されうる。このコントロール対象は、ヒトのような哺乳類、げっ歯動物類（例えば、ラット、ハムスター、又はマウス）又はサルであってもよいし、それとも鳥類のような哺乳類以外の他の動物であってもよい。

30

【0219】

好ましくは、サンプル又は値、及び参照サンプル又は値の双方とも、同じ種の対象（例えば、ヒト）、より好ましくは、同じ性（例えば、雌性又は雄性）及び/又は類似の年齢又は生活相（例えば、乳幼児、若年小児、年少者、成人、又は高齢者）の対象に起源する。

【0220】

この発明の異なった局面及び実施態様における参照又は参照サンプルは、好ましくは、健常な個体、罹患している個体、又は関心対象サンプルと同じ個体に起源する。参照（例えば、参照値）又は参照サンプルが関心対象サンプルと同じ個体から取得された場合には、この参照（例えば、参照値）又は参照サンプルは、好ましくは、先のより早い、又はその後のより遅い時点で、次いで関心対象サンプルが取得された。参照（例えば、参照値）又は参照サンプルの取得と、参照（例えば、参照値）又は関心対象サンプル又は値の取得の間に経過した期間は、年（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100年）、月（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12月）、週（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8週）、日（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35

40

50

、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500日)、時間(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間)、分(例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60分)、又は秒(例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60秒)を表す。これに代えて、あるいはこれに加えて、参照サンプルは、健常な個体を表しているアルファ2インテグリンのレベルを有するか、あるいはアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在するか、又は存在しないことを表しているアルファ2インテグリンのレベルを有するか、あるいはアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大しているか又は減少しているかを表しているアルファ2インテグリンのレベルを有する参照サンプルである。

10

【0221】

参照又は参照サンプルが、健常な個体、あるいはアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが低下している、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在しないことを表しているアルファ2インテグリンのレベルを有している個体から誘導される実施態様では、参照サンプル又は値において、又は前記参照値又は参照サンプルと比較して関心対象のサンプル又は値において、アルファ2インテグリンのレベルの上昇は、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が進行していることを示す。参照が、罹患している個体、あるいはアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大している、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していることを表している値を有している個体から誘導される実施態様では、アルファ2インテグリンの同程度のレベルは、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が進行していることを示す。

20

【0222】

参照(値)又は参照サンプルが、先の早い時点において関心対象の個体と同じ個体(から)である実施態様では、関心対象の個体/値/サンプルにおけるアルファ2インテグリンのレベルの上昇は、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が進行していることを示す。参照(値)又は参照サンプルが、先の早い時点において、関心対象の個体/サンプルと同じ個体(から)である実施態様では、関心対象のサンプルにおけるアルファ2インテグリンのレベルの低下は、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が変化していること、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が改善されているか、又は存在していないこと、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが減少していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患の進行が低下していることを示す。

30

40

【0223】

参照(値)又は参照サンプルが、先の早い時点において関心対象サンプル/値と同じ個体(から)である実施態様では、関心対象サンプルにおけるアルファ2インテグリンの同程度のレベルは、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症する同様なリスクがあること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患の進行が止まっていること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が持続していることを示す。

【0224】

参照(値)又は参照サンプルが、健常な個体から、又はアルファ2インテグリン関連障

50

害若しくは疾患を発症するリスクが低下している個体から誘導され、あるいは健常な個体を表しているアルファ2インテグリンのレベル、又は疾患が存在していない状態、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが低下している状態を含む実施態様では、アルファ2インテグリンのレベル上昇は、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が進行していることを示す。

【0225】

参照(値)又は参照サンプルが、罹患している個体から、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大している個体から誘導され、あるいは罹患している個体、又は疾患が存在している状態、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していることを表しているアルファ2インテグリンのレベル若しくは量を含む実施態様では、アルファ2インテグリンの同程度のレベルは、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が進行していることを示す。

10

【0226】

参照(値)又はサンプルが、関心対象サンプル(先の早い時点で取得された)と同じ個体から誘導される実施態様では、関心対象サンプルにおけるアルファ2インテグリンのレベルの上昇は、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が存在していること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが増大していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が進行していることを示す。

20

【0227】

参照(値)又は参照サンプルが、関心対象サンプル(先の早い時点で取得された)と同じ個体から誘導される実施態様では、関心対象サンプルにおけるアルファ2インテグリンのレベルの減少は、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が変化していること、又はアルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が改善されているか、若しくは存在していないこと、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが減少していること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患の進行が低下していることを示す。参照サンプルが関心対象サンプル(先の早い時点で取得された)と同じ個体から誘導される実施態様では、関心対象サンプルにおけるアルファ2インテグリンの同程度のレベルは、その個体において、(a)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患を発症するリスクが同程度であること、及び/又は(b)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患の進行が止まっていること、及び/又は(c)アルファ2インテグリン関連障害若しくは疾患が持続していることを示す。

30

【0228】

この発明の異なる局面の好ましい実施態様によれば、このペプチド又はペプチド複合体は、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントを含んでなるか、又はそれらから成る(それらである)。下記において、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原-結合性フラグメントに関する一部の好ましい実施態様が列挙されている:

40

1. 単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又はフラグメントは、ヒト2インテグリンのE-ドメインに特異的に結合し、前記抗体又はフラグメントは、重鎖可変領域(VH)ドメイン及び軽鎖可変領域(VL)ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、非ヒト霊長類の2インテグリンを交差反応するが、非霊長類の2インテグリンとは交差反応しない、前記単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

2. 単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体

50

又はフラグメントは、ヒト 2 インテグリンの I - ドメインに特異的に結合し、前記抗体は、重鎖可変領域 (V H) ドメイン及び軽鎖可変領域 (V L) ドメインを含んでなり、前記抗体又はフラグメントは、参照抗体のエピトープとの結合について参照抗体と競合し、前記参照抗体は、アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 4 にて D S M Z に寄託されているプラスミドによってコードされる軽鎖、及び (i) アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 6 にて D S M Z に寄託されているプラスミド、又は (i i) アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 5 にて D S M Z に寄託されているプラスミドのいずれかによってコードされている重鎖を含んでなる、前記単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

3 . 前記実施態様 1 又は 2 に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記抗体又はフラグメントは、ヒト 2 インテグリンの I - ドメインに n M レベルの結合親和性で特異的に結合する、前記抗体、又はその抗原結合部分。 10

4 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記抗体又はフラグメントは、インビトロでヒト 2 インテグリンのコラーゲンとの相互作用を阻害し、それによって、前記血小板と前記コラーゲンの粘着による血小板の活性を阻害する、前記抗体、又はその抗原結合部分。

5 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域ドメインは、配列番号 5 の重鎖 H C D R 3 を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

6 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域ドメインは、配列番号 3 (H C D R 1)、配列番号 4 (H C D R 2)、及び配列番号 5 (H C D R 3) の重鎖 C D R、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。 20

7 . 実施態様 6 に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、 H C D R 2 の機能的に活性な変異体は、6 位のアミノ酸での A s p G l u の変異を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

【 0 2 2 9 】

8 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域ドメインは、配列番号 8 の軽鎖 L C D R 3 を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。 30

9 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域ドメインは、配列番号 6 (L C D R 1)、配列番号 7 (L C D R 2)、及び配列番号 8 (L C D R 3) の軽鎖 C D R、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

1 0 . 実施態様 9 に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、 L C D R 1 の機能的に活性な変異体は、1 1 位のアミノ酸での A s n G l n の変異を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

1 1 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域 (V H) ドメインは、配列番号 2 の V H 配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 % 又は 9 9 % の配列同一性を有している、前記抗体、又はその抗原結合部分。 40

1 2 . 実施態様 1 1 に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域 (V H) ドメインは、配列番号 2 の配列又はその機能的に活性な変異体 (functionally active thereof) を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

1 3 . 先行する実施態様のいずれか 1 つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域 (V L) ドメインは、配列番号 1 の V L 配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 % 又は 9 9 % の配列同一性を有する、前記抗体、又はその抗原結合部分。

1 4 . 実施態様 1 3 に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域 (V L) ドメインは、配列番号 1 の配列又はその機能的に活性な変異体 (functionally act 40

ive thereof) を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

15. 先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域(VH)ドメインは、H5、H7、H11、H12、H17、H20、H38、H40、H43、H55、H61、H65、H66、H67、H76、H81、H82、H87、H91、H93、H112、H113及びH116から成る群より選択される位置における1つ又はそれより多いアミノ酸置換を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

16. 実施態様15に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、1つ又はそれより多いアミノ酸置換は、5His Val、7Pro Ser、11Leu Val、12Val Lys、17Pro Ser、20Leu Val、38Lys Arg、40Arg Ala、43Arg Gln、55Asp Glu、61Asn Ala、65Lys Gln、66Asp Gly、67Lys Arg、76Ser Thr、81Ile Met、82Gln Glu、87Thr Arg、91Ser Thr、93Val Lys、112Thr Leu、113Leu Val及び116Ser Valから成る群より選択される、前記抗体、又はその抗原結合部分。

【0230】

17. 先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域(VL)ドメインは、L9、L12、L15、L22、L34、L46、L47、L80、L83、L85、L87、及びL89から成る群より選択される位置における1つ又はそれより多いアミノ酸置換を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

18. 実施態様17に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、1つ又はそれより多いアミノ酸置換は、9Ala Ser、12Ala Ser、15Leu Val、15Leu Pro、22Ser Thr、34Asn Gln、46Gln Lys、47Ala Pro、80Asp Asn、83Glu Gln、85Asp Glu、87Ala Thr及び89Thr Asnから成る群より選択される、前記抗体、又はその抗原結合部分。

19. 先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域(VH)ドメインは、配列番号38(HC1)、配列番号39(HC2)、配列番号40(HC3)、配列番号41(HC4)、配列番号42(HC5)、配列番号43(HC6)、及び配列番号44(HC7)から成る群より選択されるVH配列に対して、少なくとも90%、95%、97%又は99%の配列同一性を有する、前記抗体、又はその抗原結合部分。

20. 実施態様19に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記重鎖可変領域(VH)ドメインは、配列番号38(HC1)、配列番号39(HC2)、配列番号40(HC3)、配列番号41(HC4)、配列番号42(HC5)、配列番号43(HC6)、及び配列番号44(HC7)から成る群より選択されるVH配列を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

21. 先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域(VL)ドメインは、配列番号33(LC1)、配列番号34(LC2)、配列番号35(LC3)、配列番号36(LC4)、及び配列番号37(LC5)から成る群より選択されるVL配列に対して、少なくとも90%、95%、97%又は99%の配列同一性を有する、前記抗体、又はその抗原結合部分。

22. 実施態様21に記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記軽鎖可変領域(VL)ドメインは、配列番号33(LC1)、配列番号34(LC2)、配列番号35(LC3)、配列番号36(LC4)、及び配列番号37(LC5)から成る群より選択されるVL配列を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

23. 先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、前記抗体、又はその結合部分は、キメラ抗体又はヒト化抗体である、前記抗体、又はその抗原結合部分。

10

20

30

40

50

24．先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、抗原結合部分は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィドにより連結されたFv、scFv、及び(scFv)₂から成る群より選択される、前記抗体、又はその抗原結合部分。

【0231】

25．先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、抗体又は結合部分は、多特異性抗体(multispecific antibody)、デュアル特異性抗体(dual specific antibody)、アイソタイプ抗体(isotype antibody)、デュアル可変ドメイン抗体(dual variable domain antibody)及び二特異性抗体(bispecific antibody)から成る群より選択される、前記抗体、又はその抗原結合部分。

10

26．先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、抗体又は結合部分は、ヒトIgM定常ドメイン、ヒトIgG1定常ドメイン、ヒトIgG2定常ドメイン、ヒトIgG3定常ドメイン、ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、ヒトIgE定常ドメイン、及びヒトIgA定常ドメインから成る群より選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

27．先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分であって、抗体又は結合部分は、ヒトIgG4定常ドメインを含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

28．先行する実施態様のいずれか1つに記載の抗体又はその抗原結合部分のアミノ酸配列をコードする単離された核酸。

20

29．実施態様28に記載の核酸を含んでなる組み換え発現ベクター。

30．実施態様29に記載の組み換え発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

31．実施態様1～26のいずれか1つに記載の抗体又は抗原結合性フラグメントを作製する方法であって、抗体が宿主細胞によって作製されるような条件下にて実施態様30に記載の宿主細胞を培養することを含んでなる、前記方法。

32．実施態様1～27のいずれか1つに記載の抗体、又はその抗原結合部分と、1つ又はそれより多い製薬学的に許容される担体を含んでなる医薬組成物。

33．2インテグリン関連障害若しくは疾患を処置し、予防し、又は診断する方法であって、その方法が、実施態様32に記載の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含んでなる、前記方法。

30

34．実施態様33に記載の方法であって、2インテグリン関連疾患若しくは障害は、血栓症、血管疾患、血管新生及び転移を含む癌、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び異常な又は増加した新脈管形成によって特徴付けられる疾患、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植に対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、レイノー症候群、実験的自己免疫性脳脊髄炎、シェーグレン症候群、強皮症、心血管疾患、乾癬、及び炎症反応を誘発する感染症から成る群より選択される、前記方法。

35．実施態様33に記載の方法であって、2インテグリン関連疾患若しくは障害は、急性冠動脈症候群、経皮的冠動脈インターベンション、虚血性脳卒中、頸動脈狭窄又は末梢動脈閉塞性疾患から成る群より選択される、前記方法。

40

【0232】

36．2インテグリンの変化に関連する疾患を診断する方法であって、その方法が、

a) 2インテグリンを含むサンプルを実施態様1～27のいずれか1つに記載の、抗体又は抗原結合性フラグメントと接触させることと；

b) 2インテグリンの、この抗体又は抗原結合性フラグメントへの結合を検出することと；及び

c) 工程b)の結合を参照と比較することを含んでなり、

上記において、参照と比較してサンプル中の2インテグリンの結合の変化が、疾患の存在を示す、前記方法。

50

37. a) 包装材料、
 b) 実施態様 1 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の抗体又は抗原結合性フラグメント、
 c) ラベル又はパッケージインサート

を含んでなる製品であって、

このパッケージ材料内に含まれている前記インサートが、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、 $\alpha 2$ インテグリン関連疾患・障害の処置又は診断に有効であることを表示している、前記製品。

【0233】

本発明は、本明細書中で述べられている特定の方法、プロトコル、及び試薬に限定されることはなく、それはそれらが変化する場合がありうるからである。更に、本明細書中で使用されている用語定義は具体的な実施態様を説明する目的のためであり、この発明の範囲を限定する意図ではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲中で使用されている際には、単数形“a”、“an”、及び“the”は、この文脈で明瞭にそうではないと指示しない限り、複数の言及も含む。同様に、語“含んでなる (comprise)”、“含む (contain) 及び“包含する (encompass)”は、排他的 (exclusively) ではなく、包括的 (inclusively) に解釈されなければならない。

10

【0234】

特段明記しない限り、本明細書中で使用されているすべての技術及び科学用語、並びにすべての頭字語は、本発明の技術分野における当業者によって通例理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で述べられているものと類似、又は等価なあらゆる方法及び材料がこの発明の実施の中で使用されうるが、好ましい方法、及び材料は本明細書中に記載されている。

20

【0235】

本発明は更に、下記の実施例によって説明される。しかしながら、こうした実施例は、単に説明の目的だけのものであり、別途具体的に指示されない限り、本発明の範囲を限定する意図はない。

【図面の簡単な説明】

【0236】

【図1】A及びBは、HUVEC MesoScale Technologyによるハイブリドーマ上清から精製した抗 $\alpha 2$ インテグリン m A B の結合を示す。

30

【図2】ハイブリドーマ上清から精製した抗 $\alpha 2$ インテグリン m A B のHUVEC血管新生に対する作用を示す。抗 $\alpha 2$ インテグリン m A b は、FGF2によって誘発された血管新生を用量依存的に阻害することができた。

【図3】抗 $\alpha 2$ インテグリン m A b - F a b による流動状態下でのコラーゲンへの血小板粘着阻害を示す。抗凝集ヒト血液を、DiOC6(3)色素及び抗 $\alpha 2$ インテグリン F a b の階段希釈液と共に、37℃で10分間インキュベートする。次いでこの血液を、コラーゲンコートキャピラリーを通してずり速度3000 s⁻¹で流動させる。被覆面積を表している例としての10個の写真から、表面被覆率を算出する。こうした値は、抗 $\alpha 2$ インテグリン F a b の用量依存的な作用として前記表面被覆率による阻害パーセンテージを示す。

40

【図4】マカカ (macaca: オナガザル科; カニクイザル) (図4 a 及び図4 b) 及びヒト (図4 c 及び図4 d) に由来するハイブリドーマ上清及び血液サンプルからの $\alpha 2$ m A b を用いてFACS解析によって行なわれた種差間交差反応試験 (interspecies cross reactivity studies) を示し、図4 a 及び図4 c は、一次抗体を使用せずに二次抗体を使用してネガティブコントロールのみを表す。

【図5】図5 a) は、ハイブリドーマによって作製された抗 $\alpha 2$ インテグリンモノクローナルマウス抗体の可変軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号1) 及びコード配列 (配列番号12) を示す。図5 b) は、抗 $\alpha 2$ インテグリンモノクローナルマウス抗体の可変重鎖のアミノ酸配列 (配列番号2) 及びコード配列 (配列番号13) を示す。アミノ酸配列において、CDRは、ボールド体でマークがつけられ、下線が引かれている。

50

【図6】抗 2 インテグリンモノクローナルマウス抗体の異なるCDRのアミノ酸配列を示し、図6 aは重鎖CDRを示し、そして図6 bは軽鎖CDRを示し、HCDR1は配列番号3であり、HCDR2は配列番号4であり、HCDR3は配列番号5であり、LCDR1は配列番号6であり、LCDR2は配列番号7であり、LCDR3は配列番号8である。

【図7-1】実施例中で詳述されているように、上記のマウス可変軽鎖領域(配列番号1)又は可変重鎖領域(配列番号2)を、ヒト定常領域(の一部)と連結させることによって作製されたキメラコンストラクトの配列を示す。図7 aは、キメラ軽鎖のアミノ酸配列(配列番号9)及びコード配列(配列番号14)を示し、図7 bは、キメラ重鎖のアミノ酸配列(配列番号10)及びコード配列(配列番号15)を示し、図7 cは、キメラ重鎖Fabフラグメントのアミノ酸配列(配列番号11)及びコード配列(配列番号16)を示す。アミノ酸配列において、CDRは下線が引かれており、2可変ドメインに相当する配列は、ボールド体でタイプされており、そしてHisタグはイタリック体で書かれている。

【図7-2】図7-1の続きである。

【図8】キメラコンストラクトの作製のために使用される種々のヒト定常領域のアミノ酸配列を示す。配列番号17は、ヒトIGKCタンパク質、配列番号9による軽鎖キメラの作製に使用される軽鎖定常領域[スイスプロットアクセッション番号(Swiss-Prot accession number)Q502W4]のアミノ酸配列であり、配列番号18は、ヒト変異IGHG4、配列番号10(変異したアミノ酸はボールド体でタイプされている)による重鎖キメラの構築に使用される重鎖定常領域[スイスプロットアクセッション番号P01861.1]のアミノ酸配列であり、配列番号19は、ヒトIGHG1タンパク質、配列番号11による重鎖Fabフラグメントキメラの作製に使用されるスイスプロットアクセッション番号Q569F4による重鎖定常領域のアミノ酸配列である。

【図9-1】ヒト2及び1インテグリンのアミノ酸配列及びコード配列を示し、配列番号20は、NP_002194.2による2インテグリン前駆体タンパク質のアミノ酸配列である。実験に使用され、大腸菌において組み換え発現されたI-ドメインについては、下線が引かれ、かつボールド体でタイピングされている。配列番号21は、NCBIアクセッション番号(NCBI accession number): NM_002203.3による2インテグリンのコード配列であり、配列番号22は、NCBIアクセッション番号: NP_002202.2による1インテグリンアイソフォーム1A前駆体タンパク質のアミノ酸配列であり、そして配列番号23は、NCBIアクセッション番号: NM_002211.3による1インテグリンアイソフォーム1Aのコード配列である。

【図9-2】図9-1の続きである。

【図9-3】図9-2の続きである。

【図9-4】図9-3の続きである。

【図9-5】図9-4の続きである。

【図9-6】図9-5の続きである。

【図9-7】図9-6の続きである。

【図10-1】MSによって検証された、マウスハイブリドーマに起源するオリジナルマウス抗2インテグリン抗体のアミノ酸配列及びコード配列を示し: 配列番号45(図10 a)は、抗2インテグリンmABのLCをコードするcDNAのヌクレオチド配列であり、配列番号46(図10 b)は、抗2インテグリンmABのHCをコードするcDNAのヌクレオチド配列であり、配列番号47(図10 c)は、ハイブリドーマから分泌された抗2インテグリンmABのLCのアミノ酸配列であり、配列番号48(図10 d)は、ハイブリドーマから分泌された抗2インテグリンmABのLCのアミノ酸配列である。配列番号53(図10 e)は、コンパレーター(comparator)mAb TMC2206のLCのアミノ酸配列であり、配列番号54(図10 f)は、コンパレーターmAb TMC2206のHCのアミノ酸配列である。

【図10-2】図10-1の続きである。

【図 1 1】ピアコア (Biacore) によって決定された種々のアルファ 2 インテグリン抗体の解離定数を示す。結果は、m A b T M C 2 2 0 6 の場合に対して、多くの場合において、より望ましいか、又は多くとも (at least) 等しい解離定数を示す。

【図 1 2】Biacoreを用いて測定された、非ヒト化 F a b によってプレバインディングされた (前結合 : pre-bound) インテグリン α_2 I - ドメインへのコンパレーター m A b T M C 2 2 0 6 の結合 ((s) 秒単位の時間 (x 軸) 対 (R U) レスpons単位でのレスポンスの差 (y 軸)) を示す。図 1 2 から得られることができるように、T M C 2 2 0 6 は、非ヒト化 F a b によってプレバインディングされたインテグリン I - ドメインに結合する。

【図 1 3】コンパレーター m A b T M C 2 2 0 6 によってプレバインディングされたインテグリン α_2 I - ドメインへの非ヒト化 F a b の、結合 ((s) 秒単位の時間 (x 軸) 対 (R U) レスpons単位でのレスポンスの差 (y 軸)) を示す。図 1 3 から得られることができるように、非ヒト化 F a b は、コンパレーター m A b T M C 2 2 0 6 によってプレバインディングされたインテグリン α_2 I - ドメインに結合する。

【図 1 4】洗浄血小板を用いて静止状態下におけるコラーゲンへの血小板粘着の阻害を示す。パッチ 6 6 0 は、L C 1 / H C 1 に相当し、パッチ 6 6 1 は、L C 2 / H C 2 に相当し、パッチ 6 6 2 は、L C 3 / H C 3 に相当し、パッチ 6 6 3 は、L C 3 / H C 4 に相当し、パッチ 6 6 4 は、L C 4 / H C 5 に相当し、パッチ 6 6 5 は、L C 4 / H C 6 に相当し、パッチ 6 6 6 は、L C 5 / H C 7 に相当し、そしてパッチ 6 6 7 は、コンパレーターである。この結果はまた、表 1 2 から誘導することができる。パッチ番号 6 6 0、6 6 2、及び 6 6 3 は、m A b T M C 2 2 0 6 に対して、少なくとも等しいか、あるいは更によくコラーゲンへの血小板粘着を阻害する。

【 0 2 3 7 】

実施例

実施例 1 : 機能的な抗 α_2 インテグリン m A b 及び F a b の作製及び選択

A - α_2 インテグリン m A B クローン細胞からのシーケンス単離

ハイブリドーマからの α_2 インテグリン m A b の作製及び精製

α_2 インテグリン m A B 細胞バンクの 2×10^6 細胞を含む 1 つのクライオバイアルを 3 7 °C で急速解凍した。こうした細胞を、オービタルシェーカープラットフォームによって 1 1 0 r p m で回転させながら、大気中 5 % C O₂ の加湿雰囲気下にて 3 7 °C のインキュベーター中で、1 0 % F B S、1 X I T S (Gibco 41 400-045)、1 X ビルビン酸ナトリウム (Gibco 11 360-039)、1 5 0 μ g / m L のオキサロ酢酸、2 m M のグルタミン (Gibco 25030-024) 及び 1 0 0 U / m l ペニシリン / ストレプトマイシン (Gibco 15070-063) を補充した、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco 31053-028)) から成る新鮮な 5 m L の培地を含む T - 2 5 c m² フラスコに移した。

【 0 2 3 8 】

ハイブリドーマから精製された m A b のアイソタイピングは、セロテック (Serotec) (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit; ref. MMT1) からの標準的な市販のアイソタイピングキットの使用によって行なわれ、m C k、m I g G 2 a アイソタイプが明らかにされた。

【 0 2 3 9 】

細胞は、細胞増幅のために 2 ~ 3 日ごとにサブ培養された。作製の場合には、細胞を、6 つの T 5 0 0 フラスコ (2 0 0 m L) 中に、1 0 % F B S、1 X I T S、1 X ビルビン酸ナトリウム、1 5 0 μ g / m L オキサロ酢酸、2 m M グルタミン及び 1 0 0 U / m l ペニシリン / ストレプトマイシンを補充した、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's medium) (Sigma I3390) 中、 1.8×10^5 C / m L において 1 0 日間播種した。

【 0 2 4 0 】

精製の場合には、抗 α_2 インテグリン m A b をプロテイン G アフィニティークロマトグ

ラフィー (Hitrap Protein G, GE Healthcare) によって上清から直接取得し、そして 0.1 M 酢酸によって溶出させた。Superdex 200 (GE Healthcare) 及び限外ろ過を用いる SEC によってタンパク質をポリッシング (polishing) した後、このタンパク質を指示された実験に用いた。

【0241】

2 インテグリン mAb の重鎖及び軽鎖配列の決定

モノクローナル抗体の可変ドメインをコードする cDNA は次のように得られた：mRNA を、キアゲン社 (Qiagen) からのオリゴテックスキット (Oligotex kit) を用いてハイブリドーマ細胞から抽出した。相当する cDNA を、Gene Racer キット (Invitrogen)、転写酵素 (transcriptase SuperScript III) (55 歳) (Invitrogen) 及び表 1 に述べられているプライマー (RACEMOG2a 又は CKFOR) を使用する RACE 法による RT-PCR によって増幅した。この cDNA フラグメントは、55 歳 でポリメラーゼ Phusion (Finnzymes) を用いて PCR によって増幅し、プライマーはまた、表 1 に記載されている。

10

【0242】

【表 1】

表 1. RT-PCR 及び PCR に用いられるプライマー

プライマー	5' ~ 3' の配列
5' -GeneRacer プライマー	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA (配列番号 24)
RACEMOG2a : 3' -マウスヒンジ内部プライマー (3' -Primer internal to murine hinge)	AGGACAGGGCTTGATTGTGGG (配列番号 25)
CKFOR : 3' -マウス Ck マウス内部プライマー (3' -Primer internal to murin Ck murine)	CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC (配列番号 26)

20

【0243】

重鎖 (VH) 及び軽鎖 (VL) の可変領域をコードする増幅されたフラグメントを、大腸菌中で増幅された、Invitrogen からの pCR4-Topo プラスミド中にクローニングした。次いでクローン化された cDNA を双方の鎖 (strand) 上でシーケンシングした。

30

【0244】

タンパク質配列は、こうした配列をコードするプラスミドから翻訳し、重鎖 (HC) 及び軽鎖 (LC) の質量を算出した (表 2)。得られた値は、対応するハイブリドーマの培養液から精製された mAb の作製物から得られたマスペクトル分析データと完全に一致した (表 2 参照)。HC 及び LC の核酸及びアミノ酸配列は、下記の配列表中で報告されている：配列番号 46 及び 48 は、ハイブリドーマ上清から精製された 2 インテグリン mAb の HC に相当し、配列番号 45 及び 47 は、ハイブリドーマ上清から精製された 2 インテグリン mAb の LC に相当する。

40

【0245】

【表 2】

表 2. ハイブリドーマからの $\alpha 2$ インテグリン mAb のマスペクトル分析

	鎖	質量 (Da) (LC/MS)	質量 (Da) (インシリコでの値)
$\alpha 2$ インテグリン mAB	LC	23899	23896
	HC	50728 (GOF)	50725 (GOF)

50

【0246】

B - 抗 2 インテグリン m A b の C D R の配列の決定

C D R 領域の配列は、K A B A T 命名法を用いてタンパク質配列から推定された。

【0247】

H C の場合には、C D R 1 は、配列番号 3 に相当し、C D R 2 は、配列番号 4 に相当し、C D R 3 は、配列番号 5 に相当する。

【0248】

L C の場合には、C D R 1 は、配列番号 6 に相当し、C D R 2 は、配列番号 7 に相当し、C D R 3 は、配列番号 8 に相当する。

【0249】

C - キメラ抗 2 インテグリン m A b 発現プラスミドの作製

抗 2 インテグリン m A b の可変重鎖及び軽鎖は、AccuPrimePfx SuperMix (Invitrogen; Cat. No.: 12344-040)、及び、それぞれ、抗 2 インテグリン m A b 重鎖及び軽鎖 c D N A (c D N A 作製については、上記参照)を用いて、P C R によって作製された。25 μ l P C R 反応では、5 サイクルが、プライマー 2 m A B - V H F O R 及び R E V (重鎖)、又はプライマー 2 m A B - V L F O R 及び R E V (軽鎖)プライマー (95 , 15 秒; 62 , 30 秒; 68 , 1 分)を用いて行なわれた。リーダー配列を導入するには、0.5 μ l のそれぞれの第 1 P C R サンプルが、第 1 P C R に関する場合と同じ P C R 条件を用いて、リーダー F O R 1 - 5 4 及び 2 m A B - V L (又は - V H) R E V プライマーを持つ第 2 P C R のためのテンプレートとして使用された。最後に、最初の反応の場合と同じ P C R 条件を用いて、0.5 μ l の第 2 P C R を、リーダー F O R 1 - 2 3 及び 2 インテグリン m A B - V L (又は - V H) R E V プライマーを持つ第 3 P C R (25 サイクルを行なう)のためのテンプレートとして使用した。第 3 P C R の P C R 産物を、P C R 精製キット (Qiagen, Cat.No.28104)を用い、そのキットプロトコルの記載の通り精製した。P C R 産物を、販売者のマニュアル中の記載の通り、Invitrogen TOPO TA クローニングキット (Cat #450001)を用いて、p C R 2.1 - T O P O 中にクローニングし、そしてこのクローニングキットに含まれている M 1 3 フォワードプライマー及び M 1 3 リバースプライマーを用いてシーケンシングした。

【0250】

マウス 2 抗体可変軽鎖及び重鎖の配列は、可変軽鎖ドメインのアミノ酸配列に言及している配列番号 1、及び可変軽鎖ドメインのコード配列に言及している配列番号 1 2、並びに可変重鎖ドメインのアミノ酸配列に言及している配列番号 2、及び可変重鎖ドメインのコード配列に言及している配列番号 1 3 を有している図 5 から得ることができる。

【0251】

この可変軽鎖ドメイン (配列番号 1 による)を、V L を配列番号 9 及び配列番号 1 4 による 2 抗体 V L - I G K C 軽鎖キメラを生じさせる NheI/BsiWI 及び IGKC BsiWI/HindIII で消化させることによって、定常軽鎖 (IGKC, Swiss-Prot: Q502W4) と融合させた。この融合によって、エピソーム発現ベクター p X L (Durocher et al. (2002), Nucl. Acid s Res. 30(2))、E 9 の NheI/HindIII 部位に結合し、キメラ 2 抗体軽鎖の哺乳類発現プラスミド “pFF0033_pXLc-AscII-IGKC” (アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 4 のもとで D S M Z に寄託されている) が作製された。

【0252】

この可変重鎖ドメイン (配列番号 2 による)は、配列番号 1 0 / 1 5 による 2 インテグリン V H - I G H G 4 定常重鎖キメラを生じさせる、ヒト定常重鎖 (IGHG4, Swiss-Prot P01861, S108P, L115E) の変異した変異体 (バリエーション) (mutated variant) と融合し、あるいは F a b を作製するために、配列番号 1 1 / 1 6 による 2 インテグリン V H - I G H G 1 定常重鎖 F a b キメラを生じさせる、ヒト定常 I G H G 1 (Swiss-Prot: Q569F4) からの 6 x H i s タグ C H 1 ドメインと融合した。この目的を達成させるために、この V H を、NheI/ApaI で消化し、そしてそれぞれ、ApaI/HindIII で消化した I G H G 4 又は H i s タグ C H 1 ドメインと融合させた。この融合によって、エピソーム発現ベクタ

10

20

30

40

50

— p X L のNheI/HindIII部位に結合し、キメラ 2抗体重鎖 - I g G 4 の哺乳類発現プラスミド “ pFF0036_pXLc-AscII-IGHG4 ” (アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 6 のもとで D S M Z に寄託されている) が、あるいは、キメラ 2抗体重鎖 - F a b の哺乳類発現プラスミド “ pFF0035_pXLc-AscII-CH1-Hi ” (アクセッション番号 D S M 2 3 9 4 5 のもとで D S M Z に寄託されている) が、それぞれ、作製された。

【 0 2 5 3 】

種々のプラスミドが、以下のアクセッション番号のもとでDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweigに寄託されている： D S M 2 3 9 4 5 (キメラ抗 2抗体重鎖 F a b フラグメントの真核細胞発現のためのプラスミド)、 D S M 2 3 9 4 6 (キメラ抗 2抗体 I g G 4 重鎖の発現のためのプラスミド) 及び D S M 2 3 9 4 4 (キメラ抗 2抗体 I G K C 軽鎖の発現のためのプラスミド)。

10

【 0 2 5 4 】

【表 3】

上記で使用されたプライマーの配列	配列番号	
α 2mAB-VL FOR :	27	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCA ACATTGTGCTGACCCAATCTC		
α 2mAB-VL REV :	28	
ACCGTACGTTTTATTTCAGCTTGGTCCCC		
α 2mAB mAB-VH FOR :	29	20
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCC AGGTCCAACCTGCATCAGCCTG		
α 2mAB mAB-VH REV :	30	
TAGGGCCCTTGGTGCTGGCTGAGGAGACTGT GAGAGTGG		
1~54のためのリーダー :	31	
GCTAGCACCATGGGCTGGTCCTGCATCATCC TGTTTCTGGTGGCCACCGCCACC		
1~23のためのリーダー :	32	30
CAAGCTAGCACCATGGGCTGGTCCTG		

【 0 2 5 5 】

実施例 2 : 抗 2 インテグリン m A b 及び F a b の特性

A - 組み換え抗 2 インテグリン m A B 及び F a b フラグメントの作製

キメラ抗 2 インテグリン I g G 4 及び抗 2 インテグリン F a b 分子の発現

抗体の重鎖及び軽鎖をコードする発現プラスミドを、大腸菌 D H 5 a 中で増殖した。トランスフェクションのために使用されるプラスミドは、Qiagen EndoFree Plasmid Megaキットを用いて大腸菌から調製した。

【 0 2 5 6 】

フリースタイル培地 (Freestyle Medium) (Invitrogen) 中で増殖する H E K 2 9 3 - F S 細胞を、Fugene (Roche) トランスフェクション試薬を用いて指示されている L C 及び H C プラスミドでトランスフェクトした。7日後、この細胞を、遠心分離により除去し、上清を 0 . 2 2 μ m フィルター上に通して粒子を除去した。

40

【 0 2 5 7 】

キメラ抗 2 インテグリン - I g G 4 及び抗 2 インテグリン - F a b 分子の精製

I g G 4 タンパク質を、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー (HiTrap Protein A HP Columns, GE Life Sciences) によって精製した。100 mM 酢酸バッファー、100 mM N a C l pH 3 . 5 を用いて、カラムから溶出後、モノクローナル抗体を、HiPrep 26/10脱塩カラムを用いて脱塩し、1 mg / mL の濃度で P B S 中に混和し、0 . 2 2 μ m ろ過した。

50

【 0 2 5 8 】

F a b タンパク質を、HiTrap IMAC HPカラム (GE Life Sciences) 上で I M A C によって精製した。直線勾配グラジエント (溶出バッファー: 20 mM リン酸ナトリウム, 0.5 M NaCl, 50 ~ 500 mM イミダゾール, pH 7.4) を用いてカラムから溶出した後、タンパク質を含む画分をプールし、そしてHiPrep 26/10脱塩カラムを用いて脱塩し、1 mg/mL の濃度で P B S 中に混和し、0.22 μmろ過した。

【 0 2 5 9 】

タンパク質濃度を 280 nm で吸光度を測定することにより決定した。各バッチを、Protein 200 Plus LabChipキットを用い、アジレント 2100 バイオアナライザー (Agilent 2100 bioanalyzer) によって還元条件及び非還元条件下にて分析し、それぞれのサブユニット及びモノマーの純度及び分子量を決定した。

【 0 2 6 0 】

B - 抗 2 インテグリン m A b 又は F a b の結合特性

精製された抗体及び相当する F a b フラグメントの詳細な速度論的キャラクタリゼーションのために、Biacore 3000 (GE Healthcare) による表面プラズモン共鳴テクノロジー (Surface plasmon resonance technology) を用いた。リガンドとしての抗インテグリン抗体又は F a b フラグメント、及びアナライトとしてのインテグリン 2 1 I - ドメインを用いて、直接結合アッセイが使用された。通例、抗体又は F a b フラグメント (600 RU) を、アミン反応カップリングによって研究グレードの CM5 チップ上に固定化し、その結果、それぞれ、抗体及び F a b フラグメントに結合した I - ドメインの場合、80 及び 140 RU の最大結合レスポンス (Rmax) になった。結合速度を、4 mM MgCl₂ (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% 界面活性剤 P20) を用いて補充した HBS - P バッファー中、30 μl/分の流速で、0.4 ~ 28 nM I - ドメインの濃度範囲にわたって測定した。チップ表面を、10 mM グリシン pH 2.2 を用いて再生した。速度論的パラメーターを、参照として固定化された抗インテグリン抗体又は F a b フラグメントを含まないフローセル (flow cell) を用いて、BIAevaluation program package (バージョン 4.1) で解析し、算出した。質量移動 (mass transfer) を有する 1 : 1 結合モデルが、抗体又は F a b フラグメントの 0.4 ~ 28 nM のアナライト濃度に相当する曲線データのグローバルフィッティングに適用された。

【 0 2 6 1 】

【表 4】

表 3 : インテグリン I - ドメインに対する抗 α 2 インテグリン m A b 及び F a b フラグメントの結合速度論

リガンド	k _a (1/Ms) E+05	k _d (1/s) E-04	KD (M) E-10
抗体	8.6	11.7	13.5
F a b フラグメント	9.9	8.3	8.4

【 0 2 6 2 】

ブロッキング m A b 及び F a b は、ヒト 2 1 - ドメインに対してナノモル範囲での親和性を示した (表 3)。

【 0 2 6 3 】

更に、抗 α 2 インテグリン m A b の結合特性を評価するために、HUVEC細胞 (promocell C12200, lot 6062203) を用いる細胞ベースアッセイが行なわれた。細胞を、P B S (10,000細胞/ウェル) 中で高結合型プレート (Meso Scale Discovery (MSD), L15XB-

3) 上にコートし、そして室温で2時間インキュベートした。次いでこのプレートを空にし、PBSで2回洗浄し、そしてブロッキング溶液 (MSD, R93BA-4) で90分間ブロッキングした。上記に述べられているように再びプレートを空にし、そして洗浄した後、抗2-mAbの階段希釈液を加え、そして室温で1時間細胞と共にインキュベートした。上記のような洗浄工程の更なる1回の後、界面活性剤 (Meso scale Discovery, R92TD-2) を加えないReadバッファ-Tを加えた。電気化学発光を適切なデバイス (Meso scale Discovery, Sector imager) で読み取った。スキャチャードプロット解析 (Scatchard plot analysis) を試験mAbのKDを決定するために使用した (図1参照)。

【0264】

C - 抗2インテグリンmAbの交差反応特性

10

抗2インテグリンmAbを、血液サンプル又はヒト血小板を用いて、FACS実験によって、マカカ (macaca: オナガザル科; カニクイザル) 及びヒトからの血小板と特異的に相互作用する能力があるかどうかを評価した。mAbをヒト血液、マカカ血液又はヒト血小板のサンプルと共に、そしてヤギ-抗マウス-IgGフィコエリトリン (PE) 結合二次mAb (Beckman Coulter #731856) と共にインキュベートした。このサンプルを溶解液 (Lysing Solution) (BD #349202) で処理し、そして血小板を遠沈させ、再懸濁し、FACSで解析した。

【0265】

マウス、ラット、イヌ、モルモット、ブタ又はウサギの21インテグリンに対して、こうした種からの全血を用いて試験したところ、なんら反応性は検出されなかった (データは示されていない) 一方で、この抗2インテグリンmAbは、ヒト全血サンプル (>98%ポジティブ、図4d) との反応性の場合のように、カニクイザル (macaca fascicularis) の血液サンプルとの類似の反応性 (97.3%ポジティブ、図4b) を示した。すなわち、FACS解析によると、マウス、ラット、イヌ、モルモット、ブタ又はウサギの21インテグリンに対して、こうした種からの全血を用いて試験したところ、なんら交差反応性は検出されなかった一方で、カニクイザル血液からの血小板による霊長類21インテグリンの場合には、抗体の種間交差反応性があるように見える。

20

【0266】

実施例3 - 抗2IgG及びFabのFvドメインのヒト化及び操作設計
ヒト化

30

抗2インテグリンmAb抗体のVL及びVH配列の3D相同モデル (3D homology models) を、MOE 2008における抗体モデラーアプリケーション (antibody modeller application) を用いて構築した。いくつかのPDBテンプレートが、LC及びHCフレームワーク並びにCDRループを構築するために特定された。すべてのテンプレート (templates) は、H3ループに対するベストなテンプレート (56%同一性) 以外は、VL及びVH抗2インテグリンmAb配列に対して83%を超える同一性を有した。この結果生じたLC及びHCモデルは、その後、MOEにおいて実施された標準的な手順を用いてエネルギーが最小化された。その後、マウスVL/VHの最小化3D相同モデルの分子動力学 (MD) 算定がタンパク質バックボーンに関する、500K温度、一般化ボルン暗溶媒 (Generalized Born implicit solvent) 中、1.1ナノ秒間という拘束された状態で行なわれた。10の多様なコンフォメーションが、最後の1nsの間に100ps毎のこの最初のMD処理から抽出された。次いでこうした10の多様なコンフォメーションは、それぞれ、タンパク質バックボーンに関する、300K温度、一般化ボルン暗溶媒中、2.3ナノ秒間という拘束がない状態で、MDに提出された。次いで、それぞれの10MD処理の場合には、MD軌道からの最後の2,000のスナップショット (ピコ秒毎に1つ) が算出するために使用され、それぞれの抗2インテグリンmAbアミノ酸の場合には、その標準偏差 (rmsd) を参照モノイドポジション (medoid position) と比較した。所与のアミノ酸の10の別々のMD処理における平均rmsdを、すべての抗2インテグリンmAbマウスアミノ酸の全平均rmsdと比較することによって、MDの間に理解されたように、アミノ酸がT細胞受容体と相互作用する可能性があり、免疫応答の活

40

50

性化の原因であると考えられるのに十分フレキシブルであるかどうか決定される。64個のアミノ酸は、最終的には、抗 2 インテグリン m A B 抗体においてフレキシブルであると認定され、そのうち34個は、C D R 内に位置していないか、あるいはそれらのすぐ近くに位置していない(5)。"バーニア(Vernier)"領域に位置しているアミノ酸はまた、考慮されない(J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499)。

【0267】

次いで、最も多い34個のフレキシブル抗 2 インテグリン m A B アミノ酸(C D R + 5 領域を除いて)の作動を、20ns(10x2ns)の間、49のヒト生殖細胞系相同モデル(human germlines homology models)の相当するフレキシブルなアミノ酸の作動と比較し、それぞれの場合に10x2ns MDシミュレーションを行なった。この49のヒト生殖細胞系モデルを、7つの最も一般的なヒト生殖細胞系軽鎖(vk1、vk2、vk3、vk4、vlambda1、vlambda2、vlambda3)及び、7つの最も一般的なヒト生殖細胞系重鎖(vh1a、vh1b、vh2、vh3、vh4、vh5、vh6)と体系的に組み合わせて構築した。このvk1-vh1bヒト生殖細胞系抗体は、抗 2 インテグリン m A B のフレキシブルアミノ酸と比較してそのフレキシブルアミノ酸の62%4D類似性を示した；それ故、vk1-vh1b生殖細胞系抗体を、フレキシブルアミノ酸に焦点をあてて抗 2 インテグリン m A B 抗体をヒト化するために使用した。抗 2 インテグリン m A B とvk1-vh1bアミノ酸の間の対アミノ酸結合(pairwise amino acid association)の場合には、2つの配列は、2つの相当する相同モデル炭素の最適な3D重ね合わせ(3D superposition)に基づいてアライメントされた。

【0268】

安定化

C D Rを除いて、それらのそれぞれの正準な配列に対して低頻度に発生する軽鎖及び重鎖のアミノ酸は、本来、最も高頻度に見出されるアミノ酸に変異されることが提示されている($\Delta G_{th} > 0.5 \text{ kcal/mol}$; [E. Monsellier, H. Bedouelle. Improving the stability of an antibody variable fragment by a combination of knowledge-based approaches: validation and mechanisms. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593])。LC及びHCの場合のコンセンサス変異の最初のリストは、最も近縁なヒト生殖細胞系(すなわち、vk1-vh1b)中に見出されるアミノ酸、すなわち、LC中の4つの可能性のある変異及びHC中の3つの可能性のある変異に限定されている。こうした変異は、C D R中、そのすぐ近く(+5オングストローム)、あるいは"バーニア(Vernier)"領域には位置していない(J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499)。抗アルファ2インテグリン抗体を安定化する可能性のあるこうしたコンセンサス変異を検討する他のクライテリアが考慮される。こうしたクライテリアは、変異の表面での疎水性親水性指標(hydrophathy)、あるいは分子力学ベースの予測される安定化の有利な変化である。

【0269】

グラフィングによるヒト化

ヒト化は、最も近縁なヒト生殖細胞系を、それぞれ、抗 2 インテグリン m A B 軽鎖及び重鎖に特定化することによって開始される。これは、体系的に列挙されるすべてのヒト生殖細胞系に対してBLASTサーチを行なうことによってなされる(カッパ鎖及びラムダ鎖のV及びJドメイン；重鎖のV、D及びJドメインの全ての可能な組み合わせ)。このBLASTサーチは、インハウス・イントラネットアプリケーションを用いて行なわれた。

【0270】

下記の最も近縁なヒト生殖細胞系は、抗 2 インテグリン軽鎖及び重鎖に対して、それぞれ、77%及び68%の同一性を有するものと確認された：

10

20

30

40

【表 5】

$\alpha 2_{1c}$	NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QKPGQAPKL LIYLASNLAS	
IGLKV79_IGLKJ2	DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVS FLGINLIHWY QKPGQPPKL LIYQASNKDT	
$\alpha 2_{1c}$	GVPARFSGSG SRTDFLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K	
IGLKV79_IGLKJ2	GVPARFSGSG SGTDFILTIN PVEANDTANY YCLQSKNFPY TFGGQTKLEI K	
$\alpha 2_{hc}$	QVQLHQPGE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY	10
IGHV11_IGHD33_IGHJ8	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYMHVWRQA PGQGLEWMGI INPSGGSTSY	
$\alpha 2_{hc}$	NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS	
IGHV11_IGHD33_IGHJ8	AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARL- TGYFDYWGQG TLVTVSS	

【0271】

IGLKV79_IGLKJ2 は、配列番号 49 に相当する。IGHV11_IGHD33_IGHJ8 は、配列番号 50 に相当する。

【0272】

このヒト化変異は、CDR (カバットナンバリング (Kabat numbering)) 及びバーニア領域残基を除いて、2つのアライメントされた配列を対比較することによって得られる。

【0273】

好ましからざる配列モチーフの変異

下記の配列モチーフが考えられる: Asp-Pro (酸に不安定な結合)、Asn-X-Ser/Thr (グリコシル化、X = 任意のアミノ酸 (Pro は除く))、Asp-Gly/Ser/Thr (フレキシブル領域におけるスクシンイミド/iso-aso形成)、Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (アミド分解サイトの露出)、Met (露出領域の酸化)。この結果生じるヒト化配列は、IEDB データベースに対する配列類似性が破壊され (<http://www.immuneepitope.org/home.do>; version June 2009)、どの配列もいずれかの公知の B 又は T 細胞エピトープを含まないことが保証されている。

10

20

30

【表 6】

1. 抗 a 2 b 1 インテグリン可変ドメインのオリジナル配列

- a. 軽鎖 (CDR + 5 Å がハイライトされており、CDR 領域中の 1 つの NS (1 NS) の問題ある可能性があるモチーフに下線が引かれている)

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS
GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCOQNNEDPY TFGGGTKLEI K

10

- b. 重鎖 (CDR + 5 Å がハイライトされており、CDR 領域の 1 つの問題あるサイト

[DS スクシンイミド及び i s o - A s p 形成サイト] に下線が引かれている)。

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY
NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGGQ TTLTVSS

20

【0274】

操作設計された配列

軽鎖についての 5 つのバージョン (軽鎖変異体、LC 1、LC 2、LC 3、LC 4、LC 5) 及び重鎖についての 7 つのバージョンが設計された (重鎖変異体、HC 1、HC 2、HC 3、HC 4、HC 5、H 6、H 7)。LC 1バージョンは、抗 2 インテグリン m A B 軽鎖の非 CDR の最もフレキシブルなアミノ酸と、VK 1 ヒト生殖細胞系軽鎖の間の直接比較から誘導される 4 つの変異を示す。LC 2バージョンは、CDR 領域 (N 3 4 Q) 中のアミド分解サイトの可能性を除去するための 1 つの付加変異を含む。LC 3バージョンは、抗 2 インテグリン m A B 軽鎖を最適に安定化させると予測されるヒト化及び安定化変異を含む。LC 4バージョンは、アミド分解サイト (N 3 4 Q) の可能性を除去するための 1 つの付加変異を含む。LC 5バージョンは、グラフティング方法から誘導される 6 つの変異を示す。

30

【0275】

HC 1バージョンは、抗 2 インテグリン m A B 重鎖の非 CDR の最もフレキシブルなアミノ酸と、VH 1 b ヒト生殖細胞系間の直接比較から誘導される 3 つの変異を示す。HC 2バージョンは、CDR 領域 (D 5 5 E) 中の問題あるスクシンイミド I s o - A s p 形成サイトを除去するための別の付加変異を含む。HC 3バージョンは、抗 2 インテグリン m A B 重鎖を最適に安定化させると予測されるヒト化及び安定化変異を含む。HC 4バージョンは、可能性のある凝集問題に対応するための付加変異を含む。HC 5バージョンは、HC 3 変異及び CDR 領域 (D 5 5 E) 中の問題あるスクシンイミド I s o - A s p 形成サイトの可能性を除去するための付加変異を含む。HC 6バージョンは、可能性のあるアグリゲーション問題に対応するための付加変異を含む。HC 7バージョンは、グラフティング方法から誘導される 20 の変異を示す。

40

【0276】

全部で、7 つの組み合わせが作製された :

- ・ LC 1 / HC 1 (ヒト化のみに対応する変異 (mutations addressing humanization only))
- ・ LC 2 / HC 2 (ヒト化及び LC / HC の可能性のある問題あるサイト [NS 及び DS] に対応する変異)
- ・ LC 3 / HC 3 (ヒト化及び安定化に対応する変異)

50

- ・ LC 3 / HC 4 (ヒト化及び安定化及び抗凝集 (anti-aggregation) に対応する変異)
- ・ LC 4 / HC 5 (ヒト化及び安定化及び LC の可能性のある問題あるサイト [NS] 及び HC の可能性のある問題あるサイト [DS] に対応する変異)
- ・ LC 4 / HC 6 (ヒト化、安定化、抗凝集及び LC の可能性のある問題あるサイト [NS] 及び HC の可能性のある問題あるサイト [DS] に対応する変異)
- ・ LC 5 / HC 7 (グラフティングによるヒト化に対応する変異)。

【 0 2 7 7 】

【 表 7 】

表 4. 7 LC×HC 組み合わせの要約

	(LC 1) ヒト化	LC 2 ヒト化及び CDR 中の NS サイト	LC 3 ヒト化及び 安定化	LC 4 ヒト化及び CDR 中の NS サイト 及び安定化	LC 5 (グラフ ティング)
(HC 1) ヒト化	x				
(HC 2) ヒト化及び CDR 中の DS		x			
(HC 3) ヒト化及び 安定化			x		
(HC 4) ヒト化及び 安定化及び “抗凝集”			x		
(HC 5) ヒト化及び CDR 中の DS 及び安定化				x	
(HC 6) ヒト化及び 安定化及び “抗凝集” 及び CDR 中の DS				x	
HC 7 (グラフティング)					x

【 0 2 7 8 】

10

20

30

40

【表 8】

表 5. 操作設計された抗 $\alpha 2 \beta 1 F a b$ 軽鎖に導入された変異の要約

軽鎖 (配列ナン バリング)	(LC1) ヒト化	(LC2) ヒト化及び CDR中の NS	(LC3) ヒト化及び安 定化	(LC4) ヒ ト化及びCD R中のNS及 び安定化	(LC5) グラフティ ング
ALA9	SER	SER	SER	SER	
ALA12			SER	SER	
LEU15	VAL	VAL	VAL	VAL	PRO
SER22					THR
ASN34		GLN		GLN	
GLN46	LYS	LYS			
ALA47					PRO
ASP80					ASN
GLU83	GLN	GLN	GLN	GLN	
ASP85			GLU	GLU	
ALA87					THR
THR89					ASN

10

20

【 0 2 7 9 】

【表 9】

表 6 : 抗 α 2 インテグリン抗体の 7 つの HC 変異体の変異 (mutations)

重鎖 (配列ナン バリング)	(HC1) ヒト化	(HC2) ヒト化及 び CDR 中の DS	(HC3) ヒト化及 び安定化	(HC4) ヒト化及び 安定化及び “抗凝集”	(HC5) ヒト化及び CDR 中の DS 及び安 定化	(HC6) ヒト化及び 安定化及び “抗凝集” 及び CDR 中の DS	(HC7) グラフ テイング
HIS5							VAL
PRO7							SER
LEU11							VAL
VAL12							LYS
PRO17			SER	SER	SER	SER	SER
LEU20							VAL
LYS38							ARG
ARG40							ALA
ARG43	GLN	GLN					GLN
ASP55		GLU			GLU	GLU	
ASN61							ALA
LYS65							GLN
ASP66							GLY
LYS67	ARG	ARG					ARG
SER76							THR
ILE81							MET
GLN82							GLU
THR87							ARG
SER91							THR
VAL93				LYS		LYS	
THR112							LEU
LEU113							VAL
SER116	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	
	3 変異	4 変異	2 変異	3 変異	3 変異	4 変異	20 変異

10

20

30

【0280】

ヒト化可変配列を遺伝子合成によって作製し、そして実施例 1 C 中で述べられているような相当する重鎖及び軽鎖発現ベクター中にクローニングした。

【0281】

操作設計軽鎖配列

5 つのバージョンの軽鎖変異体をクローニングした (LC1、LC2、LC3、LC4、LC5)。可変鎖の操作設計によって導入された変異は、ハイライトされているか、あるいは下線が引かれている。

40

【表 10】

LC 1 (ヒト化変異 (ボールド・アンダーラインされている)) :

NIVLTQSPSS LAVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QOKPGKAPKL
LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQADDAATY YCQQNNEDPY
TFGGGTKLEI K (配列番号 33)

LC 2 (ヒト化変異がハイライトされ、CDR NS サイトの変異はボールド体で
タイプされ、アンダーラインされている) :

NIVLTQSPSS LAVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QOKPGKAPKL
LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQADDAATY YCQQNNEDPY
TFGGGTKLEI K (配列番号 34)

LC 3 (ヒト化及び安定化変異が、ハイライトされている) :

NIVLTQSPSS LSVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QOKPGQAPKL LIYLASNLAS
GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEADAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (配列番号
35)

LC 4 (ヒト化及び安定化変異がハイライトされ、CDR NS サイトの変異が、
ボールド体でタイプされ、下線が引かれている) :

NIVLTQSPSS LSVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QOKPGQAPKL LIYLASNLAS
GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEADAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (配列番号
36)

LC 5 (グラフィティングされた変異がハイライトされている) :

NIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVE SYGNSFIYWY QOKPGQPPKL
LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDTANY YCQQNNEDPY
TFGGGTKLEI K (配列番号 37)

【0282】

下記は、VK1__Vh1b ヒト生殖細胞系と対比した LC 抗 2 1 インテグリンのア
ライメントである :

【化 1】

LC_anti_a2b1 NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QOKPGQAPKL
Vk1LC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIG SYLN----WY QOKPGKAPKL

LC_anti_a2b1 LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY
Vk1LC LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDLATY YCQQSYSTPP

LC_anti_a2b1 TFGGGTKLEI K-
Vk1LC TFGQGTKVEI KR (配列番号 51)

10

20

30

40

50

【 0 2 8 3 】

操作設計重鎖配列

7つのバージョンの重鎖変異体をクローニングした（HC 1、HC 2、HC 3、HC 4、HC 5、HC 6、HC 7）。可変鎖の操作設計によって導入された変異は、ハイライトされている。

【表 1 1】

HC 1（ヒト化変異がハイライトされている）：

QVQLHQPQGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQQGLEWIGR
IDPSDSETHY NQKFKDRATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS（配列番号 38）

10

HC 2（ヒト化変異がハイライトされている、問題ある可能性のあるモチーフ
[CDR DSサイト]）：

QVQLHQPQGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQQGLEWIGR
IDPSESETHY NQKFKDRATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS（配列番号 39）

20

【 0 2 8 4 】

【表 1 2】

HC 3 (ヒト化及び安定化変異がハイライトされている) :

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (配列番号 40)

HC 4 (ヒト化及び安定化変異がハイライトされている、抗凝集変異
(anti-aggregation mutation)) :

10

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAKYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (配列番号 41)

HC 5 (ヒト化及び安定化変異がハイライトされている、問題ある可能性のある
モチーフ [CDR DSサイト]) :

20

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSESETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (配列番号 42)

HC 6 (ヒト化及び安定化変異がハイライトされている、問題ある可能性のある
モチーフ [CDR DSサイト]、抗凝集変異) :

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSESETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAKYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (配列番号 43)

30

HC 7 (グラフィックされた変異がハイライトされている) :

QVQLVQSGAE VRKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVROA PGQGLEWIGR
IDPSDSETHY AQKFQGRATL TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TLVTVSS (配列番号 44)

40

【 0 2 8 5】

下記は、HC V k 1 _ V h 1 b ヒト生殖細胞系と対比したHC抗 2 1 インテグリン
m A b のアライメントである。

【化2】

```

HC2_anti_α2    QVQLHQPGEAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
Vh1b           QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYMHVVRQA PGQGLEWGW
HC2_anti_α2    IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
Vh1b           INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDKSSSTAY MELSSLRSED TAVYYCARWG
HC2_anti_α2    RGY-----F DYWGQGTTLT VSS
Vh1b           YDYDVFYYAM DYWGQGTTLT VSS (配列番号52)

```

10

【0286】

それぞれの抗インテグリン₂ mAb変異体の可変重鎖及び軽鎖（5つの異なる軽鎖：VL1 - VL5及び7つの異なる重鎖VH1 - VH7）を遺伝子合成によって作製した [ApalIを有する5' UTR - 配列（5' - GTGCA CAGC - 3'）及びApaI（重鎖）又はBsiWI（軽鎖）を有する3' UTR（5' - GCTTCCACCAAGGCCCC - 3'）を含む]。この可変重鎖ドメインを抗インテグリン₂ VH - IGHG4定常重鎖mAbを生じるヒト定常重鎖（IGHG4, Swiss - Prot P01861, S108P, L115E）の変異された変異体（mutated variant）を含む改変pXL発現ベクターのApalI / ApaIサイトに結合させた。

【0287】

この可変軽鎖ドメインを、抗インテグリン₂ VL - IGKC定常軽鎖mAbを生じるヒト定常軽鎖（IGKC, Swiss - Prot: Q502W4）を含む改変pXL発現ベクターのApalI / BsiWIサイトに結合させた。遺伝子合成、クローニング及びDNA作製の完全なプロセスは市販の製造供給元（Genart AG）によって理解された。

20

【0288】

比較のために、当技術分野において知られているヒト化hIgG4抗アルファ2インテグリン抗体（TMC2206）が使用された（“コンパレーター（comparator）”）。このコンパレーターの軽鎖アミノ酸配列及び重鎖アミノ酸配列は、本明細書中、図10eの配列番号53及び配列番号54として記載されている。

【0289】

30

【表 1 3】

表 7 : 抗 α_2 インテグリンmAbのヒト化変異体のリスト

LC/HC 組み 合わせ	ヒト化変異体
LC1/HC1	ヒト化のみに対応する変異
LC2/HC2	ヒト化のみ及びLC/HCの可能性のある問題あるサイト [NS ; DS] に対応する変異
LC3/HC3	ヒト化及び安定化に対応する変異
LC3/HC4	ヒト化及び安定化及び抗凝集に対応する変異
LC4/HC5	ヒト化及び安定化及びLC/HCの可能性のある問題あるサイト [NS ; DS] に対応する変異
LC4/HC6	ヒト化及び安定化及び抗凝集及びLC/HCの可能性のある問題あるサイト [NS ; DS] に対応する変異
LC5/HC7	グラフティングによるヒト化に対応する変異
TMC2206	配列番号53によるコンパレーター

10

20

【0290】

30

こうした配列を検証するために、このmAbを、マスマスペクトロメトリーを用いて解析した。インタクト質量測定のために、サンプルを20分間トラップし、15%溶出剤A (H₂O / 0.05% TFA) ~ 50%溶出剤B (アセトニトリル / 0.05% TFA) の範囲のグラジエントで溶出する前に、2%アセトニトリル / 0.1% TFA (v/v) を用いるモノリストラップカラム (monolithic trap column) によって20 μ l / 分で脱塩した。

【0291】

このサンプルを、37 の温度で、モノリスカラム (PS - DVB ; 100 μ m I.D. \times 5 cm) によってナノフロー (nanoflow) (300 nl / 分) で操作して分離した。このサンプルの投入は、外径365 μ m、内径75 μ m、先端径15 μ mを有するエレクトロスプレー針を用い、それにシーズガスを加え新しいオブジェクト (new objective) から行なわれた。取得後、スペクトルを、相当する時間範囲にわたってまとめ、そしてApplied Biosystems/MDS SciexからのBioAnalystと共に供給されるタンパク質の再構成ツールを用いてデコンヴォリューションした。

40

【0292】

タンパク質配列を、プラスミドコード配列から翻訳し、そしてHC及びLCの質量を算出した (表 8)。

【0293】

【表 1 4】

表 8：精製したヒト化抗 α_2 インテグリンmA bの質量分光分析

LC/HC 組み合わせ	軽鎖			重鎖		
	予測 Da	測定 Da	ppm	予測 Da (G O F)	測定 Da	ppm
LC1/HC1	23727.38	23724.56	119	50314.47	50311.80	53
LC2/HC2	23741.41	23738.26	130	50328.5	50327.52	19
LC3/HC3	23757.36	23753.89	146	50304.47	50301.96	50
LC3/HC4	23757.36	23754.17	134	50333.52	50331.29	44
LC4/HC5	23771.39	23769.87	64	50318.5	50317.68	16
LC4/HC6	23771.39	23768.13	137	50347.54	50350.26	54
LC5/HC7	23792.41	23789.01	142	50187.3	50184.84	49
TMC2206	23378.01	23374.51	150	50237.54	50233.48	81

10

【0 2 9 4】

観察された値は、算出された質量と非常によく一致し、そしてクローン化コンストラクトを検証した。

【0 2 9 5】

実施例 4 - インビトロの生化学的及び細胞ベースアッセイにおける α_2 インテグリンmA Bの評価

20

固相アッセイのために、インテグリン (α_2 -I-ドメイン: α_2 -I-ドメイン GST aa 140-339 (TBS / 5 mM Mn^{2+} 中), 50 μ l / ウェル;) を、96 ウェルプレート (Corning Costar, 3690) 上で、室温で終夜固定化した。次いで 25 μ l / ウェルのブロッキング溶液 (5% BSA (クルード) (A7906), 1x TBS) を加え、そして廃棄した。200 μ l / ウェルのブロッキング溶液を加え、3時間室温で放置した。洗浄工程 (200 μ l / ウェル 結合バッファー (1x TBS 及び 0.1% BSA (A7638) 及び 2 mM Mn^{2+} ; TBS: 150 mM NaCl, 25 mM Tris (Fluka 93371) pH 7.4) で 3回) の後、サンプルを、室温で3時間 (静止)、下記の 50 μ l と共にインキュベートした:

30

- a) ビオチン化コラーゲンのみ - コントロール (10 μ l 結合バッファー 及び 40 μ l ビオチン化コラーゲン)
- b) 10 μ l / ウェル化合物 (compound)、40 μ l / ウェル ビオチン化コラーゲン
- c) ブランク: 50 μ l / ウェル 結合バッファー。

【0 2 9 6】

洗浄工程 (200 μ l / ウェル 結合バッファーで 3回) の後、サンプルを、50 μ l / ウェル ExtrAvidin Peroxidase (ペルオキシダーゼコンジュゲート (Peroxidase conjugate), Sigma E2886; 1:500 (結合バッファー中)) と共に室温で 30 分間インキュベートし、そして再び 200 μ l / ウェル 結合バッファーで 4回洗浄した。50 μ l / ウェル ペルオキシダーゼ基質 (ABTS 溶液; 2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)、Sigma A-1888; 275 μ l (11 mg ABTS (0.5 ml dH_2O 中に溶解)); 及び 5.5 ml 0.1 M 酢酸ナトリウム (Sigma S-3272) / 0.05 M NaH_2PO_4 (Riedel de Haen 04270) pH 5.0; 及び 55 μ l H_2O_2 Sigma H-1009 (10 μ l (= 30%) 及び 1045 μ l dH_2O) を 10 ~ 30 分間にわたって室温で加え、静止 (緑色の着色が得られるまで) させ、そして 50 μ l / ウェル 2% SDS を加えた後、吸光度を 405 nm (SpectraMax 190) で読み取った。ブランクサブトラクション (blank subtraction) 処理の後、100 - ((平均値 化合物 / 100) / 平均値 コラーゲンポジティブコントロール) として阻害 % を算出した。

40

【0 2 9 7】

50

【表 15】

表9： $\alpha 2$ インテグリンmABによるコラーゲン相互作用の阻害

アッセイ	$\alpha 2\beta 1$ -コラーゲン相互作用	$\alpha 2$ -I-ドメイン-コラーゲン相互作用	$\alpha 2\beta 1$ -コラーゲン相互作用 (4% HSA)	静的状態下でのコラーゲンへのヒト血小板粘着 (洗浄 plt)	静的状態下でのコラーゲンへのヒト血小板粘着 (PRP)	ずり応力下でのコラーゲンへのヒト血小板粘着 (全血) 3000 s ⁻¹
IgG4 IC50 (μ g/mL)	0.05	0.2	na	0.017	0.3	na
IgG4 IC50 (nM)	0.3	1.5	na	0.1	6.7	na
Fab IC50 (μ g/mL)	0.2	na	0.4	0.04	0.3	0.06
Fab IC50 (nM)	4.2	na	8.2	0.8	6.7	1.3

10

20

30

40

【0298】

要約すれば、 $\alpha 2$ インテグリンmABは、 $\alpha 1 \beta 1$ /コラーゲン相互作用(固相アッセイ)、 $\alpha 5 \beta 1$ /フィブロネクチン相互作用(固相アッセイ)、 $\alpha I I \beta b b 3$ (GPIIb/IIIa)活性化(FACSアッセイ)、P-セレクチンのヒト血小板(hu plt)上での発現(FACSアッセイ)、全血液だけでの、又はADP、TRAP、コラーゲンで刺激後のヒト血小板凝集、ヒトPBLからのLDH放出、TNF放出又はIL1放出(単独又はLPSを組み合わせて)に対する作用を示さなかった。

【0299】

ヒト臍帯静脈内皮細胞管腔長形成(Huvec tubule length formation)

血管新生におけるインテグリン抗 $\alpha 2$ mabの活性を評価するために、HUVEC細胞

50

を用いるインビトロアッセイを行なった。マトリゲル (Matrigel) (BD Biosciences, #354230) を、I 型コラーゲン (BD Biosciences #35429) (matrigel 1/3.25, PBS 5 × 1/5, コラーゲン I 1 mg/ml, q s p 水) と混和し、37 °C、5% CO₂ で1時間インキュベートした。粘着した H U V E C 細胞を、Acutase 溶液を用いて培養フラスコから注意深く引き離し、遠心分離し、そして培養液培地 (EBM, FCS 2%, EGF プレットキット (EGF bullet kit)) 中、 1.2×10^5 細胞/ml で再懸濁した。100 μl の細胞懸濁液を、抗 α2 m a b 及び F G F 2 (Peprotech, 10 ng/ml) の階段希釈液の存在下又は非存在下でマトリックスを含むウェルに加え、そして37 °C、5% CO₂ で18時間インキュベートした。管腔形成の検出のために、クレシルバイオレット溶液を加え、そして37 °C で30分間インキュベートした。管腔形成は、ウェル当たりの管腔長の合計を測定することによって決定された。算出は、Image Proand software (MediaCybernetics) を用いて、ネガティブコントロール (F G F 2 を含まない) 及びポジティブコントロール (F G F 2 を含むが、抗 α2 m a b を含まない) と対比して行なわれ、1つの条件で6回 (6 replicats per condition) 測定した。一致する結果が図2に示されている。抗アルファ2インテグリン m A B では、F G F 2 によって誘発される血管新生を用量依存的に阻害することが可能であった。

10

【0300】

実施例5 - 血流下及び静止状態下での抗 α2インテグリン m A B - F a b によるコラーゲンへの血小板粘着の阻害

タンパク質 - タンパク質相互作用検討のために、組み換えによって発現されたインテグリン α2 β1インテグリン、又はインテグリン α2 β1インテグリンのI - ドメインを、T B S バッファー中、4 °C で終夜、96ウェルプレート (Corning Costar 3690) にコートした。過剰のタンパク質を洗い流した後、このプレートをB S A 溶液 (5% Sigma A7906) でブロッキングし、そして再び洗浄した。α2インテグリン M a b の階段希釈液を、プレート及びビオチン化コラーゲン (ラット尾, Sigma C8897) に加えた。これは4% H S A の存在下又は非存在下で行なわれた。室温で2時間インキュベーションした後、このプレートを再び洗浄した。Extravidin Peroxidase 溶液 (Sigma E2886) を加え、そしてこのプレートを暗室で20分間インキュベートした。測定は、405 n M で Elisa reader (SpectraMax190 Molecular Devices) で行なわれた。阻害%及びI C 5 0 が知られている標準品と対比して算出された。

20

30

【0301】

コラーゲンへの血小板結合検討のために、プレート (Isoplate, Perkin Elmer, F1450571) を T B S 中、室温で1時間、コラーゲン (Sigma C8897) でコートした。ウェルを繰り返し T B S で洗浄し、その後抗 α2インテグリン M A b の階段希釈液を加えた。ヒルジン、P G E 1 及び R e o P r o で抗凝固され、そしてカルセイン A M (CalceinAM) (C-3099 Molecular Probes) で標識された、新たに調製したヒト多血小板血漿、又は単離されたヒト血小板を加え、そして光から保護して室温で90分間インキュベートした。洗浄後、プレートを 492 n M E X、535 n M E M で M 5 リーダー (M5 reader) (Molecular Devices) で測定した。阻害%及びI C 5 0 を知られている標準品と対比して算出した。

40

【0302】

ずり応力下 (under shear) での実験で、抗 α2インテグリン m A B について、流動状態下で、コラーゲンへの血小板粘着を阻害する能力があるかどうかを解析した。ガラスキャピラリーを4 °C で終夜、コラーゲンでコートした。洗浄し、ブロッキング (B S A を用いて) した後、それらをフローデバイス (flow device) 中に取り付けた。ボランティアからの新たに取り出した抗凝固ヒト血液を、D i O C 6 (3) で標識し、そして、抗 α2インテグリン m A B の階段希釈液と共に37 °C で10分間インキュベートした。このサンプルを、キャピラリーに通してずり速度 3000 s⁻¹ の擬似動脈フローで流動させた。キャピラリーをリンスした後、流動血液に接しているキャピラリーの表面を表している10個の写真をとった。イメージングソフトウェアを用いて、表面被覆率を決定し、そして

50

阻害%及びIC50を知られている標準品と対比して算出した。

【0303】

血小板(thrombocyte)粘着アッセイのために、血小板を次のように濃縮した：ヒルジン(20 µg/ml; レフルダン(Refludan)(Pharmion))及び血液を、150gで20分間遠心分離し、抗凝固ヒト血液を作成した。多血小板血漿(PPP)を回収し、そして再び遠心分離し、上記のように回収した。少血小板血漿を1949gで10分間(2回)の遠心分離によって残存する血液から得た。PPPを希釈細胞(2mM Mg)に加え、細胞の濃度を $2 \times 10^5 / \mu\text{l}$ に調整した。細胞を0.5時間放置し、そして $5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ に希釈した。その後、細胞を3 µg/ml Reopro(2.5 µg/ml; Centocor B.V., Leiden, NL)(10分, 室温)と接触させ、6mM $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (5mM)を加えた(インキュベーション(10分間))。

10

【0304】

プレートは次のように調製した：プレート(Perkin Elmer, IsoPlate, 1450-571)を100 µl/ウェル I型コラーゲン 10 µg/ml(酢酸中、0.01Mでのラット尾 C8897 Sigma Stock 200 µg/mlからのI型)で、室温で1時間インキュベートした。次いでそれらを200 µl/ウェル TBS(50mM Tris-HCl pH7.4, 120mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.05mM CaCl_2 , 2mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1% BSA)を用いて3回洗浄した。その後、10 µl/ウェル 化合物及びReopro処理及びMn処理血小板(5×10^4 細胞/µl, 50 µl/ウェル)を加えた。細胞を1.5時間(暗室)インキュベートし、そして200 µl/ウェル TBSで3回洗浄した。2.5 µM カルセインAM(50 µl/ウェル, C-3099, Molecular Probes, MW 994.87, 30分, 室温)を加え、引き続いて洗浄工程を行なった。読みとり工程を細胞の不存在下で、SpectraMax M5: Fluoreszenz 励起(EX) 492 放出(EM) 535 カットオフ(Cutoff): 530 (Automatic)を用いて行なった。ブランクサブトラクション処理の後、100 - ((平均値 化合物 + 100) / 平均値 コントロール)として阻害%を算出した。

20

【0305】

図3から得ることができる通り、抗 α_2 インテグリンmAbは、用量依存的にずり応力下にて血小板粘着を、ナノモル単位のIC50で阻害した。

【0306】

実施例6 - サイズ排除クロマトグラフィーによって決定された抗 α_2 インテグリンmAbの凝集挙動

30

すべてのヒト化変異体及びコンパレーター(comparator)の凝集パーセンテージ(aggregation percentage)がどうかについて試験した。TSKgel SWXLガードカラム(TosohBioscience)と共に、TSKgel G3000SWXLカラム(7.8mm ID x 30.0cm L, TosohBioscience)を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーをAEKTA explorer 10(GE Healthcare)によって行なった。30 µlのサンプル(0.4 ~ 1mg/ml)を注入し、そしてクロマトグラフィーをランニングバッファーとして100mM Na_2SO_4 、100mM Na_2HPO_4 、0.05% NaN_3 pH 6.7を用い、1ml/分、そして280nmの検出波長で行なった。このカラムをゲルろ過分子量マーカー(gel filtration molecular weight markers (Sigma Aldrich))を用いてキャリブレーションした。データ評価を、ユニコーンソフトウェア v5.11 (Unicorn software v5.11) (GE Healthcare)を用いて行なった。

40

【0307】

【表 16】

表 10：サイズ排除クロマトグラフィーによって決定された抗 α_2 インテグリンmAbの凝集パーセンテージ

LC/HC組み合わせ	凝集 [%]	ピーク高さ [mAU]
LC1/HC1	<0.5	74.4
LC2/HC2	<0.5	47.8
LC3/HC3	<0.5	93.7
LC3/HC4	2.3	67.2
LC4/HC5	1.8	67.9
LC4/HC6	<0.5	29.1
LC5/HC7	<0.5	46.5
TMC2206	11.8	20.7

10

20

【0308】

表 10 から得ることができる通り、アルファ 2 インテグリン m A b のすべての試験変異体は、低いパーセンテージの凝集を有する。コンパレーターの凝集挙動を比較すると、すべての試験したアルファ 2 インテグリン抗体は、コンパレーターと比較してより低い凝集パーセンテージ値を示した。

【0309】

実施例 7 - ビアコア (Biacore) によって測定された抗 α_2 インテグリン m A b の速度論的結合データ

Biacore 3000 (GE Healthcare) による表面プラズモン共鳴テクノロジーが精製ヒト化抗体の詳細な速度論的キャラクタリゼーションのために使用された。抗ヒト F c 特異性抗体 (MAB1302, Millipore) によってキャプチャーされた抗インテグリン抗体を用いて、キャプチャーアッセイ (capture assay) が使用され、そしてインテグリン α_2 I - ドメインがアナライトとして使用された。通例、120RUの抗インテグリン抗体が、固定化抗ヒト F c 特異的抗体によってキャプチャーされ (研究グレード C M 5)、その結果、この抗体に結合した I - ドメインの 30RU の R m a x がもたらされた。4mM M g C l ₂ (10mM H E P E S pH 7.4, 150mM N a C l, 0.005% 界面活性剤 P 2 0) を補充した H B S - P バッファー中、0.8 ~ 25nM I - ドメインの濃度範囲にわたり、30 μ l / 分の流速で結合カイネティクス (Binding kinetics) が測定された。チップ表面を 10mM グリシン pH 2.5 で再生した。参照として固定化抗ヒト F c 特異的抗体を含むフローセル (flow cell) を用いて、速度論的パラメーターを解析し、

30

40

【0310】

表 11) 3 つの変異体は、非ヒト化 m A b として Biacore で類似の K_D を有した :

- 組み合わせ LC1/HC1 (ヒト化のみに対応する変異)
- 組み合わせ LC3/HC3 (ヒト化及び安定化に対応する変異)
- 組み合わせ LC3/HC4 (ヒト化及び安定化及び抗凝集に対応する変異)。

グラフィングによる変異体変異 (variant mutation) は、非ヒト化 m A b に近接していた。

50

【0311】

実施例8 - 抗アルファ2インテグリン抗体のエピトープ決定

非ヒト化抗アルファ2 mAb、コンパレーターmAbのエピトープを検証するために、エピトープキャラクタリゼーションが表面プラズモン共鳴テクノロジーを用いてBiacore 3000 (GE Healthcare) によって行なわれた。非ヒト化抗アルファ2 mAbに相当するFabフラグメントをアミン反応性カップリングによって500 RUでCM5チップ上に固定した。このインテグリンI - ドメインを10 μ l /分でFabフラグメントによってキャプチャーし、そして短時間の解離期間の後、抗体 TMC2206を、30 μ l /分で₂I - ドメインに結合させた。再生を10 mM グリシンバッファー pH 2.0を用いて行なった。第二の実験では、コンパレーターmAb TMC2206を、抗ヒトFc特異的抗体 (MAB1302 Millipore) の表面上にキャプチャーした。次いでこのインテグリンI - ドメイン、引き続いて非ヒト化Fabを結合させた。この結果は、図13及び図14から得ることができる。この結果によると、コンパレーター抗体 TMC2206が非ヒト化Fabによってプレバインディング (prebound) されたインテグリンI - ドメインに結合することが明瞭に示された。

10

【0312】

従って、非ヒト化Fabは、コンパレーターmAb TMC2206によってプレバインディングされたインテグリンI - ドメインに結合する。非ヒト化Fab及びコンパレーターmAbのインテグリン₂I - ドメインへの同時結合 (simultaneous binding) は、Fab及びコンパレーターmAb双方のエピトープが同一ではないことを示す。このことは、この発明の抗アルファ2抗体及びコンパレーター抗体がアルファ2インテグリンの中の異なったエピトープに結合することを意味する。

20

【0313】

実施例9 - コラーゲンコートプレート及び洗浄血小板又は多血小板血漿を用いる静止状態下での血小板結合アッセイ

2 1インテグリンは血液血小板で発現され、それらのコラーゲンへの粘着において重要な役割を演じているので、こうした細胞を用いる血小板結合試験のためのインビトロアッセイシステムが使用された。血小板結合試験のために、プレート (Isoplate, Perkin Elmer, F1450 571) をTBS中、室温で1時間、コラーゲン (Sigma C8897) でコートした。ウェルをTBSで繰り返し洗浄し、その後、抗₂インテグリンmAbの階段希釈液を加えた。ヒルジン、PGE1及びReoproで抗凝固され、そしてカルセインAM (CalceinAM) (C-3099 Molecular Probes) で標識された、新たに調製したヒト多血小板血漿、又は新たに単離されたヒト血小板を加え、そして光から保護して室温で90分間インキュベートした。洗浄後、プレートを492 nM 励起、535 nM 放出でM5リーダー (M5 reader) (Molecular Devices) で測定した。阻害%及びIC50を、アルファ2インテグリン又は非ヒト化アルファ2 mAbの小分子阻害剤を用いて作成された滴定曲線と対比して算出した。結果は表12から得ることができる。

30

【0314】

【表 17】

表 12 : 洗浄血小板のコラーゲンへの結合の阻害

LC/HC組み合わせ	IC50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
LC1/HC1	0.021
LC2/HC2	0.092
LC3/HC3	0.012
LC3/HC4	0.016
LC4/HC5	0.057
LC4/HC6	0.068
LC5/HC7	0.031
TMC2206 (コンパレーター)	0.023

10

【0315】

表 12 で示されている結果から得られることができる通り、洗浄血小板を用いる静止状態下のもとで異なる抗アルファ2抗体変異体によって示される血小板阻害は、コンパレーター抗体のそれに匹敵し、一部の变異体 (LC3/HC3 又は LC3/HC4) の場合には、一層顕著に、あるいは幾分強い (LC1/HC1)。

20

【0316】

【表 18】

表 13 : 多血小板血漿における血小板のコラーゲンへの結合の阻害

LC/HC組み合わせ	MW IC50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
LC1/HC1	0.277
LC2/HC2	3.963
LC3/HC3	0.132
LC3/HC4	0.193
LC4/HC5	3.251
LC4/HC6	4.113
LC5/HC7	0.224
TMC2206	0.110

30

【0317】

表 13 に示されている結果から得られることができる通り、多血小板血漿を用いて静止状態下で、異なる抗アルファ2抗体変異体、変異体 LC1/HC1、変異体 LC3/HC3、変異体 LC3/HC4 及び変異体 LC5/HC7 によって示される血小板阻害は、コンパレーター抗体のそれに匹敵する。

40

【0318】

静止状態での血小板結合アッセイから結論づけられうる通り、抗 α_2 インテグリン抗体のヒト化形態は、濃度依存的に血液血漿の存在下、又は非存在下で新たに単離されたヒト血小板の粘着を遮断する。4つの変異体は、非ヒト化 mAb と、生物アッセイにおいて同様な阻害活性を示す：

- 組み合わせ LC1/HC1 (ヒト化のみに対応する変異)
- 組み合わせ LC3/HC3 (ヒト化及び安定化に対応する変異)

50

- 組み合わせ LC3 / HC4 (ヒト化及び安定化及び抗凝集に対応する変異)
- 組み合わせ LC5 / HC7 (グラフティングによるヒト化に対応する変異)

【0319】

問題あるサイト(NS; DS)に対応する、そして上記の血小板結合実験においてより低い血小板阻害を示す3つの変異体(LC2 / HC2、LC4 / HC5及びLC4 / HC6)は、実施例7(表11参照)の上記のBiacoreによる実験における非ヒト化抗アルファ2インテグリン抗体と比較してより弱い2I-ドメイン結合活性を示す変異体と全く同様であった。すなわち、血小板結合アッセイの結果は、Biacoreによる評価からの親和性データと完全に一致している。

【0320】

実施例10 - 異なる抗アルファ2抗体変異体の熱安定性

熱安定性に関する結果は、表14にまとめられている。この抗体は、コンパレーターと同等な、等しい又は良好な熱安定性を示す。熱安定性測定は、PCRサーモサイクラー(PCR thermocycler)(My-IQ-10~90の温度範囲(1/分)で2回)を用いて行なわれた。PBSバッファー中に希釈された抗体の2マイクログラムが40Xサイプロオレンジ(40XSYPRO Orange)(Invitrogen)に補充された。

【0321】

【表19】

表14:異なる変異体の熱安定性

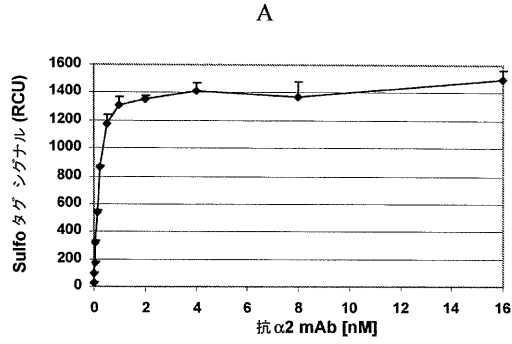
LC/HC組み合わせ	融解温度 °C (1)	融解温度 °C (2)
LC1/HC1	64	—
LC2/HC2	63	—
LC3/HC3	64	68
LC3/HC4	66	—
LC4/HC5	62	67
LC4/HC6	66	—
LC5/HC7	65	72
TMC2206 (コンパレーター)	65	71

10

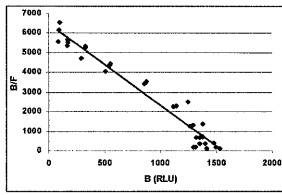
20

30

【 図 1 】

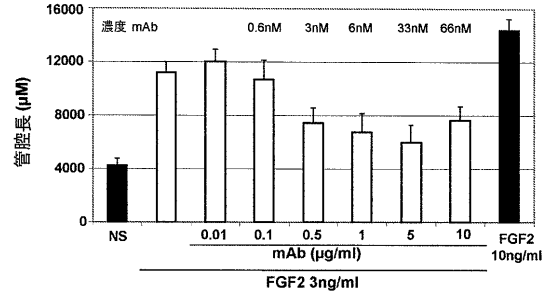


B

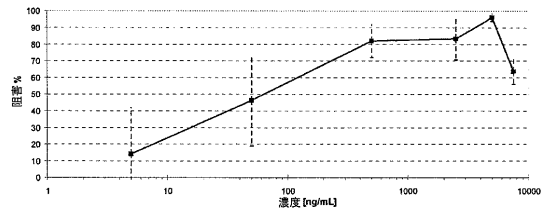


パラメーター	推定 (Estimate)	SD	CV(%)	95%CI
KD (nM)	0.2146	0.01291	6.0	[0.1899 ; 0.2425]

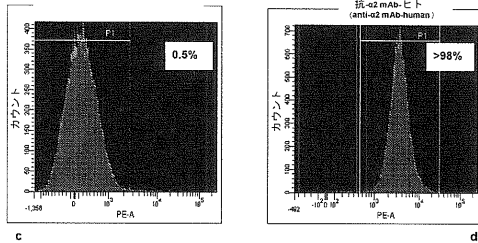
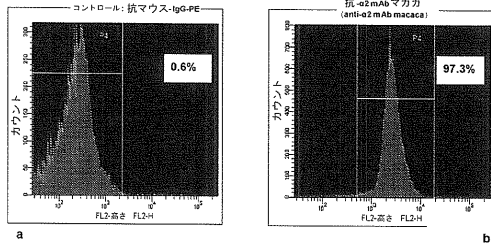
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

5a) 抗α2インテグリンmAbの軽鎖可変ドメイン

```
NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLNSLAS GVPARFSGGG
SRIDFTLTID FVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K
```

(配列番号 1)

```
AACATTGTGCTGACCCAACTCCAGCTCTTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCTCTGAGGCCAG
TGAAGTGTGAGAGTTATGGCAAGTTTATTTACTGGTACAGCAGAAACAGSACAGGCACCCAACTCCCTCA
TCTATCTGCATCCAACTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGTTCACTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTCACCTC
ACCAATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTGACGAAATAATGAGGATCCGTACACTTCGG
AGGGGGACCAAGCTGAAATAAAA
```

(配列番号 2)

5b) 抗α2インテグリンmAbの重鎖可変ドメイン

```
QVQLHQPDAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYRMNWVKQR PGPGLIEWR ILQSDSETHY NQKFKDNATL
TVDKSSSTAY IQLSLTSED SAVYSCARVG RGYFDWSGG TITLVSS
```

(配列番号 2)

```
CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGTACTGGATGAACTTGGTGAAGCAGAGGCTGGACGAGGCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG
ATCCTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAAGTGGGACGGGGTA
CTTGACTACTGGGGCCAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCTCA
```

(配列番号 13)

【 図 6 】

6a: 重鎖可変ドメインのCDR

HCDR1
GYFTSYWMM
(配列番号3)

HCDR2
RIDFSDSETHYNQKFK
(配列番号4)

HCDR3
VGRGYFDY
(配列番号5)

6b: 軽鎖可変ドメインのCDR

LCDR1:
RASSEVESYGNSELY
(配列番号6)

LCDR2:
LASNLAS
(配列番号7)

LCDR3:
QQNNEDPYT
(配列番号8)

7c: キメラ(抗 $\alpha 2$ VH-IHGH1 CH1)重鎖 Fab フラグメント

ATCCTTCGGATAGTGAACCTCACTCAATCAAAGTTCAAGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCTACATCCAACCTCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGGGCTATTACTGTGCAAAGGTGGACGGGGGTA
CTTGACTACTGGGCCAAGGCACACTCTCACAGCTCTCAGCCAGCAOAAAGGCCCTTCCGTGTCCCTCTGG
CCCTTGTCTCCGCTCCACTCCGACTCCAGCTCACCCTGGCTCTGGCTGCTGGTGAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTG
ACCTGTCTCTGGAACTCTGGCCCTGACTCCGCTGCTGGCAACAGACTACACTTCCCTGCGCTGTGCACTCTCCCTGGCTGTA
CTCCCTCTCCCTGGTGGCCCTGCTCTCTCCCTGGCAACAGACTACACTGTAAAGTGGACCAAGC
CTTCCAAACCAAGGTGGCAAGCGGCTGGAGTCCAACTACGGCCCTTTCCTCCCTGGCTGCTGGTGGACCAAGC
GAGGGGGACTAGCTGTCTCTCTCCCTTAAAGCTAAGGACACCTTGATGACTCCCGGACCTTGAAGTGAAC
CTGTGTGGTGGACTGTGCCAGGAGGACCTGAGCTCCAACTGCTAGCTGGACGGCTGGAGTGGCA
AGCCAAAGCAAGCTCGGGAGGAGCAATTCACCTACACCTACCGGCTGCTGCTGTGCTGACCTGCTGCACAG
GACTGGTGAACGGCAAAGAACTAAGTGTAAAGTCTCCAAAGGGCCCTGCCCTCCCTCAACGAAACACTCT
CAAGGCCAAGGCCAGCTAGGAGCTCAGGTGTACACCTGCTCCTAGCCAGGAGAGATGACCAAGAACCAAG
TGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTACCTTCCGACATGCCCTGAGTGGAGTCCCAAGCCAGCCTGAG
AACAATACAGACCAACCTCTGTGCTGACTCCGAGGCTCTCTTCTGCTACTCCAGCTGACCTGGCAAA
GTCCCGTGGCAGGAGGCAACGTCTTCTCTGCTGATGACAGGCGCTGCAACACCACTACCCAGAAAGT
CCTGCTCCTGCTCTGGCC

(コード配列: 配列番号15)

QVQLHQPQGAELVKGAPVKLSCKASGYTFSTSYWMMVKQRPGRGLEWIGRIDPDSSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYCAKVRGYPDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFLP
APSSKTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQYICNVNHPKSTKVDKVKPEKSKDKTHTHHHHH

(アミノ酸配列: 配列番号11)

CAGGTCCAACCTGCATCAGCTGGGGCTGAACCTGTGAAGCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGCTCCGAAAGCTCTGG
CTACACCTTCACAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGACAGAGGCTCGAGTGGATTGCGCAGGATTG
ATCCTTCGGATAGTGAACCTCACTAACAATAAAGTTCAAGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCTACATCCAACCTCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTCCGCTTATTACTGTGCAAAGGTGGACGGGGGTA
CTTGACTACTGGGCCAAGGCACACTCTCACAGTCTCCAGCCAGCAOAAAGGCCCTTCCGTGTCCCTCTGG
CCCTTGTCTCCGCTCCACTCCGACTCCAGCTCACCCTGGCTCTGGCTGCTGGTGAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTG
ACCTGTCTGGAACTGGCCCTGACCCAGGCTGCTGGCTGCTGGCAACAGACTACACTTCCCTGGCTGTA
CTCCCTGTCTCCCTGGTGGCCCTGCTCTCCCTGGCAACAGACTACACTGTAAAGTGGACCAAGC
CTTCCAAACCAAGGTGGCAAGCGGCTGGAGTCCAACTACGGCCCTTTCCTCCCTGGCTGCTGGTGGACCAAGC
CTTCCAAACCAAGGTGGCAAGCGGCTGGAGTCCAACTACGGCCCTGACCTGCTGCTGACCTGGACGGCTGGAGTGGCA

(コード配列: 配列番号16)

【 図 7 - 1 】

7a: キメラ (抗アルファ2VL-IGKC CL) 軽鎖

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVESYGNSELYWYQQKPGQAPKLLIYASNLASGVPA
RFSGSGSRDTDFLLIDPVEADDAATYCYQNNEDPYTFGGGTKLEIKRIVAAAPSVYIFPSPDDEQ
LKSQTSASVVCLLNFFPREAKVQKQVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(アミノ酸配列: 配列番号9)

AACATTTGCTGACCCAACTCCAGCTTCTTGGCTGTGTCTTAGGGCAGAGGCCACCATATCCTGAGAGCCAG
TGAAGTGTGAGAGTATGGCAACAGTTTTATTACTGTGACAGCAAGAACAGGACAGCCAACTCCTCA
TCTATCTTGGATCGAACCTGACCTTGGGCTCCCTCCAGGCTGAGTGGGCTGAGGCAACACTCACCTC
ACCATGTACTCTGTGGAGCTGATGATCTGCAACCTATTACTGTGCAAAATTAAGAGGATCCCTACACTCCG
AGGGGGACCAAGCTGGAATAAAGCTACCGTGGCCCTCCTTCCGTGTTCACTTCCCTCCCTCCGACGACAGC
TGAAGTCCGGCCAGCCCTCCGTTGTTGCTGCTGAAACAACCTTACCTCCGGGAGCCAAAGTGCAGTGGAGGTG
GACAACCCCTGCACTCCGGCACTCCAGGAGTCCCTCAGGAGGAGCACTCAAGGACAGCACTACTCCCTGTC
CTCCACCTGACCTGTCGAAGGCCACTACGAGAGCAAGTGTACCCCTGTGAGGTGACCCACAGGCGCTGT
CCAGCCCTGTGACCAACTCCTCAACCGGGCGAGTGC

(コード配列: 配列番号14)

7b: キメラ (抗 $\alpha 2$ VH-IHGH4 CH1) mAb

QVQLHQPQGAELVKGAPVKLSCKASGYTFSTSYWMMVKQRPGRGLEWIGRIDPDSSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYCAKVRGYPDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFLP
APCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQYICNVNHPKSTKVDKRVESKYPPCPAPEFEGGSPVFLPFPKPDLMISRTPEV
TCVVVDVQEDDEVEQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKRTTPVLDSDGSEFLYSLRSLTVDKSRWQEGNPFVSCVMHEALHNHTYQKLSLSLGLG

(アミノ酸配列: 配列番号10)

CAGTCCAACCTGCATCAGCTGGGGCTGAACCTGTGAAGCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGCTCCGAAAGCTCTGG
CTACACCTTCACAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGACAGAGGCTCCAGTGGATTGGCAGGATG

【 図 7 - 2 】

【 図 8 】

キメラ抗体コンストラクトの作製のためのヒト定常領域

Swiss-Prot: Q502W4
>gi|74740177|sp|Q502W4|Q502W4_HUMAN IGKC protein
RTVAAAPSVYIFPSPDDEQLKSGTASVVCLLNFFPREAKVQKQVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(アミノ酸配列: 配列番号17)

Swiss-Prot: P01881.1 (S108P, L115E)
>gi|121047|sp|P01881.1|IGHG4_HUMAN RecName: Full=Ig gamma-4 chain C region
ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYICNVNHPKSTKVDKRVESKYPPCPAPEFEGGSPVFLPFPKPDLMISRTPEVTCVVVDVQEDDEVEQ
FNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PFSQEQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKRTTPVLDSDGSEFLYSLRSLTVDKSRWQEGNPFVSCVM
HEALHNHTYQKLSLSLGLG

(アミノ酸配列: 配列番号18)

Swiss-Prot: Q569F4
>gi|74735951|sp|Q569F4|Q569F4_HUMAN IGHG1 protein
ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYICNVNHPKSTKVDKRVESKYPPCPAPELGGSPVFLPFPKPDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKRTTPVLDSDGSEFLYSLRSLTVDKSRWQEGNPFVSC
VMHEALHNHTYQKLSLSLPGK

(アミノ酸配列: 配列番号19)

【 図 9 - 1 】

ヒト $\alpha 2$ 及び $\beta 1$ インテグリン配列

アクセッション番号: NP_002194.2 による $\alpha 2$ インテグリン前駆体:

1 mmpertgaap lpllllvials qgllnccloy nvglpesakif sppsseqfsy avqqfinpkg
61 nwillvqspws gfpenamgydr ykcpvdista tceklnlqts tsipnvtcmk tmslglilit
121 nmmtggfllt cgp1waqqcg nqyyttgvcs dispdfqlsa sfspatqpop slidvvvvcd
181 ensniypwda vknflekvq gldigptktg vgligvannp rvvfnlntyk tkeemivats
241 qtsqvggdlit ntfqaiqvar kyvasaasgg rrsatkvmv vtdgeshdqs mikavidqen
301 hdnlirfgia vlgynrnal dtknlkeik aliasiptery ffnvsdeaal lekagltige
361 ifsigtvqq gdnfcmemsq vqfaadyssq ndilnlgavq afgwsgtiqv ktsghlflp
421 kqafqilqld znhssylgys vaastgest hfvagapran ytgqivlysv nengnitviq
481 ahrqdgigsy fgsvlcsvdv dkdtidvll vqapmysdl kkeegrviyf tikegilgsh
541 qflegpegie ntrfgsaiaa ladinmdfn divvgsplen qnsagaviyn ghsqitrtky
601 sqklgsdga frshlyqfgr sldgygdng dsitdvsiga fqqvvlwsg siadvaieas
661 ftpekitlvn knaqiilkic fsakfrptkq nnqvaivyni tldadgfsar vtarglfken
721 nerc1qknmv vnqaqspeh iiyiqepsdv vnsldlrvid slenpgtspa leaysetakv
781 fsipfkhdcg edglcisldv ldvrqipaag eqpfivsnqn krltfsvtlk nkesayntg
841 ivvdfeenlf fassfslpvdg tevtcqvaaas qksvacdvgy palkreqvvt ftinfdfnlq
901 nlqmqaslef qalsesqeen kadnlvnlki pllydaeh1 trstninfye issdgnvps1
961 vnsfedvqpk f1fs1kvttg svpvsmatvi ih1pqr1kek nplmlytgvq tdkagdlscn
1021 adinplk1qg lsssvs1kse n1rftkkelnc r1ascnsvtc w1kdvhm1ge y1fvn1t1r1w
1081 ngtfasfstq tvqltaae1 n1ngyep1yvi edntv1plm imk1pdekaev ptgviigs1i
1141 ag1ll1lalv a1l1k1lgf1k r1kyekatknp deidettels s
(配列番号 20)

NCBI アクセッション番号: NM_002203.3 による $\alpha 2$ インテグリンコード配列 (hs):

【 図 9 - 2 】

1 atggggccag aacggacagg gggccgcgcy ctgcoctgcy tctgtgtgtt agcctcagc
61 caaggcattt taaatgtgtt ttggcctac aatgttggtc tccagaagc aaaaatattt
121 tccggtcctt caagtgaaca gtttggtatc gcagtgagc agttataaa tccaaaagc
181 aactggttac tggltgggtc accctggagt ggtttctcgc agaaccgaat gggagatgtg
241 tataaatgct ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaatgt gcaacttca
301 acaagcattc caaatgttac tgaagatgaa accaacatga gctcggctt gatcctcacc
361 aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtgtctctc tgtgggcaca gcaatgtggg
421 aatcagtatt acacaacggg tgtgtgtctt gacatcagtc ctgatttcca gctctcagcc
481 agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgtgtggtt tgtgtgtgat
541 gaatcaata gtattatcc ttgggatgca gtaagaaltt ttltgaaaa atttgtacaa
601 ggcctggata taggcccacc aaagacacag gtaggggttaa ttcagatgc caataatcca
661 agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aatgatgtgt agcaactccc
721 cagacatccc aatattgtgg ggaactcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga
781 aatatgctt atcagcagc tctctgtggg gcagcaggtg ctacgaagt aatgttagtt
841 gtaactgagc gtgaatcaca tgatgttcca atgttgaagc ctgtgatgta tcaatgcaac
901 catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttctgtggt acttaaacag aaacyccctt
961 gatactaaaa atttaataa agaataaaa gcaatcgtca gtattccaac agaagatcac
1021 ttttccaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaaag ctgggacatt aggagaaca
1081 atttccagca ttgaaggtac tgltaaggga ggagacaact ttcagatgta aatgtcaca
1141 gtgggatcca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatctgggg tgcagtggga
1201 gcttttggct ggagtgagac cattgtccag aagacatccc atggccattt gatcttctct
1261 aaacaagcct ttgacaaatc tctgagggag agaatacaca gttcatattt aggltaactc
1321 tgggctgcaa tttctactgg agaaaacact cacttgttgy ctgggtctcc tgggcaaat
1381 tataccggcc agatagctgt atatagttg aatgagaatg gcaatcacac ggtlattcag
1441 gctaccagag gtgaccagat tggctcctat ttgtgtagt tgtgtgtctt agttgatgtg
1501 gataagaca ccattacaga cgtgctctgt gtaggctcac caatgtacat gactgacctc
1561 aagaaagagg aaggaagagt ctactgtttt actatcaaa agggcatttt ggtcagcac
1621 caatttcttg aaggcccoga gggcattgaa aacactgat ttgttctcag aattgcagct
1681 ctttcagaca tcaaacatga tggctttaa gatgtgatgt ttggttcaac actagaaat

【 図 9 - 3 】

1741 cagaattctg gactgtata catttacaat ggtcatcagg gcaactatcc cacaagat
1801 tcccaaaaa tcttgggact ogatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttggggag
1861 tccctgggat gotatggaga ttaaatggg gattccatca cogatgtgctc tattgtgtcc
1921 ttggacaag tggttcaact ctggtcaca agtatctgct atgagetat agaagcttca
1981 ttcacaccag aaaaatcac ttgggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc
2041 ttcagtgcac agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc
2101 acaactgatg cagatgattt tcaaccaga gtaacctcca ggggttat taaagaaac
2161 aatgaaagt gcttcagaca gaalatgta gtaaatcaag cacagagltg ccccgagcac
2221 atcattata tacaggagcc ctctgatgtt gtaacctctt tggatttggc tgtggaactc
2281 agtctggaaa accctggacc tagcctgccc cttagagcct attctgagac tggcaaggtc
2341 ttcagattc ctttccaca agactgtggt gaggacggac ttgcaattc tgcattgctc
2401 ctgagtgtcc gacaaatac agctgtcaca gaacaacct ttattgtcag caaccaaaac
2461 aaaaggttaa cattttcagt aacgtcga aataaaaagg aaagtgcata caaactgga
2521 attgtgtgtt attttcaga aaactgtt ttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg
2581 acagaagtaa catgcaggtt ggtctgactc cagaagctgt ttgctcgoga tgtaggctac
2641 cctgotttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actllgactt caactctcaa
2701 aacctctaga atcagggttc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaac
2761 aaggtgata atttggcca cctcaaaatt cctctcctgt atgatgtga aatcaacta
2821 acaagatcta caacataaa ttttatgaa atctctcgg atgggaatgt tcttcaactc
2881 gtgcaagtt tgaagatgt tggccaataa ttoactctct cctgaaagt aacaacagga
2941 agtgttccag taagcatggc aactgtaac atccactcc ctcaatatac caaagaaaag
3001 aaccactgca tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg clgltgacal cagltglaat
3061 gcagatata atccactgaa aataggacaa acatctctct ctgtatcttt caaaagtga
3121 aatttcaggc acacaaga atgaaactgc agaactgctt ctgttagtaa tgttacctgc
3181 tggttgaaag acgttcaact gaagagaga tctttgtta atgtactac cagaatttgg
3241 aacggactt tgcatact aacgtccag acagtacag taacggcagc tgcagaaac
3301 aacactata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttactat tccctgatg
3361 ataataaac ctgatgaga agccgaagta ccaacaggag ttataatag aagtataatt
3421 gctgaaatcc tttgtgctt agctctggtt gcaatttat ggaagctgg cttcttcaaa

【 図 9 - 4 】

3481 agaaaatag aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt
3541 agctga
(配列番号 21)

NCBI アクセッション番号 NP_002202.2 による $\beta 1$ インテグリンアイソフォーム 1A 前駆体 (hs):

1 mnlqpfwig lissvccvfa qtdenrclka nakscgeciq agpncgwctn stflqegmpt
61 sarcdleal kkkcoppddi enprgskdik knkntnrsk gtaeklkped itqigpqvlv
121 lrlrsgepqt ftlkfkraed ypidlylmd lsysmddle nvkslgtldm nemritsdff
181 zigfgsivek tvmptisttp aklnpctese gntcspfsyk nvlsltnkge vfnlvqkqr
241 isgnldspeq gfdaimvav csgliqwrnv trllvfstda gfnfadgkkl gvlvlpndgg
301 chlenmytm shydypsia hlrvklseenn iqtifavtee fqpvykelkn lipkaavgtl
361 sanssviql iidaaysls evilengkls egvtisyksy cknvgntge ngrkesnisi
421 gdevqfeisi tsnkcpkkds dsfkirplgf teevevilgy icececgseg ipespckhey
481 ngtfecgacr cnegrvgrhc ecstdevnse dmdaycrken sseicsnag evocgqvrck
541 rdntneisyg kfcednfnrc drsnlgicgg ngvckrcvce cnpnytgsac dcsldtstce
601 asngqicnrg gicecgvcke tdpkfgqgtc emcqtclgvc aekhecqvcr afnkgekddt
661 ctqecsyfni tkvesrdklp qpvpdpvsh ckekvdvddw fyftysvngn nemvhwven
721 pceptgpdii pivagvvagi vliqlallli wkllmihrd refakfekek mnakwdtgen
781 piykasvttv vnpkyegk

(配列番号 22)

NCBI アクセッション番号 NM_002211.3 による $\beta 1$ インテグリンコード配列 (hs) アイソフォーム 1A:

1 atcagacgcy cagagaggc ggggcccggc ctggttctct gccggggggc ggetctgggc
61 cgcagagacc cctctccgc cccctgagga ggaagagcc cgcgaccgc cgcgcccoga
121 cccccggag gcccccagc cccgcccggc agcccagcc gsgctgcgcy aacagcagge
181 cccgcccacc cgcgcccggc cccgagccc cgcgcccaga gatgattta caacaaatct
241 tctgattgg actgatcagt tcaatttctt gttgttctgc tcaaacagat gaaaatagat

【 図 9 - 5 】

301 gttttaaagc aatgcccaca tcatctggag aatgtatata agcagggcca aattgtgggt
361 ggtgcacaaa ttoaacattt ttaacaggag gaatgcctac ttctgcaaga tgtgatgatt
421 tagaagccct aaaaaagaag gtttgcctcc cagatgacat agaaaatccc agaggtccca
481 aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca
541 agccagagga tattactcag atccaaoccc agcaattggt ttgocgata agatcagggg
601 agccacagac atttacatta aaatcaaga gagctgaaga ctatccocatt gacbtocact
661 aocctatgga cctgtcttac tcaatgaaa agatlttggg gaatgtaaaa agtcttgtaa
721 cagatctgat gaatgaaat agggaggata cttygacct cagaaltgga ttbggclcat
781 ttgtggaaaa gactgtgatg ctttaccata gcacaacccc agctaagctc aggaacccct
841 gcacaagtga acagaactgc accagcccat tttagctaaa aaatgtgctc agtcttacta
901 ataaaggaga agtatttaat gaactgtgtg gaaaacagcg calatctgga aatttgatt
961 ctccagaagg tggtttogat gccatcatgc aagttgcagt ttgtgatca ctgatggct
1021 ggaggaaatg tacaagctgt ctggtgtlnt ccacagatgc cgggttccac ttgctggag
1081 atgggaaact tgggtgcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaaataa
1141 tgcacacaa gagccattat tatgatctac ctctatttgc tcaactgtgc cagaaaactga
1201 gtgaaaaata taltocataa atttctcagc tctcagaaga atttcagcct gtttcaaggg
1261 agctgaaaaa ctgtatccct aagtccagc taggaaacatt atctgcaaat cttagcaatg
1321 taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccccttccct agaagtcatt ttgaaaaacg
1381 gcaaatgtgc agaaggctga acaatlaaglt acaaatlta ctgcaagac ggggtgaaag
1441 gaacagggga aatggaaga aatgttcca atattccat tggagatgag gttcaattg
1501 aaattagcat aactlcaaat aagtgtccaa aaaagattc tgacagcttt aaatttaggc
1561 ctctggcctt tacggaggaa gtagaggata ttcttcagta catctgtgaa tglgaaagcc
1621 aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcataaggg aatgtggaca ttgagtgtg
1681 gogctgcaag gtgcaatgaa gggcgtgtgt gtacacattg tgaatgcagc acagatgaa
1741 ttaacagtga agacatggat gcttactgca gaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta
1801 acaatggaga gtgctgtcgc ggacagctgt ttgttaggaa gagggataat caaatgaaa
1861 ttattctctg caaattctgc gagtgtgata attcaactg tgatagatcc aatggcttaa
1921 ttgtggagg aaatgtgtt tgcaagctgc gtgtgtgtg gtgcaacccc aactcaactg
1981 gcaagtcatg tgactgtct ttggatacta gtaactgtga agccagcaac ggcagatct

【 図 9 - 6 】

2041 gcaatggccg gggcctctgc gactgtggtg tctgtaegtg tacagatccg aagtttcaag
2101 ggcaaaectg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tctgagcat aagaagtgtg
2161 ttoagtgcag agccttcaat aaaggagaaa aagaagacac atgcacacag gaatgttctc
2221 attttaecat taccagagta gaaagctggg acaattacc ccagcccgctc caactgtatc
2281 ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgtg acgactgttg gttctatttt acgtatcaag
2341 tgaatgggaa caacagagtc atggttcaat ttgtgagaa tccagagatg cccactggct
2401 cagacatcat tccaatlgtg gctgtgtggt tctgtgaaat gttcttatt ggccttgc
2461 tactgtgat atggaagctt ttaatgata ttatgacag aaggttattt gtaaaattg
2521 aaaaaggaaa aatgaatgcc aatgggaca cgggtgaaa tccattttat aagagtgcgc
2581 taacaactgt ggtcaatccg aagtatgag gaaaatgagt actgcccgtc caaatccac
2641 aacactgaat gcaaatgac aatttccata gtcacagta ggtagctta gggcaatatt
2701 gccatggtt tactctatg caggttttga aaatgtcaaa tatgtataat ttttaaatg
2761 ttttattatt ttgaaaaaa tggttgaatt catgccagg actgcaaaaa gacttgagac
2821 aggatgttata ctctgtcag ctaagctcac atgtgcttt ttgactttt tcttctctg
2881 ctattgaaat caagcttat ggataagtg atattttat acgctatgaa agggcaatag
2941 ttaagtaat gagcatgat agagtctgt ttaactatg attaaaactg atttttagct
3001 ttacaatat gtcagtttc agttatgag atccaaagt aaatgtctg ctatgtagt
3061 aaggatgtt taaactgtg tattttgata ttgctgctt agactgact gatgacat
3121 ctgaaagaca aglatgtga gattgtgtg tgaataaac glllgaataa gttgatctac
3181 aaagccatg gaaaaaalc agagatlag gaagaaaaa ccaatagctt taaaacctg
3241 gtgcaattt aagagtact taagtgttg taaattttat gcttcaact tacaattta
3301 agccttagat aaaaagacc agcaalltc tgcataaaa tcltgaall agcaatll
3361 acatacagc cactcttac aaagtattg ctgaagggg accttttagg ttgaattat
3421 ttattattt ttattttgt taagtgtg tcttctctg cactcttct aatctttta
3481 tgaattgtt tgcaatttg gggtaagact tttttatga gtaactttt ttgagattt
3541 tagogtcaa ttgctctt taatgaact gtaagttat actgtggctg tgcacaact
3601 ctcaactac cgagcttcc ttgagttag tgcataaca gacactgta tcttacttc
3661 tcaaatltg agttgccc atgttctac actagtcaca tcttctttt aaggtctt
3721 agtttataa gttcacttt tacagtcta ttactgaag ttatttata aatagctta

【 図 9 - 7 】

3781 aaatacttaa atcgatgtc ttgatctga tgtattttat caggtttgtt gcatgaaat
3841 ttatagattt aaagaattg aggaagaaca aaaaaaaaa (配列番号 23)

【 図 10 - 2 】

10d: 抗α2インテグリン mABの分泌HCのアミノ酸配列
qvqlhpggaelvkgpavklsckasgytftsymwvkrpgrglwlgidpsdsethynqkfkdkkatltvdks
tayklsaltscdsavvyckvgrgydywggctltvssaktapevylpavcgdtegsvtlgclvkgyipev
ltwmsglssgvtspvlsqdytlsssvtssatwpsglitcnvwhpasstkvdkkiespgrtkpckcpa
pnlggpsvflfppkikdvlmslslptvtcvvdvsadpdlvqisfvnvnvhtatqthredmstlrvsalpi
ghldmksqfKckvnnkdlpapiertiaipkgsrvrapqvylpppeemtkkvltcmvdfmpediyvewtnng
ktelnxntpevlidsdgsyfmysklrveknwvsnyscsyvhelghhhtkksfsrtgpk (配列番号 48)

【 図 10 - 1 】

10a: 抗α2インテグリン mABのLCをコードする cDNA
atggagacagacacactcctgtctgggtgctgctcgtgggtccaggttccacaggttaacattgtgtgaccca
atcccaagctctcttggctgtgctctctagggcagaggccaacatctctgcagagccagtgaaagtgtgagagtt
atggcaacagtttacttactgaccagagcaaaagcagcaacaaactccatctctatctgcatccaac
ctgacatctgggtctcctgcagctcaggtgagctgggtctgagcaagctccactccactcctgctgtgga
ggctgatgctgctgcaaccttactctgcaagaaataatgaggtccctgacagcttcggagggggaaccaagctgg
aaaataaacgggctgatgctgcaaacatgctcctctccacacatccagctgacagcttaacatctggaggtgcc
ctagctgtgctctctgaa caactctaccaccaagacatcaatgtcaagtggaaagtgatgctgagctgcaagca
aaaatggctcctgcaacagctgactgacagagcaagcaagacagcaactcagatgagcaagcaacactcagctgga
ccaggaagcagatgacacataa cagctaacctgtgagggcactcaagaacatcaactcaccatgtgcaag
agcttcaacaggaatgagctgtag (配列番号 45)

10e: コンパレーター抗体のアミノ酸配列
コンパレーターのLCのアミノ酸配列
DFVMTQSPAPFLSVTPGKVTITCSAQSSVNYIHWYQKDPQAPKLLYDTSKLASGVPSR
FSGSGSTDYFTTISLEAEADAATYQCQWTTNPLTFGGQKVEIKRTRVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
SKADYERKRVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 53)

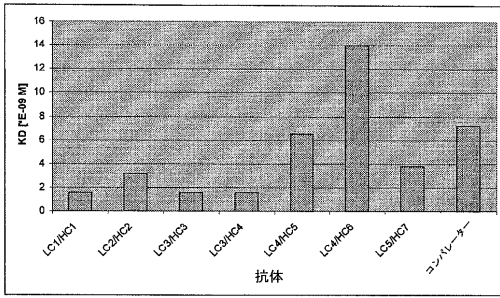
10b: 抗α2インテグリン mABのHCをコードする cDNA
atggatggagctgtatcaactctctctgtgagcaacagcaaggttccactcccaagctccaaactgcatcagcc
tggggtgaaacttgaaagcctggggctccaagtgaagctctgcaaggtcttggtcacacctcaccagctact
ggatgaactgggtgaagcagagggcctggagcagcctcagatggatlgcaggattgactcctccgatagtgaaact
cactcaactcaaaagtcaaggaacagcactgactgagcaaaactcctccagcagcagctcaactccaaactcag
cagctgcaactctgggctctgggtctatctactgtgcaaaaggtggaggggactcttgactactgggccaag
gcaccactctcaactctcctcagctaaaaacaacagccactcgtctatccactggccctctggtgtggagataca
actgctcctcagtgactatagatgctgagcaaggttatctccctgaccagtgacctgactgaaactcctgg
atccctgctcaggtgtgcaacactcctcagctgtcctgcaagctgcaactcaacactcaagcagctcagtgactg
taacctggagcactggcccaagcagctccactcctgcaatgtggccaccggcgaagcagcaacaggtggacaag
aaaattgagccagagggcccaaa tcaagcctctcctccatgaaattgcccagcaacttaacctctggtyggcc
atcctgctcctctctcccaaaagcaagagatgactcatgatctcctgagcccaatgactcaactgtgtgggtg
tggatgtggcggaggtgcaacagctgctcagatcagctgggtttgtgcaacaagctggagatcacacagctcagaca
caaaccaatagagagattcaaacagctactccgggtgtcagtgccctcccaactcaagcaccaggaactggaag
tggcaagaggttcaaatgcaaggtcaacaacaagaactccagcggccactcgagagaaacctctcaaaacccaag
ggctcagtaagagctcaaacaggtatctgcttgcctcccaagagagagatgactagaaaacaggtcactctgacc
tgaatgtccagactcctgctggaagcatttaogtggatggcccaacaacagggaaacagaggtcaactcaaca
gaacactgaacagctcctgactgctggttctactctatgacagcaagctgagaggtggaaaagaagaactggg
tggaaagaatagctactcctgttcaaggtccagagggctgcaacaatcaaccacaagactaagactctcccgag
actccgggaagtgga (配列番号 46)

10f: コンパレーターの HC のアミノ酸配列
QVQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGFSLTNYGIHWIRPFGKLEWLVSIWARGFTN
YNSALMSRLTISKDNRKQVSLKLSVTAADTAVYCARANDGVYAMDYWGQGLVT
VSASTRKGPSVFLPAPCSRSTSEALGLVLDVFEPEVTVSWNSGALTSVGHFFA
VLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVKESYKGPFPCCPAPE
FEGGSPVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVDSQDEQDEQVFNVDGVEVHNKTKP
REBQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRPQVY
TLPFSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTKTIPVLDSDGSPFLY
SRLTIVDKSRWQEGNVFSCSVMHLELHNHTKQKLSLSLGL (配列番号 54)

10c: 抗α2インテグリン mABの分泌 LC のアミノ酸配列
niwltgspaslavslgqratisccasesvesygnfiywrqkpggpklliyaslmslasgyparfsqgsgrtdtlt
tidvveadadaiyyqgnedpytfgggkllkkaadaapvifppaaetlccggsvvflnnyfpkdlvkwkhi
dgerqrvlnsdtdqskdstysmsstlbtckdeybrhsyctcahtkttatpikvafnrcnc (配列番号 47)

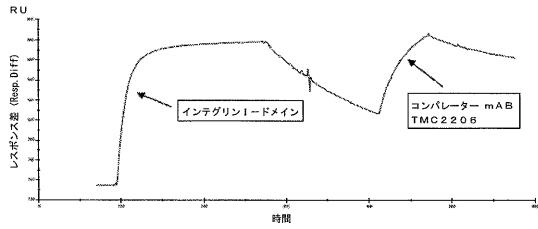
【 図 1 1 】

ピアコア (Biacore) によって決定されたヒト化変異体及びコンパレーターの場合の平衡解離定数 K_D



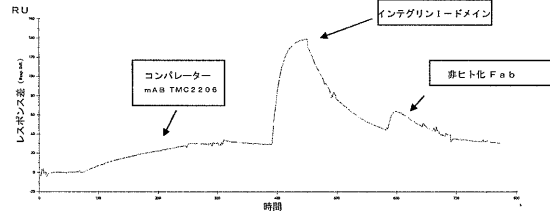
【 図 1 2 】

ピアコア (Biacore) を用いて測定された、非ヒト化 Fab によってプレバインディングされたインテグリン $\alpha_2 I$ ドメイン へのコンパレーター mAb TMC2206 の結合



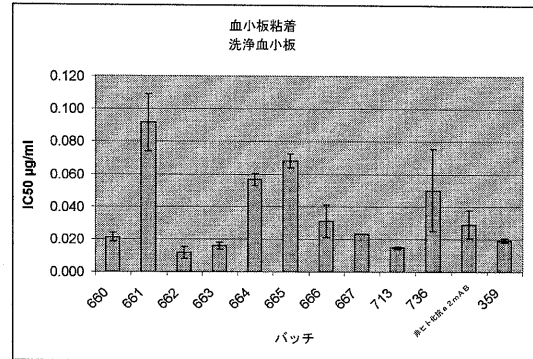
【 図 1 3 】

コンパレーター mAb TMC2206 によってプレバインディングされたインテグリン $\alpha_2 I$ ドメイン への非ヒト化 Fab の結合



【 図 1 4 】

洗浄血小板を用いる静止状態下におけるコラーゲン への血小板粘着の阻害



【 配 列 表 】

2013544489000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/064926

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K39/395 C07K16/28 A61P29/00 A61P37/06	G01N33/68 G01N33/10 A61P9/10 A61P17/06 A61P35/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/052556 A1 (GLENMARK PHARMACEUTICALS SA [CH]; MOTTI HARALD [CH]) 14 May 2010 (2010-05-14) paragraphs [0019], [0054] -----	1,2,4-44
X	WO 2007/056858 A1 (CHROMOS MOLECULAR SYSTEMS INC [CA]; LAZARIDES ELIAS [US]; WOODS CATHER) 24 May 2007 (2007-05-24) paragraphs [0002], [0017], [0038] ----- -/--	1,2,4-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 January 2012		Date of mailing of the international search report 16/05/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pilling, Stephen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/064926

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUGHES DARREN L ET AL: "Platelet integrin alpha 2 I-domain specific antibodies produced via domain specific DNA vaccination combined with variable gene phage display", THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 94, no. 6, December 2005 (2005-12), pages 1318-1326, XP009155506, ISSN: 0340-6245 abstract -----	1,2,4-44
X	SCHOOLMEESTER A ET AL: "Monoclonal antibody IAC-1 is specific for activated alpha2beta1 and binds to amino acids 199 to 201 of the integrin alpha2 I-domain", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 104, 15 July 2004 (2004-07-15), pages 390-396, XP003013249, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2003-12-4224 abstract -----	1,2,4-44
A	DATABASE WPI Week 201058 Thomson Scientific, London, GB; AN 2010-K42503 XP002626403, & WO 2010/095270 A1 (GENE TECHNO SCI CO LTD) 26 August 2010 (2010-08-26) abstract; sequence 12 -----	1,2,4-44
A	US 2005/281828 A1 (BOWDISH KATHERINE S [US] ET AL) 22 December 2005 (2005-12-22) abstract; sequence 61 paragraphs [0018], [0094] -----	1,2,4-44
A	WO 2007/106915 A2 (GENENTECH INC [US]; YE WEILAN [US]; SCHMIDT MAIKE [US]; HONGO JO-ANNE) 20 September 2007 (2007-09-20) page 1, line 9 - line 12; claims 5,23-26,33; figure 1; sequence 7 page 14, line 26 - page 15, line 27 page 19, line 2 - line 20 -----	1,2,4-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2011/064926**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2(completely); 4-44(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 064926

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 4-44(partially)

Peptide or peptide complex which specifically binds to the I-domain of a human $\alpha 2$ -integrin, and associated nucleic acid / vector/ cell and methods of preparing said peptide or peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis using said peptide/ peptide complex.

2. claims: 3-44(partially)

Peptide/ peptide complex and associated nucleic acid / vector/ cell and methods of preparing said peptide or peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis using said peptide/ peptide complex wherein the peptide/ peptide complex comprises the following subsequence RASESVESYGNSFIY (SEQ ID NO:6) or a functionally active variant thereof.

3. claims: 3-44(partially)

Peptide/ peptide complex and associated nucleic acid / vector/ cell and methods of preparing said peptide or peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis using said peptide/ peptide complex wherein the peptide/ peptide complex comprises the following subsequence LASNLAS (SEQ ID NO:7) or a functionally active variant thereof.

4. claims: 3-44(partially)

Peptide/ peptide complex and associated nucleic acid / vector/ cell and methods of preparing said peptide or peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis using said peptide/ peptide complex wherein the peptide/ peptide complex comprises the following subsequence QQNNEDPYT (SEQ ID NO:8) or a functional active variant thereof

5. claims: 3-44(partially)

Peptide/ peptide complex and associated nucleic acid / vector/ cell and methods of preparing said peptide or peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis using said peptide/ peptide complex wherein the peptide/

International Application No. PCT/ EP2011/ 064926

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

peptide complex comprises the following subsequence
GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:3) or a functionally active variant
thereof

6. claims: 3-44(partially)

Peptide/ peptide complex and associated nucleic acid /
vector/ cell and methods of preparing said peptide or
peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said
peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis
using said peptide/ peptide complex wherein the peptide/
peptide complex comprises the following subsequence
RIDPSDSETHYNQKFK (SEQ ID NO:4) or a functionally active
variant thereof

7. claims: 3-44(partially)

Peptide/ peptide complex and associated nucleic acid /
vector/ cell and methods of preparing said peptide or
peptide complex; pharmaceutical compositions comprising said
peptide/ peptide complex; methods of treatment/ diagnosis
using said peptide/ peptide complex wherein the peptide/
peptide complex comprises the following subsequence VGRGYFDY
(SEQ ID NO:5) or a functional active variant thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/064926

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010052556 A1	14-05-2010	AU 2009312532 A1	14-05-2010
		CA 2742899 A1	14-05-2010
		EP 2346903 A1	27-07-2011
		US 2010158904 A1	24-06-2010
		WO 2010052556 A1	14-05-2010

WO 2007056858 A1	24-05-2007	AU 2006315037 A1	24-05-2007
		CA 2629715 A1	24-05-2007
		CN 101360826 A	04-02-2009
		EA 200801314 A1	30-10-2008
		EP 1948798 A1	30-07-2008
		JP 2009516506 A	23-04-2009
		KR 20080074184 A	12-08-2008
		WO 2007056858 A1	24-05-2007
		ZA 200804148 A	27-01-2010

WO 2010095270 A1	26-08-2010	AU 2009340658 A1	22-09-2011
		CA 2753280 A1	26-08-2010
		CN 102325796 A	18-01-2012
		EP 2399937 A1	28-12-2011
		US 2011318368 A1	29-12-2011
		WO 2010095270 A1	26-08-2010

US 2005281828 A1	22-12-2005	AU 2004229311 A1	28-10-2004
		CA 2517926 A1	28-10-2004
		EP 1605974 A2	21-12-2005
		IL 170590 A	30-11-2011
		JP 2006521387 A	21-09-2006
		JP 2010178758 A	19-08-2010
		KR 20050114224 A	05-12-2005
		NZ 542134 A	26-06-2009
		NZ 577166 A	29-10-2010
		US 2005281828 A1	22-12-2005
		US 2006257412 A1	16-11-2006
		US 2012107301 A1	03-05-2012
		WO 2004091543 A2	28-10-2004

WO 2007106915 A2	20-09-2007	AR 059851 A1	30-04-2008
		AU 2007226522 A1	20-09-2007
		BR P10707047 A2	12-04-2011
		CA 2646513 A1	20-09-2007
		CO 6180454 A2	19-07-2010
		CR 10280 A	07-11-2008
		EC SP088743 A	31-10-2008
		EP 1994056 A2	26-11-2008
		JP 2009529892 A	27-08-2009
		JP 2012036205 A	23-02-2012
		KR 20080099328 A	12-11-2008
		MA 30331 B1	01-04-2009
		NZ 570588 A	25-11-2011
		RU 2008140947 A	27-04-2010
		US 2010203041 A1	12-08-2010
		US 2011200602 A1	18-08-2011
		WO 2007106915 A2	20-09-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 3/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/08	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

- (72) 発明者 ホルスト・ブルーム
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイチュ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ベアトリス・カメロン
フランス国エフ - 7 5 0 1 3 パリ・アヴェニュー・ドゥ・フランス 1 7 4・サノフィ - アベンティス
・デパルteman・ブレヴェ
- (72) 発明者 タリク・ダブドゥビ
フランス国エフ - 7 5 0 1 3 パリ・アヴェニュー・ドゥ・フランス 1 7 4・サノフィ - アベンティス
・デパルteman・ブレヴェ
- (72) 発明者 ステファニー・ドゥカリー
フランス国エフ - 7 5 0 1 3 パリ・アヴェニュー・ドゥ・フランス 1 7 4・サノフィ - アベンティス
・デパルteman・ブレヴェ
- (72) 発明者 ニコラ・ポラン
フランス国エフ - 7 5 0 1 3 パリ・アヴェニュー・ドゥ・フランス 1 7 4・サノフィ - アベンティス
・デパルteman・ブレヴェ
- (72) 発明者 ダヴィド・パパン

フランス国エフ - 7 5 0 1 3 パリ . アヴェニュー・ドゥ・フランス 1 7 4 . サノフィ - アベンティス
. デパルteman・プレヴェ

(72)発明者 クリスティアン・ランゲ

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン . サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA07 DA02 DA03 EA04 GA11 HA01
HA15 HA17
4B064 AG27 CA19 CC24 CE06 CE07 CE12 DA01 DA13
4B065 AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA01 BD15 BD18 CA25 CA44
CA46
4C085 AA14 AA15 AA16 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
GA10 GA15 GA22 GA26

专利名称(译)	与 α 2整联蛋白结合的肽或肽复合物及其中涉及的方法和用途		
公开(公告)号	JP2013544489A	公开(公告)日	2013-12-19
申请号	JP2013526447	申请日	2011-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲		
申请(专利权)人(译)	Sanofui		
[标]发明人	カールステン・コルヴィー ホルスト・ブルーム ベアトリス・カメロン タリク・ダブドゥビ ステファニー・ドゥカリー ニコラ・ボラン ダヴィド・パパン クリスティアン・ランゲ		
发明人	カールステン・コルヴィー ホルスト・ブルーム ベアトリス・カメロン タリク・ダブドゥビ ステファニー・ドゥカリー ニコラ・ボラン ダヴィド・パパン クリスティアン・ランゲ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P43/00 A61P7/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P35/04 A61P1/04 A61P27/02 A61P19/02 A61P37/02 A61P3/08 A61P25/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P31/04 A61P9/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/2839 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/55 C07K2317/567 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/6857 G01N2333/70546 C07K16/2842 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/6872 G01N2333/7055		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P7/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P35/04 A61P1/04 A61P27/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P3/08 A61P25/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P31/04 A61P9/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE06 4B064/CE07 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA15 4H045/GA22 4H045/GA26		
优先权	2010305929 2010-08-31 EP		
其他公开文献	JP6250395B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明涉及与 $\alpha 2$ 整联蛋白结合的肽或肽复合物，编码肽或肽复合物的一种或多种核酸，产生肽或肽复合物的重组细胞，肽或肽复合物本发明涉及及其制备方法，包含该肽或肽复合物的药物组合物，其用作药物或核酸，检测 $\alpha 2$ 整联蛋白的方法和筛选方法。

表2. ハイブリドーマからの $\alpha 2$ インテグリンmAbのマスマスペクトル分析

	鎖	質量 (Da) (LC/MS)	質量 (Da) (インシリコでの値)
$\alpha 2$ インテグリン mAb	LC	23899	23896
	HC	50728 (GOF)	50725 (GOF)