

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6250395号
(P6250395)

(45) 発行日 平成29年12月20日(2017.12.20)

(24) 登録日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	3/08	(2006.01)	A 6 1 P	3/08	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	

請求項の数 31 (全 91 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)
 (65) 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)
 (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)
 審査請求日 平成26年7月22日(2014.7.22)
 審判番号 不服2016-14111 (P2016-14111/J1)
 審判請求日 平成28年9月21日(2016.9.21)
 (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)

(73) 特許権者 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】 α 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与する方法及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記のコンポーネント a) ~ f) :

a) LC DR 1 [ここで、LC DR 1は、R A S E S V E S Y G N S F I Y (配列番号6)である]、

b) LC DR 2 [ここで、LC DR 2は、L A S N L A S (配列番号7)である]、

c) LC DR 3 [ここで、LC DR 3は、Q Q N N E D P Y T (配列番号8)である]、

d) HC DR 1 [ここで、HC DR 1は、G Y T F T S Y W M N (配列番号3)である]、

e) HC DR 2 [ここで、HC DR 2は、R I D P S D S E T H Y N Q K F K (配列番号4)である]、及び

f) HC DR 3 [ここで、HC DR 3は、V G R G Y F D Y (配列番号5)である]

を含んでなる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、CDRは、以下のアミノ酸置換：HC DR 2における6 A s p G l uおよびLC DR 1における11 A s n G l n、
 または

HC DR 2における12 A s n A l aおよび16 L y s G l n

を有していてもよく、コンポーネント a) ~ f) は、単離されたモノクローナルモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントの α 2インテグリンへの結合を可能にするよ

10

20

うに配置されている、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】

請求項 1 に記載の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、

(i) 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は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、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、単一ドメイン抗体、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

(i i) 単離されたモノクローナル抗体は、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；

及び / 又は

(i i i)

- 配列番号 1、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び / 又は
- 配列番号 2、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び / 又は
- 配列番号 9、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び / 又は
- 配列番号 10、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び / 又

は

- 配列番号 11、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列

のアミノ酸配列を含んでなり、

又は

(i v)

- 配列番号 1、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び
- 配列番号 2、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び
- 最大 50 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、

又は

(v)

- 配列番号 9、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び
- 配列番号 10、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び
- 最大 50 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、

又は

(v i)

- 配列番号 9、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び
- 配列番号 11、又はそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び
- 最大 50 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】

請求項 2 に記載の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、

- 配列番号 1 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列は、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 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列は、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

10

20

30

40

50

、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】

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2又は3に記載の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5】

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2 ~ 4のいずれか1項に記載の
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。

10

【請求項6】

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%
の配列同一性を有している、請求項2 ~ 5のいずれか1項に記載の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7】

前記重鎖可変領域(VH)ドメインが、配列番号2の配列を含んでなる、請求項6に記
載の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8】

20

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%
の配列同一性を有する、請求項2 ~ 7のいずれか1項に記載の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9】

前記軽鎖可変領域(VL)ドメインが、配列番号1の配列を含んでなる、請求項8に記
載の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10】

重鎖可変領域(VH)ドメインが、配列番号2の配列におけるH5、H7、H11、H
12、H17、H20、H38、H40、H43、H55、H61、H65、H66、H
67、H76、H81、H82、H87、H91、H93、H112、H113及びH1
16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2 ~ 9のいずれか1項に記載の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。

30

【請求項11】

1つ又はそれより多いアミノ酸置換が、5His Val、7Pro Ser、11L
eu Val、12Val Lys、17Pro Ser、20Leu Val、38L
ys Arg、40Arg Ala、43Arg Gln、55Asp Glu、61A
sn Ala、65Lys Gln、66Asp Gly、67Lys Arg、76S
er Thr、81Ile Met、82Gln Glu、87Thr Arg、91S
er Thr、93Val Lys、112Thr Leu、113Leu Val及び
116Ser Valから成る群より選択される、請求項10に記載の単離されたモノク
ローナル抗体又はその抗原結合性フラグメント。

40

【請求項12】

軽鎖可変領域(VL)ドメインが、配列番号1の配列における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2 ~ 11のいずれか1項に記載の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13】

1つ又はそれより多いアミノ酸置換が、9Ala Ser、12Ala Ser、15

50

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12に記載の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14】

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%の配列同一性を有する、請求項2~13のいずれか1項に記載の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。

10

【請求項15】

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配列を含んでなる、請求項14に記載の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16】

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%の配列同一性を有する、請求項2~15のいずれか1項に記載の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。

20

【請求項17】

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16に記載の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18】

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1~17のいずれか1項に記載の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。

30

【請求項19】

ヒトIgG4定常ドメインを含んでなる、請求項1~18のいずれか1項に記載の単離されたモノクローナル抗体。

【請求項20】

請求項1~19のいずれか1項に記載の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コードする1つ又はそれより多い核酸。

【請求項21】

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1~19のいずれか1項に記載の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。

40

【請求項22】

核酸(複数を含む)がベクター内に位置している、請求項20に記載の核酸(複数を含む)。

【請求項23】

請求項20又は22に記載の核酸の1つを異種発現する、細胞。

【請求項24】

請求項1~19のいずれか1項に記載の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生産する方法であって、請求項23に記載の細胞を該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の発現を可能にする条件のもとで培養する工程を含んでなる、上記方法。

50

【請求項 25】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの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、及び / 又は請求項 20 又は 22 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 26】

2 インテグリン関連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 25 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

2 インテグリン関連疾患又は障害が、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、請求項 26 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 28】

血管疾患及び / 又は血栓症を処置し、又は予防する際に使用するための請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

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 26 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 30】

a) 包装材料、
b) 請求項 1 ~ 19 若しくは 21 のいずれか 1 項に記載の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、又はその製薬学的に許容される塩、又は請求項 25 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含んでなり、
c) 該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が 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。

30

【請求項 31】

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 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の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、及び適切な包装、及び、2 インテグリンの検出する際に該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。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【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。

40

【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 (E C M) 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

50

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。

【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。

【0004】

インテグリンヘテロダイマーの1つに、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンがある。この $\alpha 2 \beta 1$ 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。 $\alpha 2 \beta 1$ 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。

【0005】

$\alpha 2 \beta 1$ インテグリンは、インテグリンのファミリーの $\alpha 2$ 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 $\beta 1$ インテグリンサブユニットから構成される分子である。 $\alpha 2$ 及び $\beta 1$ 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、更なる配列を、例えば、ホモ・サピエンス（homo sapiens） $\alpha 2$ 及び $\beta 1$ インテグリンに対する（以下を参照されたい）、NCBIアクセッション番号、NP_002194、NM_002203、NM_002211、NP_002202（ $\beta 1$ 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 $\alpha 2$ 又は $\beta 1$ 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。

【0007】

$\alpha 2$ 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。 $\alpha 2$ 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。 $\alpha 2$ インテグリンI-ドメインの構造キャラクター化が、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 $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ 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。

【0008】

この $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン（最晩期抗原2；VLA-2）は、血小板、血管内皮細胞、

10

20

30

40

50

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 V E G F 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。

【 0 0 0 9 】

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反応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、I I b 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、血小板血栓応答、血小板減少、及び出血性合併症を生じさせる。

【 0 0 1 0 】

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 つの障害が、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障害になるであろう。

【 0 0 1 1 】

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、炎症性刺激に反応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)。

【 0 0 1 2 】

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 C 1 q 補体タンパク質の相互作用を阻害

10

20

30

40

50

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与している（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】Argaves, 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. Disord. 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】

【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 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 $\alpha 1$ 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 $\alpha 2$ 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。

10

【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 IC_{50} 値で阻害する。コラーゲンの阻害に加えて、抗 $\alpha 2$ 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。

20

【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。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 LC DR 1、LC DR 2 及び LC DR 3、そして VH の場合の HC DR 1、HC DR 2 及び HC DR 3 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 $\alpha 2$ インテグリン抗体と同定された。

30

【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 $\alpha 2$ 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) $\alpha 2$ インテグリンと交差反応するが、非霊長類 (non-primate) $\alpha 2$ 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。

40

【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

50

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 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。

10

【 0 0 2 3 】

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) 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 (S E Q I D N O : 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]、

20

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、前記ペプチド又はペプチド複合体に関する。

【 0 0 2 4 】

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。

30

【 0 0 2 5 】

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。

【 0 0 2 6 】

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。

【 0 0 2 7 】

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。

40

【 0 0 2 8 】

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。

【 0 0 2 9 】

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、

50

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。

【 0 0 3 0 】

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。

【 0 0 3 1 】

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。

【 0 0 3 2 】

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。

【 0 0 3 3 】

第十三の局面では、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) 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 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。

【 0 0 3 4 】

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 2 インテグリンの E - 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 (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、非ヒト霊長類 2 インテグリンと交差反応するが、非霊長類とは 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。

【 0 0 3 5 】

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 2 インテグリンの E - 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 (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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 3 6 】

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。

10

【 0 0 3 7 】

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 : v r i a n t) 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。

【 0 0 3 8 】

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、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。

20

【 0 0 3 9 】

一実施態様では、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。別の実施態様では、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。

【 0 0 4 0 】

一実施態様では、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。別の実施態様では、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 active thereof) を含んでなる。

30

【 0 0 4 1 】

一実施態様では、重鎖可変領域 (V H) ドメインは、H 5、H 7、H 1 1、H 1 2、H 1 7、H 2 0、H 3 8、H 4 0、H 4 3、H 5 5、H 6 1、H 6 5、H 6 6、H 6 7、H 7 6、H 8 1、H 8 2、H 8 7、H 9 1、H 9 3、H 1 1 2、H 1 1 3 及び H 1 1 6 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、5 H i s V a l、7 P r o S e r、1 1 L e u V a l、1 2 V a l L y s、1 7 P r o S e r、2 0 L e u V a l、3 8 L y s A r g、4 0 A r g A l a、4 3 A r g G l n、5 5 A s p G l u、6 1 A s n A l a、6 5 L y s G l n、6 6 A s p G l y、6 7 L y s A r g、7 6 S e r T h r、8 1 I l e M e t、8 2 G l n G l u、8 7 T h r A r g、9 1 S e r T h r、9 3 V a l L y s、1 1 2 T h r L e u、1 1 3 L e u V a l 及び 1 1 6 S e r V a l から成る群より選択される。

40

【 0 0 4 2 】

一実施態様では、軽鎖可変領域 (V L) ドメインは、L 9、L 1 2、L 1 5、L 2 2、L 3 4、L 4 6、L 4 7、L 8 0、L 8 3、L 8 5、L 8 7、及び L 8 9 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、9 A l a S e r、1 2 A l a S e r

50

、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。

【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。

10

【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。

20

【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。一実施態様では、抗体又は結合部分は、ヒトIgG4定常ドメインを含んでなる。

30

【0046】

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。

40

【0047】

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、グラフトイングに対する反応、視神経炎、脊髄外傷、関節リウマチ、全身性工

50

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。

【 0 0 4 8 】

本発明の詳細な説明
定義

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。

10

【 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。

20

【 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ないことは理解されるべきである。

30

【 0 0 5 1 】

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ス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。

40

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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。

【 0 0 5 4 】

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

50

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“E-ドメイン(1 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。

【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 binds)”抗体であると見なされる。

【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。

【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ぬという点において区別されうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

“ 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。

【 0 0 6 2 】

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。

10

20

【 0 0 6 3 】

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。

【 0 0 6 4 】

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 の脱落もまた可能である。1つ又は2つの C D R 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、C D R 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 C D R 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) 。

30

【 0 0 6 5 】

抗原と接触していない C D R 残基は、Chothia C D R 外にある Kabat C D R 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、C D R H 2 中の残基 H 6 0 ~ H 6 5 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。C D R 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。C D R 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。

40

【 0 0 6 6 】

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を示されている。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) V L、V H、C L 及び C H ドメインから成る一価のフラグメントである F a b フラグメント ; (i i) ヒンジ領域でジスルフィ

50

ド架橋によって連結された2つのF a bフラグメントを含む二価のフラグメントであるF (a b ')₂フラグメント；(i i i) V H及びC Hドメインから成るF dフラグメント；(i v) 抗体の単一アーム (single arm) のV L及びV Hドメインから成るF vフラグメント、(v) V Hドメインから成るd A bフラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)；(v i) 単離された相補性決定領域 (C D R)、並びに(v i i) 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C D Rの組み合わせが含まれる。更に、F vフラグメントの2つのドメイン、V L及びV H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、V L及びV H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F v (s c F v) 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、(i i) ヒンジ領域に融合された免疫グロブリンの重鎖C H 2定常領域、及び(i i i) C H 2定常領域に融合された免疫グロブリンの重鎖C H 3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U S 2 0 0 3 / 0 1 1 8 5 9 2 及びU S 2 0 0 3 / 0 1 3 3 9 3 9 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C D R (single C D R) から誘導される。例えば、Heapらは、H I V - 1のg p 1 2 0エンベロープグリコプロテインを対象とする抗体の重鎖C D R 3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) によって、互いに融合した2つ又はそれより多いC D R領域を含んでなる小分子擬似抗体が含まれる。同属V H F R 2によって連結されたV H C D R 1及びV L C D R 3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)。

【 0 0 6 7 】

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。

【 0 0 6 8 】

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せら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せられるヒト化分子を含む。

【 0 0 6 9 】

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、C H O細胞、又はリンパ球細胞)

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 7 0 】

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。

10

【 0 0 7 1 】

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テ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CDR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。

20

30

【 0 0 7 2 】

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。それにひきかえ、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 (Humaneering) が含まれる。

40

【 0 0 7 3 】

50

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。

10

【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。

【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ーマ(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。

20

【0076】

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。

30

【0077】

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。

【0078】

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。

40

【0079】

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

50

り連結された F v s (d s F v)、一本鎖抗体 (例えば、s c F v)、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 I d) 抗体 (例えば、本発明の抗体に対する抗 I d 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。

【 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 m A b 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 m A b 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。

【 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 (collagen-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 V E G F 誘導性血管新生に関連するプロセス。

【 0 0 8 2 】

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。

【 0 0 8 3 】

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。

【 0 0 8 4 】

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ため、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。

【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。

【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；
- 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PAM250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、PAM250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。

【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。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

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。

【 0 0 9 0 】

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。

【 0 0 9 1 】

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ープログラムBLAST、特にBLASTP又はTBLASTN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。

【 0 0 9 2 】

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。

【 0 0 9 3 】

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。

【 0 0 9 4 】

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)

10

20

30

40

50

”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、前記の活性化合物を製剤化し、そして前記活性化合物が、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
20
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
30
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。

【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
40
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に罹患している対象が含まれる。

【0100】

10

20

30

40

50

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。

10

【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 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

【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) :

30

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な変異体である]、

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な変異体である]、

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な変異体である]、

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な変異体である]、

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な変異体である]、及び

40

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。

50

【 0 1 0 5 】

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な変異体及び / 又は重鎖 C D R のうちの 1 つ又はその機能的に活性な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。

10

【 0 1 0 6 】

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。

【 0 1 0 7 】

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。

20

【 0 1 0 8 】

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、C D R 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、F a b、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。

30

【 0 1 0 9 】

C D R 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。

【 0 1 1 0 】

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。

40

【 0 1 1 1 】

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

50

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。

10

【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。

20

【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、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、2インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト2インテグリンに多くとも $1 \cdot 2 \times 10^{-6}$ (at least 1.2×10^{-6}) の K_D で結合する。特定の実施態様では、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2インテグリンに結合する。更なる実施態様では、2インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト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、2インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト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、2インテグリン特異的ペプチド又はその複合体は、ヒト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、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2インテグリン (例えば、ヒト及び/又は非ヒト霊長類2インテグリン)に結合する。

30

40

【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

50

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】

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、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。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。

10

【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、2インテグリンに結合する能力、そして場合により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。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。

20

【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)の可変ドメイン中に含まれ、

(ii) d) ~ f) の1つ、2つ又は3つのコンポーネントが、重鎖(VH)の可変ドメイン中に含まれ、

30

(iii) ペプチド又はペプチド複合体は抗体であり、

(iv) ペプチド又はペプチド複合体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、(scFv)₂、二特異性抗体(bispecific antibody)、多特異性抗体(multispecific antibody)、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、

40

(vi) 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60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、あるいは99%以上から成る、機能的に活性なフラグメントであり、

(vii) 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、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、あるいは99%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、

(viii) 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

50

- 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、及び / 又は、
 のアミノ酸配列を含んでなり、

(ix) 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 個以下の付加アミノ酸残基 (additional amino acid residue(s))、
 1 ~ 40 個、1 ~ 30 個、1 ~ 25 個、1 ~ 15 個、1 ~ 10 個、又は 5 個、4 個、3 個
 10
 、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 11、又はその機能的に活性な変異体、及び
 - 場合により、50 個以下の付加アミノ酸残基、1 ~ 40 個、1 ~ 30 個、1 ~ 25 個、
 1 ~ 15 個、1 ~ 10 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。

【0119】

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。 20

【0120】

配列番号 9、10 及び 11 は、図 7 から得ることができる：配列番号 9 は、IgG4 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 (CDR はアンダーライン
 されている) であり、配列番号 10 は、IgG4 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 (CDR はアンダーラインされている) であり、そして配列番号
 11 は、6xHis タグを加えた Fab フォーマット中のキメラ重鎖のアミノ酸配列であ
 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。 30

【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。

【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) (40
 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 (40
 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 DR1、LC DR2、LC DR3、HC DR1、HC DR2 及び HC DR3) 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 DR1、LC DR2 及び LC DR3、並びに VH のフレームワーク中の HC DR1
 、HC DR2 及び HC DR3 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 50

うな C D R を単独、一緒に、あるいはそれらを任意に組み合わせて、所定の近隣域 (show 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 C D R 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 C D R 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 C D R 領域は、組み換え D N A 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。

【 0 1 2 3 】

前のパラグラフ中で述べられている C D R 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。

【 0 1 2 4 】

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 (C H O) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (B H K) 細胞、N S O - 及び S P 2 / 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)。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)。W O 9 9 5 4 3 4 2 (A 1) 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。

【 0 1 2 5 】

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 R N A 分子、(例えば、R N A i))、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體である場合には、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、W O 0 5 / 1 0 3 0 8 1 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

10

20

30

40

50

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150kDa)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ため、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。

10

【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。

20

【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 δ は、約450アミノ酸を含み、 δ は、約500アミノ酸を含み、一方 μ 及び λ 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、異なったアイソタイプの抗体においては異なる。重鎖 δ 、 δ 及び δ は、3つのタンデム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 λ 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。

30

【0130】

哺乳類では、 δ 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、 δ 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。

40

【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

50

て包含されている。

【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(VL)に3つの可変ループがあり、そして重鎖(VH)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。VH及びVL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。

10

【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。

20

【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つのドメイン、CH1、CH2及びCH3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、CL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。

30

【0135】

“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、Ig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(Fab)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(Fc)である。このFcは、炭水化物、補体結合及びFcR結合部位を含む。限定ペプシン分解すると、Fab片とヒンジ領域の双方を含む1つのF(ab')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(ab')₂は抗原結合に対して二価である。F(ab')₂のジスルフィド結合は、Fab'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(scFv)を形成することができる。

40

【0136】

50

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。

10

【0137】

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。

20

【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 (ダイアボディ又は(s c F v)₂)、トリマー (トリアボディ)、又はタンダブ (TandAbs)、及びフレキシボディ (Flexibodies) のようなより大きい複合体化することができる。

30

【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 (ダイアボディ) 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ボディであり、これは、同じもの、類似のもの (二価のダイアボディ) でありうるか、あるいは異なる抗原に対する特異性 (二特異性ダイアボディ) 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。

40

【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ボディ, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, Germany)。二特異性ダイアボディとは対照的に、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。フレキシボディは、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ボ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

50

には、この抗体は、多特異性 (multispecific) である。

【0141】

Fv、scFv、ダイアボ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、VH及びVL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、BiTE™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。

10

【0142】

好ましくは、この抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、(scFv)₂、二特異性抗体、多特異性抗体、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CDRをコードするDNAをヒト抗体生成DNA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DNAコンストラクトは通例、CDR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。

20

【0144】

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。

30

【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)。

40

【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

50

- 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。

10

【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、2 インテグリン及び / 又は 2 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 2 及び / 又は 2 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。2 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 1 D 中に述べられている。

20

30

【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、2 インテグリン及び / 又は 2 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 2 及び / 又は 2 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

40

50

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】

(ix、x又はxi)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。

10

【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。

20

【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-hydroxylysine)、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。

30

【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。

40

【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 Bla

50

st 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。

【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 Gluを含んでなり；
- 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；

10

20

30

40

50

- 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、

【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、

【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15Leu Val及び34Asn 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34Asn Gln及び46Gln Lys、又は9Ala Ser及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び34Asn Gln及び46Gln Lys、又は15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は34Asn Gln及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び46Gln Lys、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び15Leu Val及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び34Asn Gln及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は15Leu Val及び34Asn Gln及び46Gln Lys及び83Glu Gln、又は表5のLC2：9Ala Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び46Gln Lys及び83Glu 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、9Ala Ser、又は12Ala Ser、又は15Leu Val、又は83Glu Gln、又は85Asp Glu、又は9Ala Ser及び12Ala Ser、又は9Ala Ser及び15Leu Val、又は9Ala Ser及び83Glu Gln、又は9Ala Ser及び85Asp Glu、又は12Ala

10

20

30

40

50

a 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8
 5 Asp Glu、又は12 Ala Ser及び15 Leu Val及び83 Glu G
 ln、又は12 Ala Ser及び15 Leu Val及び85 Asp Glu、又は1
 2 Ala Ser及び83 Glu Gln及び85 Asp Glu、又は15 Leu V
 al及び83 Glu Gln及び85 Asp Glu、又は9 Ala Ser及び12 A
 la Ser及び15 Leu Val及び83 Glu Gln、又は9 Ala Ser及
 び12 Ala Ser及び15 Leu Val及び85 Asp Glu、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 As
 p 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】

10

20

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(L
 C4)；すなわち、9 Ala Ser、又は12 Ala Ser、又は15 Leu Va
 l、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 Va
 l、又は9 Ala Ser及び34 Asn Gln、又は9 Ala Ser及び83 Gl
 u 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 Al
 a Ser及び83 Glu Gln、又は12 Ala Ser及び85 Asp Glu、
 又は15 Leu Val及び34 Asn Gln、又は15 Leu Val及び83 Gl
 u Gln、又は15 Leu Val及び85 Asp Glu、又は34 Asn Gln
 及び83 Glu Gln、又は34 Asn Gln及び85 Asp Glu、又は83 G
 lu 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34 Asn
 Gln、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34 Asn Gln、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8
 5 Asp Glu、又は9 Ala Ser及び34 Asn Gln及び83 Glu Gl
 n、又は9 Ala Ser及び34 Asn Gln及び85 Asp Glu、又は9 Al
 a Ser及び83 Glu Gln及び85 Asp Glu、又は12 Ala Ser及
 び15 Leu Val及び34 Asn Gln、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34 Asn Gln及び83 Glu
 Gln又は12 Ala Ser及び34 Asn Gln及び85 Asp Glu、又は1
 2 Ala Ser及び83 Glu Gln及び85 Asp Glu、又は15 Leu V
 al及び34 Asn Gln及び83 Glu Gln、又は15 Leu Val及び34
 Asn Gln及び85 Asp Glu、又は15 Leu Val及び83 Glu Gl
 n及び85 Asp Glu、又は34 Asn Gln及び83 Glu Gln及び85 A
 sp Glu、又は9 Ala Ser及び12 Ala Ser及び15 Leu Val及
 び34 Asn Gln、又は9 Ala Ser及び12 Ala Ser及び15 Leu

30

40

50

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 Se
 r及び15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gln、又は9Al
 a Ser及び15Leu Val及び34Asn Gln及び85Asp Glu、又
 は9Ala Ser及び15Leu Val及び83Glu Gln及び85Asp G
 lu、又は9Ala Ser及び34Asn Gln及び83Glu Gln及び85A
 sp 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34As
 n Gln及び85Asp Glu、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34As
 n 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 S
 er及び15Leu Val及び34Asn Gln及び83Glu Gln及び85A
 sp 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(L
 C5)；すなわち、15Leu Pro、22Ser Thr、47Ala Pro、8
 0Asp 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80Asp Asn、又は15Leu Pro及び87Ala Thr、
 又は15Leu Pro及び89Thr Asn、又は22Ser Thr及び47Al
 a Pro、又は22Ser Thr及び80Asp Asn、又は22Ser Thr
 及び87Ala Thr、又は22Ser Thr及び89Thr Asn、又は47A
 la Pro及び80Asp Asn、又は47Ala Pro及び87Ala Thr
 、又は47Ala Pro及び89Thr Asn、又は80Asp Asn及び87A
 la Thr、又は80Asp Asn及び89Thr Asn、又は87Ala Th
 r及び89Thr Asn、又は15Leu Pro及び22Ser Thr及び47A
 la Pro、又は15Leu Pro及び22Ser Thr及び80Asp Asn
 、又は15Leu Pro及び22Ser Thr及び87Ala Thr、又は15L
 eu Pro及び22Ser Thr及び89Thr Asn、又は15Leu Pro
 及び47Ala Pro及び80Asp Asn、又は15Leu Pro及び47Al
 a Pro及び87Ala Thr、又は15Leu Pro及び47Ala Pro及
 び89Thr Asn、又は15Leu Pro及び80Asp Asn及び87Ala
 Thr、又は15Leu Pro及び80Asp Asn及び89Thr Asn、又
 は15Leu Pro及び87Ala Thr及び89Thr Asn、又は22Ser
 Thr及び47Ala Pro及び80Asp Asn、又は22Ser Thr及び
 47Ala Pro及び87Ala Thr、又は22Ser Thr及び47Ala
 Pro及び89Thr Asn、又は22Ser Thr及び80Asp Asn及び8
 7Ala Thr、又は22Ser Thr及び80Asp Asn及び89Thr A
 sn、又は22Ser Thr及び87Ala Thr及び89Thr Asn、又は4
 7Ala Pro及び80Asp Asn及び87Ala Thr、又は47Ala P

10

20

30

40

50

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 Thr及び89 Thr Asn、又は15 Leu Pro及び22 Ser Thr及び47 Ala 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 Ser 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 Asn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 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 Asn、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 Pro及び80 Asp Asn及び87 Ala Thr、又は15 Leu Pro及び22 Ser 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 Asn及び89 Thr Asn、又は表5に基づいて(LC5)：15 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、

【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、

【0166】

10

20

30

40

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(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、

10

【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、

20

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】

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、12 Val Lys、又は55 Asp Glu、又は93 Val Lys、又は116 Ser Val、又は12 Val Lys及び55 Asp Glu、又は12 Val Lys及び93 Val Lys、又は12 Val Lys及び116 Ser Val、又は55 Asp Glu及び93 Val Lys、又は55 Asp Glu及び116 Ser Val、又は93 Val Lys及び116 Ser Val、又は12 Val Lys及び55 Asp Glu及び93 Val Lys、又は12 Val Lys及び55 Asp Glu及び116 Ser Val、又は12 Val Lys及び93 Val Lys及び116 Ser Val、又は55 Asp Glu及び93 Val Lys及び116 Ser Val、又は表6に基づいて(HC6): 12 Val Lys及び55 Asp Glu及び93 Val Lys及び116 Ser Val、

30

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); 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、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、112 Thr Leu、113 Leu Val。

40

【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

50

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。

【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）₂Strept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。

【0171】

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

10

20

30

40

50

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化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。

【0175】

更に、フラグメント又はその機能的に活性化変異体を含む、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。

【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

10

20

30

40

50

的には、核酸を作製するための、エンドヌクラーゼ及び/又はエクソヌクラーゼ及び/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ー遺伝子、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。

【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、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、 α 2インテグリン、特に α 2 β 1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こと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。

10

【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、可溶形態で分離するか、あるいは公知の手法(例えば、グアニジニウムクロリド中)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)。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。

20

30

【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。

40

【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

50

【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。

10

【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。

20

【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、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。

30

【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ー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、アルコールペン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。

40

【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包

50

含する；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、 $\alpha 2$ 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、 $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ インテグリン機能又は活性に関与している、1つ又はそれより多い $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ インテグリンが媒介する異常な細胞反応が関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。

10

20

【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。

30

【0194】

$\alpha 2$ 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。 $\alpha 2$ 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。 $\alpha 2$ 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、 $\alpha 2$ の発現の増加をもたらし、その結果、 $\alpha 2$ 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、 $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ 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。 $\alpha 2$ 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ーマ腫瘍浸潤に拮抗し、そして特に、インテグリン-ECM/ $\alpha 2$ インテグリン媒介I型コラーゲン粘着（Integrin-ECM/ $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ 拮抗性mAb（anti- $\alpha 2$ antagonistic mAbs）は、ラッ

40

50

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う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。

10

【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21 - 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關与している。mAbのような21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a21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。

20

【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關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;

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;

30

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、前記方法に關する。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、特定の疾患に關連しうる。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。

40

【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關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;

50

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、マイクロタイタープレート、ガラス顕微鏡スライド、又はカバースリップ、スティック、ビーズ、又はマイクロビーズの形態の、ガラス又はプラスチックが含まれる。

10

【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、フィコビリプロテイン、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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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）

20

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。

30

40

【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。

【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

50

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、

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。

10

【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

20

【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。

30

【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。

40

【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、2

50

0、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。

【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。

10

【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、健全な個体、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、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、健全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。

20

30

【0221】

参照又は参照サンプルが、健全な個体、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

40

50

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。

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

【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。

10

【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：

20

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 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、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(ii)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。

30

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。

40

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(HCDR1)、配列番号4(HCDR2)、及び配列番号5(HCDR3)の重鎖CDR、又はその機能的に活性な変異体を含んでなる

50

、前記抗体、又はその抗原結合部分。

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、HCDR2の機能的に活性な変異体は、6位のアミノ酸でのAsp Gluの変異を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

【0229】

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LCDR3を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

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(LCDR1)、配列番号7(LCDR2)、及び配列番号8(LCDR3)の軽鎖CDR、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。

10．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、LCDR1の機能的に活性な変異体は、11位のアミノ酸でのAsn Glnの変異を含んでなる、前記抗体、又はその抗原結合部分。

11．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、前記抗体、又はその抗原結合部分。

12．実施態様11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。

13．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、前記抗体、又はその抗原結合部分。

14．実施態様13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、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

10

20

30

40

50

いアミノ酸置換は、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、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。

10

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。

20

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。

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。

30

【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。

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。

40

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。

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。

50

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。

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。

【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。

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、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だけのためであり、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。

【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。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 5 】

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 】

【 0 2 3 6 】

【 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 2 インテグリン m A B の結合を示す。

【 図 2 】 ハイブリドーマ上清から精製した抗 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 2 インテグリン m A b は、F G F 2 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 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、D i O C 6 (3) 色素及び抗 2 インテグリン F a b の階段希釈液と共に、3 7 で 1 0 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 3 0 0 0 s⁻¹ で流動させる。被覆面積を表している例としての 1 0 個の写真から、表面被覆率を算出する。こうした値は、抗 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。

【 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 2 m A b を用いて F A C S 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 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 1 2) を示す。図 5 b) は、抗 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 1 3) を示す。アミノ酸配列において、C D R は、ボールド体でマークがつけられ、下線が引かれている。

【 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った C D R のアミノ酸配列を示し、図 6 a は重鎖 C D R を示し、そして図 6 b は軽鎖 C D R を示し、H C D R 1 は配列番号 3 であり、H C D R 2 は配列番号 4 であり、H C D R 3 は配列番号 5 であり、L C D R 1 は配列番号 6 であり、L C D R 2 は配列番号 7 であり、L C D R 3 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 1 4) を示し、図 7 b は、キメラ重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 0) 及びコード配列 (配列番号 1 5) を示し、図 7 c は、キメラ重鎖 F a b フラグメントのアミノ酸配列 (配列番号 1 1) 及びコード配列 (配列番号 1 6) を示す。アミノ酸配列において、C D R 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 H i s 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 1 7 は、ヒト I G K C 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ス番号 (Swiss-Prot accession number) Q 5 0 2 W 4] のアミノ酸配列であり、配列番号 1 8 は、ヒト変異 I G H G 4、配列番号 1 0 (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ス番号 P 0 1 8 6 1 . 1] のアミノ酸配列であり、配列番号 1 9 は、ヒト I G H G 1 タンパク質、配列番号 1

10

20

30

40

50

1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。

10

【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10a)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10b)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10c)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10d)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10e)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10f)は、コンパレーターmAb TMC2206のHCのアミノ酸配列である。

20

【図10-2】図10-1の続きである。

【図11】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、mAb TMC2206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。

30

【図12】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(前結合: pre-bound)インテグリン₂I-ドメインへのコンパレーターmAb TMC2206の結合((s)秒単位の時間(x軸)対(RU)レスポンス単位でのレスポンスの差(y軸))を示す。図12から得られることができるように、TMC2206は、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I-ドメインに結合する。

【図13】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₂I-ドメインへの非ヒト化Fabの、結合((s)秒単位の時間(x軸)対(RU)レスポンス単位でのレスポンスの差(y軸))を示す。図13から得られることができるように、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₂I-ドメインに結合する。

40

【図14】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。バッチ660は、LC1/HC1に相当し、バッチ661は、LC2/HC2に相当し、バッチ662は、LC3/HC3に相当し、バッチ663は、LC3/HC4に相当し、バッチ664は、LC4/HC5に相当し、バッチ665は、LC4/HC6に相当し、バッチ666は、LC5/HC7に相当し、そしてバッチ667は、コンパレーターである。この結果はまた、表12から誘導することができる。バッチ番号660、662、及び663は、mAb TMC2206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。

50

【 0 2 3 7 】

実施例

実施例 1 : 機能的な抗 2 インテグリン m A b 及び F a b の作製及び選択

A - 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 2 インテグリン m A b の作製及び精製

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 37 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 110 rpm で回転させながら、大気中 5 % C O₂ の加湿雰囲気下にて 37 のインキュベーター中で、10 % F B S、1 X I T S (Gibco 41 400-045)、1 X ピルビン酸ナトリウム (Gibco 11 360-039)、150 μ g / mL のオキサロ酢酸、2 mM のグルタミン (Gibco 25030-024) 及び 100 U / mL 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 mL の培地を含む T - 25 cm² フラスコに移した。

10

【 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 (200 mL) 中に、10 % F B S、1 X I T S、1 X ピルビン酸ナトリウム、150 μ g / mL オキサロ酢酸、2 mM グルタミン及び 100 U / mL 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 / mL において 10 日間播種した。

20

【 0 2 4 0 】

精製の場合には、抗 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 S E C 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。

30

【 0 2 4 1 】

2 インテグリン m A b 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 c D N A は次のように得られた: m R N A 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 c D N A を、Gene Racer キット (Invitrogen)、転写酵素 (transcriptase SuperScript III) (55 で) (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 R T - P C R によって増幅した。この c D N A フラグメントは、55 でポリメラーゼ Phusion (Finnzymes) を用いて P C R 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。

40

【 0 2 4 2 】

【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	CGACTGGAGCACGAGGGA CACTGA (配列番号24)
RACEMOG 2 a : 3' -マウスヒンジ内部プライマー (3' -Primer internal to murine hinge)	AGGACAGGGCTTGATTG TGGG (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)	CTCATTCCTGTTGAAGC TCTTGAC (配列番号26)

10

【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。

【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 $\alpha 2$ 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 $\alpha 2$ インテグリンmAbのLCに相当する。

20

【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)

30

【0246】

B - 抗 $\alpha 2$ インテグリンmAbのCDRの配列の決定

CDR領域の配列は、KABAT命名法を用いてタンパク質配列から推定された。

【0247】

HCの場合には、CDR1は、配列番号3に相当し、CDR2は、配列番号4に相当し、CDR3は、配列番号5に相当する。

40

【0248】

LCの場合には、CDR1は、配列番号6に相当し、CDR2は、配列番号7に相当し、CDR3は、配列番号8に相当する。

【0249】

C - キメラ抗 $\alpha 2$ インテグリンmAb発現プラスミドの作製

抗 $\alpha 2$ インテグリンmAbの可変重鎖及び軽鎖は、AccuPrimePfx SuperMix (Invitrogen; Cat. No.: 12344-040)、及び、それぞれ、抗 $\alpha 2$ インテグリンmAb重鎖及び軽鎖cDNA (cDNA作製については、上記参照) を用いて、PCRによって作製された。 $\alpha 2$

50

5 μ l PCR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 PCR サンプルが、第1 PCR に関する場合と同じ PCR 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 PCR 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 PCR 条件を用いて、0.5 μ l の第2 PCR 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 PCR (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 PCR の PCR 産物を、PCR 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。PCR 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。

10

【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】

20

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-Pro t 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: Q5 69F4) 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ー 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

30

40

【0253】

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)。

【0254】

【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	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCA ACATTGTGCTGACCCAATCTC		
α 2mAB-VL REV :	28	
ACCGTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCC		
α 2mAB mAB-VH FOR :	29	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCC AGGTCCAACATGCATCAGCCTG		10
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	
CAAGCTAGCACCATGGGCTGGTCCTG		
【0255】		20
実施例2 : 抗 2インテグリンmAb及びFabの特性 A - 組み換え抗 2インテグリンmAb及びFabフラグメントの作製 キメラ抗 2インテグリンIgG4及び抗 2インテグリンFab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DH5a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。		
【0256】		30
フリースタイル培地 (Freestyle Medium) (Invitrogen) 中で増殖するHEK 293-FS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LC及びHC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0.22 μ mフィルター上に通して粒子を除去した。		
【0257】		
キメラ抗 2インテグリン-IgG4及び抗 2インテグリン-Fab分子の精製 IgG4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 NaCl 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PBS中に混和し、0.22 μ mろ過した。		
【0258】		40
Fabタンパク質を、HiTrap IMAC HPカラム (GE Life Sciences) 上でIMAC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PBS中に混和し、0.22 μ mろ過した。		
【0259】		
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。		
【0260】		50

B - 抗 $\alpha 2$ インテグリン mAb 又は Fab の結合特性

精製された抗体及び相当する Fab 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 Fab フラグメント、及びアナライトとしてのインテグリン $\alpha 2$ 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 Fab 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 Fab 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 $MgCl_2$ (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 μ l / 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 Fab 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 Fab 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。

【0261】

【表4】

表3 : インテグリン I - ドメインに対する抗 $\alpha 2$ インテグリン mAb 及び Fab 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
Fab フラグメント	9.9	8.3	8.4

【0262】

ブロッキング mAb 及び Fab は、ヒト $\alpha 2$ I - 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)。

【0263】

更に、抗 $\alpha 2$ インテグリン mAb 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、PBS (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 $\alpha 2$ - mAb の段階希釈液を加え、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 バッファー 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 $\alpha 2$ インテグリン mAb の交差反応特性

抗 $\alpha 2$ 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。m A b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 - I G g フィコエリトリン (P E) 結合二次m A b (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、F A C Sで解析した。

【 0 2 6 5 】

マウス、ラット、イヌ、モルモット、ブタ又はウサギの 2 1 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m A bは、ヒト全血サンプル (> 9 8 % ポジティブ、図 4 d) 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 (9 7 . 3 % ポジティブ、図 4 b) を示した。すなわち、F A C S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 2 1 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 2 1 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。

【 0 2 6 6 】

実施例 3 - 抗 2 I g G 及び F a b の F v ドメインのヒト化及び操作設計
ヒト化

抗 2 インテグリンm A B 抗体の V L 及び V H 配列の 3 D 相同モデル (3D homology models) を、M O E 2 0 0 8 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 P D B テンプレートが、L C 及び H C フレームワーク並びに C D R 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、H 3 ループに対するベストなテンプレート (5 6 % 同一性) 以外は、V L 及び V H 抗 2 インテグリンm A B 配列に対して 8 3 % を超える同一性を有した。この結果生じた L C 及び H C モデルは、その後、M O E 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 V L / V H の最小化 3 D 相同モデルの分子動力学 (M D) 算定がタンパク質バックボーンに関する、5 0 0 K 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。1 0 の多様なコンフォメーションが、最後の 1 n s の間に 1 0 0 p s 毎のこの最初の M D 処理から抽出された。次いでこうした 1 0 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、3 0 0 K 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、M D に提出された。次いで、それぞれの 1 0 M D 処理の場合には、M D 軌道からの最後の 2 , 0 0 0 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m A B アミノ酸の場合には、その標準偏差 (r m s d) 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 1 0 の別々の M D 処理における平均 r m s d を、すべての抗 2 インテグリンm A B マウスアミノ酸の全平均 r m s d と比較することによって、M D 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。6 4 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 3 4 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) 。

【 0 2 6 7 】

次いで、最も多い 3 4 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、2 0 n s (1 0 x 2 n s) の間、4 9 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 1 0 x 2 n s M D シミュレーションを行なった。この 4 9 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 (v k 1、v k 2、v k 3、v k 4、v l a m b d a 1、v l a m b d a 2、v l a m b d a 3) 及び、7

10

20

30

40

50

つの最も一般的なヒト生殖細胞系重鎖 (v h 1 a、v h 1 b、v h 2、v h 3、v h 4、v h 5、v h 6) と体系的に組み合わせて構築した。この v k 1 - v h 1 b 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 6 2 % 4 D 類似性を示した；それ故、v k 1 - v h 1 b 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 v k 1 - v h 1 b 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 3 D 重ね合わせ (3D superposition) に基づいてアライメントされた。

【 0 2 6 8 】

10

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 (Gth > 0.5 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])。L C 及び H C 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、v k 1 - v h 1 b) 中に見出されるアミノ酸、すなわち、L C 中の 4 つの可能性のある変異及び H C 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 (hydropathy)、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。

20

【 0 2 6 9 】

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 B L A S T サーチを行なうことによってなされる (カップ鎖及びラムダ鎖の 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 B L A S T 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。

30

【 0 2 7 0 】

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、7 7 % 及び 6 8 % の同一性を有するものと確認された：

【表5】

$\alpha 2_{lc}$	NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFTIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS	
IGLKV79_IGLKJ2	DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVS FLGINLIHWY QQKPGQPPKL LIYQASNKDT	
$\alpha 2_{lc}$	GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K	
IGLKV79_IGLKJ2	GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCLQSKNFPY TFGGGTKLEI K	
$\alpha 2_{hc}$	QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNVVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY	10
IGHV11_IGHD33_IGHJ8	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYMHVWRQA PGQGLEWMI INPSGGSTSY	
$\alpha 2_{hc}$	NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS	
IGHV11_IGHD33_IGHJ8	AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARL- TGYFDYWGQG TLTVSS	

【0271】

I G L K V 7 9 _ I G L K J 2 は、配列番号 4 9 に相当する。I G H V 1 1 _ I G H D 3 3 _ I G H J 8 は、配列番号 5 0 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：A s p - P r o（酸に不安定な結合）、A s n - X - S e r / T h r（グリコシル化、X = 任意のアミノ酸（P r o は除く））、A s p - G l y / S e r / T h r（フレキシブル領域におけるスクシンイミド / i s o - a s p 形成）、A s n - G l y / H i s / S e r / A l a / C y s（アミド分解サイトの露出）、M e t（露出領域の酸化）。この結果生じるヒト化配列は、I E D B 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。

【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 SRTDFTLID 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
NQQFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS

【0274】

20

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 C D R の最もフレキシブルなアミノ酸と、V K 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 C D R の最もフレキシブルなアミノ酸と、V H 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 C D R 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)
- ・ 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)

50

- ・ 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

【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 ティン 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1C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】

LC1 (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 YCQONNEDPY
 TFGGGTKLEI K (配列番号 33)

LC2 (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) :

10

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

LC3 (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 PVQAEDAATY YCQONNEDPY TFGGGTKLEI K (配列番号
 35)

20

LC4 (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 PVQAEDAATY YCQONNEDPY TFGGGTKLEI K (配列番号
 36)

LC5 (グラフ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 YCQONNEDPY
 TFGGGTKLEI K (配列番号 37)

30

【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

40

LC_anti_a2b1	LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQONNEDPY
Vk1LC	LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDLATY YCQSYSTPP

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

【0283】

操作設計重鎖配列

50

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 LVKPGAPVQKL SCKASGYTFT SYWMNWVQKQR PGQGLEWIGR
IDPSDSEQETHY NQKFKDRQATL TVDKSSSTAY IQLSSLTQSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQQ TTLTVVQS（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 LVKPGAPVQKL SCKASGYTFT SYWMNWVQKQR PGQGLEWIGR
IDPSESEQETHY NQKFKDRQATL TVDKSSSTAY IQLSSLTQSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQQ TTLTVVQS（配列番号 39）

【 0 2 8 4 】

20

【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 VVKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVROA PGGLEWIGR
IDPSDSETHY AQKFQGRATL TVDKSSTAY 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   QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNVVKQR PGRGLEWIGR
Vh1b          QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYMHVVRQA PGQGLEWMGW
HC2_anti_α2   IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
Vh1b          INPNSGGTNY AQKFGQGRVTM 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' - GTGCACAGC - 3'）及びApaI（重鎖）又はBsiWI（軽鎖）を有する3' UTR（5' - GCTTCCACCAAGGCC - 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 5 3 によるコンパレーター

10

20

【 0 2 9 0 】

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) を用いるモノストラップカラム (monolithic trap column) によって20 μ l / 分で脱塩した。

30

【 0 2 9 1 】

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

【 0 2 9 2 】

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)。

【 0 2 9 3 】

【表 1 4】

表 8：精製したヒト化抗 α_2 インテグリンmAb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

【0294】

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。

【0295】

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mAb 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

- ピ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 ピオチン化コラーゲン)
- 10 μ l/ウェル 化合物 (compound)、40 μ l/ウェル ピオチン化コラーゲン
- ブランク: 50 μ l/ウェル 結合バッファー。

【0296】

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 dH₂O 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 NaH₂PO₄ (Riedel de Haen 04270) pH 5.0; 及び 55 μ l H₂O₂ Sigma H-1009 (10 μ l (= 30%) 及び 1045 μ l dH₂O) 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

【0297】

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)	ざ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

【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, #3

10

20

30

40

50

54230) 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 (E B M, F C S 2%, E G F プレートキット (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 a 2 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 a 2 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 2 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 2 1 インテグリン、又はインテグリン 2 1 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 A 7906) でブロッキングし、そして再び洗浄した。2 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 nM で Elisa reader (SpectraMax190 Molecular Devices) で行なわれた。阻害% 及び I C 50 が知られている標準品と対比して算出された。

20

【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, F1450 571) 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 2 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 nM E X、535 nM E M で M 5 リーダー (M5 reader) (Molecular Devices) で測定した。阻害% 及び I C 50 を知られている標準品と対比して算出した。

30

【0302】

ずり応力下 (under shear) での実験で、抗 2 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採取した抗凝固ヒト血液を、D i O C 6 (3) で標識し、そして、抗 2 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、そして阻害% 及び I C 50 を知られている標準品と対比して算出した。

40

50

【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 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 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 (PRP) 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。PRP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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Reopro (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (酢酸中、0.01Mでのラット尾 C8897 Sigma Stock 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 \times 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mAb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mAb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Fc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Fc特異的抗体によってキャプチャーされ (研究グレードCM5)、その結果、この抗体に結合したI-ドメインの30RUのRmaxがもたらされた。4mM MgCl₂ (10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 0.005% 界面活性剤P20) を補充したHBS-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Fc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mAb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mAb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

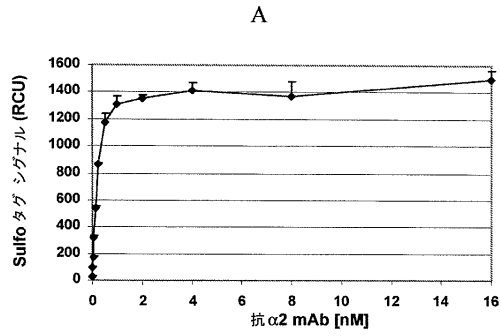
LC/HC組み合わせ	融解温度 °C (1)	融解温度 °C (2)
LC1/HC1	64	—
LC2/HC2	63	—
LC3/HC3	64	68
LC3/HC4	66	—
LC4/HC5	62	67
LC4/HC6	66	—
LC5/HC7	65	72
TMC2206 (コンパレーター)	65	71

10

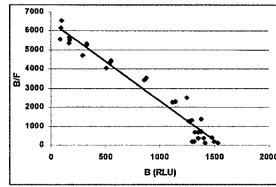
20

30

【 図 1 】

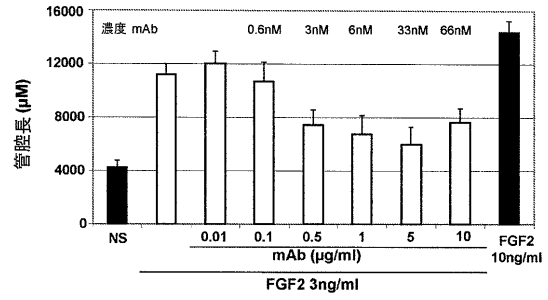


B

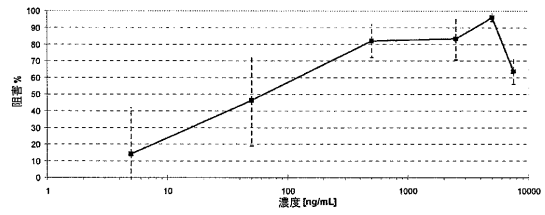


パラメーター	推定 (Estimate)	SD	CV(%)	95%CI
KD (nM)	0.2146	0.01291	6.0	[0.1899 ; 0.2425]

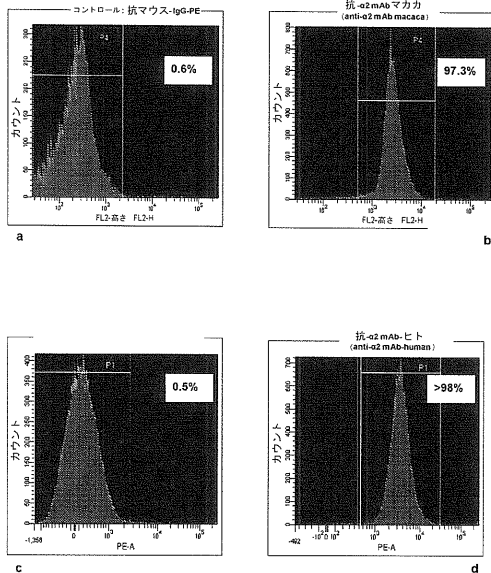
【 図 2 】



【 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 ISCRASESYE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLIASNLAS GVPAREFSGG
 SRITDFLEID PVEADDAATY YCQNNEDPY TFGGGTKLEI K

(配列番号 1)

AACATTGTGCTGACCAATCTCCAGCTTCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCTGCGAGGCCAG
 TGAAGTGTGAGAGTTATGGCAACAGTTTATTACTGGTACAGCAGAAACCAGACAGGCCAACCTCTCA
 TCIATCTGCAFCACACTAGCATCTGGGTCCCTGCCAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTCACCTC
 ACCATTGATCCTGTGAGGCTGATGATGCTGCAACTATTACTGTGCAAAAATAATGAGGATCCGTACAGCTCG
 AGGGGGACCAAGCTGAAATAAAA

(配列番号 12)

5b) 抗α2インテグリンmAbの重鎖可変ドメイン

QVQLHQPGE LVKPGAPVRL SKASGYTF YSRMNFVKR PPGLEWISR ILPSDSETHY NQKFKDRATL
 TVRKSSEAY IQLSLSLSED SAVVYGAQVQ RGEYDYWGQ TILFVSS

(配列番号 2)

CAGGTCCAATGCATCAGCTGGGCTGAACTTGTGAAGCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGG
 CTACACCTCACCAGTACTGGATGAATGGGTGAAGCAGAGGCTGGACGAGGCTCGAGTGGATGGCAGGATTG
 ATCCCTCCGATAGTGAACCTACTCAATCAAAAGTTCAAGGACAGGCCCACTGACTGTAGACAAATCTCCAGC
 ACAGCCTACATCCAATCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTAATACTGTGCAAAAGTGGACGGGGTA
 CTTTGACTACTGGGGCCAGGCCACTCTCACGCTCTCTCA

(配列番号 13)

【 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 mppertgaap lplllvlals gqilncclay nvglpakif sgpssaqfgy avqqfnpkg
61 nwlvlvgspsw gfpencmgdv ykcpvdlsta toeklnlqts tsipnvtcmk tmselglillt
121 rnmgtggflr cgpilwaqcg nqyyttgvcv dispdfqlsa sfsapatqcp slldvrvvcd
181 eensiyowda vknflekvq gldigptktq vgligvannp rvvfnlntyk tkeemivat
241 gtsqyvgdlt ntfoaiqvar kyavsaaagq rrsatkvmv vtdgeshdgs mlkavidacn
301 hdnilrfgia vlgvlnrnal dtknlkikv aiasiptery ffnvdeaal lekagtlqeg
361 ifsigvtvg gdnfmemsq vgsaadyssq ndiilmgavq afgwsgtiwq kshghlflp
421 kqafdqild rnhasylygs vaaisgest hfvagapran ytgqivlysv nengnitviq
481 ahrgdqigsy fgsvlcvsvd dkditdvll vgapmymdsi kkeegrviylf tikegilgqh
541 qfllepegie ntrfysaiaa ladinmdgfn dviagsplen qnsgavyiyn ghqgtirtky
601 sqkllgsdga frshlqyfr sldgygdng dsitdvsiga fgqvvlwsg siadvaietas
661 ftpekiltvn knaqqillk fseakfrptk nnqvalvyni tldadgfssr vtrsglfken
721 nerciqkmm vnaqsqopeh iiyiqepsdv vnsidlrvid slenpqtspa leaysetakv
781 fsipfhkdcg edglcisdlv ldvrqipaag eqpfiwvsnqn kzltfsvtk nkresayntg
841 ivrvfsemlf fassalpvdg tevteqvaas qksvacdvgy palkreqvt ftinfdfnlq
901 nlqnqaslsf qalesseqn kadnlvnlki pliydaehi trstainfyv issdgnvpsi
961 vhsfedvopk fifskvktg svpvsamatv ihipykkek nplmlytgvq tdkagidiscn
1021 adlnpklqg tessvfkse nfchtkelnc rtsacsnlvc wkldvhmkgv yfvnvtlriw
1081 ngtfasstfq tvqltaaeai ntyneiyivi edntvtiplm impkdekaev ptvgiysii
1141 aglllllaiv ailwklgfkf rkyekmknkp 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 aacggacag ggcgcgcgcg ctgcoctgc tgcgtgtgt agcctcagc
61 caagcattt taaatgttg tttggcctac aatgttggt tccagaagc aaaaatatt
121 tccggtcctt caagtgaaca btttgctat cgagtgcagc agttataaa tccaaaagc
181 aactggttac tggltggctt accctggagt ggtttctcg agaaccgaat ggaagatgt
241 tataaatgct ctgttgactt atccactgcc acatgggaaa aactaaattt gcaacttca
301 acaagcattc caaatgttac tgaagatgaa accaacatga gctcggctt gatcctacc
361 aggaacatgg gaactggagg tttctcaca tgggtctct tgtggcaca gcaatgtgg
421 aatcagtatt acacaacggg tgggtgtctt gacatcagc ctgatttca gctctcagc
481 agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgtgtggt tgtgtgtgat
541 gaatcaata gtattatcc ttggatgca gtaagaalt tttgaaaa atttgtaca
601 ggcctggata taggcccacc aaagacacag gttgggttaa ttcctatgc caataatca
661 agagtgtgt ttaacttga cacatataaa accaaagaag aatgatgtg agcaactcc
721 cagacatccc aatattggg ggaactcaca aacacattcg gagcaattca atagtcaaga
781 aatatgctt atcagcagc tctctgggg gacagagtg ctacgaagt aatgttagt
841 gtaactgacg tgaatcaca tgatgttca atgttgaag ctgtgatga tcaatgcaac
901 catgacaata tactgaggt tggcatagca gttctgttg acttaaacag aaagccctt
961 gatactaaa atttaataa agaataaaa gcaatccta gtattccaa agaagatac
1021 ttttcaatg tgcctgatga agcagctcta ctagaagaag ctgggacat aggagaaca
1081 atttccagca ttgaaggtac tgltaagga ggagacaact ttcagatga aatgcacaa
1141 gtgggatcca gtcagatta ctcttctca aatgatatt tgcctggg tgcagtggg
1201 gcttttggc gtaggtgac cattgtccag aagacatcc atggccattt gatcttctt
1261 aaacaagcct ttgacaaat tctgagggc agaatacaca gttcatatt aggttactt
1321 tgggtgcaa tttctactg agaaagcact cacttgttg tgggtgtcc tgggcaaat
1381 tataccggc agatagctt atatagtg aatgaagat gcaatcac ggtlattcag
1441 gctaccgag gtagcacat tggctctct tttgtagt tgcgtgttc agttgatgt
1501 gataagaca ccattacaga cgtctcttg ttaggtgac caatgtcat gtagcacta
1561 aagaaagag aaggaagat ctactgttt actatcaag agggcattt ggtcagcac
1621 caatttctg aagggccoga gggcattga aacactgat tttgtcagc aattgcagc
1681 ctttcagaca tcaaatgga tggcttaat gatgtggt tgggtcacc actagaaat

【 図 9 - 3 】

1741 cagaattctg gagctgata cattaacat ggtcatcag gcactatccg cacaaagtat
1801 tcccagaaa tcttgggac cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttggggag
1861 tccctggagt gctatggaga tttaaatgg gattccatca ccgatgtgct tattgtgccc
1921 ttggacaag tggctcaact ctggtcaca agtaltgtgt atgtagcat agaagcttca
1981 ttcacaccag aaaaatcac tttggtcac aagaatgct agataattct caaactctgc
2041 ttcagtgcac agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggcattgt atataacatc
2101 acaactgatg cagatggatt ttcactcaga gtaacctcca ggggttat taaagaaaac
2161 aatgaagagt gcctgcagaa gaatalgta gtaaatcaag cacagagltg ccccgagcac
2221 atcattata tacagagacc ctctgatgt gtaacctct tggatttgcg tttggacatc
2281 agtctgaaa accctggacc tagccctgcc cttgaagcct atctgagac tgccaaggtc
2341 ttcagattc cttccacaa agactgtgt gaggacggac tttgcatlc tgcattagtc
2401 ctagatgccc gacaatacc agctgctcaa gaacaacct ttattgtcag caacaaaaac
2461 aaaaggttaa cattttcagt aacgtgaaa aataaaagg aaagtgcata caaactgga
2521 attgttggc attttcaga aacttgttt ttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg
2581 acagaagtaa catgcaggt ggtgcatct cagaagctg ttgctcgoga tggatgctac
2641 cctgcttaa agagagaaca acagtgact tttactata actltgact caacttcaa
2701 aaccttcaga atcagcgtc tctcagttc caagccttaa gtaaaagca agaagaaaac
2761 aagctgata atttggtaa cctcaaat cctcctgt atgtgctga aatcactta
2821 acaagatca ccaacataa tttlatgaa atctctcgg atgggaatg tcttcaatc
2881 gtcacagct tgaagatgt tggttcaaaa ttcactctt cctgaaggt aacaacagga
2941 agtgttccag taagcatgac aactgtaac atccacatcc ctacgtatc caaagaaaag
3001 aaccocacta gtaacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagltgtaat
3061 gcagatatca atccactgaa aatagacaa acatctctt ctgatcttt caaaagtga
3121 aatttccagc acacaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttactcgc
3181 tgggtgaaa agtltccat gaaagagaa taacttgta atgtgactac cagaatttgg
3241 aacggactt tgcactcat aacgttccag acagtacagc taaccgacg tgcagaaatc
3301 aacacctata accctgagat atagtgtat gaagataaca ctgttacgat tccccgatg
3361 ataatgaaa ctgatgaga agccagata ccaacaggag ttataatagg aagtataatt
3421 gctggaatcc tttgtgctt agctcgtgt gaaatttat ggaagctcg ctcttcaaa

【 図 9 - 4 】

3481 agaaaatag aaaaatgac caaaaatca gatgagatt gatgaccac agagctcag
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 agpncwctn stflqegmpt
61 sarcdleal kkkcoppddi enprgskdik knknvnrsk gtaekllped itqigpqlv
121 lrlrsgepqt ftlkfkraed ypidlylmd lsysmddle nvkslgtldm nemritsd
181 zigfgsvk tvmvystlp aklnpctse gntspfsyk nvlsltnke vfnlvqkq
241 isgnldspeg gfdaimvav csgliqwrn trllvfstda gfnfadgkl gvlvlpndgg
301 chlenmytm shydypsia hlvgklenn iqtifavtee fqpvykeln lipkaavgtl
361 sanssviql iidaaysls evilengkl egvtisyksy cknvgntge ngrkesnisi
421 gdevqfeisi tsnkcpkks dsfkirplg teevevilg icececgseg ipespckey
481 ngtfecgacr cnegrvgrhc ecstdevnse dmdaycrken sseicnng evoqgqvrk
541 rdntneisyg kfceednfn drcnglicy ngvckcrvce cnpnytgac dcsldtstce
601 asngqicnrg gicecgvckc tdkfqqgtc emcqtlgvc aekhecqvr afnkgekddt
661 ctqecsyfni tkvesrdkl qpvpdpvsh ckekvdvddw fyftysvngn nemvhwven
721 pectgpdii pivagvvgi vliqllalli wkllmihr refakfekek mnakwdtgen
781 piyksavttv 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 ggggcccgcg ctggttctc gccggggggc ggetctggc
61 cggcagatcc cctctccc ccctgagga ggaagagcc cggcaccgc cggcggcga
121 caccgggag gcccccagc cccggggg agcccagc gsgctgcyg aacagcagc
181 cggagccac cggcggcgc cccgagccc ggggggaaa gatgattta caacaaattt
241 tctggttgg actgatcag tcaattgtc gttgttctc tcaaacagat gaaaatagat

【 図 9 - 5 】

301 gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtatata agcaggggcca aattgtgggt
361 ggtgcaacaa ttoaacattt ttaacaggaag gaatgocac ttctgcacga tgtgatgatt
421 tagaagcctt aaaaaagaag ggttgcocct cagatgacat agaaaatccc agaggotcca
481 aagatataaa gaaaaataaa aatgtacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca
541 agccagagga tattatcoag atccoaacc agcagttggt ttgogatta agatcagggg
601 agccacagac atttaacata aaatccaaga gactgaaga ctatccocat gacotctact
661 acctatgga cctgtcttat toaatgaag acgatttga gaatgtaaa agtcttggaa
721 cagatctgal gaalgaatg aggagatta ctctggact cagaatgga ttgtctcat
781 ttgtgaaaa gactgagact ccttaccata gcaacaacc agctaagctt aggaaccctt
841 gcacaagtga acagaactgc accagcccat tttagctaca aaatgtgct agtcttacta
901 ataaaggaga agtattbaat gaacttgttg gaaaacagc catatctgga aatttggatt
961 ctccagaagg tggttctgat gcatcatgc aagttgcat ttgtggata ctgattggct
1021 ggaggaaagt tacaagcgtc ctggtgttll ccacagatgc cgggtttcac ttgtctggag
1081 atggaaact tgggtgcat gttttacca atgatggaca atgtcacctg gaaaataata
1141 tgcacacaat gagccattat tattgttacc ctcttatgc tcaactgtgc cagaactga
1201 gtgaaaaata taatcagata atctttgacg ttaactgaag atttcagcct gttacaagg
1261 agctgaaaaa ctgtactcct aagtccagag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg
1321 taattcagtt gatcatgat gcaataact cctttctcc agaagtcatt ttgaaaaacg
1381 gcaaatgtc agaagcgtt acaatagtl acaatctta ctgcaagaac ggggtgaaag
1441 gaacagggga aaatggaaga aaatgtcca atatttccat tggagatgag gttcaattg
1501 aaattagcat aacttcaaat aagttccaa aaaaggttc tgacagcttt aaattlaggc
1561 ctctgtggct taccggagga glagaglla tcttcaagta catcttggaa lgtgaaigcc
1621 aaagcaagg cactccctgaa agtcccaagt gtaactgaag aaatgggaca tttagatgtg
1681 gcgctgcaag gtgcaatgaa gggctgtgtg gtacacattg tgaatgcagc acagatgaag
1741 ttaacagtga agacatggtt gcttactgca ggaagaaaa cagttcagaa atctgcagta
1801 acaatggaga gtgctctgc ggaagctgtg ttgtagaaa gagggtataat acaaatgaaa
1861 ttattctcgg caaatctcgc gactgtgata atttcaactg tgaatgaccc aatgcttaa
1921 ttgtggagg aaatgtggtt tgcagatgc gtgtgtgta gtgcaacccc aactacactg
1981 gcaatgcatg tgaactgtct ttgactata gtaactgtga agccagcaac ggaagatct

【 図 9 - 6 】

2041 gcaatggcog gggcatctgc gactgtggtg tctgtaagt tacagatcog aattttcaag
2101 ggcacacgtg tgagatgtgt cagacotgoc ttggtctgct tctgagcat aaagaatgtg
2161 ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgtctct
2221 attttaecat taccaggtta gaaagctggg acaaatacc ccagccgctc caactctgac
2281 ctgtgtccca ttgtaaggag aagatgtgtg agactgtgt gttctatttt acgtattcaag
2341 tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtgagaa tccagatgtt cccactgttc
2401 cagacatcat tccaatgta gctgggtggy ttgctgaaat tgttctatt ggccttgcag
2461 tactgtgat atggaagctt tlaalataaa tctatgacag aaggatgatt gctlaaatltg
2521 aaaaaggaaa aatgaaatgc aaatgggaca cgggtgaaaa tccattttta aagatgtcgc
2581 taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccaac
2641 aacactgaat gcaaaatgac aatttcata gtcacagta ggtagctta ggcgaatatt
2701 gcaatggttt tactcatgct caggttttga aatgtacaa tatgtataat tttttaaagt
2761 ttttattat ttgaaaaata tgttgaatt catgccaggg actgacaaa gacttgagac
2821 aggatgtta ctctgtcag ctaaggctac atltgtcct ttgactctt tcttctcgtg
2881 ctattgaaat caagctatt ggaatagtg atattctcat agcagatgaa agggcaatga
2941 ttaaagtaat gacatgatg agagtctctg ttaactatg attaaaactg atttttagct
3001 ttaacaatat gtcagtttg agttatgag aatccaaagt aaatgctctg ctgactgatt
3061 aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta ttgctctgt agacatgact gatgacatat
3121 ctgaaagaca aglatgtgta gactgtctg lgtaaaatac glllgaata gttgatctac
3181 aaagccatg ggaaaaalc agagatgag gaagaaaaa ccaatagctt taaaacctga
3241 gtgcaattt aagatgtact taatgttggg taacttttat gcttcaact tacaacttca
3301 agcttagat aaaaagaccg agcaalltll tctgtaaaaag tctllgall agcaatlll
3361 acalacagc catactttac aaagtattg ctgaaatggg accttttagg ttgaatttat
3421 tttattatt tttttttgt taatgtctg tgcctttctg cacctctctt aacttttaa
3481 tgtatttgt tgcattttg ggttaagact tttttatga gtaacttttc ttgaaattt
3541 tagcgtcaa ttgctcttt taatgaact gtgaattat actgtgcta tgcacaagct
3601 ctcaactcag agactctac tttagctag tgcataaca gaaactgta tgttacttc
3661 tcaactgtg agtggccat ctgttttcc actagtaca tcttctttt aagtgcttt
3721 agtttataca gttcaactt tacaagtcta tttactgag ttatttata aatagctca

【 図 9 - 7 】

3781 aaatacctaa atcagatgct ttgactgta tgtatttat caggttctgt gcatgaatt
3841 tttatagatt aaagaatgt aggaaaagca aaaaaaaaa

(配列番号 23)

【 図 10 - 2 】

10c: 抗α2インテグリンmABの分泌HCのアミノ酸配列

qvllhpgaelvkgpavklsckasgyftsymnrvsqppgglwiegripdpsdshynqtkdkkatltvdksks
talyqlaelteadsavvycakvgrfyfdywggttltvssaictkapsyplapvcgdtgssvltgclvkgyfepv
tlwnsglsagvhtfpvllqsdlylssvttstspwsglcnvhpasstkvtkklieprptlkpccpkcpa
pnllggsyvfifppkikvmlslapitvctvvdvedpvdqisvfnvnevhtagtqthredynstlrvsalpi
qhdwmskfkckvnnkdlpapierltispkpysvrappvylpppeemckkqvlctmvdtpmpeiyewetnng
kteinyktpelvldsgyfmysklrvekkmwernyscsvheglhnhhtkksfrztpgk

(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

atggaagacagacacactcctctgattggtgtgctgctctgggtccaggttccacaggttaacatgtgtgaccca
atctcaagcttctttggtgtgctctcaaggcaaggcccaatctctcagagcagcctgaaagctgtgagagct
atggcaacgctttatttactgtaccagcaagaacccaggaacccaacactctctctctgcaacac
ctgactctgggtccctgcaagttcaagtgcagctgggtctaggaacagactcaccctcaacttgaactctgga
gtgatgatgctgcaaacctattactgtcagcaaaaataatagagatccgttaacagcttggaggggggcaacagctgg
aaataaaacggctgtgctgcaacactgtatccactctcccaactccagtgagcaagttaacatctgagaggtgccc
cagctgtgtgtctttgcaaacctctcaacccaagaactcaatgtcagggagagatgagtgcagtgcaagaca
aaatggctctgcaacagttgactgtacagcaagcaagaacgaactcaagcatgagcaacactcaactgttga
ccaaggaagatgaaacacatacagctatctctgtgagggcaactcaacagacatcaactcaacccattgtcaag
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

DFVMTQSPAFSLVTPGKVTITCSAQSSVNYIHWYQQKFDQAPKKLIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSTDYFTTISLLEAEDAATYCCQWTTNPLTFGQTKVEIKRVAAPSIFLPPS
DEQLKSGTASVCLNNPFRFAKVKQKVDNALAGQNSQSGSVTEQDSKDTSLSTLTL
SKADYERKRVYCEVTHQGLSSPVRKFNREGC

(配列番号 53)

10b: 抗α2インテグリンmABのHCをコードするcDNA

atggatggagctgtatcatctctctttgtgtagcaacagcaaggttccactcccaaggtccaactgcatgaccc
tgggctgaaacttggaaagcctgggctccagtgagctgctcctgaaggtcttggctacacactcaccagctact
ggatgaactgggtgaaagcagggcctggagggcctcagtgatggaagattgactctccogatactgaaact
cactcaactcaaaagttcaaggcaagccactgactgtagcaaaaactcccaagcagcagctacatccactcag
cagctgacacttgaggactctcagctctatctctgtgcaaatgggaaggggactttgactactctgggcaag
gcaacactctcaagctctcagctcaaaaacagcccaactcagctctcaactcagcctctgtgtgagataca
actggctctcagctcagctgaggtgctggctcaagggttattcctcagcagcagctgactgactgaaactctgg
atccctgtccagttgtgcaacactccagctgtcctcagctcactcactcaacactcagcagctcagtgactg
taactcagcaactggcccagccagctcactcactcactgagcccaacccggcagcagcagcagcagcagcagcag
aaaattggcccagggggcccaactcaagcctctcctcaatgcaaatggcagcaactcaactctgggtgcaac
atccctctcactctccctccaagatcaagatgactactatgactcctcctgagcccaactgactcagctgtgtgtg
tggatgtgagcagggatgaccagatgctcagatcagctgggttggcaaacogtggagatgacacacagctcagaca
caaacctatagagagatatacaacagtaactcctcgggtggtcagctccctcccaactcagcaacagcagctgtag
tggcaagagattcaaatgaaaggtcaacaaacagacactccagcgcctcagagaaacactctcaaaccaaacag
ggtcagtaagactcceaaggtatgcttctcctcccaagaaagagatgactaaagaaacagctcaactgcaoc
tgcctgtcagacactctcctgcaagacttcactggagtggaacaaacagggaaacacagagactaaactcaaa
gaacactgaacagctcctgactctgaggtcttactcactgtagcaagcagctgagagtggaaaaagaagactggg
tggaaagaaatagctcctcctgtcagtggtccacagaggtctgcacaaatcaaccacagactaagagctctcccccg
actccogggaaagta

(配列番号 46)

10f: コンパレーターのHCのアミノ酸配列

QVQLQESGGPLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGIHWIRQPPGKLEWLGVIWARGFTN
YNSALMSRLTISKDNSKNOVSLKLSVTAADTAVYICARANDGVYIMDYWGQGLVTF
VSAATKGSVYFLPFCRSTESTALGLKLRDIFPEFVTVSWNSGALTSVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVYVPSLSLTCTTCVNHDKFENWIKRVAAPSIFLPPS
FEGGSPVFLFPPKDTLMSITPEVTCTVVDVSDQDQPEQWYVVDVGVNHNKTKP
REQFNSTYRVRVSLTVLHQLDMLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAGQPREPQVY
TLPFSQEMTRKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHTYKLSLSLGL

(配列番号 54)

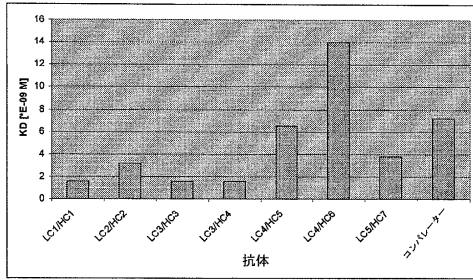
10c: 抗α2インテグリンmABの分泌LCのアミノ酸配列

nivltqspaslvglvgraticrasasvesyngsfiwyqqkpgapklilylesnlasgvparfsgsgrtdftl
tidpveaddaalyccqnnedpytfggtk1eikradaptvsi fppsseqllsgsasvvcflmnyfkndvkwki
dgsrctqgvlnsvtdqdskdstymsstl1tkdeyerhmsycoeatktktsps1vksfnrnc

(配列番号 47)

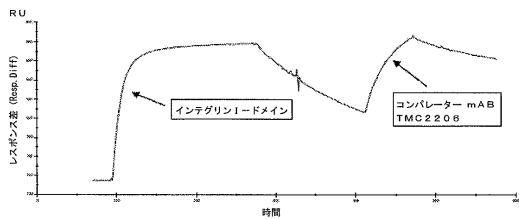
【 図 1 1 】

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



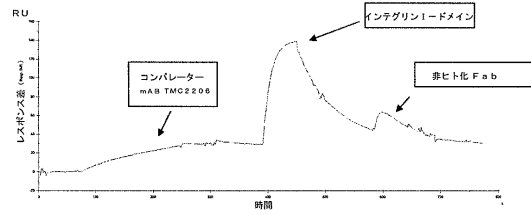
【 図 1 2 】

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 α_2 I-ドメインへのコンパレーター mAb TMC2206 の結合



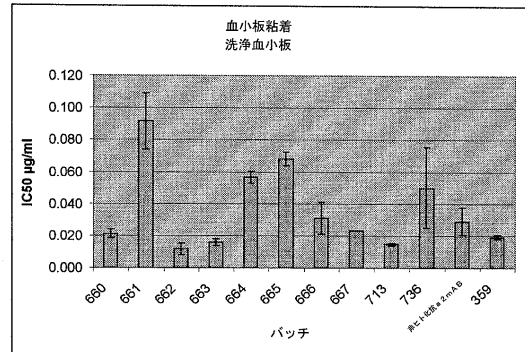
【 図 1 3 】

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 α_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 】

0006250395000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
		G 0 1 N	33/53 D

- (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・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ベー・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
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・ボラン
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・バパン
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・ブレヴェ
- (72)発明者 クリティアン・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・ベー・ハー

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 福井 悟

審判官 山本 匡子

(56)参考文献 特表2009-516506(JP,A)
国際公開第2010/052556(WO,A1)
Blood, 2004年, Vol. 104, No. 2, pp. 390-396
The Journal of Biological Chemistry, 1994年, V
ol. 269, No. 13, pp. 9659-9663
Journal of Virology, 2003年, Vol. 77, No. 17, ppp.
9486-9501

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K1/00-19/00

C12N15/00-15/90

UniProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	与 $\alpha 2$ 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	JP6250395B2	公开(公告)日	2017-12-20
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		
当前申请(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 A61K39/395 A61P1/04 A61P3/08 A61P7/02 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/06 A61P43 /00 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/08 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37 /00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 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 A61K39/395.N A61P1/04 A61P3/08 A61P7/02 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21 /08 G01N33/53.D		
优先权	2010305929 2010-08-31 EP		
其他公开文献	JP2013544489A		
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，与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，产生肽或肽的方法。复合物，包含肽或肽复合物或核酸的药物组合物，用作药物，检测 $\alpha 2$ 整联蛋白的方法和筛选方法。

(45) 発行日 平成29年12月20日 (2017.12.20)

(24) 登録日 平成29年12月1日 (2017.12.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	3/08	(2006.01)	A 6 1 P	3/08	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	

請求項の数 31 (全 91 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)
- (65) 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)
- (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)
- 審査請求日 平成26年7月22日 (2014.7.22)
- 審判番号 不服2016-14111 (P2016-14111/11)
- 審判請求日 平成28年9月21日 (2016.9.21)
- (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)

- (73) 特許権者 504456798
サノファイ
フランス国、エフ・75008・パリ、リ
ユ・ラ・ボエティ・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・コルヴェー
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・ベー
ハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α 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与する方法及び使用