

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3833723号

(P3833723)

(45) 発行日 平成18年10月18日(2006.10.18)

(24) 登録日 平成18年7月28日(2006.7.28)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02
 C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 5 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願平6-23365	(73) 特許権者	391015708
(22) 出願日	平成6年1月24日(1994.1.24)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(65) 公開番号	特開平7-69914		パニー
(43) 公開日	平成7年3月14日(1995.3.14)		BRISTOL-MYERS SQUIB
審査請求日	平成12年11月7日(2000.11.7)		B COMPANY
審査番号	不服2004-14506(P2004-14506/J1)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101
審査請求日	平成16年7月12日(2004.7.12)		54 ニューヨーク パーク アベニュー
(31) 優先権主張番号	008898		345
(32) 優先日	平成5年1月22日(1993.1.22)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫応答調節組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リンパ球とB7との相互作用をブロックすることにより免疫応答を制御するために使用するための、抗-IL-4抗体及び可溶性CTLA4Ig融合蛋白質を含んで成る組成物において、前記CTLA4Ig融合蛋白質が、CTLA4の細胞外ドメインに対応する配列番号：14に示されるアミノ酸配列の1位のアラニンから125位のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含む第1アミノ酸配列及びヒト免疫グロブリンCγ1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応するアミノ酸残基を含む第2アミノ酸配列を有する融合蛋白質である、ことを特徴とする組成物。

【請求項2】

前記リンパ球がB7陽性リンパ球である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記免疫応答が、抗体産生阻害をもたらすB細胞応答、細胞性免疫の阻害をもたらすT細胞応答、又はリンパ球増殖阻害である、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記組成物が、移植組織の受容者である対象者において移植拒絶を阻害するために使用するものである、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記組成物が、移植片対宿主病の抑制のために使用されるものである、請求項1に記載の組成物。

10

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、CTLA 4 レセプター遺伝子の発現、前記レセプターと B7 抗原を発現する細胞との間の相互作用の同定、および CTLA 4 レセプターを含む細胞の相互作用を調節する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

脊椎動物の免疫系の特徴は、「自己」と「非自己」とを区別する能力である。この性質は、最適な免疫活性化を達成するために多数のシグナルを必要とする系の進化に導いた (Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54 : 1-14 (1989))。T 細胞-B 細胞の相互作用は免疫応答に対して必須である。T 細胞および B 細胞上に見いだされる多数の付着分子のレベルは、免疫応答の間に上昇する (Springer ら、(1987)、前掲；および Shimizu, Current Opinion in Immunology, Kindt および Long 編、1 : 92-97 (1988))；および Hemler, Immunology Today 9 : 109-113 (1988))。

【0003】

これらの分子のレベルの上昇は、活性化された B 細胞が、抗原特異的 T 細胞の増殖を刺激するとき、休止の B 細胞よりもいっそう有効である理由の説明を助けるであろう (Kaiuchi ら、J. Immunol. 131 : 109-114 (1983)；Krciger ら、J. Immunol. 135 : 2937-2945 (1985)；McKenzie, J. Immunol. 141 : 2907-2911 (1988)；および Hawrylowicz および Unanue, J. Immunol. 141 : 4083-4088 (1988))。

【0004】

T リンパ球（「T 細胞」）の免疫応答の発生は、細胞-細胞の相互作用 (Springer ら、A. Rev. Immunol. 5 : 223-252 (1987))、とくに T 細胞とアクセサリー細胞、例えば、B 細胞との間の相互作用、および可溶性仲介因子（サイトカインまたはリンホカイン）の生産を含む複雑なプロセスである (Dinarello および Mier, New Engl. Jour. Med. 317 : 940-945 (1987))。

【0005】

この応答は、T 細胞レセプター複合体 (Weiss ら、Ann. Rev. Immunol. 4 : 593-619 (1986)) および他の「アクセサリー」表面分子 (Springer ら、(1987) 前掲) を含む、いくつかの T 細胞表面レセプターにより調節される。これらのアクセサリー分子の多数は、細胞の表面上のモノクローナル抗体の反応性により定められる、天然に見いだされる細胞表面の分化 (CD) 抗原である (McMichael 編、Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press、オックスフォード、ニューヨーク (1987))。

【0006】

リンパ球のアクセサリー分子を含む抗原独立の細胞間の相互作用は、免疫応答に対して必須である (Springer ら、(1987) 前掲)。例えば、T 細胞関連タンパク質 CD2 のそのリガンド LFA 3 (広く発現される糖タンパク質 (Shaw および Shimuz、前掲の中に概観されている)) への結合は、抗原特異的 T 細胞の活性化を最適化するために重要である (Moigcon ら、Nature 339 : 314 (1988))。

【0007】

重要な付着系は、リンパ球、マクロファージ収量顆粒球上に見いだされる LFA-1 糖タンパク質 (Springer ら、(1987) 前掲；Shaw および Shimuz (1988) 前掲) のそのリガンド ICAM-1 (Makgoba ら、Nature 311 : 86-88 (1988)) および ICAM-2 (Staunton ら、Nature 339 : 61-64 (1989)) への結合を含む。T 細胞のアクセサリー分子 CD8 および CD4 は、それぞれ、MHC クラス I (Norment ら、Nature 336 : 79-81 (1988)) およびクラス II (Doyle および Strominger, Nature 330 : 256-259 (1987)) 分子との相互作用により、T 細胞の付着を強化する。「ホーミング・レセプター (homing receptor)」はリンパ球の移動のコントロールのために重要である (Stoolman, Cell 56 : 907-910 (1989))。

【0008】

VLA 糖タンパク質は、細胞外マトリックス成分への付着を必要とするリンパ球の機能を仲介するように思われるインテグリン (integrin) である (Hemler、前掲)。CD 2 / LFA- 3 , LFA- 1 / ICAM-1、および VLA 付着系は、広範な種類のタイプの細胞上に存在する (Springerら、(1987)、前掲; ShawおよびShimuz、(1989)、前掲およびHemler、(1988))、前掲)。

【0009】

さまざまなインビトロ研究により、サイトカインが同種異系反応性エフェクター細胞の生成に関与していることが実証された。例えば、膜結合 IL- 4 及び可溶性 IL- 4 レセプターは、マウスに対し別々に投与されリンパ増殖性応答を増大させるものであることが示された (William C, Fanslow et al. 「IL- 4 及び可溶性 IL- 4 レセプターによるインビボでの同種異系反応性の調節」 J. Immunol. 147 : 535-540 (1991))。特異的に言うと、BALB / c マウスに対する IL- 4 の投与は、リンパ増殖性応答のわずかな増大という結果をもたらした。これとは対照的に、可溶性 IL- 4 レセプターはこの同種異系細胞に対する応答を用量に依存した形で抑制した。その上、IL- 4 に対する中性化抗体及び可溶性 IL- 4 レセプターに対するもう 1 つの抗体は、リンパ増殖性応答の効果的な阻害物質であった。

10

【0010】

B-リンパ球の活性化は 2 つのシグナルを必要とすることがかなり以前に提案され (Bretscher および Cohn, Science 169 : 1042-1049 (1970))そして現在すべてのリンパ球はそれらの最適な活性化のための 2 つのシグナル、抗原特異的またはクローナルシグナル、ならびに抗原非特異的シグナルを必要とすると信じられている (Janeway、前掲)。

20

【0011】

Freeman ら (J. Immunol. 143 (8) : 2714-2722 (1989)) は、mAB B7により認識される B 細胞活性化抗原をエンコードする cDNA クローンを単離しそして配列決定した (Freeman ら、J. Immunol. 138 : 3260 (1987))。この cDNA でトランスフェクションした COS 細胞は、標識化 mAB B7 および mAB BB- 1 の両者により染色されることが示された (Clark ら、Human Immunol. 16 : 100-113 (1986); Yokochi ら、J. Immunol. 128 : 823 (1981)); Freeman ら、(1989) 前掲; および Freeman ら、(1987)、前掲))。さらに、この抗原の発現は他の系統の細胞、例えば、単球上に検出された (Freeman ら、前掲)。

【0012】

T ヘルパー細胞 (T_h) 抗原の応答のために要求されるシグナルは、抗原を提示する細胞 (APC) により提供される。T 細胞レセプター複合体 (Weiss, J. Clin. Invest. 86 : 1015 (1990)) を、APC 上のクラス II の主要な組織適合性複合体 (MHC) 分子に関係して提示された抗原と相互作用させることによって、第 1 シグナルは開始される (Allen, Immunol. Today 8 : 270 (1987))。この抗原特異的シグナルは完全な応答を発生するために不十分であり、そして第 2 シグナルの存在下に、クローナルの不活性化またはアネルギーに実際に導くことがある (Schwartz, Science 248 : 1349 (1990))。

30

【0013】

MHC により提供される第 2 「共同刺激 (costimulatory)」シグナルについての要件は、ある数の実験の系において証明された (Schwartz, 前掲; Weaver および Unanue, Immunol. Today 11 : 49 (1990))。これらの 1 または 2 以上のシグナルの分子の性質は完全には理解されないが、ある場合において、可溶性分子、例えば、インターロイキン (IL) - 1 (Weaver および Unanue, 前掲) および細胞間付着に関係する膜レセプターの両者は共同刺激シグナルを提供できることが明らかである。

40

【0014】

CD28 抗原、すなわち、免疫グロブリン上科のホモ 2 量体の糖タンパク質 (Aruffo および Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 84 : 8573-8577 (1987)) は、ほとんどの成熟ヒト T 細胞上に見いだされるアクセサリー分子である (Damle ら、J. Immunol. 131 : 2296-2300 (1983))。現在の証拠が示唆するように、T 細胞反応複合体により開始されるものと区別される別の T 細胞活性化の経路において、この分子は機能する (June ら、Mol. Cell. Biol. 7 : 4472-4481 (1987))。

50

【0015】

CD28抗原と反応性のモノクローナル抗体 (mAb)は、種々のポリクローナルの刺激により開始されるT細胞の応答を増強することができる (Juneら、前掲、の中に概観されている)。これらの刺激作用はmAb 誘発サイトカインの生産 (Thompsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86 : 1333-1337 (1989) ; およびLindstenら、Science 244 : 339-343 (1989)から、mRNA安定化の増加 (Lindstenら、(1989)、前掲)の結果としてを生ずることができる。

【0016】

抗CD28mAb は、また、阻止作用を有することができ、すなわち、それらはオートロガス混合リンパ球反応 (Damle ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 5096-6001 (1981)) および抗原特異的T細胞クローンの活性化 (Lesslauer ら、Eur. J. Immunol. 16 : 1289-1296 (1986)) をブロックすることができる。CD28はB細胞活性化抗原であるB7/BB-1のための対レセプターであることが研究において示された (Linsley ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 5031-5035 (1990))。便宜上、B7/BB-1 抗原を以後「B7抗原」と呼ぶ。

【0017】

CD28とB7抗原との間の相互作用は、B7抗原およびCD28レセプターの細胞外部分、および免疫グロブリン (Ig) C γ 1 (一定領域の重鎖)の遺伝学的融合を使用して特徴づけられた (Linsley ら、J. Exp. Med. 173 : 721-730 (1991))。同定化B7Ig融合タンパク質ならばB7陽性CHO 細胞は、T細胞の増殖を共同刺激 (costimulate)することが示された。B7陽性CHO 細胞によるT細胞の刺激は、また、IL-2のための転写レベルの増加を特異的に刺激する。追加の研究において、抗CD28mAb は、ある種のT細胞白血病細胞系においてB細胞系白血病系統との細胞の相互作用により誘発されたIL-2の生産を阻止することが示された (Kohno ら、Cell Immunol. 131-1-10 (1990))。

【0018】

CD28は単一の細胞外の可変領域 (V) 様ドメインを有する (AruffoおよびSeed、前掲)。相同性分子のCTLA4は、ネズミ細胞溶解性T細胞のcDNAライブラリーの分別スクリーニングにより同定された (Brunetら、Nature 328 : 267-270 (1987))。このCTLA4分子の転写は細胞障害活性を有するT細胞の集団の中に見いだされ、CTLA4が細胞溶解性応答において機能するであろうことを示唆した (Brunetら、前掲；およびBrunetら、Immunol. Rev. 103-21-36 (1988))。

【0019】

研究者らの報告によると、CTLA4のヒトの対 (Dariavach ら、Eur. J. Immunol. 18 : 1901-1905 (1988))の遺伝子はクローニングされそしてCD28と同一の染色体領域 (2 g 33-34) にマッピングされた (Lafage-Pochitalodd) ら、Immunogenetics 31 : 198-201 (1990))。

このヒトCTLA4のDNAとCD28タンパク質をエンコードするものとの間の配列の比較は、膜近傍領域および細胞質領域において最高度の相同性をもつ、配列の有意な相同性を明らかにする (Brunetら、1988、前掲；Dariavach ら、1988、前掲)。

【0020】

CD28とCTLA4との間の高度の相同性は、それらの遺伝子の共同局在化と一緒に、これらの分子がまた機能的に関係するかどうかという問題を発生する。しかしながら、CTLA4のタンパク質生産物はまだ首尾よく発現されてきていないので、これらの問題は未解決のままである。

免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーにおける細胞表面の糖タンパク質の可溶性誘導体の発現は、CD4、HIV-1のレセプター、およびCD28およびB7のレセプターについて、ハイブリッド融合分子を使用して活性化され、これらのハイブリッド融合分子は抗体ドメインに融合されたCD4レセプターの細胞外ドメインの部分に相当するアミノ酸をエンコードするDNA配列から成る (免疫グロブリン γ 1 (Capon ら、Nature 337 : 525-531 (1989))(CD4)およびLinsley ら、J. Exp. Med.、前掲) (CD28 およびB7)。

【0021】

本発明に対する必要性が存在する。現在のところ、臓器移植片の拒絶を防ぐための主要な

10

20

30

40

50

療法は、サイクロスポリンA又はCD3に対するモノクローナル抗体(MAbs)といった汎免疫抑制剤に依存している。これらの薬剤は、患者の生命を救うため頻繁に摂取されなくてはならず、全免疫系を衰えさせ、往々にして、感染やガンの頻度の増大といった2次的な健康上の不安定さをもたらす。

【0022】

【発明の要約】

したがって、本発明はCTLA4レセプタータンパク質に相当するアミノ酸配列をエンコードする完全なかつ正しいDNA配列を提供し、そしてCTLA4レセプターのために天然のリガンドとしてB7抗原を同定する。本発明は、また、CTLA4免疫グロブリン(Ig)融合タンパク質生産としてDNAを発現する方法を提供する。

10

【0023】

本発明の態様は、CTLA4Ig融合タンパク質、およびCD28Ig/CTLA4Ig融合タンパク質を包含するハイブリッドの融合タンパク質を包含する。また、CTLA4融合タンパク質、B7Ig融合タンパク質、およびそれらの断片および／または誘導体、例えば、CTLA4およびB7抗原と反応性のモノクローナル抗体を使用して細胞の相互作用および免疫応答を調節する方法が提供される。

本発明のヒトCTLA4レセプタータンパク質は187アミノ酸によりコードされ、そして新しく同定されたN連鎖グリコシル化部位を包含する。

【0024】

本発明のCTLA4Ig融合タンパク質は、活性化B細胞、および他の系統上に発現されたB7抗原、T細胞上のCD28レセプターのためのリガンドと結合する。CTLA4Igは、CD28レセプターに結合するB7よりも有意により高い親和性でB7抗原と結合する。CTLA4Ig構成体は、ヒトIgC γ 1ドメインに相当する第2アミノ酸配列に融合したCTLA4レセプターの細胞外ドメインに相当する第1アミノ酸配列を有する。

20

【0025】

第1アミノ酸配列は、アミノ酸配列の約位置1から約位置125のアミノ酸残基を含有し、これらのアミノ酸残基はヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列に接合したCTLA4の細胞外ドメインに相当する。融合タンパク質は好ましくは2量体の形態で生産される。可溶性CTLA4IgはTおよびBリンパ球の応答の効力のあるin vivo インヒビターである。

30

【0026】

また、本発明において、ハイブリッド融合タンパク質、例えば、第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA4Ig融合タンパク質が包含され、この第1アミノ酸配列はCTLA4Igの細胞外ドメインの断片に相当する第2アミノ酸配列およびヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当する第3アミノ酸配列に接合したCD28の細胞外ドメインの断片に相当する。

【0027】

ハイブリッド融合タンパク質の1つの態様は、CD28の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1から約94のアミノ酸残基を含有する第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA4Ig融合タンパク質であり、CD28の細胞外ドメインはCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置94から約位置125のアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列を接合し、CTLA4の細胞外ドメインはヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸残基を含有する第3アミノ酸配列に接合している。

40

【0028】

また、本発明において、T細胞をCTLA4レセプターのリガンドと反応させることによって、CTLA4陽性T細胞とB7陽性細胞との相互作用を阻止することによる、他の細胞とのT細胞の相互作用を調節する方法が包含される。リガンドはB7Ig融合タンパク質、CTLA4レセプターと反応性のモノクローナル抗体、および抗体断片を包含する。

本発明は、また、B7抗原のためのリガーゼを使用する、B7陽性細胞とのT細胞の相互作用を調節する方法を提供する。このようなリガンドは、本発明のCTLA4Ig融合タンパク質、

50

その断片または誘導体、CD28Ig／CTLA 4 Ig融合タンパク質のハイブリッド、またはB7抗原と反応性のモノクローナル抗体である。

【0029】

本発明は、さらに、B7抗原と反応性のリガンドを投与してB7陽性細胞とのT細胞の相互作用を調節することによって、B7陽性細胞とのT細胞の相互作用により仲介される免疫系の疾患を処置する方法を包含する。このリガンドは、CTLA 4 Ig融合タンパク質、CD28Ig／CTLA 4 Ig融合タンパク質のハイブリッド、またはB7抗原と反応性のモノクローナル抗体である。

CTLA 4 Ig融合タンパク質と反応性のモノクローナル抗体およびCD28Ig／CTLA 4 Ig融合タンパク質と反応性のモノクローナル抗体を、細胞の相互作用の調節における使用について記載する。

10

【0030】

CTLA 4 Ig融合タンパク質を安定に発現する新規なチャイニーズハムスター卵巢細胞系をまた開示する。

さらに、本発明は、免疫応答を調節するためB7相互作用を遮断するための方法を提供する。この方法には、CTLA 4－結合分子及びIL 4 結合分子とリンパ球を接触させる段階が含まれている。

さらに、本発明は、CTLA 4 結合分子及びIL 4－結合分子とB7陽性リンパ球を接触させる段階を含む免疫応答を調節するための方法を提供する。

【0031】

20

同様に、本発明は、移植組織の被移植者である患者による組織移植片の拒絶を阻害するための方法をも提供している。この方法には、患者に対しCTLA－ 4 結合分子及びIL 4－結合分子を投与する段階が含まれている。

本発明はさらに、患者に対しCTLA 4－結合及びIL 4－結合分子を投与する段階を含む、患者体内の移植片対宿主病を阻害するための方法をも提供する。

【0032】

【発明の具体的な説明】

ここに記載する本発明を完全に理解することができるように、次の説明を記載する。

【0033】

定義

30

本出願中で使用する以下の語い又は熟語は規定通りの意味を有する。

ここで用いる「B7相互作用を遮断する」というのは、CD28及びCTLA 4 といったそのリガンドに対するB7抗原の結合に干渉しかくしてT細胞とB細胞の相互作用を妨害することを意味する。

ここで使用するように、「CTLA 4－結合分子」はB7抗原を結合することになるあらゆる分子のことを意味する。

ここで使用されている「IL 4 結合分子」は、IL 4 を認識しこれに結合することになるあらゆる分子のことを意味する。

本書で記述する発明をより良く理解することができるように、以下の説明を提供する。

【0034】

40

本発明は、T細胞表面上に見いだされ、活性化B細胞および他の系統の細胞上に発現されたB7抗原に結合する、ヒトCTLA 4 レセプターの単離およびクローニング、およびCTLA 4 レセプター遺伝子の可溶性融合タンパク質生産物の発現に関する。本発明は、また、発現されたCTLA 4 レセプターを使用して、B7陽性細胞とのT細胞の相互作用を包含する細胞の相互作用を調節する方法を提供する。

【0035】

好ましい態様において、本発明のヒトCTLA 4 レセプタータンパク質に相当するアミノ酸配列をコードする完全なかつ正しいDNA 配列をPCR によりクローニングする。CTLA 4 の完全な予測されたコーディング配列を含有するcDNAを、下の実施例の中に詳細に記載されているように、H38RNAから増幅されたPCR 断片からアセンブリングし、そして発現ベクターCD

50

M8の中に挿入した。単離物をCOS細胞の中にトランスフェクションし、そしてB7Ig、すなわち、Linsleyら、J. Exp. Med. 173 : 721-730 (1991) 記載されているように、B7の細胞外ドメインおよびヒト免疫グロブリン (Ig) C γ 1領域に相当するアミノ酸配列を有する可溶性融合タンパク質の結合について試験した。

【0036】

次いで、OMCTLA4と表示する1つの単離物のDNA配列を決定し、そしてN末端においてオンコスタチンMからのシグナルペプチドに融合した、予測されたヒトCTLA4配列に正確に相当することが発見された。CTLA4レセプターは187アミノ酸(シグナルペプチドおよび停止コドンを除く)によりコードされ、そしてアミノ酸位置109-111に新しく同定されたN連鎖グリコシル化部位を含む(下の図3を参照)。オンコスタチンMのシグナルペプチドを使用して、CTLA4レセプターを発現させる。

10

【0037】

他の好ましい態様において、CTLA4の細胞外ドメインに相当する第1アミノ酸配列およびヒトIgC γ 1ドメインに相当する第2アミノ酸配列を有する融合タンパク質を使用して、CTLA4レセプター遺伝子(CTLA4 Ig)のタンパク質生産物の可溶性の形態を調製する。

【0038】

ここに記載するcDNA配列に基づくヒトCTLA4レセプターに相当するアミノ酸配列の部分をエンコードするcDNAを含有するクローニングおよび発現のプラスミド(CDM8および π LN)を構成し、ここでCTLA4レセプター遺伝子の細胞外ドメインの断片に相当する第1アミノ酸配列をエンコードするcDNAを、発現されたCTLA4タンパク質の可溶性の変更によりCTLA4レセプター遺伝子の発現を可能とするIgC領域に相当する第2アミノ酸配列をコードするDNAに接合する。

20

【0039】

こうして、可溶性CTLA4 Ig融合タンパク質は第1アミノ酸配列によりコードされ、この第1アミノ酸配列はヒトIgのC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列に接合したCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1~約125のアミノ酸残基を含有する。融合タンパク質は好ましくは2量体の形態で生産される。次いでこの構成体をCOSまたはCHO細胞の中にトランスフェクションし、そしてCTLA4 Igを精製しそして2量体として同定した。

【0040】

30

本発明の態様に従うと、CTLA4 Ig及びCTLA4 Ig/CD28融合タンパク質は、CTLA4の機能的特性を保持する分子を生成するべくCTLA4の外部ドメインに対応するアミノ酸配列におけるアミノ酸置換を有してよい。すなわち、このような置換を有する分子は、なおもB7抗原に結合することになる。これらのアミノ酸置換には、当該技術分野において「保存的」として知られるアミノ酸置換が含まれるがこれらに必ずしも制限されるわけではない。

【0041】

例えば、1つのタンパク質の中でタンパク質のコンホメーションや機能を変えことなく「保存的アミノ酸置換」と呼ばれるいくつかのアミノ酸置換を頻繁に行なうことができるというのは、タンパク質化学の確立した原理である。このような変化には、イソロイシン(I)、バリン(V)及びロイシン(L)のいずれかをこれらの疎水性アミノ酸のうちの他のいずれかに置換すること；グルタミン酸(E)のかわりにアスパラギン酸を又はその逆に置換すること、アスパラギン(N)に代わってグルタミン(A)を又はその逆に置換すること、及びトレオニン(T)の代わりにセリン(S)を又はその逆に置換することが含まれる。特定のアミノ酸の環境及びタンパク質の3次元構造におけるその役割に応じて、その他の置換も又保存的とみなすことができる。例えば、グリシン(G)及びアラニン(A)は、アラニンとバリン(V)がそうでありうるように、互換性があると考えられることが多い。

40

【0042】

比較的疎水性であるメチオニン(M)はロイシン及びイソロイシンと、又時としてバリンと頻繁に互換されうる。リジン(K)及びアルギニン(R)は、アミノ酸残基の有意な特

50

徴がその負荷にありこれら2つのアミノ酸残基のpKの違いが著しいものではないような場所において頻繁に互換可能である。特定の環境の中では、さらにその他の変化も「保存的」とみなすことができる。

【0043】

実際、本書で開示する方法を用いて、CTLA4結合分子の突然変異体が産生された。1つの突然変異体は、(1)CD28受容タンパク質の位置1のアミノ酸で始まり位置95のアミノ酸で終わる配列(Aruffo and Seed, 1987); (2)CTLA4の細胞外ドメインの位置95のアミノ酸で始まり位置125のアミノ酸で終わる配列(Brunet et al. 1987); 及び(3)ヒトIgC γ 1ドメインに対応する配列、を含んでいる。

【0044】

第2の突然変異体は、(1)CD28受容タンパク質の位置1のアミノ酸で始まり位置95のアミノ酸で終わる配列(Aruffo and Seed 1987); (2)CTLA4の細胞外ドメインの位置95のアミノ酸で始まり位置120のアミノ酸で終わる配列(Brunet et al. 1987); 及び(3)ヒトIgC γ 1ドメインに対応する配列、を含んでいる。

本発明は、CTLA4結合分子及びIL4結合分子とリンパ球を接触させることを含む、免疫応答を調節するべくB7相互作用を遮断するための方法を提供する。リンパ球は、B7陽性リンパ球であってよい。

【0045】

さらに、本発明は、CTLA4結合分子及びIL4結合分子とB7陽性リンパ球を接触させることを含む、免疫応答を調節するための方法を提供する。

免疫応答は、抗体産生の阻害という結果をもたらすB細胞応答でありうる。付加的には、免疫応答は、細胞性免疫の阻害を結果としてもたらすT細胞応答であってもよい。さらに免疫応答は、リンパ球増殖の阻害であってもよい。

同様に、本発明は、移植組織の被移植者である患者による組織移植片の拒絶を阻害するための方法をも提供する。この方法は、患者に対してCTLA4結合分子及びIL4結合分子を投与することを含むことができる。

【0046】

本発明はさらに、患者に対してCTLA4結合分子及びIL4結合分子を投与することを含む、患者体内の移植片対宿主病を阻害するための方法をも提供する。

本発明の態様に従うと、CTLA4結合分子はCTLA4 Ig融合タンパク質であってよい。例えば、CTLA4 Ig融合タンパク質は、CTLA4の細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列のほぼ位置1から位置125までのアミノ酸残基を含む第1のアミノ酸配列と、ヒト免疫グロブリンC γ 1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応するアミノ酸残基を含む第2のアミノ酸配列を有する融合タンパク質でありうる。

【0047】

あるいは、CTLA4結合分子は、CD28Ig/CTLA4 Ig融合タンパク質ハイブリッドであってよい。例えば、CD28Ig/CTLA4 Ig融合タンパク質ハイブリッドは、CTLA4レセプターの細胞外ドメインの一部分に対応する第2のアミノ酸配列及びヒト免疫グロブリンC γ 1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応する第3のアミノ酸配列に融合されたCD28レセプターの細胞外ドメインの一部分に対応する第1のアミノ酸配列を有する融合タンパク質ハイブリッドであってよい。

【0048】

さらに、IL4結合分子は、IL4を特異的に認識しこれに結合するモノクローナル抗体でありうる。代替的には、IL4結合分子は、IL4を認識しこれに結合する可溶性IL4レセプターである(Fanslow et al. 1991)。

CTLA4 Ig融合タンパク質に相当するアミノ酸配列をコードするDNAは、ブダベスト条約の規定に従いアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)(ATCC)(米国マリイランド州ロックビレ)に1991年5月31日に受託され、そしてATCC受け入れ番号68629を与えられた。

【0049】

本発明は、可溶性融合タンパク質の形態でCTLA4転写体の第1タンパク質生産物を提供する。CTLA4タンパク質はほぼ50,000サブユニットの M_r のジサルファイド連鎖の2量体を形成し、天然のCTLA4がT細胞表面上にジサルファイド連鎖ホモ2量体として多分存在することを示す。

B7抗原はT細胞上のCD28レセプターのためのリガンドであることが示された(Linsleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、前掲)。CTLA4レセプター分子はCD28レセプターに機能的にかつ構造的に関係すると思われる；両者はB細胞活性化抗原のためのレセプターであるが、CTLA4は、リンパ系付着系についてこれまで報告された最高のもの中で、B7に対するより高い親和性を有するようになると思われる。

【0050】

しかしながら、CTLA4 IgはCD28IgよりB7陽性($B7^+$)細胞系にいつそう強く結合することが示された。他の実験において、CTLA4はB7抗原に対してCD28レセプターより高い親和性のレセプターであることが証明された。さらに、CTLA4 IgはB7抗原に大きさが類似するリンパ芽球細胞上の単一のタンパク質に結合することが示された。CTLA4 IgはT細胞増殖を阻止し、そして T_h 誘発IgM生産を阻止した。

【0051】

他の好ましい態様において、異なるレセプタータンパク質の断片に相当するアミノ酸配列を有するハイブリッド融合タンパク質を構成した。例えば、CD28およびCTLA4の細胞外ドメインの選択した断片に相当するアミノ酸配列を連鎖して、CD28Ig/CTLA4 Igハイブリッド融合タンパク質を形成した。

こうして、第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA4 Ig融合タンパク質が得られ、この第1アミノ酸配列はCTLA4 Igの細胞外ドメインの断片に相当する第2アミノ酸配列およびヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当する第3アミノ酸配列に接合した、CD28の細胞外ドメインの断片に相当するアミノ酸残基を含有する。

【0052】

ハイブリッド融合タンパク質の1つの態様は第1アミノ酸配列を有するCD28Ig/CTLA4 Ig融合構成体であり、この第1アミノ酸配列はCD28の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1～約位置94のアミノ酸残基を含有し、CD28はCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置94～約位置125のアミノ酸残基を含有する第2アミノ酸配列に接合し、CTLA4はヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当する第3アミノ酸配列に接合している。

【0053】

CTLA4レセプタータンパク質、可溶性融合タンパク質およびハイブリッド融合タンパク質に相当するアミノ酸配列をコードするDNA配列をクローニングしそして発現する技術、例えば、オリゴヌクレオチドの合成、PCR、細胞の形質転換、ベクターの構成、発現系などはこの分野においてよく確立されており、そしてほとんどの熟練者は特定の条件および手順のための標準的原材料をよく知っている。しかしながら、必要に応じて便利および変更の注釈のために次の節を準備し、そしてこれらの節はカイドラインの役目をするであろう。

【0054】

レセプターおよび融合タンパク質のためのコーディング配列のクローニングおよび発現
本発明のCTLA4 Igを特性決定しかつCD28Ig/CTLA4 Ig融合ハイブリッドを調製するためのCD28IgC γ 1およびB7IgC γ 1に相当する融合タンパク質の構成体を、Linsleyら、J. Exp. Med. 173 : 721-730 (1991)(これを引用によって加える)に記載されているように調製した。あるいは、B7抗原およびCD28レセプターを発現する細胞から、これらのタンパク質について発表された知識(AruffoおよびSccd、およびFreeman、前掲)に基づいて標準的手順を使用して、cDNAクローンを調製することができる。

【0055】

CTLA4の細胞外ドメインおよびヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に対応するアミノ酸配列をコードするDNAから成るCTLA4 Ig融合体を、PCR断片の結合により構成した

10

20

30

40

50

。アミノ酸をコードするcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）技術に従い増幅する（米国特許第4,683,195号および米国特許第4,683,202号（Mullisら）、およびMullisおよびFaloon, Methods Enzymol. 154 : 335-350 (1987) を参照のこと）。

【0056】

CTLA4 Ig融合ポリペプチドを構成し、これらのポリペプチドはCTLA4の細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約位置1～約位置125のアミノ酸残基を含有するアミノ酸配列をコードするDNA、およびIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするDNAを有した。

【0057】

ヒトリンパ系細胞の中のCTLA4レセプタータンパク質の発現は従来報告されてきていないので、CTLA4のmRNA源を探ることが必要であった。いくつかのヒト白血病細胞系の全体の細胞のRNAから作ったPCRのcDNAを、プライマーとして、CTLA4遺伝子の発表された配列かのオリゴヌクレオチドを使用してスクリーニングした（Dariavachら、前掲）。試験したcDNAのうちで、H38細胞（HTLV II 関連白血病系統）は期待したサイズを有するPCR生産物の最良の収量を提供した。

【0058】

CTLA4の単一のペプチドはCTLA4遺伝子の中で同定されなかったもので、CTLA4の予測された配列のN末端をオンコスタチンMのシグナルペプチド（Malikら、Molec. and Cell. Biol. 9 : 2847 (1989)）に、下の実施例に記載するオリゴヌクレオチドを使用して融合した。PCR反応の生産物を、IgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするcDNAを使用して、発現ベクター、例えば、CDM8または π LNの中に結合した。

【0059】

全長のヒトCTLA4をコードするDNAを得るために、CTLA4のトランスメンブレンおよび細胞質ドメインをコードするcDNAをH38細胞からPCRにより構成し、そしてCTLA4のN末端に融合したオンコスタチンMシグナルペプチドをコードする、前述したように構成した、CTLA4 Igからの断片と、下の実施例に記載するオリゴヌクレオチドのプライマーを使用して接合した。PCR断片をプラスミドCDM8の中に結合して、全長のCTLA4をコードする発現プラスミドを生成し、そしてこれをOMCTLA4と表示した。

【0060】

ハイブリッド融合タンパク質に相当するアミノ酸配列をエンコードするDNAを構成するために、1つのレセプター遺伝子の細胞外ドメインの部分に相当するアミノ酸をコードするDNAを、他のレセプター遺伝子の細胞外ドメインの部分に相当するアミノ酸をコードするDNA、およびヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするDNAに、B7Ig、CD28IgおよびCTLA4 Ig構成体について前述した手順を使用して接合する。

【0061】

こうして、例えば、CD28レセプターの細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列の約1位置～約94位置のアミノ酸残基をコードするDNAを、CTLA4レセプターの細胞外ドメインのアミノ酸配列の約位置94～約位置125のアミノ酸残基をコードするDNA、およびヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2およびCH3領域に相当するアミノ酸配列をコードするDNAに接合する。

【0062】

大量のクローニングしたDNAを生産するために、本発明の融合構成体をコードするDNAを含有するベクターを適当な宿主細胞、例えば、細菌細胞系の大腸菌（*E. coli*）MC1061/p3株（Invitrogen Corp.、カリフォルニア州サンディエゴ）の中に標準的手順を使用して形質転換し、そしてコロニーを適当なプラスミドについてスクリーニングする。

【0063】

次いで、前述したようにして得られた融合構成体をコードするDNAを含有するクローンを、発現のために適当な宿主細胞の中にトランスフェクションする。使用する宿主細胞に依存して、このような細胞に適当な標準的技術を使用してトランスフェクションを実施する

10

20

30

40

50

。例えば、哺乳動物細胞中のトランスフェクションは、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、CaPO₄ 共沈、リポフェクション (lipofection)、エレクトロポレイションまたは原形質体の融合、および他のこの分野において知られている方法により達成し、ここで後者の方法は次のものを包含する：

【0064】

リゾチームの融合または赤血球の融合、スクレイピング、直接的吸収、浸透圧またはスクロースのショック、直接的マイクロインジェクション、間接的マイクロインジェクション、例えば、赤血球仲介技術を介するマイクロインジェクション、および／または宿主細胞を電流に暴露する。

遺伝的情報を細胞の中に導入する他の手順は疑いなく開発されるであろうから、上に列挙したトランスフェクションの技術は網羅的であると考えられない。 10

【0065】

多細胞の生物から誘導化された真核生物の宿主細胞の培養物の中の発現は好ましい (Tissue Cultures, Academic Press, CruzおよびPatterson 編、(1973)を参照のこと)。これらの系はイントロンをスプライスする能力をもつという追加の利点を有し、こうしてゲノム断片の発現に直接使用することができる。有用な宿主細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞、サル腎臓 (COS)細胞、VERO細胞およびHeLa細胞を包含する。本発明において、融合構成体を安定に発現する細胞系は好ましい。

【0066】

このような細胞のための発現ベクターは、通常、哺乳動物細胞と適合性のプロモーターおよびコントロール配列、例えば、CMV プロモーター (CDM8ベクター) および鳥類の肉腫ウイルス (ASV) (π LNベクター) を包含する。他の普通に使用される前期および後期のプロモーターは、サルのウイルス40 (SV40) (Fiersら、Nature 273 : 113 (1973))、または他のウイルスのプロモーター、例えば、ポリオーマから誘導化されたもの、アデノウイルス2、およびウシ乳頭腫ウイルスを包含する。 20

【0067】

コントロール可能なプロモーター、hMTII (Karinら、Nature 299 : 797-802 (1982)) をまた使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系の形質転換についての一般的面は、Axel (米国特許第4,399,216号、1983年8月16日発行) により記載された。現在明らかなように、「エンハンサー」領域は発現を最適化するとき重要である；これらは、一般に、非コーディング領域の中のプロモーター領域の上流または下流に見いだされる配列である。必要に応じて、複製の由来をウイルス源から得ることができる。しかしながら、染色体中の組み込みは真核生物におけるDNAの複製のための普通のメカニズムである。 30

【0068】

融合構成体の発現のために好ましい真核生物の細胞、例えば、COS またはCHO 細胞を包含するが、他の真核生物の微生物を使用できる。サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、イーストの実験室用菌株をたいいて使用するが、他の菌株、例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)を使用できる。

【0069】

例えば、Broach, Methods Enzymol. 101 : 307 (1983) の2 μの複製由来、または他の酵母適合性の複製由来 (例えば、Stinchcombら、Nature 282 : 39 (1979)) ; Tschempeら、Gene 10 : 157 (1980) ; およびClarkeら、Methods Enzymol. 101 : 300 (1983) を参照のこと) を用いるベクターを使用することができる。酵母のベクターのためのコントロール配列は、グリコール分解酵母の合成のためのプロモーターを包含する (Hessら、J. Adv. Enzyme Reg. 7 : 149 (1968) ; Hollandら、Biochemistry. 17 : 4900 (1978)) 。 40

【0070】

この分野において知られている追加のプロモーターは、CDM8ベクターの中に提供されたCMV プロモーター (Toyamaおよび Okayama, FEBS 268 : 217-221 (1990) ; 3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター (Hitzemanら、J. Biol. Chem. 255 : 2073))、および他のグリコール分解酵素のためのプロモーターを包含する。 50

【0071】

増殖条件によりコントロールされる転写の追加の利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素の代謝に関連する分解酵素、およびマルトースおよびガラクトースの利用に関係する酵素のためのプロモーター領域である。また、ターミネーター配列はコーディング配列の3'末端において望ましいと信じられる。このようなターミネーターは、酵母誘導化遺伝子の次の3'-非翻訳領域の中に見いだされる。

【0072】

あるいは、原核生物の細胞を発現のための宿主として使用することができる。原核生物の細胞は、大腸菌(E. coli)の種々の株により最も頻繁に発現される；しかしながら、他の微生物の菌株も使用できる。ここにおいて転写開始のためのプロモーターを、必要に応じてオペレーターとともに含むと定義される、普通に使用される原核生物のコントロール配列は、リボソーム結合部位の配列と一緒に、ベクターラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)およびラクトース(lac)プロモーター系(Chang ら、Nature 198 : 1056 (1977))、トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddel ら、核酸の研究(Nucleic Acids Res.) 8 : 4057 (1980))およびラムダ誘導化P₁プロモーターおよびN-遺伝子リボソーム結合部位(Shimatake ら、Nature 292 : 128 (1981))のような普通に使用されているプロモーターを包含する。

【0073】

CD28IgおよびCTLA4 Igタンパク質、および融合ハイブリッドタンパク質、例えば、CD28Ig/CTLA4 Igを後述するように種々の系の中で発現することができる。cDNAを適当な制限酵素で切り出し、そしてこのような発現について適当な原核生物または真核生物の発現ベクターの中に結合することができる。CD28およびCTLA4レセプターのタンパク質は天然に2量体として存在するので、これらのタンパク質の首尾よい発現はこれらのタンパク質を2量体として形成することを可能とする発現系を必要とすると信じられる。

【0074】

これらのタンパク質の切頭バージョン(すなわち、タンパク質のトランスメンブレン領域より上流の位置において配列の中に停止コドンを導入することによって形成される)は発現されると思われる。CD28およびCTLA4レセプターの融合タンパク質としての発現は、これらのタンパク質の2量体の形成を可能とする。こうして、CTLA4タンパク質の融合生産物としての発現は、本発明において好ましい。

チャイニーズハムスター卵巣細胞系CTLA4 Ig-24と表示する本発明の安定なCHO系はCTLA4 Igの発現のために好ましく、そしてブダベスト条約の規定に従いATCCに1991年5月31日に受託され、そしてATCC受け入れ番号10762を与えられた。

【0075】

本発明のCTLA4レセプターの発現は、細胞系、例えば、COS細胞をトランスフェクションし、そしてCTLA4トランスフェクションした細胞をCTLA4レセプターに結合することによって、例えば、細胞のB7Ig融合タンパク質への結合について経験することによって、発現を検出して達成される。

生ずる構成体の配列は、既知の手順、例えば、Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5463 (1977)に記載されている、さらにMessing ら、Nucleic Acids Res. 9 : 309 (1981)に記載されている手順を使用するDNAの配列決定によるか、あるいはMaxam ら、Methods Enzymol. 65 : 499 (1980)の方法により確証される。

【0076】

タンパク質生産物の回収

前述したように、CD28およびCTLA4レセプターの遺伝子は、切頭タンパク質をエンコードするDNAの直接の発現を使用して成熟タンパク質として容易に発現されない。ホモ2量体の形成を可能とするために、CD28およびCTLA4の細胞外ドメインに相当し、そしてシグナル配列、例えば、適当なプロセッシングを行うことができる細胞中のオンコスタチンMの配列のためのコドンを含むアミノ酸配列をエンコードするDNAを、天然に2量体のタンパ

10

20

30

40

50

ク質のFcドメインに相当するアミノ酸配列をエンコードするDNA と融合する。

【0077】

こうして、細胞から分泌された後のこれらの融合タンパク質の生産物の精製は、融合タンパク質の免疫グロブリン部分と反応性の抗体を使用して促進される。融合タンパク質の生産物は、培地の中に分泌されると、タンパク質の標準的精製技術、例えば、プロテインAカラムへの適用により回収される。

【0078】

使 用

CTLA4 Ig融合タンパク質および／またはその融合タンパク質の断片を使用してB7陽性細胞、例えば、B細胞と反応させて、B7抗原陽性細胞とのT細胞の相互作用により仲介される免疫応答を調節することができる。

10

【0079】

CTLA4 Ig融合タンパク質およびCTLA4 Ig／CD28Igハイブリッドタンパク質、および／またはこれらのタンパク質の断片および誘導体を、また、使用して、B7陽性細胞、例えば、B細胞と反応させて、T細胞依存性B細胞の応答により仲介される免疫応答を調節することができる。用語「断片」は、ここにおいて使用するとき、「CTLA4」と呼ぶタンパク質をエンコードするアミノ酸配列の部分を意味する。使用できるCTLA4 Ig融合のタンパク質の断片は、ここに記載するCTLA4 Ig融合タンパク質を得るために使用するCTLA4 レセプターに相当するアミノ酸配列のある部分に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

20

【0080】

活性化されたB細胞および他の系統の細胞上で発現されたB7抗原、およびT細胞上で発現されたCD28レセプターを互いに直接結合することができ、そしてこの相互作用は細胞－細胞の相互作用を仲介することができる。このような相互作用は、T細胞の増殖、および免疫グロブリン生産細胞へのB細胞の分化に導く、T細胞の中のCD28活性化経路を直接トリガーする。

【0081】

起こるB細胞の活性化は、B7抗原の発現を増加し、さらにCD28を刺激して、慢性の炎症の状態、例えば、自己免疫疾病、異種移植の拒絶、移植片対宿主の疾患または慢性のアレルギー反応に導くことがある。この反応をブロックまたは阻止することは、T細胞のサイトカインの調製を防止し、こうして炎症反応を防止または逆転するとき有効であることがある。

30

【0082】

CTLA4 Igは、ここにおいて、T細胞およびB細胞の相互作用を必要とするin vitroリンパ球機能の効力のあるインヒビターであることが示された。これはB7抗原およびその対レセプター、CTLA4 および／またはCD28の間の相互作用の重要性を示す。ネズミおよびヒトのCTLA4 の細胞質ドメインは類似し (Dariavach ら、前掲、1988)、この領域が重要な機能的性質を有することを示唆する。また、CD28およびCTLA4 の細胞質ドメインは相同性を共有する。

【0083】

CTLA4 は、抗BB1 または抗CD28モノクローナル抗体よりも、いっそう効力のあるリンパ球の応答のin vitroインヒビターである。CTLA4 Igは、その阻止作用と反作用するT細胞の増殖に対する直接の刺激作用をもたない。したがって、CTLA4 Ig融合タンパク質は抗CD28モノクローナル抗体よりもすぐれたin vivo インヒビターとして働くことができる。CTLA4 Igのin vitro免疫抑制作用は、異常なT細胞の活性化またはIgの生産を包含する自己免疫疾患の処置の治療におけるその使用を示唆する。

40

【0084】

CTLA4 Ig融合タンパク質は、in vivo 阻止性質を示すことが期待された。こうして、CTLA4 Igは、同様なin vivo 条件下に抗CD28抗体について観察される作用に類似する方法で、T細胞を阻止する作用をすることが期待される。T細胞／B細胞の相互作用がT細胞とB

50

細胞との間の接触の結果として起こる条件下に、B7抗原陽性細胞、例えば、B細胞と反応させるために導入されたCTLA 4 Igの結合は、T細胞／B細胞の相互作用を妨害、すなわち、阻止して免疫応答の調節を生ずることができる。この独占的な阻止作用のために、CTLA 4 Igは生体内でT細胞の活性のインヒビターとして、非特異的インヒビター、例えば、シクロスポリンまたはグルコステロイドよりも有用であることが期待される。

【0085】

1つの態様において、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはCTLA 4 Ig／CD28Igハイブリッドタンパク質は、適当な製剤学的担体と組み合わせてin vivo 導入する、すなわち、病理学的状態、例えば、免疫系の疾患または癌の処置のためにヒトの投与することができる。

融合タンパク質のin vivo 導入は、T細胞と他の細胞、例えば、B細胞との相互作用を、B7陽性細胞へのリガンドの結合の結果として、妨害することが期待される。正常のT細胞の相互作用の防止は、T細胞の活性を減少し、例えば、T細胞の増殖を減少することができる。

10

【0086】

さらに、融合タンパク質のin vivo 投与はサイトカインのin vivo レベルの調節して被検体において所望の作用を促進することが期待され、ここでサイトカインは次のものを包含するが、これらに限定されない：インターロイキン、例えば、インターロイキン（「IL」）-2，IL-3，IL-4，IL-6，IL-8，成長因子、例えば、腫瘍成長因子（「TFG」）、コロニー刺激因子（「CSF」）、インターフェロン（「IFN」）および腫瘍壊死因子（「TNF」）。

20

【0087】

例えば、融合タンパク質をin vivo 導入するとき、それは悪性の増殖、例えば、腫瘍細胞の増殖に寄与するサイトカインの生産をブロックすることができる。融合タンパク質は、また、T細胞の活性化に依存するウイルス、例えば、エイズを引き起こすウイルス、HTLV 1の増殖をブロックすることができる。

【0088】

ある環境下に、前述したように、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはその断片のin vivo 投与の作用は阻止であり、T細胞／B細胞の接触から生ずるCTLA 4およびCD28のトリガーの融合タンパク質によるブロッキングから生ずる。例えば、CTLA 4 Igタンパク質はT細胞の増殖をブロックすることができる。こうして、CTLA 4 Ig融合タンパク質のin vivo 導入は、T細胞およびB細胞の両者が仲介する免疫応答に対する作用を生成するであろう。また、融合タンパク質をサイトカインまたは他の治療用試薬の導入と組み合わせて被検体に投与することができる。

30

【0089】

本発明の追加の態様において、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはCTLA 4 レセプターと反応性の誘導体を包含する他の試薬を使用してT細胞の相互作用を調節する。例えば、CTLA 4 レセプターと反応性の抗体および／または抗体断片をスクリーニングして、B7抗原へのCTLA 4 Ig融合タンパク質の広いスペクトルのを阻止することができるものを同定することができる。次いで、抗体または抗体断片、例えば、Fab またはF(ab')₂断片を使用して、例えば、T細胞と反応させてT細胞の増殖を阻止することができる。

40

【0090】

CTLA 4 レセプターと反応性のモノクローナル抗体は、既知の手順、例えば、KohlerおよびMilstein (KohlerおよびMilstein, *Nature*, 256 : 495-97 (1975))により導入された手順、およびその変更により生成して、細胞の相互作用を調節することができる。

これらの技術は、特定の抗体を生産するようにプライミングした動物の使用を包含する。動物は免疫原（例えば、B7Ig融合タンパク質、CTLA 4 Ig融合タンパク質またはCD28Ig／CTLA 4 Igハイブリッド融合タンパク質）の注入によりプライミングして、所望の免疫応答、すなわち、プライミングされた動物からの抗体の生産を引き出すことができる。また、プライミングされた動物は疾患を発現する動物である。

【0091】

50

プライミングされた病気の動物のリンパ節、脾臓または末梢血液から誘導化されたリンパ球を使用して、特定の抗体を探索することができる。所望の免疫グロブリンをエンコードするリンパ球の染色体を、一般に融合剤、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) の存在下に、リンパ球を骨髄腫細胞と融合することによって、永久分裂能化する。ある数の骨髄腫細胞系、例えば、P3-NS1 / 1-Ag4-1, P3-x63-Ag8, 653, Sp2/O-Ag14、またはHLI-653 骨髄腫系統の任意のものを、標準的技術に従い、融合相手として使用することができる。これらの骨髄腫系統はATCC (米国マリイランド州ロックビレ) から入手可能である。

【0092】

次いで、所望のハイブリドーマを包含する生ずる細胞を選択培地、例えば、HAT 培地の中で成長させ、ここで未融合の親の骨髄腫またはリンパ球の細胞は究極的に死亡する。ハイブリドーマ細胞のみは生き残り、そして制限希釈の条件下に成長して単離されたクローンを得ることができる。ハイブリドーマの上澄み液を、例えば、免疫化に使用したCTLA4 Igタンパク質を使用するイムノアッセイ技術により、所望の選択性の存在についてスクリーニングする。次いで、陽性のクローンを制限希釈の条件下にサブクローニングし、そして生成したモノクローナル抗体を単離することができる。

10

【0093】

モノクローナル抗体の単離および精製の種々の普通の方法を使用して、他のタンパク質および汚染物質を含有しない抗体を得ることができる。モノクローナル抗体を精製する普通に使用されている方法は、硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、およびアフィニティクロマトグラフィーを包含する (Zolaら、Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications, Hurell 編、p. 51-52 (CRC Press, 1982 を参照のこと))。

20

【0094】

これらの方法に従い生産されたハイブリドーマは、この分野において知られている技術を使用してin vitroまたはin vivo (腹水の中で) 増殖することができる (一般に、Finkら、Prog. Clin. Pathol., 9: 121-33 (1984), Fig. 6-1, p. 123 を参照のこと)。

一般に、個々の細胞系を、例えば、実験室用容器の中でin vivo 増殖させ、そして高い濃度の単一の特定のモノクローナル抗体を含有する培地をデカンテーション、濾過または遠心により収穫することができる。

30

【0095】

さらに、CTLA4 レセプターの細胞外ドメインと反応性の活性結合領域を含有するこれらの抗体の断片、例えば、Fab, F(ab')₂ およびFv断片を生成することができる。このような断片は、この分野においてよく確立された技術を使用して生成することができる (例えば、Rousseaux ら、Methods Enzymol. 121: 663-69, Academic Press (1986)を参照のこと)。

【0096】

前述したようにして調製した抗B7モノクローナル抗体を使用してB7抗原に結合させて、CD28陽性またはCTLA4 陽性のT細胞とB7陽性細胞との相互作用を阻止することができる。抗CTLA4モノクローナル抗体を使用してCTLA4 レセプターと結合させて、CTLA4 陽性T細胞と他の細胞との相互作用を阻止することができる。他の態様において、CTLA4 Ig融合タンパク質を使用して、CTLA4 とB7抗原との間の相互作用を調節できる追加の化合物を同定することができる。このような化合物は、B細胞および／またはT細胞と反応させるために使用できる天然に見いだされる小さい分子を包含することができる。

40

【0097】

例えば、発酵プロセスをCTLA4 / B7の相互作用を阻止する能力について試験することができる。さらに、前述のCTLA4 Ig融合タンパク質の誘導体を使用してT細胞の増殖を調節することができる。例えば、断片または誘導体を使用して、異種移植の骨髄の移植に伴う移植片対宿主 (GVH) の疾患におけるT細胞の増殖をブロックすることができる。

【0098】

50

CD28仲介T細胞増殖経路は、CD3／T細胞のレセプター複合体により与えられる増殖（Juneら、1987、前掲）と対照的に、シクロスポリン耐性である。シクロスポリンはGVH疾患のための処置として比較的無効である（Storb, Blood 68 : 119-125 (1986)）。GVH疾患は、CD28抗原を発現するTリンパ球により仲介されると考えられる（Storb およびThomas, Immunol. Rev. 88 : 215-238 (1985)）。こうして、CTLA4 Ig融合タンパク質は、単独で、あるいは免疫抑制剤、例えば、シクロスポリンと組み合わせて、GVH疾患におけるT細胞の増殖のブロックに有用であることができる。

【0099】

こうして、B細胞を包含するB7陽性細胞とのCTLA4陽性T細胞の相互作用の本発明の方法による調節を使用して、病理学的状態、例えば、自己免疫性、移植、感染症および新形成を処置することができる。

10

ここで記述されているCTLA4結合分子及びIL4結合分子は、溶液又は懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、座薬、重合体マイクロカプセル又は微小囊、リポソーム及び注射液又は輸液を含むもののこれらに限定されるわけではないさまざまな用量決定形態をしていてよい。好ましい形態は、投与様式及び治療的利用分野によって異なる。

【0100】

本発明に基づく分子のための最も効果的な投与様式及び用量決定方法は、疾病の重症度及び経過、患者の健康状態及び治療に対する応答性ならびに担当医の判断によって左右される。従って、分子の服用量は、個々の患者に対し滴定されなくてはならない。

表面積1m²あたりのmg数に基づくさまざまなサイズ及び種の動物及び人間に対する服用量の相互関係は、Freireich, E. J et al.によって記述されている（マウス、ラット、ハムスター、イヌ、サル及びヒトにおける抗ガン剤の毒性の定量比較、Cancer Chemother, Rep., 50, No.4, 219-244, 1966年5月）。

20

【0101】

成長阻害応答を最適化するため、用量決定方法を調製することが可能である。用量は、分割して毎日投与することもできるし、又状況に比例して用量を減少することもできる。例えば、いくつかの分割用量を毎日投与することもできるし、或いは又特定の治療状況によって指示される通りに比例して減少させることもできる。

【0102】

本発明の実施例に従うと、患者を治療するための有効量は、患者の体重1kgあたり約0.1～約10mgでありうる。同様に、有効量は、患者の体重1kgにつき約1mg～約10mgの量でもありうる。

30

発明の利点：本発明は、組織又は器官の移植片の拒絶を防止することに向けられた現行の療法に付随する問題を克服する。現行の療法とは対照的に、本発明はB7相互作用により媒介される免疫応答のみに影響を及ぼす。

【0103】

例えば、本発明は、移植片抗原特異T細胞に影響を及ぼし、かくしてドナー特異的及び抗原特異的寛容を誘導する。T細胞レセプター嵌入中のCD28のそのリガンドB7／BB1（B7）による結合は、いくつかの系内での適切なT細胞シグナル付与にとって重大なことである（M. K. Jenkins, P. S. Taylor, S. D. Norton, K. B. Urdahl, J. Immunol. 147 : 2461 (1991) ; C. H. June, J. A. Ledbetter, P. S. Linsley, C. B. Thompson, Immunol. Today 11 : 211 (1990) ; H. Reiser, G. J. Freeman, Z. Razi-Wolf, C. D. Gimmi, B. Bencerraf, L. M. Nadler, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 : 271 (1992) ; N. K. Damsky, K. Klussman, P. S. Linsley, A. Aruffo, J. Immunol. 148 : 1985 (1992)）。

40

【0104】

CD28とそのリガンドの相互作用が遮断されると、抗原特異T細胞は、不適切に抗原特異T細胞アネルギー状態に誘導される（M. K. Jenkins, P. S. Taylor, S. D. Norton, K. B. Urdahl, J. Immunol. 147 : 2461 (1991) ; F. A. Harding, J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, J. P. Allison, Nature 356 : 607 (1992)）。

【0105】

50

CTLA4 Ig融合タンパク質は、(CD28に比べ20倍大きい親和力をもつ) ヒト及びマウスB7の両方に結合し、B7に対するCD28の結合を遮断し、T細胞活性化を阻害し、インビトロでのT細胞不応答を誘導する (F. A. Harding, J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, J. P. Allison, *Nature* 356 : 607 (1992); P. S. Linsley et al., *J. Exp. Med.* 174 : 561 (1991)。

【0106】

その上、本発明は、それまで発現されなかったCTLA遺伝子の可溶性タンパク質産物の発現を得るため、又T細胞の機能的応答に関与するCTLA4のための天然リガンドを同定するために役立つ。このとき、可溶性タンパク質産物は、病理状態を治療するべくインビボでT細胞応答を調節するのに使用することができる。

10

次の実施例によって、本発明をさらに説明しかつ当業者による本発明の実施および使用を助ける。これらの実施例は本発明を限定しない。

【0107】

例 1. B7Ig及びCD28Ig融合タンパク質の調製

レセプター-免疫グロブリンC γ (IgC γ) 融合タンパク質B7Ig及びCD28Igを、本発明において引用により組込まれる、Linsley など., *J. Exp. Med.* 173 : 721 ~ 730 (1991)により記載されているようにして調製した。簡単に言えば、それぞれのレセプタータンパク質 (たとえばB7) に対応するアミノ酸配列をコードするDNA を、ヒトIgC γ 1のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応するアミノ酸配列をコードするDNA に連結した。これは次のようにして達成される。

20

【0108】

ポリメラーゼ鎖反応 (PCR)

PCR のために、DNA フラグメントを、個々の融合タンパク質について下記のようにしてプライマー対を用いて増幅した。PCR 反応 (0.1 mlの最終体積) を、Tag ポリメラーゼ緩衝液 (Stratagene, La Jolla, CA) において行ない、ここで前記緩衝液は、個々のdNTP20 μ モル; 前記に示されたプライマー50~100 p モル; 鋳型 (引用により本明細書において組込まれる、Kauasaki, PCR Protocols, Academic Press, 21 ~ 27ページ (1990) により記載されるようにして、ランダムヘキサマープライマーを用いて合計 $\leq 1 \mu$ g のRNA から合成されたプラスミド又はcDNA1 ng) ; 及びTag ポリメラーゼ (Stratagene) を含んだ。反応は、16~30回のサイクル (典型的なサイクルは、94°Cで1分、50°Cで1~2分及び72°Cで1~3分の段階から成る) のためにサーモサイクラー (Perkin Elmer Corp. Norwalk, CT) 上で行なわれた。

30

【0109】

プラスミドの構成

Aruffo and Seed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 8573 (1987)により記載されるような、CD28をコードするcDNAを含む発現プラスミドが、Drs. Aruffo and Seed (Mass General Hospital Boston, MA) により供給された。Aruffo, *Cell* 61 : 1303 (1990)により記載されるような、CD5をコードするcDNAを含むプラスミドがDr. Aruffoにより供給された。Freeman など., *J. Immunol.* 143 : 2714(1989)により記載されるような、B7をコードするcDNAを含むプラスミドは、Dr. Freeman (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) により供給された。

40

【0110】

CD28及びB7の可溶性形の発現での初期試みのために、構成体をLinsley など., *J. Exp. Med.*, 前記により記載されているようにして製造し (OMCD28及びOMB7)、ここで停止コドンがトランスメンブランドメインの上流に導入され、そして生来のシグナルペプチドがオンコスタチンM (oncostatin M) (Malik など., *Mol. Cell Biol.* 9 : 2847 (1989)) からのシグナルペプチドにより置換された。それらは、再構成のための合成オリゴヌクレオチド (OMCD28) を用いて又はPCR のためのプライマー (OMB7) として製造された。

【0111】

OMCD28は、シグナルペプチドをオンコスタチンMからの類似領域により置換することに

50

よってより効果的な発現のために変性されたCD28 cDNA である。CD28Ig及びB7Ig融合構成体を2つに分けて製造した。5'部分を、鋳型として0MCD28及びOMB7及び前方プライマーとしてオリゴヌクレオチド、CTAGCCACTGAAGCTTCACCATGGGTGTACTGCTCACAC（配列番号1）（オンコスタチンMシグナルペプチドに対応するアミノ酸配列をコードする）及び逆方向プライマーとしてTGGCATGGGCTCCTGATCAGGCTTAGAAGGTCCGGGAAA（配列番号2）又は、TTGGGCTCCTGATCAGGAAAATGCTCTTGCTTGTTGT（配列番号3）のいずれかをそれぞれ用いて製造した。

【0112】

PCR 反応の生成物を、PCR プライマーに導入される部位として制限エンドヌクレアーゼ（HindIII 及びBcl I）により切断し、そしてゲル精製した。

10

ヒトIgC γ 1配列に対応する融合構成体の3'部分を、鋳型として、ヒトーマウスキメラmAB L6を生成する骨髓細胞系（Dr. P. Fell and M. Gayle, Bristol-Myers Squibb Company, Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WAにより供給される）からのRNAを用いて、連結された逆転写酵素（トリ骨髓芽症ウィルスからの；Life Sciences Associates, Bayport, NY)-PCR反応により製造した。

【0113】

オリゴペプチド、すなわち

AAGCAAGAGCATTTTCCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAATCAGACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTG（配列番号4）を前方プライマー及びCTTCGACCAGTCTAGAAGCATCCTCGTGCACCGCGAGAGC（配列番号5）を逆方向プライマーとして使用した。反応生成物をBal I 及びXba I により切断し、そしてゲル精製した。

20

【0114】

最終生成物を、IgC γ 1配列を含む、Bcl I/Xba I 切断されたフラグメントと共に、CD28又はB7配列を含む、HindIII/Bcl I 切断されたフラグメントを、HindIII/Xba I 切断されたCD28中に連結することによってアセンブリーした。連結生成物を用いてMC1061/p3 E. コリ細胞を形質転換し、そしてコロニーを適切なプラスミドのためにスクリーンした。得られた構成体の配列を、DNA 配列決定により確認した。

【0115】

B7をコードする構成体は、B7の細胞外ドメインの約1位～約215位のアミノ酸残基に対応するアミノ酸をコードするDNを含んだ。CD28をコードする構成体は、CD28の細胞外ドメインの約1位～約134位のアミノ酸残基に対応するアミノ酸をコードするDNAを含んだ。

30

CD5 Igを、前方プライマーとして

CATTGCACAGTCAAGCTTCCATGCCCATGGGTTCTCTGGCCACCTTG（配列番号6）及び逆方向プライマーとしてATCCACAGTGCAGTGATCATTTGGATCCTGGCATGTGAC（配列番号7）を用いて、同じ態様で構成した。PCR 生成物を制限エンドヌクレアーゼ消化し、そして上記のようにしてIgC γ 1フラグメントにより連結した。

【0116】

得られた構成体（CD5 Ig）は、CD5に対応する配列の1位～347位のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有する成熟タンパク質、前記構成工程により導入された2つのアミノ酸（アミノ酸DQ）、次にIgC γ 1領域に対応するアミノ酸をコードするDNAをコードした。

40

【0117】

細胞培養及びトランスフェクション

COS(モンキー腎細胞)を、引用により本発明に組込まれる、Seed and Aruffo (Proc. Natl. Acad. Sci. 84 : 3365 (1987))の方法の変法を用いて、CD28及びB7を発現する発現プラスミドによりトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクトする18～24時間前、10 cmの直径の培養皿当たり 10^6 個で接種した。

【0118】

プラスミドDNAを、0.1 mMのクロロキン (cloroquine) 及び600 μ g/mlのDEAE Dextranを含む血清フリーDMEM 5 mlに添加し（約15 μ g/皿）、そして細胞を37°Cで3～3.5時間インキュベートした。次に、トランスフェクトされた細胞をすぐに、PBS 中、10%ジメチ

50

ルスルホキシドにより処理し（約2分）、そして10%FCSを含むDMEMにおいて37℃で16～24時間インキュベートした。トランスフェクションの24時間後、培養培地を除去し、そして血清フリーDMEMにより変換した（6 ml/皿）。インキュベーションを37℃で3時間続け、この時点で、古い培地を集め、そして新鮮な血清フリー培地を添加した。37℃でさらに3日後、古い培地を再び集め、そして細胞を捨てた。

【0119】

CD28, CD5又はB7を発現するCHO細胞を、次の通りに、Linsleyなど., (1991) 前記により記載されるようにして単離した：簡単に言及すれば、CD28, CD5又はB7を発現する安定したトランスフェクタントを、適切な発現プラスミド及び選択マーカー、pSV2dhfr (Linsleyなど., Proc. Natl., Acad. Sci. USA 87 : 5031 (1990))の混合物によるジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣 (dhfr⁻ CHO)細胞の同時トランスフェクションの後、次に、形質転換体を、1 μMの最終レベルまでメトトレキヤートの徐々に高まる濃度で増殖させ、そして10%ウシ胎児血清 (FBS)、0.2 mMのプロリン及び1 μMのメトトレキヤートにより補充されたDMEMに維持した。

10

【0120】

高レベルのCD28 (CD28⁺ CHO)又はB7 (B7⁺ CHO)を発現するCHO系を、mAbs9.3又はBB-1による間接的な免疫染色に従って、複数回の蛍光活性化細胞ソーティング (FACS (R))により単離した。CD28又はB7の表面発現のために陰性の増幅されたCHO細胞をまた、CD28-トランスフェクトされた集団からFACS (R)により単離した。

20

【0121】

免疫染色及びFACS (R) 分析

トランスフェクトされたCHO又はCOS細胞又は活性化されたT細胞を、間接的免疫染色法により分析した。染色の前、CHO細胞を、10mMのEDTAを含むPBSにおけるインキュベーションによりそれらの培養器から除去した。細胞をまず、ネズミmAbs9.3 (Hansenなど., Immunogenetics 10 : 247 (1980))又はBB-1 (Yokochiなど., J. Immunol. 128 : 823 (1981))と共に、又はIg融合タンパク質 (10%のFCSを含むDMEMにおいて10 μg/mlで)と共に4℃で1～2時間インキュベートした。

【0122】

次に細胞を洗浄し、そしてさらに0.5～2時間、4℃で、FITC-接合の第2段階試薬 (ネズミmAbsのためにヤギ抗マウスIg血清又は融合タンパク質のためにヤギ抗ヒトIgG γ血清 (Tago, Inc., Burlingame, CA))と共にインキュベートした。蛍光を、40対数増幅器 (four decade logarithmic amplifier)を備えたFACS IV(R)細胞ソーター (Becton Dickinson and Co., Mountain View, CA)上で分析した。

30

【0123】

Ig融合タンパク質の精製

トランスフェクトされたCOS細胞からの古い血清フリー培養培地の第1, 第2及び第3回収集物を、Ig融合タンパク質の精製のための源として使用した。高速遠心分離により細胞残骸物を除去した後、培地を、0.05Mのクエン酸ナトリウム溶液 (pH8.0)により平衡化された、固定されたプロテインA (Repligen Corp., Cambridge, MA)のカラム (約200～400 mlの培地/ml充填層体積)に適用した。

40

【0124】

その培地の適用の後、カラムを1 μのリン酸カリウム溶液 (pH8)により洗浄し、そして結合されたタンパク質を0.05Mのクエン酸ナトリウム溶液 (pH3)により溶出した。画分を集め、そしてすぐに、2Mのトリス (pH8) 1/10体積の添加により中和した。A₂₈₀吸収材料のピークを含む画分をプールし、そして使用の前、PBSに対して透析した。それぞれCD28Ig及びB7Igのための吸光係数は、既知の吸光度の溶液のアミノ酸分析により2.4及び2.8 nl/mgであった。精製されたCD28Ig及びB7Ig結合活性の回収率は、B7⁺ 及びCD28⁺ CHO細胞の間接的な蛍光染色の後、FACS (R) 分析により判断される場合、ほぼ定量的であった。

【0125】

50

例 2. CTLA 4 Ig融合タンパク質の調製

CTLA 4 の細胞外ドメインと IgC γ 1 ドメインとの間に CTLA 4 Ig をコードする可溶性遺伝子融合体を、CD28Ig 構成体についての上記方法に類似する方法で構成した。CTLA 4 遺伝子の細胞外ドメインを、公開された配列 (Dariarach など., Eur. Jour. Immunol. 18 : 1901 ~ 1905 (1988)) に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR によりクローン化した。CTLA 4 のためのシグナルペプチドは CTLA 4 遺伝子において同定されていないので、CTLA 4 の示された配列の N-末端を、オーバーラップオリゴヌクレオチドを用いて 2 段階で、オンコスタチン M (Melik など., Mol. and Cell. Biol. 9 : 2847 (1989)) のシグナルペプチドに融合せしめた。

【0126】

第 1 段階に関しては、オリゴヌクレオチド、CTCAGTCTGGTCCTTGCACCTCTGTTTCCAAGCATGGCGA GCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCC (配列番号 8) (CTLA 4 の N 末端側の 7 個のアミノ酸に融合されるコンスタチン M シグナルペプチドからの C 末端側の 15 個のアミノ酸をコードする) を、前方プライマーとして、及び TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (配列番号 9) (Bcl I 制限酵素部位を含み、そして CTLA 4 レセプターをコードするアミノ酸配列のアミノ酸残基 119 ~ 125 をコードする) を逆方向プライマーとして使用した。

【0127】

この段階のための鋳型は、H38 細胞 (Drs. Salahudin and Gallo, NCI, Bethesda, MD により供給される HTLVII 感染性 T 細胞白血球細胞系) からの合計 1 μ g の RNA から合成された cDNA であった。第 1 段階からの PCR 生成物の一部を、オンコスタチン M シグナルペプチドの N 末端部分をコードし、そして HindIII 制限エンドヌクレアーゼ部位を含むオーバーラップ前方プライマー、CTAGCCACTGAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAG TCTGGTCCTTGCACCTC (配列番号 10) 及び同じ逆方向プライマーを用いて再増幅した。

【0128】

PCR 反応の生成物を HindIII 及び Bcl I により消化し、そして Bcl I / Xba I により切断された、IgC γ 1 のヒンジ、CH2 および CH3 領域に対応するアミノ酸配列をコードする cDNA フラグメントと共に、HindIII / Xba I 切断された発現ベクター、CDM8 又は HindIII / Xba I 切断された発現ベクター、 π LN (Dr. Aruffo により供給される) 中に連結した。

【0129】

得られた CTLA 4 Ig 融合構成体の地図は図 1 に示される。その図に示される配列は、CTLA 4 (上方の文字、黒くない部分) とコンスタチン M のシグナルペプチド SP (黒い部分) 及び IgC γ 1 のヒンジ H (点描模様の部分) との間の連結を示す。括弧内のアミノ酸は、構成の間に導入された。星印 (★) は、IgC γ ヒンジ領域に導入されたシステイン ~ セリン変異を示す。CTLA 4 に存在する免疫グロブリンスーパーファミリー V-株ドメインは、IgC γ 1 の CH2 及び CH3 ドメインであるように示される。

【0130】

次に、CTLA 4 Ig を含む発現プラスミド、CDM8 を、Seed and Aruffo, 1987, 前記により記載される方法の変法 (Linsley など., 1991, 前記) により、DEAE / テキストラントランスフェクションを用いて COS 細胞中にトランスフェクトした。

CTLA 4 Ig のアミノ酸配列をコードする cDNA を含む発現プラスミド構成体 (π LN 又は CDM8) を、標準方法を用いてのリポフェクションにより dhfr⁻ CHO 系中にトランスフェクトし、CTLA 4 Ig を安定して発現する新規細胞系を得た。

【0131】

CTLA 4 Ig に対応するアミノ酸配列をコードする DNA は、1991 年 5 月 31 日、ブタペスト条約に基づいて ATCC に寄託され、そして ATCC 受託番号 68629 を得た。

チャイニーズハムスター卵巣細胞系 CTLA 4 Ig-24 と称する、CTLA 4 Ig を発現する好ましい安定性のトランスフェクタントを、免疫染色法を用いて、培地における B7 結合活性について B7 陽性 CHO 細胞系をスクリーンすることによって製造した。トランスフェクタントは、10% ウシ胎児血清 (FBS)、0.2 mM のプロリン及び 1 μ M のメトトレキヤートにより補充された DMEM に維持された。

10

20

30

40

50

【0132】

CTLA 4 Ig-24CHO 細胞系は、1991年 5 月31日、ブタペスト条約に基づいてATCCに寄託され、そしてATCC受託番号10762 を得た。

CTLA 4 Igを、血清フリーに条件付けられた上清液からプロテインAクロマトグラフィー処理により精製した(図2)。CTLA 4 Igの濃度を、280 nmで1.6 の吸光係数(既知の吸光度の溶液のアミノ酸分析により実験的に決定された)を仮定して、決定した。CTLA 4 Igのサンプル(1 μ g)(レーン2及び4)及び分子量標準(レーン1及び3、図2)を、非還元条件(- β ME、レーン1及び2)又は還元条件(+ β ME、レーン3及び4)下でSDS-PAGE(4~12%のアクリルアミドグラジエント)にゆだねた。タンパク質は、クーマシーブルーリアンドブルーによる染色により可視化された。

10

【0133】

非還元条件下で、CTLA 4 IgはMrが約100,000 である種として移動し、そして還元条件下でそれは、Mrが約50,000である種として移動した(図2)。IgC γ ヒンジのジスルフィドが構成の間に排除されたので、CD28IgのようなCTLA 4 Igは、生来のジスルフィド結合を通してたぶん連結されたダイマーである。

【0134】

例 3. CTLA 4 レセプター

十分な長さのヒトCTLA 4 遺伝子に対応するアミノ酸をコードするDNA を再構成するために、CTLA 4 のトランスメンブラン及び細胞質ドメインのフラグメントに対応するアミノ酸をコードするcDNAを、PCR によりクローン化し、そして次に、CTLA 4 のN-末端に融合されるオンコスタチンMシグナルペプチドに対応する、CTLA 4 Igからのフラグメントに対応するアミノ酸をコードするcDNAにより連結した。PCR のための方法、及び細胞培養及びトランスフェクションは、COS 細胞及びDEAE-デキストラン トランスフェクションを用いて、例1に記載されている通りであった。

20

【0135】

ヒトリンパ球細胞におけるCTLA 4 レセプタータンパク質の発現はこれまで報告されていないので、CTLA 4 mRNAの源を示す必要はなかった。上記に示されるような、H38 細胞の全体の細胞RNA から逆転写されるPCR cDNAを、PCR によるクローニングのために使用した。この目的のためには、オリゴヌクレオチド、GCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTAGTG (配列番号11)(推定されるコード配列に初めの11個のアミノ酸をコードする)を、前方プライマーとして及び逆方向プライマーとして、TGATGTAACATGTCTAGATCAATTGATGGGAATAAAATAAGGCTG (配列番号12) CTLA 4 における最後の8個のアミノ酸に相同であり、且つXba I 部位を含む)を使用した。

30

【0136】

鋳型は再び、H38 細胞からの1 μ gのRNA から合成されたcDNAであった。PCR 反応の生成物を制限エンドヌクレアーゼNco I 及びXba I により切断し、そして得られた316 bpの生成物をゲル精製した。上記CTLA Ig融合からの340 bpのHindIII /Nco I フラグメントをまたゲル精製し、そして両制限フラグメントを、HindIII /Xba I 切断されたCDM8中に連結し、OMCTLAを形成した。

【0137】

得られる構成体は、完全な長さのCTLA 4 (配列番号13及び14) 及びオンコスタチンMシグナルペプチドに対応した。その構成体は図3に示され、そしてOMCTLA 4 と称した。図3に示されるCTLA 4 のための配列は、示されるアミノ酸配列のアミノ酸位置111 でのこれまで達告されたアラニンがトレオニンをコードするような塩基変化により、推定されるヒトCTLA 4 DNA 配列(Dariavach など、前記)とは異なる。このトレオニンは、融合タンパク質の好結果をもたらす発現のために重要である、新しく同定されたN-連結グリコシル化部位の一部である。

40

【0138】

連結生成物を用いて、MC1061/p3 E. コリ細胞を形質転換し、そしてコロニーを適切なプラスミドについてスクリーンした。得られる構成体の配列を、DNA 配列分析により確か

50

めた。

【0139】

例 4. CTLA 4 Igの特徴化

CTLA 4 Ig構成体を特徴づけるために、いくつかの単離体、CD28Ig, B7Ig及びCD 5 Igを上記のようにして調製し、そして例 2 及び 3 に記載されるようにしてCOS 細胞をトランスフェクトし、そしてB7Igの結合のためにFACS (R) 分析により試験した。上記構成体の他に、Aruffo and Seed (EMBO Jour. 6 : 3313~3316 (198)) により記載されるようなCD 7 をコードするcDNAを含むCDM8プラスミドをまた使用した。

【0140】

mAbs. ネズミモノクローナル抗体 (mAb) 9.3 (抗-CD28) 及びG19-4 (抗-CD 3)、G3-7 (抗-CD 7)、BB-1 (抗-B7抗原) 及びラットmAb 187.1(抗-マウスK鎖) はこれまで記載されており (Ledbetter など., Pruc. Natl. Acad. Sci. 84 : 1384~1388 (1987)) ; Ledbetter など., Bloud 75 : 1531 (1990) ; Yokochi など.,前記)、そして使用の前、腹水から精製した。

【0141】

mAb OKT8を生成するハイブリドーマをATCC, Rockville, MD から得、そしてmAb をまた、使用の前、腹水から精製した。mAb 4G9(抗-CD19) は、Dr. E. Engleman (Stanford University, Palo Alto, (A))により提供された。精製されたヒト-マウスキメラmAb L6 (ヒトC γ 1Fc部分を有する) は、Dr. P. Fell and M. Gayle (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Seattle, WA)の贈与である。

【0142】

免疫染色及びFACS (R) 分析

染色の前、COS 又はCHO 細胞を、10mMのEDTAを含むPBS においてインキュベートすることによってそれらの培養容器から除去した。細胞をまず、mAbs又はIg融合タンパク質と共に、10%FBS を含むDMEMにおいて10 μ g/mlで4℃で1~2時間インキュベートした。

【0143】

次に、細胞を洗浄し、そしてFITC-接合ヤギ抗-マウス免疫グロブリン又はFITC-接合ヤギ抗-ヒトIgC γ 血清 (両者とも、Tago, Burlingame, CA からである) と共に、4℃でさらに0.5~2時間インキュベートした。両mAbs及びIg融合タンパク質の結合が同じ実験において測定される場合、FITC-接合抗-マウス及び抗-ヒト第2段階試薬を、使用の前、一緒に混合した。合計10,000個の細胞に基づく蛍光を次に、FACS (R) により分析した。

【0144】

末梢血液リンパ球分離及び刺激

末梢血液リンパ球 (PBLs) を、リンパ球分離媒体 (Litton Bionetics, Kensington, MD) を通しての遠心分離により単離した。アロ反応性T細胞を、一次混合リンパ球反応 (MLR) におけるPBL の刺激により単離した。PBL を、10⁶/mlの照射された (5000ラド) T51 LCL で培養した。EBV-形質転換リンパ球芽細胞系 (LCL), PM (Bristol-Myers Squibb Co.) 及びT51 (Bristol-Myers Squibb Co.)を、10%FBS により補充されたRPMIに維持した。

【0145】

6日後、アロ反応性“幼芽”細胞を凍結保存した。二次MLR を、mAbs及びIg融合タンパク質の存在及び不在下で、新鮮な照射T51 LCL と共に融解されたアロ反応性幼芽を培養することによって行なった。細胞を、10%FBS を含むRPMIを有する96ウェル平底プレート (0.2 mlの体積、4 $\times$ 10⁴ 個のアロ反応性幼芽及び1 $\times$ 10⁴ 個の照射T51 LCL 細胞/ウェル) において培養した。四重培養物の細胞増殖を、2~3日の培養の最後の6時間、[³H]-チミジンの摂取により測定した。

【0146】

PHA-活性化されたT細胞を、1 μ g/mlのPHA (Wellcome, Charlotte, NC) と共にPBL を5日間、培養することによって、及びPHA を欠く培地において1日間、培養することによって調製した。生存細胞を、使用の前、リンパ球分離媒体を通しての沈殿により集めた。細胞をmAbsにより刺激し、又はCHO 細胞により37℃で4~6時間トランスフェクトせしめ

10

20

30

40

50

、遠心分離により集め、そしてRNA を調製するために使用した。

【0147】

CD4⁺ T細胞を、健康なドナーからのPBL を、羊赤血球ロゼット技法を用いてT及び非-T細胞に分離し、そしてさらに、Damle など., J. Immunol. 139 : 1501 (1987) (引用により本明細書に組込まれる) により記載されるようにCD4⁺ 細胞をパンニングすることによりT細胞を分離することによってPBLsから単離した。B細胞をまた、抗-CD19mAb 4G9を用いて、Wysocki and Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. 75 : 2844 (1978) (引用により本明細書に組込まれる) により記載されるようにパンニングすることにより末梢血液から精製した。

【0148】

T_h -誘発されたIg生成を測定するために、10⁶ 個のCD4⁺ T細胞を、10%のFBS を含むRPMI 1 mlにおいて10⁶ 個のCD19⁺ B細胞と共に混合した。37°Cでの6日間の培養に続いて、ヒトIgM の生成を、Volkman など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2528 (1981) (引用により本明細書に組込まれる) により記載されるようにして固相ELISA を用いて培養上清液において測定した。

【0149】

簡単に言及すれば、96-ウェル平底マイクロタイターELISA プレート (Corning, Corning, NY) を、10 μg/mlのアフィニティー精製されたヤギ抗-ヒトIgG 又はIgM 抗体 (Tago, Burlingame, CA) を含む200 μl/ウェルの炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.6)により被覆し、4°Cで一晩インキュベートし、そして次に、PBS により洗浄し、そしてウェルをさらに、PBS 中、2%BSA (BSA-PBS) によりブロックした。

【0150】

アッセイされるべきサンプルを、それらのウェルに適切な希釈度で添加し、そして200 μl/ウェルの1:1000希釈度のアフィニティー精製されたヤギ抗-ヒトIgG 又はIgM 抗体 (Tago) のホスラディシュ ペルオキシダーゼ (HRP)-接合F(ab')₂ 画分と共にインキュベートした。次に、プレートを洗浄し、そして100 μl/ウェルのオーフェニレンジアミン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)溶液 (pH5のクエン酸-リン酸緩衝液1ml当たり0.6 ng及び0.045 %の過酸化水素) を添加した。色の進行を、2Nの硫酸により止めた。

【0151】

490 nmでの吸光度を、自動ELISA プレートリーダーにより測定した。試験及び対照サンプルは3通り行なわれ、そして吸光度の値を、培養上清液におけるIgの濃度が定量化される標準曲線を生成するために、上清液サンプルにより同時に行なわれた既知のIgG 又はIgM 標準により得られた値と比較した。データを、三重反復又は四重反復培養物のIg±SEM のng/mlとして表わされる。

【0152】

免疫沈殿分析及びSDS PAGE

細胞を、¹²⁵Iにより表面ラベル化し、そして免疫沈殿分析にゆだねた。簡単に言及すれば、PHA-活性化されたT細胞を、Vitetta など., J. Exp. Med. 134 : 242 (1971) (引用により本明細書に組込まれる) により記載されるように、ラクトペルオキシターゼ及びH₂O₂ を用いて¹²⁵Iにより表面ラベル化した。

SDS-PAGEクロマトグラフィー処理を、5%のアクリルアミドの積み重ねゲルを有する直線アクリルアミドグラジエントゲル上で行なった。ゲルをクーマシーブルにより染色し、脱色し、そして写真を取り、又は乾燥せしめ、そしてX線フィルム (Kodak XAR-5)に露光せしめた。

【0153】

結合アッセイ

B7Igを、約2 × 10⁶ cpm/pモルの比活性に¹²⁵Iによりラベルした。96のウェルのプラスチック皿を、CTLA4 Ig (10mMのトリス (pH8) 0.05mlの体積において0.5 μg) を含む溶液により16~24時間、被覆した。ウェルを、競争体の存在又は不在下で、¹²⁵I B7Ig (約5

10

20

30

40

50

$\times 10^5$ cpm)を含む溶液 (0.09ml) の添加の前、結合緩衝液 (50mMのBES (Sigma Chemical Co), pH6.8, 0.1% BAS 及び10%FCS を含むDMEM) によりブロックした。23°Cで2～3時間のインキュベーションに続いて、ウェルを結合緩衝液により1度洗浄し、そしてPBSにより4度洗浄した。次に、結合された放射能を0.5 NのNaOHの添加により溶解し、そしてr計数により定量化した。

【0154】

B7Igへの結合

完全なヒトCTLA4 DNA 遺伝子をコードするOMCTLA4構成体の官能多活性が、図4に示される実験に示される。COS細胞を、上記のようにして発現プラスミドCD7, OMCD28及びOMCTLA4によりトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を集め、そして培地のみ (添加なし) と共に又はmAbs 9.3, B7Ig, CD5 Ig又はG3-7と共にインキュベートした。次に細胞を洗浄し、そして結合性を、FITC-接合ヤギ抗マウスIg及びFITC-接合ヤギ抗ヒトIg第2段階試薬の混合物により検出した。トランスフェクトされた細胞を、間接的免疫染色法により適切な細胞表面マーカーの発現について試験し、そして蛍光を上記のようにしてFACS (R) 分析を用いて測定した。

10

【0155】

図4に示されるように、mAb 9.3 は、CD28-トランスフェクトされたCOS細胞に結合したが、しかしCTLA4-トランスフェクトされる細胞には結合しなかった。対照的に、B7Ig融合タンパク質 (但し、対照のCD5 Ig融合タンパク質ではない) は、CD28-及びCTLA4-トランスフェクトされた細胞の両者に結合した。CD7-トランスフェクトされたCOS細胞は、mAb 9.3 にも融合タンパク質のいずれにも結合しなかった。これは、CD28及びCTLA4の両者がB細胞活性化抗原、B7を結合することを示唆する。さらに、mAb 9.3 は検出できるほどは、CTLA4を結合しなかった。

20

【0156】

B7陽性CHO細胞上へのCTLA4 Igの結合

CTLA4 Ig及びB7の結合をさらに特徴づけるために、 $B7^+$ CHO細胞及びリンパ芽球細胞系 (PM LCL) 上への精製されたCTLA4 Igの結合活性を、図5に示される実験において測定した。増幅された、トランスフェクトされたCHO細胞系及びPM LCLを、培地のみ (添加なし) 又はCD5 Ig, CD28Ig又はCTLA4 Igの同濃度のヒトIgC γ 1-含有タンパク質 (10 μ g/ml) と共にインキュベートした。結合性を、FITC-接合ヤギ抗ヒトIg第2段階試薬の添加に続いて、FACS (R) により検出した。合計10,000個の染色された細胞を、FACS (R) により分析した。

30

【0157】

図5に示されるように、CD28Igは $B7^+$ CHO細胞に結合するが、しかしPM LCLには結合せず、すなわち細胞系は比較的低レベルのB7抗原を発現する (Linsley など., 前記, 1990)。CTLA4 IgはCD28Igよりも両細胞系により強く結合し、これは、それが高い親和性を伴って結合することを示唆する。CD28IgもCTLA4 Igも、CD28 $^+$ CHO細胞に結合しなかった。

【0158】

CTLA4 Ig及びB7Igの結合の親和性

次に、CTLA4 IgとB7Igとの間の相互作用の見掛け親和性を、固相競争結合アッセイを用いて測定した。96-ウェルプラスチック皿を、上記のようにしてCTLA4 Igにより被覆した。B7Igを ^{125} I (5 $\times 10^5$ cpm, 2 $\times 10^6$ cpm/pモル) により放射ラベルし、そして添加し、示される濃度 (図6を参照のこと) のラベルされていないキメラmAb L6, mAb 9.3, mAb BB-1 又はB7Igの存在下で、4 nMの濃度にした。

40

【0159】

プレート結合放射能を測定し、そして競争体なしに処理されたウェルに結合される放射能の百分率として表わされた (28,300cpm)。個々の点は二重反復測定の平均を示し; 反復試験は一般的に平均から20%以下変化した。濃度を、mAb に関して結合部位当たり75,000のMrに基づいて及びB7Igに関して結合部位当たり51,000のMrに基づいて計算した。

【0160】

50

図6に示されるように、mAb BB-1及びラベルされていないB7Igが ^{125}I -B7Ig結合のために有意に競争した（それぞれ約22nM及び約175 nMで最大の半分の効果）。キメラmAb L6もmAb 9.3も、試験された濃度で効果的に競争しなかった。他の実験においては、使用されるmAbの濃度は、固定されたCD28Ig又は90%以上、CD28を発現する細胞表面への ^{125}I -B7Igの結合を阻害するのに十分であった。

【0161】

図6からの競争データがスキッチャートプロットでプロットされる場合、約12nMの解離定数Kdが、固定されたCTLA4 Igへの ^{125}I -B7の結合性について計算した（図7）。この値は、 ^{125}I -B7IgとCD28との間で前で測定されたKdよりも約20倍低く（約200 nM）（Linsley など, (1991), 前記）、これは、CTLA4がCD28レセプターよりもB7抗原のためにより高い親和性レセプターであることを示唆する。

10

【0162】

CTLA4 Igを結合したリンパ芽球細胞上の分子を同定するために（図7）、 ^{125}I -表面ラベルされた細胞を、免疫沈殿分析にゆだねた（図8）。B7⁺ CHO 及びPM LCL細胞を ^{125}I により表面ラベルし、そして上記のようにして非イオン性界面活性剤溶液により抽出した。約 1.5×10^7 cpmを有する、0.1 mlの体積での抽出物のアリコート、添加を伴わないで、又はそれぞれ2 µgのCD28Ig, CTLA4 Ig又はCD5 Igを伴って、上記のようにして免疫沈殿分析にゆだねた。

【0163】

次に、洗浄された免疫沈殿物を、還元条件下でSDS-PAGE（10～20%のアクリルアミドグラジエント）により分析した。次に、ゲルを乾燥せしめ、そしてオートラジオグラフィーにゆだねた。図8の左側のパネルは、1日間の暴露の後に得られたオートラジオグラムを示す。図8の右側のパネルは、10日間の暴露の後の同じゲルのオートラジオグラムを示す。図8の中央のパネルにおけるオートラジオグラムはまた、10日間、暴露された。分子量標準の位置はまた、この図に示される。

20

【0164】

図8により示されるように、分散的に移動する（約50,000～75,000；約60,000での中央）、放射性ラベルされたタンパク質を、CTLA4 Igにより（但し、CD28Ig又はCD5 Igによってではない）免疫沈殿せしめた。この分子は、CTLA4 Igにより、B7⁺ CHO 細胞から免疫沈殿されたB7と共に同時移動し、そしてCD28Igより免疫沈殿されたB7と共に、より一層弱く同時移動した。これらの発見は、CTLA4 Igが、B7抗原に大きさが類似する、リンパ芽球細胞上の単一タンパク質を結合することを示唆する。

30

【0165】

CTLA4 Igによるインビトロでの免疫応答の阻害
増殖の阻害

これまでの研究は、抗-CD28 mAb, 9.3 及び抗-B7mAb, BB-1 が、アロ抗原を表わすB細胞により、アロ抗原特異的T_Hの増殖及び免疫グロブリン分泌を阻害することを示している（Damle, など., Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 5096 (1981); Lesslauer など., Eur. J. Immunol. 16 : 1289 (1986))。CTLA4は本明細書に示されるようにB7抗原のために高い親和性レセプターであるので、可溶性CTLA4 Igは、それらの応答を阻害するその能力について試験された。T細胞増殖に対するCTLA4 Igの効果は、図9に示される実験で試験された。

40

【0166】

一次混合リンパ球反応（MLR）幼若を、ネズミ mAb 9.3 Fabフラグメント、又はB7Ig, CD28 IgもしくはCTLA4 Ig免疫グロブリンC_γ融合タンパク質の濃縮物の不在又は存在下で、照射されたT51 リンパ芽球細胞（IC）により刺激した。細胞増殖を、4日後、〔³H〕-チミジン組込みにより測定し、そして未処理の培養物による組込みの百分率として表わす、（21,000cpm）。図9は、4重反復測定の平均を表わす（SEM ≤ 10%）。

【0167】

図9に示されるように、CTLA4 Igは、約30ng/ml（約0.8 nM）で、1/2最大応答を伴っ

50

て最大90%以上、投与量－依存性態様でMLR 反応を阻害した。完全なmAb 9.3 よりもより可能性あるMLR のインヒビターであることがこれまで示されている、mAb 9.3 のFab フラグメント (Damle など., J. Immunol. 140 : 1753 ~1761 (1988))はまた、MLR を阻害したが、しかしその濃度は、より高い濃度 (約800 ng/ml又は1/2 最大応答のためには約30nM) であった。

B7Ig及びCD28Igは、高濃度でさえ、MLR を有意に阻害しなかった。他の実験においては、CTLA 4 Igと共にB7Igの添加は、CTLA 4 IgによるMLR の阻害を一部克服し、この事は、その阻害がB7抗原との特異的な相互作用によることを示唆する。

【0168】

免疫グロブリン分泌の阻害

10

ヘルパーT細胞 (T_h)－誘発性免疫グロブリン分泌に対するCTLA 4 Igの効果をまた試験した (図10)。CD4⁺ T細胞を、上記のようにして、指示された免疫グロブリン分子の存在又は不在下で、同種CD19⁺ B細胞と共に混合した。ネズミmAbs OKT8, 9.3及びBB-1を20 µg/mlで添加し、そしてIg融合タンパク質を10 µg/mlで添加した。6日間の培養の後、培養上清液におけるヒトIgM の濃度 (SEM < 5%) を、上記のようにして酵素イムノアッセイ (ELISA)により測定した。CD4⁺ T細胞の不在下で培養されたB細胞によるIgM生成は11ng/mlであった。

【0169】

図10に示されるように、CD4⁺ T細胞は同種CD19⁺ B細胞によるIgM 生成を刺激した (CD4⁺ T細胞の不在下で、IgM レベルは93%減じられた)。mAbs 9.3及びBB-1は、 T_h －誘発されたIgM 生成を有意に阻害した (それぞれ63%及び65%の阻害率)。CTLA 4 Igは、それらのmAbsよりもインヒビターとしてより効果的であった (89%の阻害率)。

20

【0170】

対照分子、mAb OKT8及びCD5 Igによる阻害は、より低かった (30%以下の阻害率)。それらの分子は、スタフィロコカル アウレウス (Staphylococcal aureus)エンテロトキシンBの存在下で測定されるIg生成を有意に阻害しなかった。類似する結果が、他のドナーに由来するB細胞及びCD4⁺ T細胞により得られた。それらの結果は、CTLA 4 Igによる阻害が特異的であることを示す。

【0171】

上記データはまた、CTLA 4 及びCD28レセプターが機能的及び構造的に関連していることを示す。CD28のように、CTLA 4はまた、B細胞活性化抗原、B7のためのレセプターでもある。CTLA 4 Igは、約12nMの親和性定数Kdを伴って¹²⁵I-B7を結合し、その値は、CD28とB7Igとの間の親和性よりも20倍高い (約200 nM)。従って、CTLA 4 及びCD28は、同じリガンド、すなわちB7抗原のために、それぞれ高い及び低い親和性レセプターとして考えられる。

30

【0172】

CD28とB7との間の見掛け親和性は、ネズミT細胞ハイブリドーマのT細胞レセプターへの可溶性アロ抗原の結合について報告される親和性に類似し (約100 nM; Schnekなど., Cell 56 : 47 (1989))、そしてCD2とLFA3との間 (Recny など., J. Biol. Chem. 265 : 8542 (1990))又はCD4とMHC クラスII分子との間 (Clayton など., Nature 339 : 548 (1989))の相互作用よりも高い親和性である。

40

【0173】

CTLA 4 とB7との間の見掛け親和性定数Kdはさらに大きく、そして好都合には、より高い親和性のmAbsに匹敵する (K_2 2-10,000nM; Alzariなど., Ann. Rev. Immunol. 6 : 555 (1988)) CTLA 4 とB7との間のKdは、インテグリンレセプター及びそれらのリガンドのKdに類似するか又はその値よりも大きい (10~2000nM: Hautanenなど., J. Biol. Chem. 264 : 1437 ~1442 (1989) ; Di Minnoなど., Blood 61 : 140~148 (1983) ; Thiagarajan and Kelley, J. Biol. Chem. 263 : 3035~3038 (1988))。

【0174】

従って、CTLA 4 とB7との間の相互作用の親和性は、リンパ芽球付着システムについて報告される中で最高である。

50

それらの結果は、CTLA 4 転写体の官能的タンパク質生成物の最初の発現を示す。CTLA 4 Ig、すなわち IgC γ 1 ドメインに融合される CTLA 4 の細胞外ドメインを含む融合構成体は、約 50,000 サブユニットの Mr のジスルフィド結合ダイマーを形成する (図 1)。鎖間ジスルフィドはこの融合の Ig 部分において形成することが予期されないので、CTLA 4 からのシステインはジスルフィド結合形成に包含される。同種 CD28Ig 融合タンパク質 (Linsley など, 前記, 1991) はまた鎖間ジスルフィド結合を含む。

【0175】

それらの結果は、CD28 のように CTLA 4 レセプター (Hansen など., *Immunogenetics* 10 : 247~260 (1980)) がジスルフィド結合ホモダイマーとして T 細胞表面上に存在することを示唆する。CD28 及び CTLA 4 は高い相同性のタンパク質であるが、それらは免疫学的に異な

10

。

【0176】

CTLA 4 が、CD28 に類似するシグナル化路により T 細胞を活性化できるかどうかについては知られていない。ネズミ及びヒト CTLA 4 の細胞質ドメインは同一であり (Dariavach., 前記 1988)、これは、この領域が重要な官能性質を有することを示唆する。CD28 及び CTLA 4 の細胞質ドメインはまた、相同性を共有す。但し、これが 2 つの分子に類似するシグナル性質を付与するために十分であるかいつれかについては不明である。

【0177】

CTLA 4 Ig は T 細胞及び B 細胞協力を必要とする インビトロ リンパ球機能の可能性あるイン

20

ヒビターである (図 9 及び 10)。前記研究と共に、これらの発現は、T 及び B リンパ球応答を調節することにおいて、B7 抗原とそのカウンターレセプター、CD28 及び／又は CTLA 4 との間に相互作用の基本的重要性を示唆する。CTLA 4 Ig は、免疫応答の間、それらの相互作用の役割上、未来の調査のために有用な試薬であるべきである。

【0178】

CTLA 4 Ig は、mAb BB-1 又は mAb 9.3 のいずれよりも インビトロ リンパ球応答のより可能性あるインヒビターである (図 9 及び 10)。mAb BB-1 よりもより CTLA 4 Ig の高い能力は、ほとんどそれらの分子間での B7 のための親和性の差異によると思われる (図 6)。CTLA 4 Ig はまた、mAb 9.3 よりも可能性がある。なぜならば、たぶん、mAb とは異なって、それはその阻害効果を妨害するために、T 細胞増殖に対して直接的な刺激効果を有さないからである (June など., *Immunology Today* 11 : 211 (1989))。 インビトロ の CTLA 4 Ig の免疫抑制効果は、未来の研究が、異常な T 細胞活性化又は Ig 生成を包含する自己免疫疾患の処置のために、この分子の可能な治療効果を保証されることを示唆する。

30

【0179】

例 5.

生後 6~8 週間の雌の BALB/c (H-2^d) 及び C57BL/6 (H-2^d) マウスを、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から得た。記述されたとおり、コラゲナーゼ消化の後ヒト膵島細胞を精製した (C. Ricordi et al. 移植 52 : 519 (1991); A. G. Tzakis et al. Lancet 336 : 402 (1990); C. Ricordi, P. E. Lacy, E. H. Finke, B. J. Olack, D. W. Scharp, 糖尿病 37 : 413 (1988))。

40

【0180】

移植の 3~5 日前にストレプトゾシン (体重 1 kg につき 175 mg) での処置を受け 280 mg/dl 以上 (大部分が 300 mg/ml 以上) の非絶食血漿グルコースレベルを示す B6 又は B10 マウスを被移植動物として用いた。

各々のマウスは、左副腎の下に直径 150 μ m の約 800 個の新鮮なヒト膵島を受けた (D. Faustman and C. Coe, Science 252 : 1700 (1991); Y. J. Zeng et al. 移植 53 : 277 (1992))。処置は、移植直後に開始された。

【0181】

対照動物を、移植直後 14 日間にわたり隔日に 50 μ g の割合で PBS (実線) 又は L6 (点線) で処置した (図 11)。3 日連続してグルコースレベルが 250 mg/dl 以上であった時点で、

50

膵島移植片は拒絶されたとみなされた。PBS($n=14$)及びL6($n=8$)での処置を受けた動物は、それぞれ5.6日及び6.4日の平均移植片生残期間を有していた。

移植直後連続14日間、動物を10 μ gのCTLA4 Igで処置した($n=7$)(図12)。7匹のうち3匹の動物がその移植片を80日以上維持した。残りの4匹の動物は12.75日という平均移植片生残期間を有していた。

【0182】

ヒト膵島移植直後14日間隔日に50 μ gのCTLA4 Igで動物を処置した(図13)。この用量での処置を受けた全ての動物($n=12$)が、分析中全体を通して移植片を維持した(図13)。

移植片の機能を評価するため、移植後21日目及び29日目に、選択されたマウスを腎摘出した(図13)。

【0183】

移植後29日目のヒト膵島移植を受けた対照マウスのヘマトキシリン及びエオシン染色は、大きいリンパ球浸潤を示した(図14のA)。インシュリンについて染色された同じ組織は、検出可能なインシュリン産生を全く示さなかった(図14のB)。

【0184】

移植後21日目のCTLA4 Igでの処置を受けたマウスからの組織の組織学的検査は、きわめてわずかなリンパ球しか移植された組織に浸潤していない状態の副腎下の無傷の膵島を示した(図14のC)。組織を、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。インシュリンについて染色されたCTLA4 Ig-処理されたマウスからの同じ組織は、移植された膵島によるインシュリンの産生を示した(図14のD)。後の時点で検査された移植片組織内でも類似の結果が観察された。上部、中央及び下部の矢印の頭は、副腎、膵島移植片及び腎臓実質をそれぞれ同定している。

【0185】

組織病理学検定においては、全ての組織は10%の緩衝ホルマリン内で固定され処理され、5 μ mの切片をヘマトキシリン及びエオシンのいずれかで、又はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法を用いてインシュリンについて、染色した(S. M. Hsu, L. Raine, H. Fanger, J. Histochem, Cytochem, 29: 577 (1981))。倍率は $\times 122$ であった。

【0186】

図15では、図11について上述したように、ストレプトゾトシン処理を受けた動物に移植を施した。14日間隔日に50 μ gの用量でヒトB7に対するMAb(実線)又はPBS(点線)のいずれかでマウスを処置した(図15)。(PBSで処置された)対照動物($n=3$)は3.5日という平均移植片生残期間を有し、一方、抗B7処置を受けた動物($n=5$)は、9日乃至50日以上移植片を維持した(図15)。

【0187】

図16において、血糖正常で、CTLA4 Ig処理され移植を受けたマウス(点線)を、移植後44日目に腎摘出し、直ちに1000個の第1の当事者であるドナーの膵島(点線、黒丸)又は1000個の第2の当事者の膵島(点線、白丸)を用いて残存する副腎の下に再移植した。最初の移植の時点で凍結されていたこれらの膵島を解凍し、膵島の機能を確認するため移植より前3日間にわたり培養した。ストレプトゾトシンで処置され280 mg/dlという非絶食グルコースレベルを示したB10マウスを対照として用いた(実線)(図16)。移植後はいかなる処置も施さなかった。

【0188】

対照動物は、移植後4日目までに第1の当事者(実線、黒丸)及び第2の当事者(実線、白丸)の膵島移植片の両方を拒絶した(図14)。第2の当事者の膵島で再移植を受けたCTLA4 Ig処理されたマウスは、4.5日の平均移植片生残期間を有していたのに対し、第1の当事者であるドナーの膵島で再移植された動物は、分析中ずっと(80日以上)移植片を維持した(図16)。

【0189】

10

20

30

40

50

CTLA 4 Igは、マウス体内でのヒト膵島移植片の生残期間をドナー特異的な形で著しく延長し、かくして免疫抑制に対する1つのアプローチを提供している。

マウスの膵島のB cell 機能を除去するため、C57BL/6 (B6)又はC57BL/10 (B10)マウスをストレプトゾトシンで処置した。副腎下で糖尿病の動物に対して移植を施し、外科手術後直ちに処置を開始した。血中グルコース濃度の分析により膵島移植片の生残を監視した。

【0190】

リン酸緩衝溶液 (PBS) (n = 14) 又はL6 (ヒトIgG1キメラMAb ; n = 8) のいずれかで処理された移植を受けた対照動物は、それぞれ5.6 日及び6.4 日の平均移植片生残期間を有していた (図11)。

これとは対照的に、CTLA 4 Igでの処置を受けた動物 (14日間1日14µg) における膵島拒絶は遅らされ、7匹の動物のうち5匹は平均移植片生残期間の穏やかな延長を示し (12.7 5 日)、一方残りの3匹の動物は80日以上の間正常なグルコースレベルを維持した (図12) 。活発な細胞拒絶の証拠は全く観察されなかったため、グルコース濃度におけるこの増大は膵島消耗の結果でありうる。

【0191】

長期の膵島移植片を維持した3匹のマウスにおいて、移植から21日目前後でのグルコース濃度の過度的な増大は、療法後のCTLA 4 Igの浄化値の薬物速度論と一貫した自己制限的拒絶の発現を表わしていた可能性がある (P. S. Linsley et al., Science 257 : 792 (1992)) 。

その後の実験においては、約14日間隔日で動物一匹あたりのCTLA 4 Ig用量は50µgまで増大された。この処置の結果、100 %の動物は拒絶発症の兆候を全く示さず実験全体を通して正常な膵島機能を維持することになった (図13) 。

【0192】

インシュリン産生が未変性マウス膵臓ではなく移植された膵島に源を発していたことを確認するため、我々は、膵島移植片を除去するべく21日目及び29日目に、選択された動物を腎摘出した (図13) 。これらの動物において、グルコース濃度は、24時間以内に350 mg/dl以上まで増大し、このことは、膵島異種移植片が正常なグルコースレベルを維持する原因であることを示していた。CD28-B7相互作用の遮断は、異種間膵島移植片拒絶を阻害すると思われる。

【0193】

可溶性レセプターすなわちCTLA 4 Ig融合タンパク質を用いた処理の効果は、Fc結合 (L6は移植片拒絶をひき起こさなかった) 又はインビボでのT細胞又はB細胞機能に対する全体的効果の結果ではなかった。

対照 (PBS 処置された) マウス及びCTLA 4 Ig処置されたマウスからの膵島異種移植片の経時的分析を行なった (図14) 。対照動物からの膵島組織は、移植片内への著しいリンパ球浸潤物を伴い、膵島をほとんど残さない状態で、免疫拒絶の証拠を示した (図14のA) 。

【0194】

免疫組織学的染色は、インシュリン陽性細胞が稀にしか存在せず、ソマトスタチン陽性細胞が全く存在しないことを示した (図14のB) 。これとは対照的に、CTLA 4 Ig処置されたマウスからの移植片組織には、リンパ球浸潤物が全く無かった (図14のC) 。

移植片は、数多くの膵島が見える状態で無傷であった。さらに、ヒト膵島組織内に見られるB細胞はヒトインシュリン (図14のD) 及びソマトスタチンを産生した。

【0195】

本研究において用いられたヒトCTLA 4 Igは、マウス及びヒトの両方のB7と反応する。異種間移植モデルの1つの利点は、マウスB7と反応しないヒトB7に対するMAb の利用可能性である (T. Yokochi, R. D. Holly, E. A. Clark, J. Immunol. 128 : 823 (1982)) 。かくしてヒトB7を支持する抗原提供細胞 (APCs) の役目を直接検討することができる。

記述通りマウスを移植し、次に移植後14日間隔日にヒトB7に対するMAb 50µgを用いて処置した。この処置は、対照マウスに対するものに比べて処置を受けたマウスにおける移植

10

20

30

40

50

片生残期間を延長した（9日から50日以上にまで）(図15)。抗B7MAbはCTLA4 Igと同じように有効に拒絶を遮断することができない。

【0196】

CTLA4 Ig治療は、大部分のマウスにおける移植片の受容という結果をもたらした。しかしながら、動物は寛容でない可能性がある。過度的な免疫抑制は、移植片適合のため常時脾臓移植片受容を導く可能性がある（APC機能の喪失の結果としての免疫原性の喪失）(L. Hao, Y. Wang, R. G. Gill, K. J. Lafferty, J. Immunol. 139 : 4022 (1987) ; K. J. Lafferty, S. J. Prowse, M. Simeonovic, Annu. Rev. Immunol. 1 : 143 (1983))。

【0197】

これらの可能性の区別を行なうため、我々は、選択された異種移植を受けたCTLA4 Ig処置済みマウスを（40日目に）腎摘出し、当初のドナー脾臓（第1の当事者）又は無関係の第2の当事者のヒト脾臓のいずれかを用いて残りの副腎の下でそれらに再移植した（図16）。

【0198】

ストレプトゾトシンの処置を受けた、脾臓移植片を一度も受けたことのない対照動物にも、第1の当事者又は第2の当事者のいずれかの脾臓で移植を施した。移植後は、いかなる処置もとらなかった。対照動物は、4日目までに第1及び第2の当事者の脾臓を拒絶した。第2の当事者の脾臓を受けたCTLA4 Ig処置済みの動物は、これらの脾臓を5日目までに拒絶し、一方第1の当事者であるドナーの脾臓を受けた動物は80日以上移植片を維持した（図16）。

【0199】

これらの結果は、CTLA4 Ig処置が結果として異種脾臓に対するドナー特異的不応答の延長をもたらしたということを示唆している。ヒト脾臓ドナー間の差異を識別するマウス免疫応答の能力は、ヒト脾臓細胞上で発現された多形性MHC産物の直接的認識を支援する。

【0200】

例 6.

生後6～8週目の雌のBALB/c (H-2^d) 及び C57BL/6 (H-2^d) マウスを、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)から入手した。モノクローナル抗体11B11は、ラットIgG1抗マウスIL-4である (Ohara, J., 及び W. E. Paul, 1985, B細胞刺激因子-1に対するモノクローナル抗体の産生とその分子特徴づけ。Nature 315 : 333) (Verax (Lebanon, NH))。

【0201】

BALB/c マウス（1グループにつき5匹）を10⁸のSRBC単独で又は、200 µgのキメリックL6 mAb又はヒトCTLA4 Ig融合タンパク質と合わせて、静脈内にて免疫化させた。指示されたグループに、5 mg/mlの割合でラット抗マウスIL-4 mAb11B11又はラット免疫グロブリンのいずれかを2 ml 腹腔内注射することによってSRBCの注入に先立ち2時間処置を施した。キメリックL6 mAb又はCTLA4 Igでの処置は、さらに4日間毎日繰返した。

【0202】

46日目に全ての動物にSRBC (図17) 又は KLH (図18) の静脈内注射を施した。特定のと言うと、図15では、黒丸は、0日目と46日目にSRBCのみを投与したマウスを表わしている。白丸は46日目にSRBCのみ投与したマウスを表わしている。図17中に表わされた残りのマウスは、さらに46日目にSRBCの投与を受けた。これとは対照的に、図18では、マウスは、46日目のみに異なる免疫原KLHの投与を受けた。

【0203】

SRBC又はKLHに向けられた抗体をもつものとして測定されるマウスの血清濃度は、記述どおり (Linsley et al., Science 1992) ELISAにより決定された。

バックグラウンドの5倍のA₄₅₀を与える希釈液として、血清抗体力価を計算した。図15からの血清抗体力価は、1グループにつき5匹のマウスからのプールした血清から決定されており、一方図16からの血清抗体力価は5つの個々の血清の平均力価を表わしている。矢印は、46日目におけるSRBC又はKLH注射を表わす。

10

20

30

40

50

【0204】

図17及び図18は、CTLA 4 Igと抗-IL 4 の両方を同時に注射したマウスにおける免疫応答（白い三角形）が抗原特異的な形で抑制されることを示している。

図17は、CTLA 4 Ig及び抗-IL 4 の同時注射を受け0日目及び46日目にSRBCの注射を受けたマウスにおいて血清抗体価の上昇が全く存在しない（すなわち、一次的又は二次的免疫応答が全くない）ことを示している。CTLA 4 Ig及び抗-IL 4 の組合せは、一次及び二次免疫応答を抑制し、SRBCに対する長く持続する免疫学的不応答を誘導する。

【0205】

さらに、図17は、CTLA 4 Ig及び対照ラットIgを同時に注射されたマウスにおいて一次免疫応答が全く存在しないことを示している（Cappel, Organon-Technika, Palo Alto, CA）。しかしながら、これらのマウスは、46日目にSRBCの注射後に二次免疫応答を示している（黒丸、図17）。

10

【0206】

図16は、マウスにおける46日目のCTLA 4 Ig及び抗-IL 4 とそれに続く異なる免疫原KLH の投与がマウス体内のKLH に対する一次免疫応答を抑制しないことを示している。その代り、これらのマウスはKLH に対する一次免疫応答を示した（白い三角形、図16）。かくしてCTLA 4 Ig及び抗-IL 4 で処置されたマウスは、体内に投与された抗原に応じてきわめて特異的な免疫応答を示した。

本発明が関与する当業者に明らかなように、本発明は、本発明の範囲内で、上記に特別に開示されるもの以外の形で具体化され得る。従って、上記本発明の特定の態様は例示的であると考えられるべきである。本発明の範囲は、例示的であって、本発明を制限するものではない。

20

【0207】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

30

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

CTAGCCACTG AAGCTTCACC ATGGGTGTAC TGCTCACAC

39

【0208】

配列番号：2

配列の長さ：39

40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

TGGCATGGGC TCCTGATCAG GCTTAGAAGG TCCGGGAAA**39****【0209】**

配列番号：3

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

10

TTTGGGCTCC TGATCAGGAA AATGCTCTTG CTTGGTTGT**39****【0210】**

配列番号：4

配列の長さ：84

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

20

AAGCAAGAGC ATTTTCCTGA TCAGGAGCCC AAATCTTCTG ACAAACCTCA**50****CACATCCCCA CCGTCCCCAG CACCTGAACT CCTG****84**

30

【0211】

配列番号：5

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

40

CTTCGACCAG TCTAGAAGCA TCCTCGTGCG ACCGCGAGAG C**41****【0212】**

配列番号：6

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50

トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA（ゲノム）
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：Homo sapiens
配列

CATTGCACAG TCAAGCTTCC ATGCCCATGG GTTCTCTGGC CACCTTG 47

【0 2 1 3】

10

配列番号：7
配列の長さ：39
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA（ゲノム）
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：Homo sapiens
配列

ATCCACAGTG CAGTGATCAT TTGGATCCTG GCATGTGAC 39

【0 2 1 4】

配列番号：8
配列の長さ：65
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA（ゲノム）
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：Homo sapiens
配列

30

CTCAGTCTGG TCCTTGCACT CCTGTTTCCA AGCATGGCGA GCATGGCAAT 50

GCACGTGGCC CAGCC 65

【0 2 1 5】

配列番号：9
配列の長さ：33
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA（ゲノム）
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：Homo sapiens
配列

40

50

TTTGGGCTCC TGATCAGAAT CTGGGCACGG TTG**33**

【0216】

配列番号：10

配列の長さ：72

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

CTAGCCACTG AAGCTTCACC AATGGGTGTA CTGCTCACAC AGAGGACGCT**50****GCTCAGTCTG GTCCTTGAC TC****72**

【0217】

配列番号：11

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

GCAATGCACG TGGCCCAGCC TGCTGTGGTA GTG**33**

30

【0218】

配列番号：12

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（ゲノム）

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：Homo sapiens

配列

TGATGTAACA TGTCTAGATC AATTGATGGG AATAAAATAA GGCTG**45**

【0219】

配列番号：13

配列の長さ：561

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50

トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA（ゲノム）
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：Homo sapiens
特徴：
名称／キー：CDS
位置：1..561
配列

GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA	45	
Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg		
1 5 10 15		
GGC ATC GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC	90	
Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala		
20 25 30		
ACT GAG GTC CGG GTG ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG	135	10
Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val		
35 40 45		
ACT GAA GTC TGT GCG GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC	180	
Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr		
50 55 60		
TTC CTA GAT GAT TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA	225	
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln		20
65 70 75		
GTG AAC CTC ACT ATC CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC	270	
Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu		
80 85 90		
TAC ATC TGC AAG GTG GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG	315	
Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu		
95 100 105		30
GGC ATA GGC AAC GGA ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG	360	
Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro		
110 115 120		
TGC CCA GAT TCT GAC TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT	405	
Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser		
125 130 135		
TCG GGG TTG TTT TTT TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG	450	40

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu

140

145

150

AGC AAA ATG CTA AAG AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT 495

Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr

155

160

165

GTG AAA ATG CCC CCA ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG 540

Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln

170

175

180

CCT TAT TTT ATT CCC ATC AAT 561

Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

185

【 0 2 2 0 】

配列番号：14

配列の長さ：187

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

10

20

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg		
1	5	10
Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala		
20	25	30
Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val		
35	40	45
Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr		10
50	55	60
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln		
65	70	75
Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu		
80	85	90
Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu		
95	100	105
Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro		20
110	115	120
Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser		
125	130	135
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu		
140	145	150
Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr		30
155	160	165
Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln		
170	175	180
Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn		
185		

【図面の簡単な説明】

40

【図 1】図 1 は、下の実施例 2 に記載する CTLA4 Ig 融合構成体の線図である。

【図 2】図 2 は、下の実施例 2 に記載する CTLA4 Ig の SDS-PAGE クロマトグラフィーの精製から得られたゲルの写真であり、電気泳動の結果を表わす図面に代る写真である。

【図 3】図 3 は、実施例 3 に記載する、オンコスタチン (oncostatin) M シグナルプライマー伸長 (位置 -25 ~ -1) に融合したヒト CTLA4 レセプター (配列識別番号: 13 および 14) をエンコードし、そして新しく同定された N 連鎖グリコシル化部位 (位置 109 ~ 111) を含む、完全なアミノ酸配列を示す図である。

【図 4】図 4 は、実施例 4 に記載する、CD28 および CTLA4 でトランスフェクションした CO S 細胞への B7Ig 融合タンパク質の結合の FACS^R 分析の結果を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、実施例 4 に記載する、B7 抗原陽性 (B7⁺) CHO 細胞およびリンパ芽球様

50

細胞系 (PM-LCL) 上の精製したCTLA 4 Igの結合のFACS^R 分析の結果を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、実施例 4 に記載する、同定化CTLA 4 Igへの¹²⁵I標識化B7Igの競争結合の分析を示すグラフである。

【図 7】図 7 は、実施例 4 に記載する、同定化CTLA 4 Igへの¹²⁵I標識化B7Igのスク্যাッチャード分析の結果を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、実施例 4 に記載する、¹²⁵Iで表面標識化したB7陽性CHO 細胞およびPM-LCL細胞の免疫沈澱分析のSDS-PAGEクロマトグラフィーからのゲルの電気泳動の結果を示す図面に代る写真である。

【図 9】図 9 は、実施例 4 に記載する、[³H]ーチミジンの組み込みにより測定した、CTLA 4 IgのT細胞の増殖への作用を示すグラフである。

10

【図 10】図10は、実施例 4 に記載する、酵素のイムノアッセイ (ELISA)により決定した、ヒトT細胞によるヘルパーT細胞 (T_h) 誘発免疫グロブリンの分泌へのCTLA 4 Igの作用を示す棒グラフである。

【図 11】図11は、ヒト膵島異種移植片の生残を示す線グラフである。

【図 12】図12は、ヒト膵島異種移植片の生残を示す線グラフである。

【図 13】図13は、ヒト膵島異種移植片の生残を示す線グラフである。

【図 14】図14は、B 10マウスの副腎の下に移植されたヒト膵島の組織病理学スライドの写真である。

【図 15】図15は、ヒトB7に対するMAb を用いた膵島移植片の生残期間の延長を示す線グラフである。

20

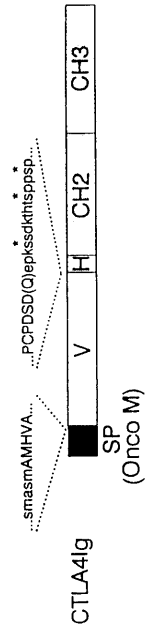
【図 16】図16は、CTLA 4 Igによる膵島移植片抗原に対するドナー特異的不応答の誘導を示す線グラフである。

【図 17】図17は、ヒツジ赤血球 (SRBC)、mAbL6 及びラット Ig, mAbL6 及び抗-IL 4, CTLA 4 Ig及びラット Ig, CTLA 4 Ig及び抗-IL 4 の注射を受けたマウスの抗体血清力価レベルを示す線グラフである。X 軸は抗体-血清力価を測定する。Y 軸は、日数単位の時間を測定する。黒の正方形は、0 日目と46日目にSRBCの注射を受けたマウスを表わす。白の正方形は、46日目にSRBCの注入を受けたマウスを表わす。黒丸は、mAbL6 及びラット免疫グロブリンの注射を受けたマウスを表わす。白丸は、mAbL6 及び抗IL4 抗体の注射を受けたマウスを表わす。黒の三角形は、CTLA 4 Ig及びラット免疫グロブリンの注射を受けたマウスを表わす。白の三角形は、CTLA 4 Ig及び抗-IL 4 抗体の注射を受けたマウスを表わす。

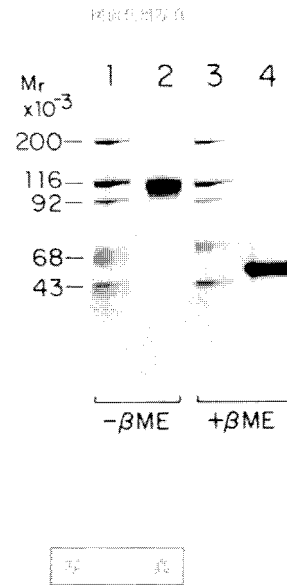
30

【図 18】図18は、KLH, mAbL6及びラット Ig, mAbL6 及び抗-IL 4, CTLA 4 Ig及びラット Ig, CTLA 4 Ig及び抗-IL 4 の注射を受けたマウスの抗体血清力価レベルを示す線グラフである。X 軸は、抗体血清力価を測定する。Y 軸は、日数で表わした時間を測定する。黒の正方形は、46日目にキーホールリンペットヘモシアニン (KLH)の注射を受けたマウスを表わす。黒丸はmAbL6 及びラット免疫グロブリンの注射を受けたマウスを表わす。白丸はmAbL6 及び抗-IL4 抗体の注射を受けたマウスを表わす。黒の三角形は、CTLA 4 Ig及びラット免疫グロブリンの注射を受けたマウスを表わす。白の三角形は、CTLA 4 Ig及び抗-IL 4 抗体の注射を受けたマウスを表わす。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

オンコスタンチンMシグナルペプチド

```

-25      -20      45
M G V L L L Q R T L L S L V L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT

-10      -1      +1      90
A L L F P S M A S M A M H V A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC

+10      +20      135
Q P A V V L A S S R G I A S F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT

+30      +50      180
V C E Y A S P G K A T E V R V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG

+40      +60      225
A T V L R Q A D S Q V T E V C A
ACA CTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG

+70      +80      270
A T Y M M G N E L T F L D D S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC

+90      +100      315
I C T G T S S G N Q V N L T I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC

+110      360
Q G L R A M D T G L Y I C K V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG

グリコシル化部位
+120      +130      405
E L M Y P P Y Y L G I G N G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA

+140      +150      450
T Q I Y V I D P E F C P D S D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC

+160      +170      495
F L L W I L A A V S S G L F F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA ACA GTT AGT TCG GSG TTG TTT TTT

+180      540
Y S F L L T A V S L S K M L K
TAT ACC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG

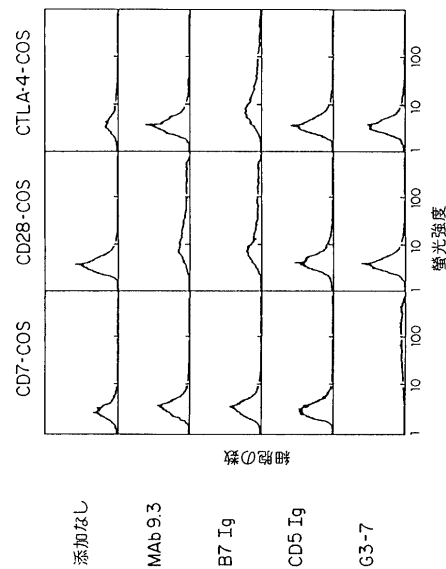
+190      585
K R S P L T T G V Y V K M P P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA

+200      630
T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC

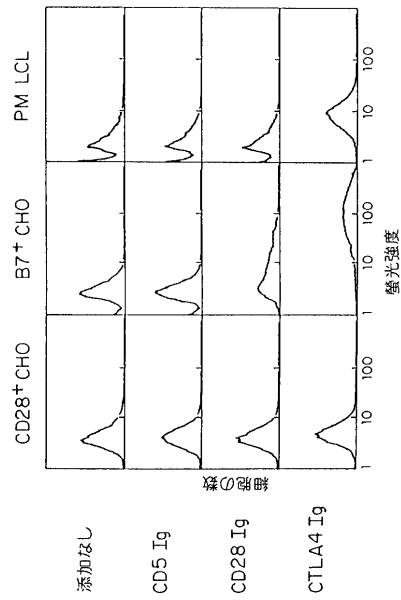
+210      636
I N
ATC AAT

```

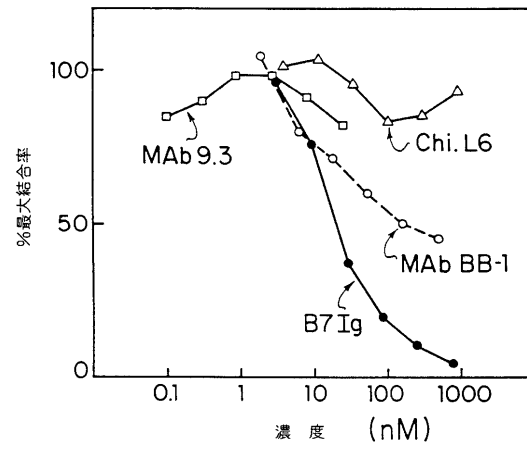
【図 4】



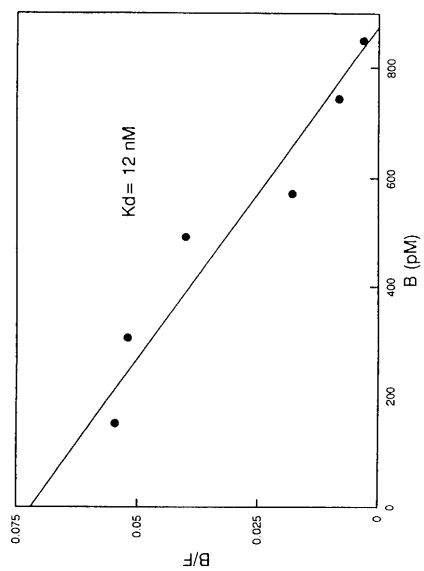
【図 5】



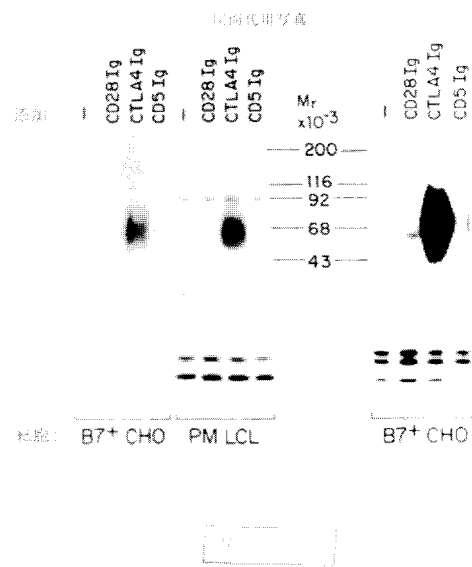
【図 6】



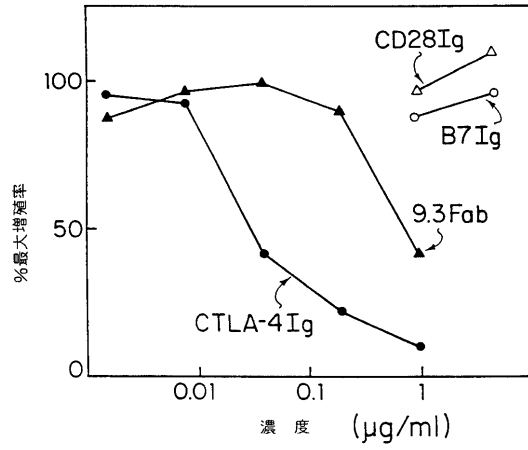
【図 7】



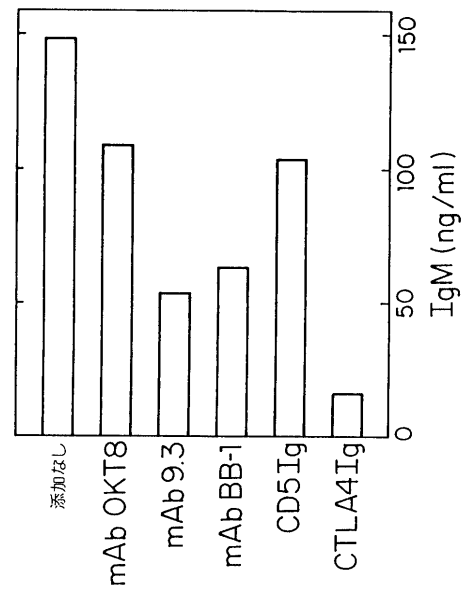
【図 8】



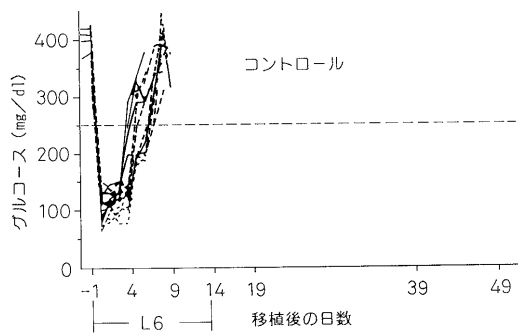
【図 9】



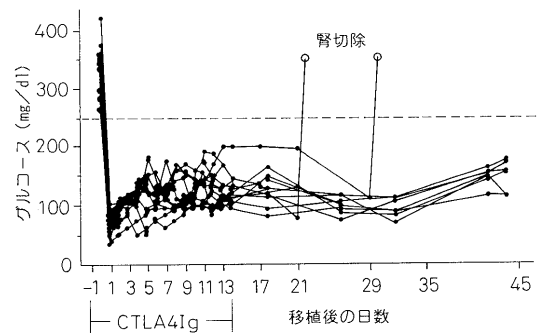
【図 10】



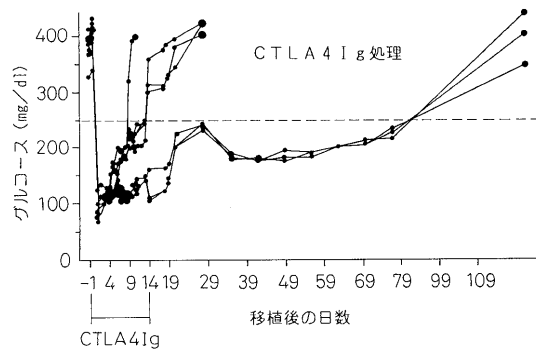
【図 11】



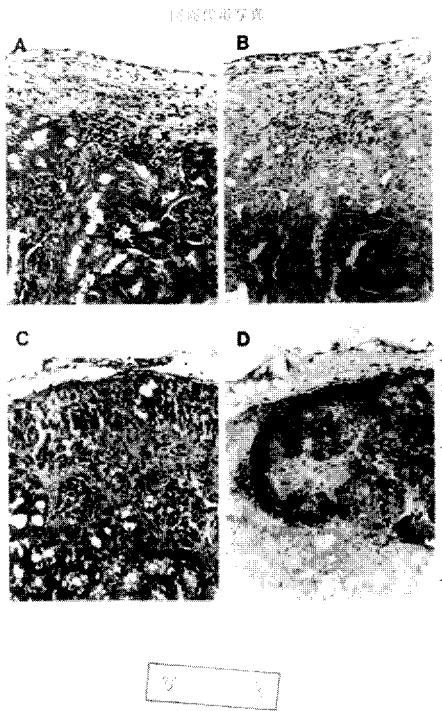
【図 13】



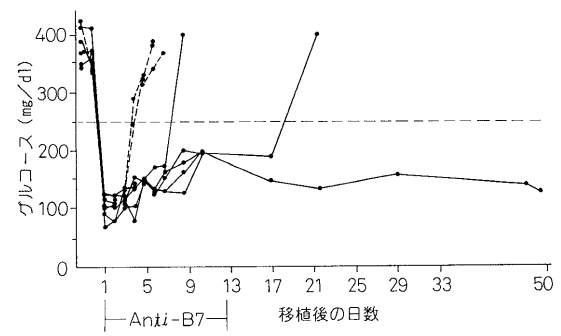
【図 12】



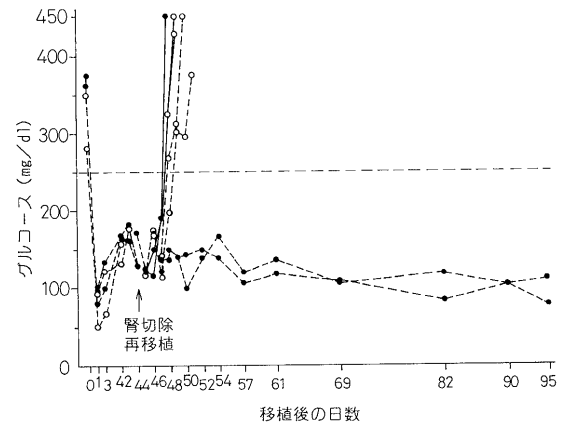
【図 14】



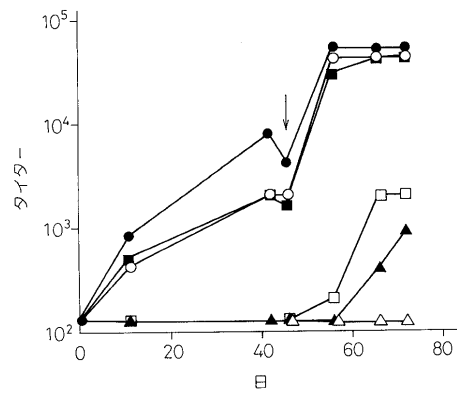
【図 15】



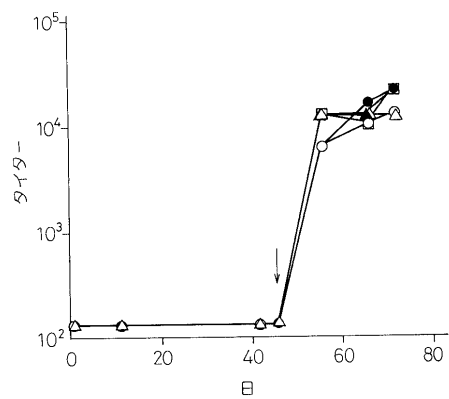
【図 16】



【図 17】



【図 18】



フロントページの続き

- (74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
- (74)代理人 100081330
弁理士 樋口 外治
- (72)発明者 ピーター エス. リンスリー
アメリカ合衆国, ワシントン 98119, シアトル, ナインス アベニュー ウエスト 2430
- (72)発明者 ジェフリー エー. リドベター
アメリカ合衆国, ワシントン 98117, シアトル, ノースウエスト ワンハンドレッドサート
ィーンズ プレイス 306
- (72)発明者 ナイティン ケー. デイムル
アメリカ合衆国, ニュージャージー 08852, モンマウント ジャンクション, リッジ ロー
ド 865
- (72)発明者 ウィリアム ブレディ
アメリカ合衆国, ワシントン 98021, ボーゼル, トゥーハンドレッドナインティーンズ プ
レイス サウスウエスト 618
- (72)発明者 フィリップ エム. ウォーレース
アメリカ合衆国, ワシントン 98116, シアトル, ディー, シックスティーフォース アベニ
ュ サウスウエスト 3020

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 中野 孝一

審判官 河野 直樹

- (56)参考文献 J. Exp. Med., Patrick Tan et al., Vol. 177,
p165-173, 1993. 01. 01

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00