(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-500005
(P2010-500005A)
(43)公表日　平成22年1月7日(2010.1.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B065
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4C076
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 84 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-506826 (P2009-506826)
(86)(22)出願日　平成19年8月10日 (2007.8.10)
(85)翻訳文提出日　平成21年2月9日 (2009.2.9)
(86)国際出願番号　PCT/JP2007/065991
(87)国際公開番号　WO2008/018641
(87)国際公開日　平成20年2月14日 (2008.2.14)
(31)優先権主張番号　60/837,004
(32)優先日　平成18年8月11日 (2006.8.11)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　000185983
小野薬品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町２丁目１番５号
(71)出願人　503411211
メダレックス，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　０８５４０－１４３７
ニュージャージー州，プリンストン，スウィート２０６，ステイト　ロード７０７
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ストローマ由来因子－１（ＳＤＦ－１）に対するモノクローナル抗体

(57)【要約】
【課題】ＳＤＦ－１に対して高い結合活性で結合するヒトモノクローナル抗体の提供。
【解決手段】本開示は、単離モノクローナル抗体、特に、ＳＤＦ－１に対して高い結合活性で結合するヒトモノクローナル抗体を提供する。また、ＳＤＦ－１抗体をコードする核酸分子、発現ベクター、宿主細胞およびＳＤＦ－１抗体を発現する方法も提供する。また、ＳＤＦ－１抗体からなる免疫抱合体、二価特異的分子および医薬組成物も提供する。ＳＤＦ－１を検出する方法、ならびに、乳癌、多発性骨髄腫および非ホジキンリンパ腫を含む様々なＢ細胞癌ならびに自己免疫疾患を治療する方法を開示する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号：１、２、３および４からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：５、６、７および８からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなり、
ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２】
（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項３】
（ａ）配列番号：２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項４】
（ａ）配列番号：３のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：７のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項５】
（ａ）配列番号：４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項６】
（ａ）ＫＤが　１×１０$^{-7}$以下でヒトＳＤＦ－１に結合し；
（ｂ）免疫沈降アッセイで検出可能なようにヒトＳＤＦ－１に結合する、
参照抗体によるＳＤＦ－１への結合を交差競合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項７】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項８】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項９】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：３のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：７のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１０】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１１】
（ａ）ＫＤが　１×１０$^{-7}$以下でヒトＳＤＦ－１に結合し；
（ｂ）免疫沈降アッセイで検出可能なようにヒトＳＤＦ－１に結合する
単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１２】
ヒト抗体である請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項１３】
キメラもしくはヒト化抗体である請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１４】
ＩｇＧ１、ＩｇＧ２もしくはＩｇＧ４アイソタイプの全長抗体である請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１５】
抗体断片もしくは単鎖抗体である請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１６】
前記抗体が、K_Dが1×10^{-8}Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１７】
前記抗体が、K_Dが1×10^{-9}Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１８】
前記抗体が、５７℃以上の融解温度をもつ請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１９】
前記抗体が、６８℃以上の融解温度をもつ請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２０】
前記抗体が、ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１結合を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２１】
前記抗体が、ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１誘導性カルシウム流入を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２２】
前記抗体が、ＣＥＭ細胞のＳＤＦ－１誘導性遊走を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２３】
前記抗体がＨｕＶＥＣ細胞の毛細血管形成を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２４】
ヒトＳＤＦ－１が、配列番号：４［Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ＿０００６０９］記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２５】
ヒトV_H１－２４遺伝子もしくはV_H３－７遺伝子の産物もしくは由来の重鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２６】
ヒトV_KＬ１８遺伝子の産物もしくは由来の軽鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２７】
さらに、ヒトV_H１－２４遺伝子もしくはV_H３－７遺伝子の産物もしくは由来の重鎖可変領域からなる請求項２６記載の単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２８】
（ａ）配列番号９からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１３からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号１７からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２１からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、

（ｅ）配列番号２５からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号２９からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項２９】
（ａ）配列番号１０からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１４からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号１８からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２２からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２６からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号３０からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項３０】
（ａ）配列番号１１からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１５からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号１９からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２３からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２７からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号３１からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項３１】
（ａ）配列番号１２からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１６からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号２０からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２４からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２８からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号３２からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項３２】
請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３３】
治療剤を結合した請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位からなる免疫抱合体。
【請求項３４】
請求項３３記載の免疫抱合体および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３５】
治療剤が細胞毒素である請求項３３記載の免疫抱合体。
【請求項３６】
請求項３３記載の免疫抱合体および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３７】
治療剤が放射性同位体である請求項３３記載の免疫抱合体。
【請求項３８】
請求項３７記載の免疫抱合体および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３９】
請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位をコードする単離核酸分子。
【請求項４０】
請求項３９記載の核酸分子からなる発現ベクター。
【請求項４１】
請求項４０記載の発現ベクターからなる宿主細胞。
【請求項４２】
請求項４０記載の宿主細胞で抗体を発現させ、その宿所細胞からその抗体を単離すること

からなる抗ＳＤＦ－１抗体を調製する方法。
【請求項４３】
患者の癌が治療されるように、請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を患者に投与することからなる患者の癌を治療する方法。
【請求項４４】
癌が、乳癌、多発性骨髄腫およびリンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、中枢神経原発リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫）からなる群から選択される請求項４３記載の方法。本発明の方法により治療されるその他の癌の例として、メラノーマ（例えば、転移性悪性メラノーマ）、腎癌（例えば、腎細胞癌）、脳腫瘍、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性もしくは急性白血病、鼻咽頭癌、前立腺癌、大腸癌、肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭頸部癌、進行期悪性黒色腫もしくは眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、睾丸癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、頸癌、膣癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎皮質癌、軟部腫瘍、尿道癌、陰茎癌、小児固形癌、膀胱癌、腎臓もしくは尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（ＣＮＳ）腫瘍、腫瘍の血管新生、脊髄腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、扁平上皮癌、扁平上皮癌、アスベストによって誘発される癌、例えば、中皮腫を含む環境誘発性癌およびそれらの組合せが含まれる。
【請求項４５】
癌細胞が、乳癌細胞である請求項４４記載の方法。
【請求項４６】
癌細胞が、多発性骨髄腫細胞である請求項４４記載の方法。
【請求項４７】
癌細胞が、非ホジキンリンパ腫細胞である請求項４４記載の方法。
【請求項４８】
患者の自己免疫疾患が治療されるように、請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を患者に投与することからなる患者の自己免疫疾患を治療する方法。
【請求項４９】
自己免疫疾患が、リウマチ関節炎（ＲＡ）、骨関節症（ＯＡ）、実験的自己免疫性脳脊髄炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、インシュリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）、炎症性大腸炎（ＩＢＤ）（クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病を含む）、多発性硬化症（ＭＳ）、乾癬、自己免疫性甲状腺炎、糸球体腎炎移および移植片拒絶からなる群から選択される請求項４８記載の方法。
【請求項５０】
自己免疫疾患が、リウマチ関節炎（ＲＡ）である請求項４９記載の方法。
【請求項５１】
自己免疫疾患が、骨関節症（ＯＡ）である請求項４９記載の方法。
【請求項５２】
患者の移植片拒絶が治療されるように、請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を患者に投与することからなる患者の移植片拒絶を治療する方法。
【請求項５３】
患者の増殖性糖尿病性網膜症が治療されるように、請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を患者に投与することからなる患者の増殖性糖尿病性網膜症を治療する方法。
【請求項５４】
幹細胞が動員されるように、請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を患者に投与することからなる幹細胞を動員する方法。
【請求項５５】
単量体および二量体のＳＤＦ－１の両方に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５６】

ＳＤＦ－１タンパク質の受容体結合部位に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５７】
ＳＤＦ－１タンパク質のアミノ酸残基７～１９に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５８】
ＳＤＦ－１タンパク質のアミノ酸残基３７～５０に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５９】
単量体ＳＤＦ－１でなく、二量体ＳＤＦ－１に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項６０】
ＳＤＦ－１ヘパリン結合部位に結合する請求項５９記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項６１】
ＳＤＦ－１の二量化接触面に結合する請求項５９記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項６２】
ＳＤＦ－１のアミノ酸残基２４～３０に結合する請求項５９記載の単離モノクローナル抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、単離モノクローナル抗体、特に、ＳＤＦ－１に結合し、多くの好ましい特徴を有するヒトモノクローナル抗体
【背景技術】
【０００２】
ケモカインは、炎症、リンパ球産生、血管新生およびリンパ組織発生の部位へのリンパ球サブセットの遊走に関連する分泌蛋白質である(Nelson and Krensky (2001) Immunity 14:377-86; Campbell et al. (2003) Immunol Rev 195:58-71; Moser et al. (2004) Trends Immunol 25:75-84; Moriguchi et al. (2005) J Biol Chem 280:17408-14)。ケモカインは、細胞性遊走反応を誘導する作用を通じて、様々な炎症や感染症において役割を持つ。その二つの主要サブファミリーは、一アミノ酸によって分離された（ＣＸＣケモカイン）あるいは隣接する（ＣＣケモカイン）最初の２つのシステインの位置によって識別される(Zlotnik and Yoshie (2000) Immunity 12:121-7; Loetscher and Clark-Lewis (2001) J Leukocyte Biol 69:881-4)。ケモカインは、７回膜貫通Ｇ蛋白質共役受容体に結合することによってそれらの機能を仲介する(Murphy et al (2000) Pharmacol Rev 52:145-76)。
【０００３】
ケモカイン幹細胞由来因子－１（ＳＤＦ－１/ＣＸＣＬ１２）はＣＸＣＲ４受容体の唯一知られている天然リガンドである。ＳＤＦ－１は第二受容体、ＲＤＣ１（ＣＸＣＲ７）のリガンドとしても機能するかもしれないと報告されている(Balabanian et al. (2005) J Biol Chem 280:35760-35766)。ＣＸＣＲ４は、リンパ球系細胞、非リンパ球系細胞の両方に広く発現しており、ある癌細胞において発現していることも同定されている。ＳＤＦ－１はＳＤＦ－１を高度に発現するリンパ組織、肺、肝臓および骨のような臓器へのＣＸＣＲ４$^{+}$癌細胞の遊走を方向付ける役割を持つと考えられている(Kucia et al (2005) Stem Cells 23:879-894)。さらに、癌の微小環境内での間質または骨髄由来の幹細胞は恒常的にＳＤＦ－１を分泌するとの研究がある(Burger and Kipps 2005)。
【０００４】
マウスＳＤＦ－１ノックアウトモデルでは、ＳＤＦ－１が、胚形成において、胎児肝臓由来造血幹細胞による骨髄のコロニー形成、それら細胞の成長期での停滞、消化管内での血管形成、心臓血管隔壁形成および小脳分化において重要であることが示されている(Nag

asawa et al. (1996) Nature 382:635-8; Ma et al. (1999) Immunity 10:463-71; You et al. (1998) Nature 393:595-9)。ＳＤＦ－１はＪａｋおよびＳｔａｔキナーゼの活性化にも関係していることが示唆されている(Vila-Coro et al. (1999) FASEB J 13:1699-1710; Zhang et al. (2001) Blood 97:3342-8)。さらに、増殖性の糖尿病性網膜症の糖尿病において、ＳＤＦ－１レベルは目おいて局在的に増加していることが示されている(Butler et al. (2005) J Clin Invest 115:86-93)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Nelson and Krensky (2001) Immunity 14:377-86
【非特許文献２】Campbell et al. (2003) Immunol Rev 195:58-71
【非特許文献３】Moser et al. (2004) Trends Immunol 25:75-84; Moriguchi et al. (2005) J Biol Chem 280:17408-14
【非特許文献４】Zlotnik and Yoshie (2000) Immunity 12:121-7
【非特許文献５】Loetscher and Clark-Lewis (2001) J Leukocyte Biol 69:881-4
【非特許文献６】Murphy et al (2000) Pharmacol Rev 52:145-76
【非特許文献７】Balabanian et al. (2005) J Biol Chem 280:35760-35766
【非特許文献８】Kucia et al (2005) Stem Cells 23:879-894
【非特許文献９】Nagasawa et al. (1996) Nature 382:635-8; Ma et al. (1999) Immunity 10:463-71
【非特許文献１０】You et al. (1998) Nature 393:595-9
【非特許文献１１】Vila-Coro et al. (1999) FASEB J 13:1699-1710
【非特許文献１２】Zhang et al. (2001) Blood 97:3342-8
【非特許文献１３】Butler et al. (2005) J Clin Invest 115:86-93

【発明の概要】

【０００６】

発明の要旨

本発明は、単離モノクローナル抗体、特に、ＳＤＦ－１に結合し、多くの好ましい特徴を有するヒトモノクローナル抗体を提供する。

【０００７】

それら特徴は、ヒトＳＤＦ－１に非常に高いアフィニティーで結合することを含み、別の態様において、本発明は、

（ａ）１ｘ１０$^{-7}$Ｍあるいはそれ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、かつ

（ｂ）免疫沈降アッセイにより、天然のヒトＳＤＦ－１に結合する、

単離モノクローナル抗体、またはその抗原結合部位を提供する。

【０００８】

別の態様において、抗体はマウス抗体、キメラ抗体もしくはヒト化抗体であってもよいが、好ましくはヒト抗体である。

【０００９】

別の態様において、抗体は、５ｘ１０$^{-8}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、２ｘ１０$^{-8}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、１ｘ１０$^{-8}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、５ｘ１０$^{-9}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、４ｘ１０$^{-9}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、３ｘ１０$^{-9}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合し、あるいは２ｘ１０$^{-9}$Ｍ以下のK_DでヒトＳＤＦ－１に結合する。

【００１０】

別の態様において、発明は、ＳＤＦ－１との結合において、

（ａ）配列番号１、２、３および４からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、

（ｂ）配列番号５、６、７および８からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、

参照抗体とクロス競合する単離モノクローナル抗体あるいはその抗原結合部位を提供する。

【００１１】
様々な態様において、参照抗体は、
（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と
（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とからなり、
または参照抗体は、
（ａ）配列番号２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と
（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とからなり、
または参照抗体は、
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と
（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とからなり、
または参照抗体は、
（ａ）配列番号４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と
（ｂ）配列番号８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とからなる。

【００１２】
別の態様において、発明は、ＳＤＦ－１に特異的に結合し、ヒトV_H１－２４遺伝子の産物またはそれに由来するものである重鎖可変領域からなる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位を提供する。

【００１３】
また、発明は、ＳＤＦ－１に特異的に結合し、ヒトV_H３－７遺伝子の産物またはそれに由来するものである重鎖可変領域からなる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位を提供する。さらに、発明は、ＳＤＦ－１に特異的に結合し、ヒトV_KＬ１８遺伝子の産物またはそれに由来するものである軽鎖可変領域からなる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位をも提供する。

【００１４】
好ましい態様として、発明は、ＳＤＦ－１に特異的に結合し、
（ａ）ヒトV_H１－２４もしくは３－７遺伝子の重鎖可変領域と
（ｂ）ヒトV_KＬ１８遺伝子の軽鎖可変領域からなる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位をも提供する。

【００１５】
好ましい態様として、抗体は、ヒトV_H１－２４遺伝子の重鎖可変領域とヒトV_KＬ１８遺伝子の軽鎖可変領域からなる。別の好ましい態様として、抗体は、ヒトV_H３－７遺伝子の重鎖可変領域とヒトV_KＬ１８遺伝子の軽鎖可変領域からなる。

【００１６】
別の面において、発明は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列からなる重鎖可変領域とＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列からなる軽鎖可変領域からなる、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位をも提供するが、
（ａ）かかる重鎖可変領域ＣＤＲ３配列は、配列番号１７、１８、１９および２０のアミノ酸配列ならびにその保守的な修飾体からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、
（ｂ）かかる軽鎖可変領域ＣＤＲ３配列は、配列番号２９、３０、３１および３２のアミノ酸配列ならびにその保守的な修飾体からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、
（ｃ）かかる抗体は、1×10^{-7}ＭまたはそれＭ以下のＫＤでヒトＳＤＦ－１に結合し、
（ｄ）免疫沈降アッセイにおいて、天然のヒトＳＤＦ－１に結合する。

【００１７】
好ましくは、重鎖可変領域ＣＤＲ２配列は配列番号１３、１４、１５および１６のアミノ酸配列ならびにその保守的な修飾体からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域ＣＤＲ２配列は配列番号２５、２６、２７および２８のアミノ酸配列ならびにその保守的な修飾体からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【００１８】

好ましくは、重鎖可変領域ＣＤＲ１配列は配列番号９、１０、１１および１２のアミノ酸配列ならびにその保守的な修飾体からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域ＣＤＲ１配列は配列番号２１、２２、２３および２４のアミノ酸配列ならびにその保守的な修飾体からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【００１９】

好ましい組合せは、

（ａ）重鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号９からなり、
（ｂ）重鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号１３からなり、
（ｃ）重鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号１７からなり、
（ｄ）軽鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号２１からなり、
（ｅ）軽鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号２５からなり、および
（ｆ）軽鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号２９からなる。

【００２０】

別の好ましい組合せは、

（ａ）重鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号１０からなり、
（ｂ）重鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号１４からなり、
（ｃ）重鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号１８からなり、
（ｄ）軽鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号２２からなり、
（ｅ）軽鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号２６からなり、および
（ｆ）軽鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号３０からなる。

【００２１】

別の好ましい組合せは、

（ａ）重鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号１１からなり、
（ｂ）重鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号１５からなり、
（ｃ）重鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号１９からなり、
（ｄ）軽鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号２３からなり、
（ｅ）軽鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号２７からなり、および
（ｆ）軽鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号３１からなる。

【００２２】

別の好ましい組合せは、

（ａ）重鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号１２からなり、
（ｂ）重鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号１６からなり、
（ｃ）重鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号２０からなり、
（ｄ）軽鎖可変領域ＣＤＲ１は配列番号２４からなり、
（ｅ）軽鎖可変領域ＣＤＲ２は配列番号２８からなり、および
（ｆ）軽鎖可変領域ＣＤＲ３は配列番号３２からなる。

【００２３】

本発明の他の好ましい抗体またはその抗原結合部位は、

（ａ）配列番号１、２、３および４からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および
（ｂ）配列番号５、６、７および８からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する。

【００２４】

好ましい組合せは

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および
（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる。

【００２５】

別の好ましい組合せは

（ａ）配列番号２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および
（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる。

【００２６】
別の好ましい組合せは
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および
（ｂ）配列番号７のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる。
【００２７】
別の好ましい組合せは
（ａ）配列番号４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および
（ｂ）配列番号８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる。
【００２８】
本発明の別の面において、抗体またはその抗原結合部位は、ただし、ＳＤＦ－１への結合に対して前記のいずれかの抗体に競合する。
【００２９】
本発明の抗体は、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２またはＩｇＧ４アイソタイプの、例えば、全長抗体であってもよい。一方で、抗体は、Ｆａｂ、Ｆａｂ′もしくはＦａｂ′２断片または単鎖抗体のような抗体断片であってもよい。
【００３０】
本発明は、細胞毒素などの治療剤または放射性同位体が結合した本発明の抗体またはその抗原結合部位からなる免疫抱合体をも提供する。また、本発明は、前記抗体またはその抗原結合部位とは異なる結合特異性を有する第二の機能部分を結合した、本発明の抗体またはその抗原結合部位からなる二価分子も提供する。
【００３１】
また、本発明の抗体もしくはその抗原結合部位もしくは免疫抱合体または二価分子と薬理学的に許容し得る担体からなる組成物も提供される。
【００３２】
本発明の抗体またはその抗原結合部位をコードする核酸分子は、そのような核酸からなる発現ベクターやそのような発現ベクターからなる宿主細胞とともに本発明に含まれる。
【００３３】
本発明の他の特徴や利点は、以下に詳述された記載や実施例から明らかであり、限定されない。本明細書にわたって引用されるすべての引例、Ｇｅｎｂａｎｋ登録、特許および公開特許明細書は、明らかに引例として、ここに利用されるものである。
【図面の簡単な説明】
【００３４】
【図１Ａ】図１Ａは、１Ｄ３ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３３）およびアミノ酸配列（配列番号：１）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：９）、ＣＤＲ２（配列番号：１３）およびＣＤＲ３（配列番号：１７）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図１Ｂ】図１Ｂは、１Ｄ３ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３７）およびアミノ酸配列（配列番号：５）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：２１）、ＣＤＲ２（配列番号：２５）およびＣＤＲ３（配列番号：２９）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図２Ａ】図２Ａは、１Ｈ２ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３４）およびアミノ酸配列（配列番号：２）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：１０）、ＣＤＲ２（配列番号：１４）およびＣＤＲ３（配列番号：１８）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図２Ｂ】図２Ｂは、１Ｈ２ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３８）およびアミノ酸配列（配列番号：６）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：２２）、ＣＤＲ２（配列番号：２６）およびＣＤＲ３（配列番号：３０）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図３Ａ】図３Ａは、１Ｃ６ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３５）およびアミノ酸配列（配列番号：３）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：１１）

、ＣＤＲ２（配列番号：１５）およびＣＤＲ３（配列番号：１９）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図３Ｂ】図３Ｂは、１Ｃ６ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３９）およびアミノ酸配列（配列番号：７）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：２３）、ＣＤＲ２（配列番号：２７）およびＣＤＲ３（配列番号：３１）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図４Ａ】図４Ａは、２Ａ５ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域の核酸配列（配列番号：３６）およびアミノ酸配列（配列番号：４）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：１２）、ＣＤＲ２（配列番号：１６）およびＣＤＲ３（配列番号：２０）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図４Ｂ】図４Ｂは、２Ａ５ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の核酸配列（配列番号：４０）およびアミノ酸配列（配列番号：８）を表わす。ＣＤＲ１（配列番号：２４）、ＣＤＲ２（配列番号：２８）およびＣＤＲ３（配列番号：３２）は下線で示され、Ｖ、ＤおよびＪ生殖細胞系列誘導体が示されている。
【図５】図５は、１Ｄ３（配列番号：１）および１Ｈ２（配列番号：２）の重鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系列V_H１－２４のアミノ酸配列（配列番号：４１）とのアラインメントを表わす。ＪＨ６ｂ配列は、配列番号：４７で表わされる。
【図６】図６は、１Ｃ６（配列番号：３）および２Ａ５（配列番号：４）の重鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系列V_H３－７のアミノ酸配列（配列番号：４２）とのアラインメントを表わす。ＪＨ６ｂ配列は、配列番号：４８で表わされる。
【図７】図７は、１Ｄ３（配列番号：５）および１Ｈ２（配列番号：６）の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系列V_kＬ１８のアミノ酸配列（配列番号：４２）とのアラインメントを表わす。ＪＫ４配列は、配列番号：４９で表わされる。
【図８】図８は、１Ｃ６（配列番号：７）および２Ａ５（配列番号：８）の軽鎖可変領域のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系列V_kＬ１８のアミノ酸配列（配列番号：４３）とのアラインメントを表わす。ＪＫ１配列は、配列番号：５０で表わされる。
【図９】図９は、１ｍＭ　二塩化カルシウムを含むＰＢＳ緩衝液でなく、ＰＢＳ緩衝液で希釈した後のＳＤＦ－１二量体化の経時的消失を示すビアコアと蛍光顕微鏡実験の結果を示す。（Ａ）異方性測定に基づく、希釈後ＳＤＦ－１二量体の経時的消失に対する１ｍＭ二塩化カルシウムの効果、（Ｂ）ＦＲＥＴ測定に基づく、希釈後ＳＤＦ－１二量体の経時的消失に対する１ｍＭ　二塩化カルシウムの効果。
【図１０】図１０は、抗ＳＤＦ－１ヒトモノクローナル抗体がＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１結合をブロックすることを示す実験結果を表す。
【図１１】図１１は、抗ＳＤＦ－１ヒトモノクローナル抗体が、ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１誘導カルシウム流入を阻害することを示す実験結果を表す。
【図１２】図１２は、抗ＳＤＦ－１ヒトモノクローナル抗体が、ＣＥＭ細胞のＳＤＦ－１誘導遊走を阻害することを示す実験結果を表す。
【図１３－１】図１３－１は、コラーゲン誘導関節炎への抗ＳＤＦ－１抗体のインビボ処置結果を表わす。（Ａ）はスコアを意味し、（Ｂ）は前脚の厚さを意味する。
【図１３－２】図１３－２は、コラーゲン誘導関節炎への抗ＳＤＦ－１抗体のインビボ処置結果を表わす。（Ｃ）は１５日後のスコアを意味し、（Ｄ）は１５日後の前脚（の厚さ）を意味する。
【図１３－３】図１３－３は、コラーゲン誘導関節炎への抗ＳＤＦ－１抗体のインビボ処置結果を表わす。（Ｅ）は病態スコアを意味し、（Ｆ）は２４日後の病態スコアを意味する。
【図１４】図１４は、抗ＳＤＦ－１抗体が空気嚢へのリンパ球の遊走を阻害することを示す、インビボ空気嚢実験の結果を表わす。（Ａ）空気嚢中の全細胞数の測定、（Ｂ）空気嚢中の好中球の測定。
【図１５】図１５は、抗ＳＤＦ－１抗体が空気嚢へのリンパ球の遊走を阻害することを示す、低投与量の抗ＳＤＦ－１抗体のインビボ空気嚢実験の結果を表わす。（Ａ）空気嚢中

の全細胞数の測定、（Ｂ）空気嚢中の好中球の測定。
【図１６】図１６は、ＨｕＶＥＣ細胞への抗ＳＤＦ－１抗体の結合を示すＦＭＡＴ研究結果を表わす。（Ａ）１Ｃ６抗体でのｒｈＳＤＦ－１ａ　ＦＭＡＴ解析。（Ｂ）２Ａ５抗体でのｒｈＳＤＦ－１ａ　ＦＭＡＴ解析。（Ｃ）ＩＣＡＭ抗体でのｒｈＳＤＦ－１ａ　ＦＭＡＴ解析。（Ｄ）１Ｄ３とネガティブコントロールでのｒｈＳＤＦ－１ａ　ＦＭＡＴ解析。
【図１７】図１７は、抗ＳＤＦ－１抗体がＨｕＶＥＣ細胞へのＳＤＦ－１結合を阻害することを示す結合アッセイの結果を表わす。
【発明を実施するための形態】
【００３５】
発明の詳細な説明
本発明は、単離モノクローナル抗体、特に、高いアフィニティーでＳＤＦ－１に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体に関する。ある態様において、本発明の抗体は、特徴的な重鎖および軽鎖生殖細胞系列配列および／または特徴的なアミノ酸配列からなるＣＤＲ領域のような特徴的な構造特性に由来する。本発明は、単離抗体、そのような抗体の製造方法、そのような抗体からなる免疫抱合体および二価分子ならびに本発明の抗体、免疫抱合体もしくは二価分子を含む薬理学的組成物を提供する。また、本発明はＳＤＦ－１検出のような抗体の使用方法や、例えば、乳癌、Ｂ細胞性腫瘍および浸潤性腫瘍を含むＣＸＣＲ４および／またはＳＤＦ－１を発現する腫瘍のように、ＳＤＦ－１発現に関連する疾患の治療方法に関する。さらに、本発明は、リウマチ性関節炎（ＲＡ）および変形性関節炎（ＯＡ）のような自己免疫疾患の治療あるいは移植拒絶反応の治療における抗体の使用方法に関する。また、さらに、本発明は、増殖性の糖尿病性網膜症の治療における抗体の使用方法に関する。
【００３６】
本発明がより容易に理解されるために、用語を最初に定義する。更なる定義は、詳細な説明を通じて説明する。
【００３７】
「幹細胞由来因子－１」および「ＳＤＦ－１」という用語は、同じ意味で使用され、その変異体、異性体およびヒトＳＤＦ－１の種相同体を含む。従って、ここに開示されるヒト抗体は、ＳＤＦ－１の異性体のいずれかに交差してもよい。さらに、ここに開示されたヒト抗体は、場合により、ヒト以外の種由来のＳＤＦ－１に交差してもよい。ある態様においては、抗体は、一つ以上のヒトＳＤＦ－１に完全に特異的であり、種あるいはその他のタイプの非ヒト交差反応を呈さなくてもよい。典型的なヒトＳＤＦ－１α、βおよびγアイソフォームの完全なアミノ酸配列は、Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＮＰ＿９５４６３７（配列番号：４４）、ＮＰ＿０００６００（配列番号：４５）およびＮＰ＿００１０２９０５８（配列番号：４６）をそれぞれ有する。
【００３８】
用語“免疫応答”とは、例えば、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球および前記細胞または肝臓によって産生された可溶性巨大分子（抗体、サイトカインおよび補体を含む）の作用を称し、その結果、病原体感染、細胞もしくは病原体に侵された組織、癌性細胞、または自己免疫若しくは病原性炎症の場合には正常ヒト細胞もしくは組織の選択的傷害、その破壊もしくは人体からの撲滅が起こる。
【００３９】
“シグナル伝達経路”とは、細胞のある部分から細胞の別の部分への信号伝達において役割を果たしている様々なシグナル伝達分子間の生化学的関係を称している。本文では、“細胞表面レセプター”という文言には、例えば、細胞の形質膜を横断して信号を受けとり、この信号を伝達できる分子および分子の複合体が含まれるものとして使用する。本発明の“細胞表面レセプター”の場合には、ＳＤＦ－１受容体がある。
【００４０】
用語“抗体”は、本文では、全長抗体およびそのいかなる抗原結合断片（すなわち、“

抗原結合部分”）またはその一重鎖を含むものとして使用する。“抗体”は、ジスルフィド結合で連結された少なくとも２個の重鎖（Ｈ）と２個の軽鎖（Ｌ）を含む糖タンパク質またはその抗原結合部分を称する。各重鎖は、重鎖可変領域（本文においてV_Hと略す。）と重鎖定常領域とから構成されている。重鎖定常領域は、３個のドメインC_H1、C_H2およびC_H3から構成されている。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本文においてV_Lと略す。）と軽鎖定常領域から構成されている。軽鎖定常領域は、１個のドメインC_Lで構成されている。V_HおよびV_L領域は、さらに、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される変異性の高い領域に小分割され、それらには、フレームワーク領域（ＦＲ）と称され、より保存性の高い領域が散在している。各V_HおよびV_Lは、３個のＣＤＲと４個のＦＲで構成され、下記の順序、すなわち、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４でアミノ末端からカルボキシ末端へ配置されている。当該重鎖およ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んでいる。抗体の定常領域は、イムノグロブリンの宿主組織または因子への結合を媒介でき、それらには、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および旧来の補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）が含まれる。

【００４１】

ここで用いられる抗体の“抗原結合部分”（または、単に“抗体部分”）という用語は、本文において、特異的に抗原（例えば、ＳＤＦ－１）に結合する能力を保持する抗体の１個以上の断片を称するものとして使用する。抗体の抗原結合機能が全長抗体の断片によって行われることが明らかとなっている。抗体の“抗原結合部分”という用語に含まれる結合断片の例として、（ｉ）V_L、V_H、C_LおよびC_H1ドメインから構成される１価の断片であるＦａｂ断片、（ii）ヒンジ領域中ジスルフィド架橋で結合した２個のＦａｂ断片を含む２価の断片である$F(ab')_2$断片、（iii）ヒンジ領域の部分を持つ本来的ＦａｂであるＦａｂ'断片（ＦＵＮＤＡＭＥＮＴＡＬ　ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ（Ｐａｕｌ　ｅｄ．，３．ｓｕｐ．ｒｄ　ｅｄ．１９９３参照）、（iv）V_HおよびC_H1ドメインから構成されるＦｄ断片、（v）抗体のシングルアームのV_LおよびV_Hドメインで構成されるＦｖ断片、（vi）V_Hドメインから構成されるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄら、（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６）、（vii）単離相補性決定領域（ＣＤＲ）および（viii）単一可変ドメインと二つの定常領域を含む重鎖可変領域であるナノボディを含む。さらに、Ｆｖ断片の２個のドメインであるV_LおよびV_Hは別々の遺伝子によりコードされているが、それらは、組み換え技術を用いてそれらを単一タンパク質鎖として作製できる合成リンカーにより連結でき、この鎖中では、V_LおよびV_H領域が対となって１価の分子を形成する（単一鎖のＦｖ（ｓｃＦｖ）として知られている；例えば、Ｂｉｒｄら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６；およびＨｕｓｔｏｎら、（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３参照）。このような単一鎖の抗体も、抗体の“抗原結合部分”という用語に含まれる。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を用いて得られ、当該断片について、未改変抗体の場合と同様に有用性を求めてスクリーニングされる。

【００４２】

ここでは、“単離抗体”とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を称する（例えば、ＳＤＦ－１に特異的に結合するが、ＳＤＦ－１以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）ものとして使用される。しかし、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離抗体は、他の種由来のＳＤＦ－１のような他の抗原に対する交差反応性を有することもある。さらに、単離抗体は、実質的に他の細胞性物質および／または化学物質を含まない。ここでの“モノクローナル抗体”または“モノクローナル抗体組成物”という用語は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を称するものとして使用する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一結合特異性と親和性を示す。ここでの“ヒト抗体”という用語とは、フレームワークとＣＤＲ領域の両方ともにヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むものとして使用する。さらに、もし抗体が定常領域を含むならば、この定常領域もヒト生殖細胞系列イムノグロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列イムノグロブリン配列

によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロにおけるランダムまたは部位特異的変異誘発またはインビボにおける体細胞変異により導入される変異）も含むものとする。しかし、ここでは、“ヒト抗体”という用語は、マウスのような別の哺乳種の生殖細胞系列に由来するＣＤＲ配列をヒトフレームワーク配列上に融合させた抗体も含むことを意図していない。

【００４３】

“ヒトモノクローナル抗体”という用語は、単一結合特異性を示す抗体を称し、フレームワークおよびＣＤＲ領域の両者ともにヒト生殖細胞系列イムノグロブイン配列に由来する可変領域を有している。１つの態様において、ヒトモノクローナル抗体は、例えば、形質転換マウスのような形質転換非ヒト動物から得られたＢ細胞を含むハイブリドーマによって産生され、かかる形質転換マウスは、不死化細胞に融合されたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。

【００４４】

ここでの“組み換えヒト抗体”という用語、（ａ）ヒトイムノグロブイン遺伝子のために形質転換またはトランス染色体されている動物（例えば、マウス）またはそれらから調製したハイブリドーマから単離された抗体（以下にさらに記述する。）、（ｂ）ヒト抗体発現のために形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（ｃ）組み換え、組み合わせヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および（ｄ）ヒトイムノグロブリン遺伝子配列を他のＤＮＡ配列にスプライシングすることを含む他の全ての手段によって調製、発現、創製または単離された抗体のように、組み換え手段によって調製、発現、創製または単離された全てのヒト抗体を含む。このような組み換えヒト抗体は、フレームワークおよびＣＤＲ配列がヒト生殖細胞系列イムノグロブリン配列に由来している可変領域を有している。しかし、ある態様においては、このような組み換えヒト抗体はインビトロ変異誘発処理（または、ヒトＩｇ配列のために形質転換動物を使用する際には、インビボ体細胞変異誘発処理）に供することができ、したがって、組み換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列V_HおよびV_L配列に由来し、それに関連しているものの、インビボでヒト抗体生殖細胞系列レパートリ内部に天然には存在しないであろう配列である。

【００４５】

ここでの“アイソタイプ”とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を称するものとして使用する。

【００４６】

“抗原認識抗体”および“抗原特異的抗体”という用語は、ここで、用語“抗原に特異的に結合する抗体”と相互に使用する。

【００４７】

“ヒト抗体誘導体”という用語とは、ヒト抗体と別の物質または抗体との複合物のようなヒト抗体の全ての修飾形状を称する。

【００４８】

“ヒト化抗体”という用語は、マウスのような別の哺乳種の生殖細胞系列に由来するＣＤＲ配列をヒトフレームワーク配列上に移植した抗体を称する。追加のフレームワーク領域改変も、ヒトフレームワーク配列内部で行うことができる。

【００４９】

“キメラ抗体”という用語は、可変領域配列が１種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体を称し、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体である。

【００５０】

ここでは、“ヒトＰＤ－１に特異的に結合する”抗体とは、ヒトＳＤＦ－１に対して、K_Dが1×10^{-7}Ｍ以下、さらに好適には、K_Dが5×10^{-8}Ｍ以下で結合し、さらに好適には、K_Dが3×10^{-8}Ｍ以下で結合し、さらに好適には、K_Dが1×10^{-8}Ｍ以下で結合する抗体を称するものとして使用する。

【００５１】
ここで、タンパク質または細胞に“実質的に結合しない”とは、そのタンパク質または細胞に結合しないかもしくは高いアフィニティーで結合しないこと、例えば、K_Dが1×10^{-6}M以上、さらに好適には1×10^{-5}M以上、さらに好適には1×10^{-4}M以上、さらに好適には1×10^{-3}M以上、なお、さらに好適には1×10^{-2}M以上でタンパク質または細胞に結合することを意味する。
【００５２】
“K_{assoc}”または“K_a”という用語は、ここでは、特定抗体－抗原相互作用の結合速度を称し、一方、用語“K_{dis}”または“K_d”は、ここでは、特定抗体－抗原相互作用の解離速度と称する。本文では、用語“K_D”は、当該解離速度と称するが、それは、“K_a”に対する“K_d”の比率（すなわち、K_d/K_a）から算出され、モル濃度（Ｍ）で表わされる。抗体のK_D値は、当該技術で確立した手法により決定できる。抗体のK_D決定のための好適な方法は、表面プラズマ共鳴を用いることによって、好適にはＢｉａｃｏｒｅ（登録商標）システムのようなバイオセンサーシステムを用いることによる。
【００５３】
本文では、ＩｇＧ抗体についての用語“高親和性”とは、標的抗原に対するK_Dが1×10^{-7}M以下、好適には5×10^{-8}M以下、さらに好適には1×10^{-8}M以下、なおさらに好適には5×10^{-9}M以下、なおさらに好適には1×10^{-9}M以下のK_Dを有する抗体を称するものとして使用する。しかし、“高親和性”結合は、他の抗体アイソタイプに対しては変動する。例えば、ＩｇＭアイソタイプに対する“高親和性”結合は、K_Dが10^{-6}M以下、さらに好適には10^{-7}M以下、さらに好適には10^{-8}M以下のK_Dを有する抗体を称する。
【００５４】
ここでは、“被験者”という用語は、全てのヒトまたは非ヒト動物を含む。用語“非ヒト動物”とは、非ヒト霊長、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生、爬虫等のような哺乳および非哺乳のような全ての脊椎動物を含む。
【００５５】
本発明の様々な点について、以下のサブセクションにおいて、さらに詳述する。
【００５６】
抗ＳＤＦ－１抗体
本発明の抗体は、抗体の特定の機能的特徴または性質によって特徴づけられる。例えば、当該抗体は、ヒトＳＤＦ－１に特異的に結合する。好適には、本発明の抗体はＳＤＦ－１に対し、例えば、K_Dが1×10^{-7}以下の高親和性で結合する。本発明の抗ＳＤＦ－１抗体は、好適には下記の性質を１個以上示す；
（ｉ）K_Dが1×10^{-7}M以下でヒトＳＤＦ－１に結合する；
（ｉｉ）免疫沈降アッセイにより、天然型ヒトＳＤＦ－１に結合する；
（ｉｉｉ）ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１の結合を阻害する；
（ｉｖ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１によるカルシウム流入を阻害する；
（ｖ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１による遊走を阻害する；あるいは
（ｖｉ）ＨｕＶＥＣ細胞での毛細血管形成を阻害する。
【００５７】
好適には、当該抗体は、ヒトＳＤＦ－１に対して、K_Dが5×10^{-8}M以下で結合し、ヒトＳＤＦ－１に対してK_Dが2×10^{-8}M以下で結合し、ヒトＳＤＦ－１に対してK_Dが5×10^{-9}M以下で結合し、ヒトＳＤＦ－１に対してK_Dが4×10^{-9}M以下で結合し、ヒトＳＤＦ－１に対してK_Dが3×10^{-9}M以下で結合し、ヒトＳＤＦ－１に対してK_Dが2×10^{-9}M以下またはヒトＳＤＦ－１に対してK_Dが1×10^{-9}M以下で結合する。
【００５８】
当該抗体は、ＳＤＦ－１に存在する抗原エピトープに結合し、そのエピトープは他のタ

ンパク質には存在しない。当該抗体は、典型的にＳＤＦ－１に結合し、他のタンパク質には結合しないか、他のタンパク質に対して、K_Dが１×１０$^{-6}$以上、より好適には１×１０$^{-5}$以上、より好適には１×１０$^{-4}$以上、より好適には１×１０$^{-3}$以上、なおさら好適には、１×１０$^{-2}$以上のような低アフィニティーで結合する。

【００５９】

ＳＤＦ－１抗体の結合能を評価するための標準的アッセイが当該技術で公知であり、例えば、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、ＲＩＡおよびフローサイトメトリーを含む。適切なアッセイは実施例で詳述する。当該抗体の結合動態（例えば、結合親和性）もまた、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）システム分析のような当該技術で公知の標準的アッセイによって評価できる。。

【００６０】

モノクローナル抗体　１Ｄ３，１Ｈ２，１Ｃ６および２Ａ５

当該発明の好ましい抗体は、実施例１および２に記載されたものとして、単離、構造決定されたヒトモノクローナル抗体１Ｄ３，１Ｈ２，１Ｃ６および２Ａ５である。１Ｄ３，１Ｈ２，１Ｃ６および２Ａ５のV_Hアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：１、２、３および４で示される。１Ｄ３，１Ｈ２，１Ｃ６および２Ａ５のV_Lアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：５、６、７および８で示される。

【００６１】

これらの抗体がそれぞれＳＤＦ－１に結合できるとすると、このV_HおよびV_L配列を“混合して適合させ”、本発明の他の抗ＳＤＦ－１結合分子を作製できる。このような“混合して適合させた”抗体のＳＤＦ－１結合は、上記で記述し、実施例でも記述する結合アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ）によって試験できる。好適には、V_HおよびV_L鎖を混合適合させ、特定のV_H／V_L対由来のV_H配列を構造的に類似のV_H配列で置き換える。同様に、特定のV_H／V_L対由来のV_L配列を構造的に類似のV_L配列で置き換える。

【００６２】

したがって、一面において、本発明は、

（ａ）配列番号：１、２、３および４から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および

（ｂ）配列番号：５、６、７および８から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、

抗体が、ＳＤＦ－１、好適には、ヒトＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【００６３】

好ましい態様として、本発明の抗体は、さらに一以上の以下の特徴を有する。

【００６４】

（ｉ）K_Dが１×１０$^{-7}$Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する；

（ｉｉ）免疫沈降アッセイにより、天然型ヒトＳＤＦ－１に結合する；

（ｉｉｉ）ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１の結合を阻害する；

（ｉｖ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１によるカルシウム流入を阻害する；

（ｖ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１による遊走を阻害する；あるいは

（ｖｉ）ＨｕＶＥＣ細胞での毛細血管形成を阻害する。

【００６５】

好適な重鎖および軽鎖組み合わせには：

（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および

（ｂ）配列番号：５のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または

（ａ）配列番号：２のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および

（ｂ）配列番号：６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または

（ａ）配列番号：３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および

（ｂ）配列番号：７のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、または

（ａ）配列番号：４のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および

（ｂ）配列番号：８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【００６６】

別の面において、当該発明は、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５またはその組み合わせの重鎖および軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３を含む抗体を提供する。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のV_H　ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、配列番号：９、１０、１１および１２で表わされる。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のV_H　ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、配列番号：１３、１４、１５および１６で表わされる。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のV_H　ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、配列番号：１７、１８、１９および２０で表わされる。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のV_k　ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、配列番号：２１、２２、２３および２４で表わされる。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のV_k　ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、配列番号：２５、２６、２７および２８で表わされる。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のV_k　ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、配列番号：２９、３０、３１および３２で表わされる。当該ＣＤＲ領域は、Ｋａｂａｔシステム（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ら，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版、米国保健・保健省、ＮＩＨ発行、第９１－３２４２号）を用いて描いた。

【００６７】

これらの抗体のそれぞれがＳＤＦ－１に結合できることおよび抗原結合特異性が主にＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３領域によって提供されるならば、V_H　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列とＶｋ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を“混合して適合させ”（すなわち、各抗体はV_H　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３とV_K　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含まなければならないが、異なる抗体由来のＣＤＲを混合適合させることができる）、本発明の他の抗ＳＤＦ－１結合分子を作製できる。このような“混合適合させた”抗体のＳＤＦ－１結合は、上記に記述し、実施例でも記述した結合アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ、ビアコア（登録商標）分析）によって試験できる。好適には、V_H　ＣＤＲ配列を混合適合させ、特定のV_H配列由来のＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３は構造的に類似のＣＤＲ配列で置き換える。同様にV_KＣＤＲ配列を混合適合させ、特定のV_K配列由来のＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３は構造的に類似のＣＤＲ配列で置き換える。新規のV_HおよびV_L配列をモノクロナール抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５についてここで開示したＣＤＲ配列由来の構造的に類似の配列で、１個以上のV_Hおよび／またはV_LＣＤＲ領域を置き換えることによって作製できることは当業者には明らかであろう。

【００６８】

したがって、別の態様において、本発明は、さらに：

（ａ）配列番号：９、１０、１１、および１２から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１；

（ｂ）配列番号：１３、１４、１５および１６から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２；

（ｃ）配列番号：１７、１８、１９および２０から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３；

（ｄ）配列番号：２１、２２、２３および２４から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１；

（ｅ）配列番号：２５、２６、２７および２８から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２；

（ｆ）配列番号：２９、３０、３１および３２から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３を含み、抗体がＳＤＦ－１に、好適にはヒトＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【００６９】

好適な態様において、当該抗体は

（ａ）配列番号：９を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１、

（ｂ）配列番号：１３を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号：１７を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号：２１を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号：２５を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号：２９を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３を含む。
【００７０】
別の好適な態様において、当該抗体は
（ａ）配列番号：１０を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号：１４を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号：１８を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号：２２を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号：２６を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号：３０を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３を含む。
【００７１】
さらに別の好適な態様において、当該抗体は
（ａ）配列番号：１１を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号：１５を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号：１９を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号：２３を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号：２７を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号：３１を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３を含む。
【００７２】
さらに別の好適な態様において、当該抗体は
（ａ）配列番号：１２を含む重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号：１６を含む重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号：２０を含む重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号：２４を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号：２８を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号：３２を含む軽鎖可変領域ＣＤＲ３を含む。
【００７３】
ＣＤＲ１および／またはＣＤＲ２ドメインとは独立に、ＣＤ３ドメインは単独で、同種抗原に対する抗体の結合特異性を決定することができ、複数の抗体が共通のＣＤＲ３配列に基づき、同じ結合特異性を持って生成されることが予測される。例えば、Ｋｌｉｍｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ８３（２）：２５２－２６０ （２０００）（マウス抗ＣＤ３０抗体Ｋｉ－４の重鎖可変ドメインＣＤＲ３を使用したヒト化抗ＣＤ３０抗体の作製を記載している。）；Ｂｅｉｂｏｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ． ２９６：８３３－８４９ （２０００）（親マウスＭＯＣ－３１抗ＥＧＰ－２抗体の重鎖ＣＤＲ３配列のみを使用した組み換え上皮グリコプロテイン－２（ＥＧＰ－２）抗体を記載している。）；Ｒａｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９５：８９１０－８９１５（１９９８）（マウス抗インテグリン$\alpha_v\beta_3$抗体ＬＭ６０９の重鎖および軽鎖を使用したヒト化抗インテグリン$\alpha_v\beta_3$抗体パネルであって、その各メンバー抗体はＣＤＲ３ドメインの外側の遠位配列からなり、親のマウス抗体と同等あるいはそれ以上の高いアフィニティーで親マウス抗体と同じエピトープに結合することができることが記載されている。）；Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１６：２１６１－２１６２（１９９４）(ＣＤＲ３ドメインが抗原結合に対して最も重要であることを開示している。)；Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９２：２５２９－２５３３（１９９５）（ヒト胎盤ＤＮＡに対する３つのＦａｂ（ＳＩ－１、ＳＩ－４０およびＳＩ－３２）の重鎖ＣＤＲ３配列を、抗破傷風トキソイドＦａｂの重鎖に、その重鎖ＣＤＲ３を入れ替えることによってグラフティングすることを記載し、ＣＤＲ３ド

メインのみで結合特異性を与えることを証明している。）；およびＤｉｔｚｅｌ　ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１５７：７３９－７４９　（１９９６）（親多特異性Ｆａｂ　ＬＮＡ３の重鎖ＣＤＲ３のみを単一特異的なＩｇＧ破傷風トキソイド結合Ｆａｂｐ３１３抗体の重鎖に移すグラフティング研究により、親Ｆａｂの結合特異性が十分に維持されることが記載されている。）参照。それら各引例は、全体として、参考文献としてここに含まれる。

【００７４】

従って、本発明は、ＳＤＦ－１に特異的に結合することができるヒトあるいは非ヒト動物由来のモノクローナル抗体からの一以上の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインからなるモノクローナル抗体を提供する。ある側面において、本発明はＳＤＦ－１に特異的に結合し、マウスまたはラットのような非ヒト抗体からの一以上の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインからなるモノクローナル抗体を提供する。いくつかの態様において、非ヒト抗体の一以上の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインからなる本発明抗体は、（ａ）同じエピトープへの結合に競合することができ；（ｂ）機能的特性を維持し；（ｃ）同じエピトープに結合し；および／または（ｄ）対応する親非ヒト抗体と同様の結合活性を持つ。

【００７５】

他の側面において、本発明は、例えば、非ヒト動物から得られ、ＳＤＦ－１に特異的に結合することができるヒト抗体からの一以上の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインからなるモノクローナル抗体を提供する。他の側面において、本発明は、例えば、非ヒト動物から得られ、ＳＤＦ－１に特異的に結合することができる一次ヒト抗体からの一以上の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインからなるモノクローナル抗体を提供し、その一次ヒト抗体からのＣＤＲ３ドメインを、ＳＤＦ－１に特異的に結合できないヒト抗体のＣＤＲ３ドメインに置換し、ＳＤＦ－１に特異的に結合できる二次ヒト抗体を生成する。いくつかの態様において、一次ヒト抗体からの一以上の重鎖および／または軽鎖ＣＤＲ３ドメインからなる本発明抗体は、（ａ）同じエピトープへの結合に競合することができ；（ｂ）機能的特性を維持し；（ｃ）同じエピトープに結合し；および／または（ｄ）対応する親一次ヒト抗体と同様の結合活性を持つ。好ましい態様として、一次ヒト抗体は１Ｄ３，１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５である。

【００７６】

特定の生殖細胞系列配列を有する抗体

ある態様において、本発明の抗体は、特定の生殖細胞系列重鎖イムノグロブリン遺伝子由来の重鎖可変領域および／または特定の生殖細胞系列軽鎖イムノグロブリン遺伝子由来の軽鎖可変領域を含む。例えば、好適な態様において、本発明は、ヒトV_H１－２４遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好適な態様において、本発明は、ヒトV_H３－７遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好適な態様において、本発明は、ヒトV_KＬ１８遺伝子の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。さらに、別の好適な態様において、本発明は、

（ａ）ヒトV_H１－２４または３－７遺伝子（この遺伝子は、それぞれ配列番号：４１または４２に記載のアミノ酸配列をコードする）の産物であるかまたはそれに由来する重鎖可変領域を含み、

（ｂ）ヒトV_KＬ１８遺伝子（この遺伝子は、それぞれ配列番号：４３に記載のアミノ酸配列をコードする）の産物であるかまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含み、

（ｃ）ＳＤＦ－１、好ましくはヒトＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【００７７】

V_H１－２４およびV_KＬ１８のV_HおよびV_Kをそれぞれ有する抗体の例としては、１Ｄ３および１Ｈ２である。V_H３－７とV_KＬ１８のV_HおよびV_Kをそれぞれ有する抗体の例は１Ｃ６および２Ａ５である。

【００７８】

好適な態様において、本発明の抗体は、さらに一以上の以下の特徴を有する。

【００７９】

（ｉ）K_Dが１×１０$^{-7}$Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する；
（ｉｉ）免疫沈降アッセイにより、天然型ヒトＳＤＦ－１に結合する；
（ｉｉｉ）ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１の結合を阻害する；
（ｉｖ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１によるカルシウム流入を阻害する；
（ｖ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１による遊走を阻害する；あるいは
（ｖｉ）ＨｕＶＥＣ細胞での毛細血管形成を阻害する。

【００８０】

ここでは、ヒト抗体は、この抗体の可変領域がヒト生殖細胞系列イムノグロブリン遺伝子を用いるシステムから得られるならば、特定の生殖細胞系列配列の“産物”であるかまたは“それに由来する”重鎖または軽鎖可変領域を含む。このようなシステムには、ヒトイムノグロブイン遺伝子を有する形質転換マウスを問題の抗原で免疫するかまたはファージディスプレイヒトイムノグロブリン遺伝子ライブラリーを問題の抗原でスクリーニングすることを含む。ヒト生殖細胞系列イムノグロブイン配列の“産物”であるかまたは“それに由来する”ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系列イムノグロブリンのアミノ酸配列と比較し、配列上ヒト抗体配列に最も近い（即ち最大同一性％）ヒト生殖細胞系列イムノグロブリン配列を選択することによって、そのものとして同定できる。特定のヒト生殖細胞系列イムノグロブイン配列の“産物”であるかまたは“それに由来する”ヒト抗体は、例えば、天然の体細胞変異または意図的な部位特異的変異導入によって、生殖細胞系列配列と比較して相違するアミノ酸を含有していてもよい。しかし、選択されたヒト抗体は、典型的には、アミノ酸配列上、ヒト生殖細胞系列イムノグロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であり、他の種の生殖細胞系列イムノグロブインアミノ酸配列（例えば、マウス生殖細胞系列配列）と比較した際、ヒトのものであるとしてヒト抗体を特定するアミノ酸残基を含んでいる。ある場合には、ヒト抗体は、アミノ酸配列上、ヒト生殖細胞系列イムノグロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも９５％同一または少なくとも９６％、９７％、９８％または９９％同一であることもある。典型的には、特定のヒト生殖細胞系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列イムノグロブイン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と１０個以下のアミノ酸の相違を示す。ある場合には、当該ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列イムノグロブイン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と５個以下、または４、３、２もしくは１個以下のアミノ酸の相違を示す。

【００８１】

相同抗体

さらに別の態様において、本発明の抗体は、ここに記載の好適な抗体のアミノ酸配列に相同のアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖可変領域を含み、ここで、当該抗体は、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体の望ましい機能的性質を保持している。

【００８２】

例えば、本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位を提供し、
（ａ）当該重鎖可変領域は、配列番号：１、２、３および４からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも８０％のアミノ酸配列からなり、
（ｂ）当該軽鎖可変領域は、配列番号：５、６、７および８からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも８０％のアミノ酸配列からなり、
（ｃ）当該抗体は、K_Dが１×１０－７Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合し、
（ｄ）当該抗体は、免疫沈降アッセイによって天然型ヒトＳＤＦ－１に結合する。

【００８３】
様々な態様において、当該抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってもよい。
【００８４】
好ましい態様において、本発明の抗体は、さらに、一以上の以下の特徴を有する。
【００８５】
（ｉ）ＣＥＭ細胞に対するＳＤＦ－１結合を阻害し、
（ｉｉ）ＣＥＭ細胞におけるＳＤＦ－１誘導性のカルシウム流入を阻害し、
（ｉｉｉ）ＣＥＭ細胞のＳＤＦ－１誘導性遊走を阻害し、
（ｉｖ）ＨｕＶＥＣ細胞における毛細血管形成を阻害する。
【００８６】
他の態様において、V_Hおよび／またはV_Lアミノ酸配列は、上述の配列に対して８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％相同であってもよい。上述の配列のV_HおよびV_L領域に対して、高い（すなわち、８０％以上）相同性を有するV_HおよびV_L領域を有する抗体は、配列番号：３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９および４０をコードする核酸分子の変異誘発性（例えば、部位特異的またはＰＣＲ媒介性変異誘発性）によって得ることができ、その後、機能（すなわち、上記（ｃ）から（ｄ）に記載の機能や上記（ｉ）－（ｉｖ）に記載の機能）保持については、ここに記載した機能的アッセイを用いて、コードされた改変抗体を試験する。
【００８７】
ここで述べたように、２つのアミノ酸配列間の相同性％は、その２つの同一性％と同じである。２つの配列間の同一性％は、その２つの配列を最適に配列させるために導入される必要のあるギャップ数および各ギャップの長さを考慮して、当該配列によって共有される同一位置の数の関数である（すなわち、相同性％＝＃同一位置の数／＃総位置数×１００）。配列比較と２つの配列の同一性％の決定は、下記の非限定的な事例に述べたように、数学的アルゴリズムを用いて達成できる。
【００８８】
２個のアミノ酸配列の同一性％は、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に取り入れたＥ．ＭｅｙｅｒｓとＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．、４：１１－１７（１９８８））のアルゴリズムを用いて、ＰＡＭ１２０重み残基表、１２のギャップ長ペナルティと４のギャップペナルティを用いて決定できる。さらに、２つのアミノ酸配列の同一性％は、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手可能）においてＧＡＰプログラムに取り入れたＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３（１９７０））アルゴリズムを用いて、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれか、そして、１６、１４、１２、１０、８、６または４のギャップ重みおよび１、２、３、４、５または６の長さ重みを用いて決定できる。
【００８９】
さらに、またはこれとは別に、本発明のタンパク質配列は、公表されたデータベースに対してサーチを行うための“クエリー配列”としてさらに用い、例えば、関連配列の同定のために使用することができる。このようなサーチは、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－１０のＸＢＬＡＳＴプログラム（ヴァージョン２．０）を用いて実行できる。ＢＬＡＳＴタンパク質サーチは、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワードレングス＝３を用いて実行して、本発明の抗体分子に相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためギャップ付きのアラインメントを得るため、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５（１７）：３３８９－３４０２に記載のように用いることができる。ＢＬＡＳＴおよびＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴプログラムを用いる際、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメータを使用できる。（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ．を参照）。

【００９０】
保存的修飾を有する抗体
ある態様において、本発明の抗体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域とＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、これらのＣＤＲ配列の１つ以上は、ここに記載の好適な抗体に基づく特定のアミノ酸配列（例えば、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５）またはその保存的修飾体を含み、かつ、当該抗体は、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体の望ましい機能的性質を保持している。したがって、本発明は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域とＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域を含み、
（ａ）重鎖可変領域ＣＤＲ３配列は、配列番号：１７、１８、１９および２０のアミノ酸配列およびその保存的修飾体から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含み、
（ｂ）軽鎖可変領域ＣＤＲ３配列は、配列番号：２９、３０、３１および３２のアミノ酸配列およびその保存的修飾体から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含み、
（ｃ）抗体が、K_D１×１０－７Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合し、および
（ｄ）抗体が、免疫沈降アッセイにおいて天然型ヒトＳＤＦ－１に結合する、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。
【００９１】
好ましい態様において、本発明の抗体は、さらに、一以上の以下の特徴を有する。
【００９２】
（ｉ）ＣＥＭ細胞に対するＳＤＦ－１結合を阻害し、
（ｉｉ）ＣＥＭ細胞におけるＳＤＦ－１誘導性のカルシウム流入を阻害し、
（ｉｉｉ）ＣＥＭ細胞のＳＤＦ－１誘導性遊走を阻害し、
（ｉｖ）ＨｕＶＥＣ細胞における毛細血管形成を阻害する。
【００９３】
好適な態様において、当該重鎖可変領域ＣＤＲ２配列は、配列番号：１３、１４、１５および１６のアミノ酸配列およびその保存的修飾体から構成される群から選択されたアミノ酸配列からなり、当該軽鎖可変領域ＣＤＲ２配列は、配列番号：２５、２６、２７および２８のアミノ酸配列およびその保存的修飾体から構成される群から選択されたアミノ酸配列からなる。別の好適な態様において、当該重鎖可変領域ＣＤＲ１配列は、配列番号：９、１０、１１および１２のアミノ酸配列およびその保存的修飾体から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含み；当該軽鎖可変領域ＣＤＲ１配列は、配列番号：２１、２２、２３および２４のアミノ酸配列およびその保存的修飾体から構成される群から選択されたアミノ酸配列を含む。
【００９４】
様々な態様において、当該抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってもよい。
【００９５】
ここでは、“保存配列修飾”とは、当該アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意な影響を及ぼさないかまたは改変しないアミノ酸修飾を称するものとして使用する。このような保存的修飾には、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。修飾は、本発明の抗体に、部位特異的変異およびＰＣＲ媒介性変異のような当該技術で公知の標準的手法により導入できる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸で置き換えることをいう。類似側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、当該技術で定義されている。そのようなファミリーには、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）、非電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、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）、ベータ分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（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。したがって、本発明の抗体のＣＤＲ領域内

部の１つ以上のアミノ酸残基は、同一側鎖ファミリーを他のアミノ酸残基で置き換えることができ、その改変抗体は、本文に述べた機能的アッセイを用いて保持機能（すなわち、上記の（ｃ）から（ｄ）に述べた機能と上記の（ｉ）から（ｉｖ）に述べた機能）について試験できる。

【００９６】

配列番号：９、１０、１１または１２の重鎖ＣＤＲ１配列は、１、２、３、４、５あるいはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損のような一以上の保存的配列修飾からなってもよく、配列番号：２１、２２、２３または２４の軽鎖ＣＤＲ１配列は、１、２、３、４、５あるいはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損のような一以上の保存的配列修飾からなってもよく、配列番号：１３、１４、１５または１６の重鎖ＣＤＲ２配列は、１、２、３、４、５あるいはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損のような一以上の保存的配列修飾からなってもよく、配列番号：２５、２６、２７または２８の軽鎖ＣＤＲ２配列は、１、２、３、４、５あるいはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損のような一以上の保存的配列修飾からなってもよく、配列番号：１７、１８、１９または２０の重鎖ＣＤＲ３配列は、１、２、３、４、５あるいはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損のような一以上の保存的配列修飾からなってもよく、配列番号：２９、３０、３１または３２の軽鎖ＣＤＲ３配列は、１、２、３、４、５あるいはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損のような一以上の保存的配列修飾からなってもよい。

【００９７】

本発明の抗ＳＤＦ－１抗体と同一エピトープに結合する抗体

別の態様において、本発明は、本発明のＳＤＦ－１モノクローナル抗体のいずれかと同一のヒトＳＤＦ－１上のエピトープに結合する抗体（すなわち、本発明のモノクローナル抗体のいずれかとＳＤＦ－１結合を交差競合する能力を有する抗体）を提供する。好適な態様において、交差競合研究の参考抗体は、モノクローナル抗体１Ｄ３（それぞれ配列番号：１および５に示したようなV_HおよびV_Lを有する）、またはモノクローナル抗体１Ｈ２（それぞれ配列番号：２および６に示したようなV_HおよびV_Lを有する）、またはモノクローナル抗体１Ｃ６（それぞれ配列番号：３および７に示したようなV_HおよびV_Lを有する）、またはモノクローナル抗体２Ａ５（それぞれ配列番号：４および８に示したようなV_HおよびV_Lを有する）であってもよい。このような交差競合性抗体は、標準的なＳＤＦ－１結合アッセイにおいて１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５と交差競合する能力に基づいて同定できる。例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標登録）分析、ＥＬＩＳＡアッセイまたはフローサイトメトリーを用いて、本発明の抗体との交差競合を明らかにすることもできる。ヒトＳＤＦ－１に対する、例えば、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５の結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がヒトＳＤＦ－１に対する結合を１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５と競合でき、従って、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５と同一のヒトＳＤＦ－１上エピトープに結合することを明らかにする。好適な態様において、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５と同一のヒトＰＤ－１上エピトープに結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このようなヒトモノクローナル抗体は、実施例に記載のようにして調製して単離できる。

【００９８】

工学的に作製かつ修飾された抗体

本発明の抗体は、修飾抗体を工学的に作製するための出発物質として、ここに開示した１つ以上のV_Hおよび／またはV_L配列を有する抗体を用いて調製でき、ここで、当該修飾抗体は、当該出発抗体と同じ改変された性質を有することがある。抗体は、１つ以上の可変領域（すなわち、V_Hおよび／またはV_L）内部、例えば、１つ以上のＣＤＲ領域内部および／または１つ以上のフレームワーク領域内部の１つ以上の残基を修飾することによって工学的に作製できる。さらに、またはこれとは別に、抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能を改変するために定常領域内部の残基を修飾することによって工学的に作製できる。

【００９９】

ある態様において、ＣＤＲグラフトは、抗体の可変領域を設計するのに使用される。抗体は、主に６個の重鎖および軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）に局在するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。このため、ＣＤＲ内部のアミノ酸配列は、ＣＤＲ外部の配列よりもそれぞれの抗体間でより多様性が高い。ＣＤＲ配列はほとんどの抗原抗体相互作用に関与しているので、異なる性質を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列に移植された特定の天然抗体由来ＣＤＲ配列を含む発現ベクターを構築することによって、この特定の天然抗体の性質を模倣する組み換え抗体を発現させることが可能である（例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ、Ｌ．ら（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７、Ｊｏｎｅｓ，Ｐ．ら（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５、Ｑｕｅｅｎ，Ｃ．ら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｅｅ．ＵＳＡ ８６：１００２９－１００３３、Ｗｉｎｔｅｒの米国特許５，２２５、５３９およびＱｕｅｅｎらの米国特許５，５３０，１０１，５，５８５，０８９，５，６９３，７６２および６，１８０，３７０を参照）。

【０１００】

したがって、本発明の別の態様は、それぞれ配列番号：９、１０、１１および１２、配列番号：１３、１４、１５および１６、および配列番号：１７、１８、１９および２０から構成される群から選択したアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域ならびにそれぞれ配列番号：２１、２２、２３および２４、配列番号：２５、２６、２７および２８および配列番号：２９、３０、３１および３２から構成される群から選択したアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む配列軽鎖可変領域を含む単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。したがって、上記抗体は、モノクローナル抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５のV_HおよびV_LＣＤＲ配列を含むが、これらの抗体と異なるフレームワーク配列も含むでもよい。

【０１０１】

このようなフレームワーク配列は、公表されたＤＮＡデータベースまたは生殖細胞系列抗体遺伝子配列を含む公表された文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖細胞系列ＤＮＡ配列は、“ＶＢａｓｅ”ヒト生殖細胞系列配列データベース（インターネットでｗｗｗ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｖｂａｓｅから入手可能）ならびにＫａｂａｔ，Ｅ．ら（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、米国健康およびヒトサービス部、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，Ｉ．Ｍ．ら（１９９２）“Ｔｈｅ Ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｒｍｌｉｎｅ V_H Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ Ｒｅｖｅａｌｓ ａｂｏｕｔ Ｆｉｆｔｙ Ｇｒｏｕｐｓ ｏｆ V_H Ｓｅｇｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ Ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ Ｌｏｏｐｓ”、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６－７９８；およびＣｏｘ，Ｊ．Ｐ．Ｌ．ら（１９９４）“Ａ Ｄｉｒｅｃｔｏｒｙ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｒｍ－ｌｉｎｅ V_H Ｓｅｇｍｅｎｔｓ Ｒｅｖｅａｌｓ ａ Ｓｔｒｏｎｇ Ｂｉａｓ ｉｎ ｔｈｅｉｒ Ｕｓａｇｅ”，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：８２７－８３６；それらのそれぞれの内容は、本文で参考として引用している。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列ＤＮＡ配列は、ＧｅｎＢａｎｋデータベース中で同定できる。例えば、ＨＣｏ７ ＨｕＭＡｂマウス中で認められる下記の重鎖生殖細胞系列配列は、１－６９（ＮＧ＿００１０１０９、ＮＴ＿０２４６３７およびＢＣ０７０３３３）、３－３３（ＮＧ＿００１０１０９およびＮＴ＿０２４６３７）および３－７（ＮＧ＿００１０１０９およびＮＴ＿０２４６３７）の付属ＧｅｎＢａｎｋ登録番号で入手可能である。別の例として、ＨＣｏ１２ ＨｕＭＡｂマウス中で見られる下記の重鎖生殖細胞系列配列は、１－６９（ＮＧ＿００１０１０９、ＮＴ＿０２４６３７およびＢＣ０７０３３３）、５－５１（ＮＧ＿００１０１０９およびＮＴ＿０２４６３７）、４－３４（ＮＧ＿００１０１０９およびＮＴ＿０２４６３７）、３－３０．３（ＡＪ５５６６４４）および３－２３（ＡＪ４０６６７８）の付属ＧｅｎＢａｎｋ登録番号で入手可能である。

【０１０２】
抗体タンパク質配列は、当業者によく知られているギャップＢＬＡＳＴと呼ばれる配列類似検索法（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２５：３３８９－３４０２）の一つを使用して、コンパイルされたタンパク質配列データベースに対して比較される。ＢＬＡＳＴは、抗体配列とデータベース配列間の統計的に優位なアラインメントが配列された文字の高スコアの区分ペア（ＨＳＰ）を含んでいるような発見的アルゴリズムである。スコアが延長またはトリミングによって改善できない区分ペアは、ヒットと呼ばれる。主に、ＶＢＡＳＥオリジン（ｈｔｔｐ：／／ｖｂａｓｅ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｖｂａｓｅ１／ｌｉｓｔ２．ｐｈｐ）の塩基配列は翻訳され、両端を含むＦＲ１からＦＲ３フレームワーク領域間の領域は保持される。データベースの配列は９８残基の平均長を有する。タンパク質の全長に渡って厳格に一致する重複配列が分離される。デフォルト、低頻度フィルターを除く標準パラメーターをオフとし、ＢＬＯＳＵＭ６２の置換行列を伴うプログラムｂｌａｓｔｐを使用したタンパク質ＢＬＡＳＴサーチは、配列マッチが上位５番目までとなるようフィルターする。塩基配列はすべての６フレームで翻訳され、データベース配列の適合区分中にストップコドンがないフレームは可能性のあるヒットと判断される。順次、これはＢＬＡＳＴプログラムｔｂｌａｓｔｘを使用して確認され、同プログラムはすべての６フレームで抗体配列を翻訳し、すべての６フレームで動的に翻訳されたＶＢＡＳＥ塩基配列に対して、それら配列を比較する。

【０１０３】
同一とは、全長配列で、抗体配列とタンパク質データベース間での実際のアミノ酸一致である。陽性（同一＋代替的一致）は同一でなく、ＢＬＯＳＵＭ６２置換行列によって誘導された代替アミノ酸である。抗体配列が同じ同一性で２つのデータベース配列に一致する場合には、最も陽性であるヒットが一致配列ヒットであると決定される。

【０１０４】
本発明の抗体における使用に好適なフレームワーク配列は、本発明の選択抗体によって使用されたフレームワーク配列に構造的に類似するものであり、例えば、本発明の好適なモノクローナル抗体において用いられたV_H１－２４フレームワーク配列（配列番号：４１）および／またはV_H３－７フレームワーク配列（配列番号：４２）および／またはV_KＬ１８フレームワーク配列（配列番号：４３）に類似である。V_H ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列およびV_K ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系列イムノグロブリン遺伝子に認められるものと同一の配列を有するフレームワーク領域に移植でき、または当該ＣＤＲ配列は、当該生殖細胞系列配列と比較して１つ以上の変異を含むフレームワーク領域に移植できる。例えば、ある場合において、フレームワーク領域内部の残基を変異させ、当該抗体の抗原結合能力を保持するかまたは増強することが有益であることが見出されている（例えば、Ｑｕｅｅｎらの米国特許５，５３０，１０１；５，５８５，０８９；５，６９３，７６２および６，１８０、，３７０を参照）。

【０１０５】
別のタイプの可変領域の修飾としては、V_Hおよび／またはV_K ＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３領域内部のアミノ酸残基を変異させ、それによって問題の抗体の１つ以上の結合性質を改善させることである。部位特異的変異またはＰＣＲ媒介性変異を実施して変異を導入でき、抗体結合または問題の他の機能的性質に及ぼす効果を、ここに記載し、実施例で提示されるインビトロまたはインビボアッセイで評価できる。好適には、（上記したような）保存的修飾を導入する。当該変異は、アミノ酸置換、付加または欠失であるが、好適には置換である。さらに、典型的には、ＣＤＲ領域内の１個以下、２個以下、３個以下、４個以下または５個以下の残基を改変する。

【０１０６】
したがって、別の態様において、本開示は、（ａ）配列番号：９、１０、１１および１２から構成される群から選択されたアミノ酸配列または配列番号９、１０、１１および１

２と比較して１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_H　ＣＤＲ１領域、（ｂ）配列番号：１３、１４、１５および１６から構成される群から選択されたアミノ酸配列または配列番号：１３、１４、１５および１６と比較して１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_H　ＣＤＲ２領域、（ｃ）配列番号：１７、１８、１９および２０から構成される群から選択されたアミノ酸配列または配列番号：１７、１８、１９および２０と比較して１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_H　ＣＤＲ３領域、（ｄ）配列番号：２１、２２、２３および２４から構成される群から選択されたアミノ酸配列または配列番号：２１、２２、２３および２４と比較して１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_K　ＣＤＲ１領域、（ｅ）配列番号：２５、２６、２７および２８から構成される群から選択されたアミノ酸配列または配列番号：２５、２６、２７および２８と比較して１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_K　ＣＤＲ２領域；および（ｆ）配列番号：２９、３０、３１および３２から構成される群から選択されたアミノ酸配列または配列番号：２９、３０、３１および３２と比較して１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_K　ＣＤＲ３領域を含む重鎖可変領域を含む単離抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【０１０７】

工学的に作製された本発明の抗体には、例えば、抗体の性質を改良するためにV_Hおよび／またはV_K内部のフレームワーク残基に修飾を行ったものを含む。典型的には、このようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減ずるために行われる。例えば、ひとつの手法は、生殖細胞系列配列に対応する１個以上のフレームワーク残基を“バック変異”させる。さらに詳細には、体細胞変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖細胞系列配列と異なるフレームワーク残基を含むことができる。このような残基は、抗体が由来する生殖細胞系列配列に対して抗体フレームワーク配列を比較することによって識別できる。

【０１０８】

別の例にあるように、例えば、２Ａ５について、V_Hのアミノ酸残基＃１（ＦＲ１内部）はグルタミン（配列番号：４）であるが、一方、対応するV_H３－７生殖細胞系列配列におけるこの残基はグルタミン酸（配列番号：４２）である。フレームワーク領域配列をそれらの生殖細胞系列配置に戻すため、例えば、２Ａ５のV_HのＦＲ１中の残基＃１は、グルタミンからグルタミン酸に“バック変異”させることができる。そのような“バック変異”抗体は、本発明に伴うものでもある。

【０１０９】

別の例にあるように、例えば、２Ａ５について、V_Hのアミノ酸残基＃６（ＦＲ１内部）はグルタミン（配列番号４）であるが、一方、対応するV_H３－７生殖細胞系列配列におけるこの残基はグルタミン酸（配列番号４２）である。フレームワーク領域配列をそれらの生殖細胞系列配置に戻すため、例えば、２Ａ５のV_HのＦＲ１中の残基＃６は、グルタミンからグルタミン酸に“バック変異”させることができる。そのような“バック変異”抗体は、本発明に伴うものでもある。

【０１１０】

例えば、下記の表１は、重鎖親生殖細胞系列配列と異なる抗ＳＤＦ－１抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のフレームワーク領域中におけるアミノ酸変化数を示している。フレームワーク領域配列中の１個以上のアミノ酸残基をそれらの生殖細胞系列配置に戻すため、体細胞変異を、例えば、部位特異的変異誘発またはＰＣＲ媒介性変異誘発によって、生殖細胞系列配列に“バック変異”させることができる。

【０１１１】

例えば、下記の表２は、軽鎖親生殖細胞系列配列と異なる抗ＳＤＦ－１抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５のフレームワーク領域中におけるアミノ酸変化数を示している。フレームワーク領域配列中の１個以上のアミノ酸残基をそれらの生殖細胞系列配置に戻

すため、体細胞変異を、例えば、部位特異的変異誘発またはＰＣＲ媒介性変異誘発によって、生殖細胞系列配列に“バック変異”させることができる。

【０１１２】

親生殖細胞系列V_H１－２４（配列番号：４１）配列に対する１Ｄ３および１Ｈ２のV_H領域の配置を図６に示す。親生殖細胞系列V_H３－７（配列番号：４２）配列に対する１Ｃ６および２Ａ５のV_H領域の配置を図７に示す。親生殖細胞系列V_kＬ１８（配列番号：４３）配列に対する１Ｄ３および１Ｈ２のV_k領域の配置を図７に示す。親生殖細胞系列V_kＬ１８（配列番号：４３）配列に対する１Ｃ６および２Ａ５のV_k領域の配置を図８に示す

【表１】

表１　重鎖生殖細胞系列配置からの抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５の修飾

抗SDF-1抗体	ｱﾐﾉ酸位置	抗体のｱﾐﾉ酸	生殖細胞系列配置のもとのｱﾐﾉ酸
1D3	1	E	Q
	84	T	S
1H2	29	F	L
	117	M	T
1C6	9	R	G
2A5	1	Q	E
	6	Q	E

【表２】

表２　軽鎖生殖細胞系列配置からの抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５の修飾

抗SDF-1抗体	ｱﾐﾉ酸位置	抗体のｱﾐﾉ酸	生殖細胞系列配置のもとのｱﾐﾉ酸
1D3	1	E	A
	3	V	Q
1H2	1	E	A
	3	V	Q
1C6	3	R	Q
	4	M	L
	11	V	L
	39	T	K
2A5	1	D	A
	4	M	L
	5	I	T

【０１１３】

別のタイプのフレームワーク修飾は、当該フレームワーク領域内部またはさらに１個以上のＣＤＲ領域内部の１個以上の残基を変異させ、Ｔ細胞エピトープを除去し、それによって抗体の潜在的免疫原性を低下させることも包含する。この手法は“脱免疫”とも称され、さらに詳細には、Ｃａｒｒらによる米国特許公報２００３０１５３０４３に記載されている。

【０１１４】

フレームワークまたはＣＤＲ領域内部に作製された修飾に加えて、またはそれとは別に、本発明の抗体を工学的に処理し、そのＦｃ領域内部に修飾を行い、典型的には、血清半減期、補体固定、Ｆｃレセプター結合および／または抗原依存性細胞傷害性のような１個以上の抗体の機能的特徴を改変する。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾でき（例えば、１個以上の化学成分を当該抗体に付加できる）、または修飾してそのグリコシル化を改変させ、また、抗体の１個以上の機能的特徴を改変させることもできる。これらのそれぞれの態様を、さらに下記で詳細に説明する。Ｆｃ領域中の残基数は、ＫａｂａｔのＥＵインデックスの数字である。

【０１１５】

一つの態様において、ヒンジ領域中のシステイン残基数を、例えば、増加させるかまたは低下させるなど改変させるように、ＣＨ１のヒンジ領域を修飾する。この手法は、さらにＢｏｄｍｅｒらの米国特許５，６７７，４２５に記載されている。ＣＨ１のヒンジ領域中のシステイン残基数を改変し、例えば、軽鎖および重鎖の集合を促進させるかまたは抗体安定性を増すかあるいは減じる。

【０１１６】

別の態様において、抗体の生物学的半減期を短くするため、抗体のＦｃヒンジ領域を変異させる。さらに詳細には、抗体が天然のＦｃヒンジドメインＳｐＡ結合に比較して不完全なブドウ球菌タンパク質Ａ（ＳｐＡ）結合を持つように、１個以上のアミノ酸変異をＦｃヒンジ断片のＣＨ２－ＣＨ３ドメイン界面領域に導入する。この手法は、さらにＷａｒｄらの米国特許６，１６５，７４５に詳細に記載されている。

【０１１７】

別の態様において、当該抗体を修飾して、その生物学的半減期を長くする。様々な手法が可能である。例えば、１個以上の下記の変異：Ｗａｒｄの米国特許６，２７７，３７５に記載のようなＴ２５２Ｌ、Ｔ２５４Ｓ、Ｔ２５６Ｆを導入できる。これとは別に、Ｐｒｅｓｔａらの米国特許５，８６９，０４６および６，１２１，０２２に記載されているとおり、生物学的半減期を長くするため、ＣＨ１またはC_L領域内部で抗体を改変し、ＩｇＧのＦｃ領域のＣＨ２ドメインの２個のループから取ったサルベージレセプター結合エピトープを含ませる。

【０１１８】

さらに他の態様において、Ｆｃ領域を、少なくとも１個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによって改変し、抗体のエフェクター機能を改変する。例えば、アミノ酸残基２３４、２３５、２３６、２３７、２９７、３１８、３２０および３２２から選択した１個以上のアミノ酸を、抗体がエフェクターリガンドに対して改変された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能は保持するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性を改変したエフェクターリガンドは、例えば、Ｆｃレセプターまたは補体のＣ１成分であってもよい。この手法は、さらに両者ともにＷｉｎｔｅｒらの米国特許５，６２４，８２１および５，６４８，２６０に詳細に記載されている。

【０１１９】

別の態様において、アミノ酸残基３２９、３３１および３２２から選択した１個以上のアミノ酸を、抗体が改変されたＣ１ｑ結合および／または低下若しくは停止した補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を有するように異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。この手法は、さらに詳細に、Ｉｄｕｓｏｇｉｅらの米国特許６，１９４，５５１に記載されている。

【０１２０】

別の例において、アミノ酸位置２３１および２３９内部の１個以上のアミノ酸残基を改変し、それによって抗体の補体固定能力を改変する。この手法は、さらに詳細に、ＢｏｄｍｅｒらのＰＣＴ公報ＷＯ９４／２９３５１に記載されている。

【０１２１】

さらに別の例において、Ｆｃ領域を修飾して、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を媒介する抗体の能力を増加させるかおよび／または下記の２３８、２３９、２４８、２４９、

２５２、２５４、２５５、２５６、２５８、２６５、２６７、２６８、２６９、２７０、２７２、２７６、２７８、２８０、２８３、２８５、２８６、２８９、２９０、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９８、３０１、３０３、３０５、３０７、３０９、３１２、３１５、３２０、３２２、３２４、３２６、３２７、３２９、３３０、３３１、３３３、３３４、３３５、３３７、３３８、３４０、３６０、３７３、３７６、３７８、３８２、３８８、３８９、３９８、４１４、４１６、４１９、４３０、４３４、４３５、４３７、４３８または４３９の位置にある１個以上のアミノ酸を修飾することによって、Ｆｃγレセプターに対する抗体の親和性を増加させる。この手法は、Ｐｒｅｓｔａにより、ＰＣＴ公報ＷＯ００／４２０７２にさらに説明されている。さらに、ヒトＩｇＧ１上のＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、ＦｃγＲＩＩＩおよびＦｃＲｎに対する結合部位はマップに示されており、改良された結合を有する改変体も記載されている（Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｒ．Ｌ．ら（２００１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２７６：６５９１－６６０４を参照）。２５６、２９０、２９８、３３３、３３４および３３９の位置における特異的変異がＦｃγＲＩＩＩに対する結合を改善することが示されている。さらに、下記のＴ２５６Ａ／Ｓ２９８Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｋ２２４AおよびＳ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａの組み合わせ変異体がＦｃγＲＩＩＩ結合を改善することが示されている。

【０１２２】

さらに別の態様において、抗体をグリコシル化修飾する。例えば、非グリコシル化抗体を作製できる（すなわち、当該抗体はグリコシル化を欠いている）。グリコシル化改変は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を高めることができる。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内部の１個以上のグリコシル化部位を改変することによって達成できる。例えば、１個以上のアミノ酸置換を作製し、その結果、１個以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位を消失させ、それによってその部位でのグリコシル化を消失させる。このような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高めることができる。このような手法は、さらに詳細に、Ｃｏらによる米国特許５，７１４，３５０および６，３５０，８６１に記載されている。

【０１２３】

さらにまたはこれとは別に、フコシル残基量が少ない低フコシル化抗体または二分性ＧｌｃＮａｃ構造が増加した抗体のような改変されたタイプのグリコシル化を有する抗体を作製できる。このような改変グリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能力を高めることが明らかになっている。このような炭水化物修飾は、例えば、改変グリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることによって達成できる。改変グリコシル化機構を有する細胞は先行技術で説明されており、本発明の組み換え抗体を発現させる宿主細胞として使用し、それによって改変グリコシル化を有する抗体を産生させる。例えば、細胞株Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５およびＭｓ７０９は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８α（１，６）フコシルトランスフェラーゼを欠失しており、ＭＳ７０４、Ｍｓ７０５およびＭｓ７０９細胞株で発現した抗体がそれら炭水化物上にフコースを欠失している。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５およびＭｓ７０９のＦＵＴ８$^{-/-}$細胞株は、２つのリプレイスメントベクター（Ｙａｍａｎｅらによる米国特許公報２００４０１１０７０４およびＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉら（２００４）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｂｉｏｅｎｇ　８７：６１４－２２を参照）を用いて、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞中でＦＵＴ８遺伝子を標的破壊することによって作製した。別の例として、ＨａｎａｉらによるＥＰ１，１７６，１９５は、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株を記載しおり、その遺伝子はフコシルトランスフェラーゼをコードしており、このような細胞株中で発現した抗体は、α　１，６結合関連酵素の減少または消失によって低フコシル化を示している。Ｈａｎａｉらは、抗体のＦｃ領域に結合するかまたはその酵素活性を有していないＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加する酵素活性が低い細胞株、例えば、ラット骨髄細胞株ＹＢ２／０（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６６２）についても述べている。ＰｒｅｓｔａによるＰＣＴ公報ＷＯ０３／０３５８３５には、フコースをＡｓｎ（２９７）結合炭水化物に結合させる能力が低下

しており、その結果、その宿主細胞中で発現した抗体のフコシル化が低下することになる様々なＣＨＯ細胞やＬｅｃ１３細胞について記載されている（同様に、Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｒ．Ｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－２６７４０を参照）。ＵｍａｎａらによるＰＣＴ公報ＷＯ９９／５４３４２は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ）を発現するように工学的に作製した細胞株を記載しており、この工学的に作製した細胞株中で発現した抗体は二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示し、その結果、抗体のＡＤＣＣ活性が増加することになる（同様に、Ｕｍａｎａら（１９９９）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．　１７：１７６－１８０参照）。これとは別に、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を用いて切断除去することができる。例えば、フコシダーゼ　α－Ｌ－フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を除去する（Ｔａｒｅｎｔｉｎｏ，Ａ．Ｌ．ら（１９７５）Ｂｉｏｃｈｅｍ．　１４：５５１６－２３）。

【０１２４】

本発明で検討した抗体の別の修飾は、ＰＥＧ化である。抗体をＰＥＧ化し、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清中）半減期を長くすることができる。抗体をＰＥＧ化するため、通常、抗体またはその断片を、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体のようなポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と、１個以上のＰＥＧ基が抗体または抗体断片に結合するようになる条件化で反応させる。好適には、ＰＥＧ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応により、実施する。ここでは、用語“ポリエチレングリコール”とは、モノ（Ｃ１－Ｃ１０）アルコキシ－またはアリルオキシ－ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール－マレイミドのような他のタンパク質を誘導体化するために用いるいかなる形状のＰＥＧをも含むものとする。ある態様において、ＰＥＧ化される抗体は非グリコシレーションされた抗体である。タンパク質ＰＥＧ化方法は、当該技術により公知であり、本発明の抗体にも適用できる。例えば、ＮｉｓｈｉｍｕｒａらによるＥＰ０１５４３１６およびＩｓｈｉｋａｗａらによるＥＰ０４０１３８４が参照できる。

【０１２５】

抗体の物理的特徴

本発明の抗体は、抗ＳＤＦ－１抗体の様々な物理的特徴によってさらに特徴付けすることができる。それら物理的特徴に基づく抗体の検出および／または相違するクラスを分類するために様々なアッセイが使用される。

【０１２６】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、軽鎖または重鎖可変領域何れかにおける一以上のグリコシル化部位を含んでいてもよい。可変領域における一以上のグリコシル化部位の存在は、抗体の抗原性の増加、変化する抗原結合による抗体のｐＫの変化をもたらすかもしれない（Ｍａｒｓｈａｌｌ　ｅｔ　ａｌ（１９７２）Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　４１：６７３－７０２；Ｇａｌａ　ＦＡ　ａｎｄ　Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ＳＬ（２００４）Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１７２：５４８９－９４；Ｗａｌｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ（１９８８）Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　１６８：１０９９－１０９；Ｓｐｉｒｏ　ＲＧ（２００２）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１２：４３Ｒ－５６Ｒ；Ｐａｒｅｋｈ　ｅｔ　ａｌ（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ　３１６：４５２－７；Ｍｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　３７：６９７－７０６）。グリコシル化は、Ｎ－Ｘ－Ｓ／Ｔ配列を含むモチーフで起こることが知られている。可変領域におけるグリコシル化は、グリコブロットアッセイで試験でき、同アッセイは、抗体を分解してＦａｂを産生させ、過ヨウ素酸酸化とシック塩基形成を測定するアッセイでグリコシル化を試験する方法である。あるいは、可変領域のグリコシル化は、Ｄｉｏｎｅｘ光クロマトグラフィー（Ｄｉｏｎｅｘ－ＬＣ）で試験することができ、同法は、Ｆａｂからサッカライドを分解してモノサッカライドを生成させ、個々のサッカライド量を分析する方法である。いくつかの例において、可変領域グリコシル化を含まない抗ＳＤＦ－１抗体を有することは好ましい。これは、可変領域におけるグリコシル化モチーフを含まな

い抗体を選択する、あるいは先行技術でよく知られている標準的技術でグリコシル化モチーフ内の残基を変異させることのいずれかによって達成できる。

【０１２７】

好ましい態様として、本発明の抗体はアスパラギン異性化部位を含まない。脱アミドあるいはイソアスパラギン酸効果は、Ｎ－ＧまたはＤ－Ｇ配列でそれぞれ生じるかもしれない。脱アミドあるいはイソアスパラギン酸効果は、イソアスパラギン酸を生成させ、主鎖よりもむしろＣ末端側鎖にねじれ構造を生じさせることによって抗体の安定性を減少させる。イソアスパラギン酸の生成は、イソークワントアッセイで分析することができ、同法は逆相ＨＰＬＣを用いて、イソアスパラギン酸を試験することができる。

【０１２８】

それぞれの抗体には、特異的な等電点（ｐＩ）があるが、一般的には、６から９．５のｐＨ範囲内となる。ＩｇＧ１抗体のｐＩは、典型的には、７～９．５のｐＨ範囲内であり、ＩｇＧ４抗体のｐＩは、典型的には、６～８のｐＨ範囲内である。この範囲外のｐＩを持つ抗体もあるかもしれない。一般的にはその効果は不明であるが、一般的な範囲外のｐＩを持つ抗体はインビボ下ではホールディングされず、不安定であるかもしれないと推測される。等電点は、キャピラリー等電点電気泳動アッセイで試験することができ、同法では、ｐＨ勾配を作り、精度を上げるためにレーザー集束を用いられる（Ｊａｎｉｎｉ ｅｔ ａｌ（２００２） Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ ２３：１６０５－１１；Ｍａ ｅｔ ａｌ．（２００１） Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｉａ ５３：Ｓ７５－８９； Ｈｕｎｔ ｅｔ ａｌ（１９９８） Ｊ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ａ ８００：３５５－６７）。いくつかの例において、通常の範囲内のｐＩ値を持つ抗ＳＤＦ－１抗体を有することは好ましい。これは、通常の範囲内のｐＩをもつ抗体を選択する、あるいは先行技術でよく知られている標準的技術で荷電表面残基を変異させることのいずれかによって達成できる

それぞれの抗体は、熱安定性の指標である融解温度を持つ（Ｋｒｉｓｈｎａｍｕｒｔｈｙ Ｒ ａｎｄ Ｍａｎｎｉｎｇ ＭＣ （２００２） Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３：３６１－７１）。高い熱安定性は、インビボでのより強い全般的な抗体の安定性を示す。抗体の融解点は、示差走査熱量測定のような技術で測定することができる（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ（２００３） Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ ２０：１９５２－６０；Ｇｈｉｒｌａｎｄｏ ｅｔ ａｌ（１９９９） Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ ６８：４７－５２）。T_{M1}は、初期アンフォールディング温度を示す。T_{M2}は 完全アンフォールディング温度を示す。一般的に、本発明の抗体のT_{M1}は、６０℃より高く、好ましくは６５℃より高く、さらにより好ましくは７０℃よりも高いことが好ましい。あるいは、抗体の熱安定性は、円偏光二色性法で測定できる（Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ．（２００２） Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ｓｃｉ ４０：３４３－９）。

【０１２９】

好ましい態様として、抗体は、急速に劣化しないものが選択される。抗ＳＤＦ－１抗体の断片化は、先行技術においてよく理解されているように、キャピラリー電気泳導法（ＣＥ）やＭＡＬＤＩ－ＭＳで分析することができる（Ａｌｅｘａｎｄｅｒ ＡＪ ａｎｄ Ｈｕｇｈｅｓ ＤＥ （１９９５） Ａｎａｌ Ｃｈｅｍ ６７：３６２６－３２）。

【０１３０】

別の好ましい態様において、抗体は、最小の凝集効果を持つものが選択される。凝集は、望ましくない免疫反応を誘発および／または変動もしくは好ましくない薬理学的動態特性を誘導するかもしれない。一般的に、抗体は２５％以下、好ましくは２０％以下、さらにより好ましくは１５％以下、さらにより好ましくは１０％以下、さらにより好ましくは５％以下の凝集が許容される。凝集は、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）および単量体、二量体、三量体または多量体を同定する光散乱を含むいくつかのよく周知の技術により測定できる。

【０１３１】

抗体の工学的処理方法

上記したように、ここに開示したV_HおよびV_K配列を有する抗ＳＤＦ－１抗体を用いて、V_Hおよび／またはV_K配列またはそれに結合した定常領域を修飾することによって、新しい抗ＳＤＦ－１抗体を作製できる。したがって、本発明の別の面において、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体の構造的特徴、例えば、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５を用いて、ヒトＳＤＦ－１に対する結合のような本発明の抗体の少なくとも一つの機能的特徴を保持する構造的に関連した抗ＳＤＦ－１抗体を作製できる。例えば、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５またはその変異体の１個以上のＣＤＲ領域を公知のフレームワーク領域および／または他のＣＤＲと組み換えで組み合わせて、付加的な組み換え工学で作製された本発明の抗ＳＤＦ－１抗体を上述のように作製できる。他の修飾タイプには、前章で述べたものが含まれる。工学的方法の出発物質は、ここで提供した１個以上のV_Hおよび／またはV_K配列またはその１個以上のＣＤＲ領域である。工学的抗体を作製するために、V_Hおよび／またはV_K配列の１個以上またはその１個以上のＣＤＲ領域を有する抗体を実際に調製（すなわち、タンパク質として発現させる）する必要はない。むしろ、配列に含まれる情報を出発物質として用いて、当初の配列に由来する“第二世代”配列を作製し、次に、この“第二世代”配列をタンパク質として調製し発現させる。

【０１３２】

したがって、別の態様において、本発明は、

（ａ）（ｉ）配列番号：９、１０、１１および１２から構成される群から選択したＣＤＲ１配列、配列番号：１３、１４、１５および１６から構成される群から選択したＣＤＲ２配列および／または配列番号：１７、１８、１９および２０から構成される群から選択したＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域抗体配列、および／または（ｉｉ）配列番号：２１、２２、２３および２４から構成される群から選択したＣＤＲ１配列、配列番号：２５、２６、２７および２８から構成される群から選択したＣＤＲ２配列、および／または配列番号：２９、３０、３１および３２から構成される群から選択したＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域抗体配列を提供すること、

（ｂ）重鎖可変領域抗体配列および／または軽鎖可変領域抗体配列内部の少なくとも１個のアミノ酸残基を改変し、少なくとも１個の改変抗体配列を作製すること；および

（ｃ）当該改変抗体配列をタンパク質として発現させることを含む抗ＳＤＦ－１抗体を調製する方法を提供する。

【０１３３】

標準的な分子生物学的技術を用いて、改変抗体配列を調製および発現できる。

【０１３４】

好適には、改変抗体配列によってコードされた抗体は、ここに記載した抗ＳＤＦ－１抗体の機能的特徴の一つ、一部または全てを保持するものであり、その機能的特徴には下記が含まれるが、それらに限定されない。

【０１３５】

（ａ）K_Dが1×10^{-7}Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する；

（ｂ）免疫沈降アッセイにより、天然型ヒトＳＤＦ－１に結合する；

（ｃ）ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１の結合を阻害する；

（ｄ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１によるカルシウム流入を阻害する；

（ｅ）ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１による遊走を阻害する；あるいは

（ｆ）ＨｕＶＥＣ細胞での毛細血管形成を阻害する。

【０１３６】

改変抗体の機能的特徴は、先行技術で利用可能でおよび／またはここに記載した標準的アッセイ、例えば、実施例に記載されたもの（例えば、フローサイトメトリー、結合アッセイ）を用いて評価できる。

【０１３７】

本発明の抗体を工学的に作製する方法のある態様において、抗ＳＤＦ－１抗体コード配列の全体または一部に沿ってランダムにまたは選択的に変異を導入でき、生成した修飾抗ＳＤＦ－１抗体について、ここに記載したような結合活性および／または他の機能的特徴

をスクリーニングできる。変異方法は先行技術に記載されている。例えば、Ｓｈｏｒｔの ＰＣＴ公報ＷＯ０２／０９２７８０は、飽和突然変異法、合成ライゲーション連結法または それらの組み合わせを用いて抗体変異を作製し、スクリーニングする方法を記載している。これとは別に、ＬａｚａｒらによるＰＣＴ公報ＷＯ０３／０７４６７９は、抗体の物理化学的性質を最適化するため、コンピュータによりスクリーニングする方法を用いる方法を記載している。

【０１３８】

本発明の抗体をコードする核酸分子

本発明の別の面は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、細胞全体に、細胞溶解物にまたは部分精製もしくは実質的に純粋な形状で存在できる。核酸は、アルカリ／ＳＤＳ処理、ＣｓＣｌ結合、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動およびその他当該技術の周知の方法を含む標準的技術によって、例えば、他の細胞性核酸またはタンパク質のような他の細胞性成分または他の夾雑物から精製して取り出す際に“単離される”かまたは“実質的に純粋にされる”。Ｆ．Ａｕｓｕｂｅｌら（１９８７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照。本発明の核酸は、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡであってもよく、イントロン配列を含んでいてもよいし、含まなくてもよい。好適な態様において、当該核酸はｃＤＮＡ分子である。

【０１３９】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学的技術を用いて得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、さらに下記で説明するようなヒトイムノグロブリン遺伝子を有する形質転換マウスから調製したハイブリドーマ）発現抗体の場合には、ハイブリドーマ作製抗体の軽鎖および重鎖をコードするｃＤＮＡは、標準的ＰＣＲ増幅法またはｃＤＮＡクローニング技術によって得ることができる。イムノグロブリン遺伝子ライブラリーから（例えば、ファージディスプレイ技術を用いて）得られた抗体の場合には、抗体をコードする核酸をライブラリーから回収できる。

【０１４０】

本発明の好適な核酸分子は、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５モノクローナル抗体のV_HおよびV_L配列をコードするものである。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５のV_H配列をコードするＤＮＡ配列は、それぞれ配列番号：３３、３４、３５および３６で示される。１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５のV_L配列をコードするＤＮＡ配列は、それぞれ配列番号：３７、３８、３９および４０に示されている。

【０１４１】

本発明の他の好ましい核酸は、配列番号：３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９および４０で示される配列の一つに対して、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性のような、少なくとも８０％の配列同一性を持つ核酸であり、同核酸は本発明の抗体もしくはその抗原結合部分をコードする。

【０１４２】

二つの核酸配列間の同一性％は、ギャップの数やそれぞれのギャップの長さを考慮に入れてヌクレオチドが同一である配列中の位置の数であり、二つの配列が最適に配置されるよう導入される必要がある。配列の比較と二つの配列間の同一性％の決定は、ＭｅｙｅｒｓとＭｉｌｌｅｒのアルゴリズムもしくは前記のＡｌｔｓｃｈｕｌのＸＢＬＡＳＴプログラムのような数学的アルゴリズムで達成できる。

【０１４３】

また、さらに、本発明の好ましい核酸は、配列番号：３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９および４０で示される核酸配列の一以上のＣＤＲコード部分からなる。この態様において、その核酸は、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３または１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５の軽鎖ＣＤＲ１、

ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３をコードしていてもよい。

【０１４４】

配列番号：３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９および４０のそのようなＣＤＲコード部位と、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％のような少なくとも８０％の配列同一性をもつ核酸も、本発明の核酸として好ましい。そのような核酸は、非ＣＤＲコード領域および／またはＣＤＲコード領域における配列番号：３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９および４０に対応する部位と異なっていてもよい。その相違がＣＤＲコード領域にあるとき、その核酸によってコードされる核酸ＣＤＲ領域は、典型的には、１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６または２Ａ５の対応するＣＤＲ配列と比較して、ここに定義される一以上の保存的配列の修飾を含む。

【０１４５】

V_HおよびV_L部分をコードするＤＮＡ断片が一旦得られると、これらのＤＮＡ断片は、さらに、標準的な組み換えＤＮＡ技術によって処理され、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂ断片遺伝子またはｓｃＦｖ遺伝子に変換できる。これらの操作において、V_LまたはV_HをコードするＤＮＡ断片は、抗体定常領域または可動性リンカーのような別のタンパク質をコードする別のＤＮＡ断片に適切に作用するように連結させる。ここで使われる用語「適切に作用するように連結する」とは、２つのＤＮＡ断片が、この２つのＤＮＡ断片でコードされるアミノ酸配列がインフレームの状態で結合することを意味する。

【０１４６】

V_H領域をコードする単離ＤＮＡは、重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子にV_HをコードするＤＮＡを適切に作用するように連結されることによって全長重鎖遺伝子に変換できる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術において公知であり（例えば、Ｋａｂａｔ、Ｅ．Ａ．ら（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版、米国保健・保健省、ＮＩＨ発行、第９１－３２４２号を参照）、これらの領域を含むＤＮＡ断片は、標準的ＰＣＲ増幅法で得られる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはＩｇＤ定常領域であってもよいが、最も好適には、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４定常領域である。Ｆａｂ断片重鎖遺伝子について、V_HをコードするＤＮＡは、重鎖ＣＨ１定常領域のみをコードする別のＤＮＡ分子に適切に作用するように連結できる。

【０１４７】

V_L領域をコードする単離ＤＮＡは、軽鎖定常領域ＣＬをコードする別のＤＮＡ分子にV_LをコードするＤＮＡを適切に作用するように連結されることによって、全長軽鎖遺伝子（ならびにＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換できる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術において公知であり（例えば、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ら（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版、米国保健・保健省、ＮＩＨ発行、第９１－３２４２号を参照）、これらの領域を網羅するＤＮＡ断片は、標準的ＰＣＲ増幅法によって得ることができる。好ましい態様において、軽鎖定常領域は、κまたはλ定常領域である。

【０１４８】

ｓｃＦｖ遺伝子を作製のため、V_HおよびV_LをコードするＤＮＡ断片は、例えば、アミノ酸配列$(Gly_4-Ser)_3$（配列番号：５１）をコードする可動性リンカーをコードする別の断片に適切に作用するように連結させ、V_HおよびV_L配列を連続的な一重鎖タンパク質として発現できるようにし、V_LおよびV_H領域はこの可動性リンカーで結合されている（例えば、Ｂｉｒｄら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６、Ｈｕｓｔｏｎら（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ． ＵＳＡ ８５、５８７９－５８８３；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５４参照）。

【０１４９】
本発明のモノクローナル抗体作製
本発明のモノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）は、例えば、ＫｏｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術のような従来のモノクローナル抗体方法を含む様々な手法によって作製できる。体細胞ハイブリダイゼーション操作が好適であるが、原則的には、モノクローナル抗体作製のための他の技術として、例えば、Ｂリンパ細胞のウイルス性または癌性形質転換を用いることができる。
【０１５０】
ハイブリドーマ調製のための好適な動物はマウスである。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、非常に確立された操作である。免疫化プロトコールおよび免疫した融合用脾臓細胞単離のための技術は、当該技術において公知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄細胞）および融合操作も公知である。
【０１５１】
本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製した非ヒトモノクローナル抗体配列に基づき調製できる。重鎖および軽鎖イムノグロブリンをコードするＤＮＡは、標準的な生物学的技術を用いて、問題の非ヒトハイブリドーマから得ることができ、非マウス（例えば、ヒト）イムノグロブリン配列を含むよう工学的に作製できる。例えば、キメラ抗体を作製するため、当該技術において公知の方法を用いて、マウス可変領域をヒト定常領域に連結させることができる（例えば、Ｃａｂｉｌｌｙらの米国特許４，８１６，５６７）。ヒト化抗体を作製するため、当該技術において公知の方法を用いて、マウスＣＤＲ領域をヒトフレームワークに挿入できる（例えば、Ｗｉｎｔｅｒの米国特許５，２２５，５３９および米国特許５，５３０，１０１、Ｑｕｅｅｎらの米国特許５，５８５，０８９および６，１８０，３７０を参照）。
【０１５２】
好適な態様において、本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。ＳＤＦ－１に対して作製されたヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりはむしろヒト免疫系部分を含む形質転換またはトランス染色体マウスを用いて産生させることができる。これらの形質転換およびトランス染色体マウスには、ここで、ＨｕＭＡｂマウスおよびＫＭマウス（商標）とそれぞれ称したマウスが含まれ、本文で“ヒトＩｇマウス”と総称する。
【０１５３】
ＨｕＭＡｂ Ｍｏｕｓｅ（登録商標）（Ｍｅｄａｒｅｘ社）は、内因性μおよびκ鎖座（例えば、Ｌｏｎｂｅｒｇら（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ ３６８（６４７４）：８５６－８５９）を不活性化する標的変異とともに、非再配置ヒト重鎖（μおよびκ）およびκ軽鎖イムノグロブリン配列をコードするヒトイムノグロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含む。したがって、当該マウスは、マウスＩｇＭまたはκ発現低下を示し、免疫化に応答して、導入したヒト重鎖および軽鎖トランスジーンがクラススイッチングと体細胞変異を受け、高親和性のヒトＩｇＧκモノクローナルを産生する（Ｌｏｎｂｅｒｇ、Ｎ．ら（１９９４）同上；Ｌｏｎｂｅｒｇ、Ｎ．（１９９４）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ １１３：４９－１０１中でレビュー、Ｌｏｂｅｒｇ，Ｎ．およびＨｕｓｚａｒ，Ｄ．（１９９５）Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３およびＨａｒｄｉｎｇ，Ｆ．およびＬｏｎｂｅｒｇ，Ｎ．（１９９５）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７６４：５３６－５４６）。ＨｕＭａｂ Ｍｏｕｓｅ（登録商標）の調製とその使用およびこのようなマウスが有するゲノム修飾は、さらに、Ｔａｉｌｏｒ，Ｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０：３２８７－６２９５、Ｃｈｅｎ，Ｊ．ら（１９９３）Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５：６４７－６５６、Ｔｕａｉｌｌｏｎら（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：３７２０－３７２４、Ｃｈｏｉら（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４：１１７－１２３、Ｃｈｅｎ，Ｊ．ら（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ．１２：８２１－８３０、Ｔｕａｉｌｌｏｎら（１９９４）

Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１５２：２９１２－２９２０、Ｔａｙｌｏｒ，Ｌ．ら（１９９４）Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　６：５７９－５９１、およびＦｉｓｈｗｉｌｄ，Ｄ．ら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：８４５－８５１に記載されており、それらの全ての内容は、ここに、特に断ってその全文を参考として引用している。さらに、米国特許５，５４５，８０６、５，５６９，８２５、５，６２５，１２６、５，６３３，４２５、５，７８９，６５０、５，８７７，３９７、５，６６１，０１６、５，８１４，３１８、５，８７４，２９９および５，７７０，４２９を参照、全てＬｏｎｂｅｒｇとＫａｙによる、Ｓｕｒａｎｉらの米国特許５，５４５，８０７、ＬｏｎｂｅｒｇおよびＫａｙのＰＣＴ公報ＷＯ９２／０３９１８、ＷＯ９３／１２２２７、ＷＯ　９４／２５５８５、ＷＯ９７／１３８５２、ＷＯ９８／２４８８４およびＷＯ９９／４５９６２、およびＫｏｒｍａｎらのＰＣＴ公報ＷＯ０１／１４４２４を参照。

【０１５４】

別の態様において、本発明のヒト抗体は、ヒト重鎖トランスジーンとヒト軽鎖トランス染色体を有するマウスのようなトランスジーンおよびトランス染色体上にヒトイムノグロブリン配列を有するマウスを用いて作製できる。本文でこのようなマウスを“ＫＭマウス（商標）”と称し、ＩｓｈｉｄａらのＰＣＴ公報ＷＯ０２／４３４７８に詳細に記載されている。

【０１５５】

またさらに、ヒトイムノグロブリン遺伝子を発現する別の形質転換動物システムは公知技術により利用可能であり、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体を作製するために使用できる。例えば、ゼノマウス（Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ）（Ａｂｇｅｎｉｘ社）と称されている別の形質転換系も用いることができ、このようなマウスは、例えば、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉらの米国特許５，９３９，５９８、６，０７５，１８１、６，１１４，５９８、６，１５０，５８４および６，１６２，９６３に記載されている。

【０１５６】

さらに、ヒトイムノグロブリン遺伝子を発現する別の形質転換動物システムは公知技術により利用可能であり、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体を作製するために使用できる。例えば、“Ｔｃマウス”と称されているヒト重鎖トランス染色体とヒト軽鎖トランス染色体を両者ともに有するマウスも使用でき、このようなマウスは、Ｔｏｍｉｚｕｋａら（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：７２２－７２７に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖トランス染色体を有するウシも先行技術において記載されており（Ｋｕｒｏｉｗａら（２００２）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０：８８９－８９４）、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体の作製に使用できる。

【０１５７】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子ライブラリースクリーニングのためのファージディスプレイ方法を用いて調製できる。ヒト抗体単離のためのこのようなファージディスプレイ方法は公知技術において確立されている。例えば、Ｌａｄｎｅｒらの米国特許５，２２３，４０９、５，４０３、，４８４および５，５７１，６９８、Ｄｏｗｅｒらの米国特許５，４２７，９０８および５，５８０，７１７、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙらの米国特許５，９６９，１０８および６，１７２，１９７、およびＧｒｉｆｆｉｔｈｓらの米国特許５，８８５，７９３、６，５２１，４０４、６，５４４，７３１、６，５５５，３１３、６，５８２，９１５および６，５９３，０８１を参照。

【０１５８】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、免疫によりヒト抗体応答が起こるように、ヒト免疫細胞を再構築したＳＣＩＤマウスを用いて調製できる。このようなマウスは、例えば、Ｗｉｌｓｏｎらの米国特許５，４７６，９９６および５，６９８，７６７に記載されている。

【０１５９】

ヒトＩｇマウスの免疫

ヒトＩｇマウスを用いて本発明のヒト抗体を作製する場合、Ｌｏｎｂｅｒｇ，Ｎ．ら（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ　３６８（６４７４）；８５６－８５９、Ｆｉｓｈｗｉｌｄ，Ｄ．ら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：８４５－８５１およびＰＣＴ公報ＷＯ９８／２４８８４およびＷＯ０１／１４４２４に記載されているようにして、精製または高含量のＳＤＦ－１抗原および／または組み換えＳＤＦ－１もしくはＳＤＦ－１発現細胞またはＳＤＦ－１融合タンパク質により、このようなマウスを免疫できる。好適には、６－１６週齢の当該マウスに対して最初の注入を行う。例えば、ＳＤＦ－１抗原の精製または組み換え調製物（５－５０μｇ）を用いて、腹腔中でヒトＩｇマウスに免疫できる。

【０１６０】

ＳＤＦ－１に対する全長ヒトモノクローナル抗体を作製するための詳細な操作を下記の実施例１に述べている。様々な抗原による累積的な経験により、完全フロイントアジュバントの抗原で最初に腹腔内（ＩＰ）免疫し、次に２週おきに不完全フロイントアジュバントの抗原でＩＰ免疫（最大６まで）した時、形質転換マウスが応答することが明らかにされている。しかし、フロイント以外のアジュバントも有効であることがわかる。さらに、アジュバントの非存在下において全細胞が極めて免疫原性が高いことがわかっている。この免疫応答を、眼窩後方出血により得られた血漿サンプルを免疫化プロトコール過程でモニターできる。血漿は、ＥＬＩＳＡ（下記で述べたように）によりスクリーニングでき、十分な抗ＳＤＦ－１ヒトイムノグロブリン力価を有するマウスを融合に使用できる。マウスを、屠殺３日前に抗原を静注することでブーストし、脾臓を取り出した。各免疫には２－３回の融合を実施する必要がある。通常、６～２４匹のマウスを各抗原で免疫する。通常、ＨＣｏ７およびＨＣｏ１２株の両者を使用する。さらに、ＨＣｏ７およびＨＣｏ１２トランスジーンの両者を、２つの異なるヒト重鎖導入遺伝子（ＨＣｏ７／ＨＣｏ１２）を有する１匹のマウスで作製できる。これとは別に、またはこれに加えて、ＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）系統を、実施例１に記載のようにして使用できる。

【０１６１】

ファージーディスプレイ　コンビナトリアル　ライブラリーの作製とスクリーニング

抗体可変領域の初期ｃＤＮＡライブラリーは、ＳＤＦ－１で免疫されたＨｕＭＡｂ　ｍｏｕｓｅ（登録商標）またはＫＭ　ｍｏｕｓｅ（登録商標）のいずれかからの脾臓で構築された。その後、抗体可変領域はファージ発現ベクターにクローン化された。ファージの選別は、ビオチン化ＳＤＦ－１とともに、Ｏｍｎｉｃｌｏｎａｌ（登録商標）ファージ選別法（バイオサイト社，サンディエゴ，カリフォルニア）で行い、ナノモル結合活性（ＫＭ脾臓）またはサブナノモル結合活性（ＨｕＭＡｂ脾臓）を持つ可変領域断片のスクリーニングを行った。問題の可変領域断片は、Ｆａｂ発現ベクターに再クローン化され、そのＦａｂは結合活性および機能アッセイについて再試験される。プライマーをコードする可変領域のＮ末端部位は、それぞれの可変領域の生殖細胞系列配列に戻し突然変異された。その後、抗体全体は、標準的な分子生物学的技術で、高親和性抗ＳＤＦ－１　Ｆａｂから作製された。

【０１６２】

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

本発明のヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ作製のため、免疫したマウス由来の脾臓および／またはリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄細胞株のような適切な不死化細胞株に融合できる。得られたハイブリドーマについて、抗原特異的抗体の産生をスクリーニングできる。例えば、免疫したマウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁物を、５０％ＰＥＧにより、６分の１数のＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３非分泌マウス骨髄細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ１５８０）に融合できる。これとは別に、免疫したマウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁物を、サイトパルス大型チェンバー細胞融合エレクトロポレータ（ＣｙｔｏＰｕｌｓｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇｌｅｎ　Ｂｕｒｎｉｅ，ＭＤ）を用いて、電場に基づく電気融合法により融合させることができる。細胞は、約2×10^{5}個で平底マイクロタイタープレートに播種し、２０％　胎児クローン血清、１８％　“６５３”調

製培地、５％　オリゲン（ＩＧＥＮ）、４ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１ｍＭ　ピルビン酸ナトリウム、５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．０５５ｍＭ　２－メルカプトメタノール、５０単位／ｍＬ　ペニシリン、５０ｍｇ／ｍＬ　ストレプトマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ　ゲンタマイシンおよび１ｘＨＡＴ（Ｓｉｇｍａ；ＨＡＴを注入２４時間後に添加する）を含む選択培地中で２週間インキュベーションする。約２週後、細胞をＨＡＴをＨＴに置き換えた培地中で培養する。次に、それぞれのウェルをヒトモノクローナルＩｇＭおよびＩｇＧ抗体のＥＬＩＳＡでスクリーニングする。いったん広範なハイブリドーマ増殖が起こると、培地は、通常、１０－１４日後に観察できる。抗体分泌ハイブリドーマを再播種し、再度スクリーニングし、もしヒトＩｇＧがまだ陽性であるならば、モノクローナル抗体を少なくとも２回限定希釈によってサブクローニングする。次に、安定なサブクローンをインビトロで培養し、少量の抗体を組織培地に産生させ、特性解析する。

【０１６３】

ヒトモノクローナル抗体を精製するため、選択したハイブリドーマを２リットルのスピナーフラスコ中で増殖させ、モノクローナル抗体を精製できる。上清をろ過し、濃縮して、プロテインＡ－セファロース（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、Ｎ．Ｊ．）によるアフィニティクロマトグラフィーを行う。溶出したＩｇＧをゲル電気泳動と高速液体クロマトグラフィーでチェックし、純度を確認できる。緩衝液をＰＢＳに交換し、濃度は１．４３吸光係数を用いてＯＤ２８０で決定できる。モノクローナル抗体を等量に分け、－８０℃で保存できる。

【０１６４】

モノクローナル抗体産生トランスフェクトーマの作製

また、本発明の抗体は、例えば、当該技術において周知の組み換えＤＮＡ技術と遺伝子トランスフェクション技術を組み合わせて、宿主細胞中で産生させることができる（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２）。

【０１６５】

例えば、抗体またはその抗体断片発現のため、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするＤＮＡは、標準的な分子生物学的技術（例えば、ＰＣＲ増幅または問題の抗体を発現するハイブリドーマを用いたｃＤＮＡクローニング）により得られ、このＤＮＡを、遺伝子が適切に作用するように転写および翻訳調節配列に連結されるように発現ベクター中に挿入できる。この本文において、用語“適切に作用するように連結する”とは、ベクター内部の転写および翻訳調節配列が抗体遺伝子の転写と翻訳を制御するというそれらの目的機能を果たすようにベクターに連結されることを意図している。発現ベクターと発現調節配列は、使用した発現宿主細胞に適合するように選択する。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入できるが、さらに典型的には、両者の遺伝子ともに同一発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は、標準的方法（例えば、抗体遺伝子断片上の相補性制限部位とベクターとのライゲーション、または制限部位が全く存在しないならば、平滑末端ライゲーション）によって発現ベクター中に挿入される。ここに述べた抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用いて、V_Hセグメントがベクター内部のC_Hセグメントに作用可能なように連結され、V_Kセグメントはベクター内部のC_Lセグメントに作用可能なように連結されるよう、それらを所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をすでにコードしている発現ベクター中に挿入することによって、いかなる抗体のアイソタイプの全長抗体遺伝子をも創製できる。さらにまたはこれとは別に、組み換え発現ベクターは、宿主細胞から抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードできる。当該抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドがインフレームで抗体鎖遺伝子のアミノ末端に連結されるようにベクター中にクローニングできる。当該シグナルペプチドは、イムノグロブリンシグナルペプチドまたは非相同シグナルペプチド（すなわち、非イムノグロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であってもよい。

【０１６６】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞中において抗体鎖遺伝子の発現を調節できる制御配列を有している。用語“制御配列”とは、抗体鎖遺伝子

の転写または翻訳を調節するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。このような制御配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ（Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ（１９９０））に記載されている。当業者は、制御配列の選択を含む発現ベクターの設計が形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等のような因子に依存することを理解できる。哺乳類宿主細胞発現のための好適な制御配列には、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ）およびパピローマに由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーのような、哺乳類細胞におけるタンパク質高発現を指示するウイルスエレメントを含む。これとは別に、ユビキチンプロモーターまたはβ－グロビンプロモーターのような非ウイルス制御配列も使用できる。さらに、制御エレメントは、ＳＲαプロモーターシステムのような異なる起源由来の配列で構成され、それらはＳＶ４０アーリープロモーターおよびヒトＴ細胞白血病ウイルス１型の長い末端繰り返し由来の配列を含む（Ｔａｋｅｂｅ，Ｙ．ら（１９８８）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．　８：４６６－４７２）。

【０１６７】

抗体鎖遺伝子および制御配列に加えて、本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞中におけるベクターの複製を制御する配列（例えば、複製開始点）および選択マーカー遺伝子のような付加的配列も有することができる。当該選択マーカー遺伝子は、ベクターを導入した宿主細胞の選択を促進する（例えば、すべてＡｘｅｌらの米国特許４，３９９，２１６、４，６３４，６６５および５，１７９，０１７を参照）。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターを導入した宿主細胞上でＧ４１８、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートのような薬物に対する耐性を付与する。好適な選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子（メトトレキセート選択／増幅とともにｄｈｆｒ－宿主細胞中で使用するため）およびｎｅｏ遺伝子（Ｇ４１８選択用）を含む。

【０１６８】

軽鎖および重鎖発現のため、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術により宿主細胞に導入できる。用語“トランスフェクション”の様々な形態は、外来性ＤＮＡを原核生物または真核生物宿主細胞に導入するために一般的に用いた広範囲の技術を包含することを意図しており、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラントランスフェクション等である。本発明の抗体を原核生物または真核生物の宿主細胞のいずれにも発現させることは理論的には可能であるが、そのような真核細胞、特に、哺乳類細胞が原核生物に比べて、適切に折りたたまれ、免疫学的に活性のある抗体を集合させ分泌させやすいため、真核細胞での抗体の発現、さらにもっとも好適には哺乳類宿主細胞での抗体の発現が最も好適である。抗体遺伝子の原核生物における発現は高収率の活性抗体産生には無効であると報告されている（Ｂｏｓｓ，Ｍ．Ａ．およびＷｏｏｄ、Ｃ．Ｒ．（１９８５）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ６：１２－１３）。

【０１６９】

本発明の組み換え抗体発現のために好適な哺乳類宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞）（例えば、ＵｒｌａｕｂおよびＣｈａｓｉｎ（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　７７：４２１６－４２２０に記載されているＤＨＦＲ選択可能マーカーとともに使用した、Ｒ．Ｊ．ＫａｕｆｍａｎおよびＰ．Ａ．Ｓｈａｒｐ（１９８２）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５９：６０１－６２１に記載されているようなｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む）、ＮＳＯ骨髄細胞、ＣＯＳ細胞およびＳＰ２細胞が含まれる。特に、ＮＳＯ骨髄細胞とともに使用する場合には、別の好適な発現システムは、ＷＯ８７／０４４６２、ＷＯ８９／０１０３６およびＥＰ３３８，８４１に開示されたＧＳ遺伝子発現システムである。抗体遺伝子をコードする組み換え発現ベクターを哺乳類

宿主細胞中に導入する時、宿主細胞中で抗体を発現させるまたはさらに好適には宿主細胞を増殖させる培地中に抗体を分泌させるだけの十分な時間宿主細胞を培養することによって抗体は産生される。抗体は標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収できる。

【０１７０】

抗原への抗体結合の特性解析

本発明の抗体は、例えば、標準的ＥＬＩＳＡによってＳＤＦ－１への結合を試験できる。簡単に述べると、マイクロタイタープレートをＰＢＳ中０．２５μｇ／ｍＬの精製ＳＤＦ－１でコートし、次に、ＰＢＳ中５％のウシ血清アルブミンでブロックする。抗体希釈物（例えば、ＳＤＦ－１免疫マウス由来の血漿の希釈物）を各ウェルに添加し、３７℃で１－２時間インキュベーションする。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで洗浄し、次に、アルカリホスファターゼ結合第２試薬（例えば、ヒト抗体用には、ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ－特異的ポリクローナル試薬）とともに３７℃で１時間、インキュベーションする。洗浄後、プレートをｐＮＰＰ基質（１ｍｇ／ｍＬ）で発色させ、ＯＤ４０６－６５０で分析する。好適には、最大力価を示したマウスを融合用に用いる。

【０１７１】

上記したようなＥＬＩＳＡアッセイも同様に用いて、ＳＤＦ－１抗原と陽性反応を示すハイブリドーマをスクリーニングする。ＳＤＦ－１に高親和力で結合するハイブリドーマをサブクローニングし、さらに特性解析する。各ハイブリドーマから親細胞の反応性を保持するクローンを１個（ＥＬＩＳＡにより）選択し、抗体精製のために５－１０個のバイアル細胞バンクを作成し、－１４０℃で保存する。

【０１７２】

抗ＳＤＦ－１抗体精製のため、選択したハイブリドーマを２リットルのスピナーフラスコ中で増殖させることができ、モノクローナル抗体を精製する。上清をろ過し濃縮した後、プロテインＡ－セファロース（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、Ｎ．Ｊ．）によるアフィニティクロマトグラフィーを行う。溶出したＩｇＧをゲル電気泳動と高速液体クロマトグラフィーでチェックし、純度を確認できる。緩衝液をＰＢＳに交換し、濃度は１．４３吸光係数を用いてＯＤ２８０で決定できる。モノクローナル抗体を一定分量に分け、－８０℃で保存できる。

【０１７３】

選択された抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体が独自のエピトープに結合するかどうかを決定するため、各抗体を市販の試薬（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてビオチン化できる。非標識モノクローナル抗体とビオチン化モノクローナル抗体を用いた競合実験を、上記のＳＤＦ－１塗布ＥＬＩＳＡプレートを用いて実施できる。ビオチン化ｍＡｂ結合は、ストレプトアビジン－アルカリホスファターゼプローブにより検出できる。

【０１７４】

精製した抗体のアイソタイプを決定するため、アイソタイプＥＬＩＳＡは特定アイソタイプの抗体に特異的な試薬を用いて実施できる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプ決定のため、マイクロタイタープレートウェルを１μｇ／ｍＬの抗ヒトイムノグロブリンで一晩４℃でコートできる。１％ＢＳＡでブロックした後、１μｇ／ｍＬ以下の試験モノクローナル抗体または精製アイソタイプコントロールを室温で１～２時間プレートと反応させる。次に、当該ウェルをヒトＩｇＧ１またはヒトＩｇＭ特異的アルカリホスファターゼ結合プローブと反応させる。プレートを上記のようにして発色・分析する。

【０１７５】

さらに、抗ＳＤＦ－１ヒトＩｇＧは、ウェスタンブロッティングによりＳＤＦ－１抗原との反応性を試験できる。簡単に述べると、ＳＤＦ－１を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロース膜に移し、１０％ウシ胎児血清でブロックし、試験すべきモノクローナル抗体により調べることができる。ヒトＩｇＧ結合は、抗ヒトＩｇＧアルカリホスファターゼを用いて検出し、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質錠剤（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．Ｃｏ．，Ｓｔ

．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）により発色させることができる。

【０１７６】

本発明の抗体の結合特性は、ＳＤＦ－１発現細胞への抗体の結合をモニターすること、例えば、フローサイトメトリーによっても決定できる。典型的には、ＣＨＯ細胞株のような細胞株は、細胞膜結合型ＳＤＦ－１をコードする発現ベクターでトランスフェクションできる。そのトランスフェクトされたタンパク質は、好ましくはＮ末端にｍｙｃ－タグのようなタグを含み、抗体によって、そのタグを検出できる。本発明の抗体のＳＤＦ－１への結合性は、抗体とトランスフェクト細胞をインキュベートし、結合抗体を検出することによって決定できる。トランスフェクト蛋白上のタグへの抗体の結合は陽性コントロールとして用いることができる。

【０１７７】

さらに、本発明の抗体のＳＤＦ－１に対する特異性は、ＳＤＦ－１への結合が決定されたのと同じ方法で、他のタンパク質に結合するかどうかを決定することによって調べることができる。

【０１７８】

免疫複合物

別の面において、本発明は、サイトトキシン、薬物（例えば、免疫抑制剤）または放射性トキシンのような治療分子に複合させた抗ＳＤＦ－１抗体またはその断片を特徴とする。ここでは、このような複合物を“免疫複合物”と称する。１個以上のサイトトキシンを含む免疫複合物は、“イムノトキシン”と称される。サイトトキシン、すなわち、細胞傷害性物質には、細胞に有害な（例えば、死滅させる）いかなる物質も含まれる。例として、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジハイドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ，、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンおよびそのアナログまたはホモログを含む。また、治療薬には、例えば、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルカリ化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブチル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロソスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ，、およびシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン（ＡＭＣ））、および有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が含まれる。

【０１７９】

本発明の抗体に複合できる治療薬サイトトキシンの他の好適な例として、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、マイタンシンおよびオーリスタチンならびにそれらの誘導体が含まれる。カリケアマイシン抗体複合物の例は市販されている（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標）；Ｗｙｅｔｈ－Ａｙｅｒｓｔ）。

【０１８０】

サイトトキシンは、先行技術であるリンカー技術を用いて本発明の抗体に結合できる。サイトトキシンを抗体に結合するために用いたリンカータイプの例として、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィドおよびペプチド含有リンカーが含まれるが、これらに限定されない。リンカーは、例えば、リソソームコンパートメント内部の低ｐＨによる切断を受けやすいか、カテプシン（例えば、カテプシンＢ、Ｃ、Ｄ）のような癌組織中に主に発現するプロテアーゼのような、プロテアーゼによる切断を受けやすいものが選択される。

【０１８１】

サイトトキシンのタイプ、リンカーおよび抗体に治療物質を結合する方法をさらに検討するためには、Ｓａｉｔｏ，Ｇ．ら（２００３）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５５：１９９－２１５、Ｔｒａｉｌ，Ｐ．Ａ．ら（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５２：３２８－３３７、Ｐａｙｎｅ，Ｇ．（２００３）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ３：２０７－２１２、Ａｌｌｅｎ、Ｔ．Ｍ．（２００２）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ ２：７５０－７６３、Ｐａｓｔａｎ，Ｉ．およびＫｒｅｉｔｍａｎ，Ｒ．Ｊ．（２００２）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ｄｒｕｇｓ ３：１０８９－１０９１、Ｓｅｎｔｅｒ，Ｐ．Ｄ．およびＳｐｒｉｎｇｅｒ，Ｃ．Ｊ．（２００１）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５３：２４７－２６４も参照できる。

【０１８２】

また、本発明の抗体は放射性同位元素に結合させ、放射性免疫複合物とも称される細胞傷害性放射性薬物を作製できる。診断または治療に使用するための抗体結合放射性同位元素の例として、ヨード^{131}、インジウム^{111}、イットリウム^{90}およびルテチウム^{177}が含まれるが、これらに限定されない。放射免疫複合物を調製する方法は先行技術で確立されている。放射免疫複合物の例は市販されており、Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）（ＩＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）およびＢｅｘｘａｒ（登録商標）（Ｃｏｒｉｘａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）が含まれ、類似の方法を用いて本発明の抗体を用いて放射免疫複合物を調製できる。

【０１８３】

ある生物応答を修飾するために、本発明の抗体複合物を用いることができるが、薬物分子は、旧来の化学的治療薬剤に限定されるとみなされない。例えば、薬物分子は所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、アブリン、リシンＡ、シュードモナス菌体外毒素またはジフテリアトキシンのような、例えば、酵素的に活性の毒物またはその活性断片、腫瘍壊死因子またはインターフェロン－γのようなタンパク質、または、例えば、リンホカイン、インターロイキン－１（“ＩＬ－１”）、インターロイキン－２（“ＩＬ－２”）、インターロイキン－６（“ＩＬ－６”）、顆粒マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（“Ｇ－ＣＳＦ”）または他の増殖因子のような生物学的応答調節物質が含まれる。

【０１８４】

このような治療分子を抗体に結合するための技術は、周知で、例えば、Ａｒｎｏｎら“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＯＦ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ”、ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編著）、ｐｐ．２４３－５６（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）、Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら、“Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”、ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第２版）、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編著）、ｐｐ．６２３－５３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ、Ｉｎｃ．１９８７）、Ｔｈｏｒｐｅ，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ ｒｅｖｉｅｗ“，ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ‘８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編著）、ｐｐ．４７５－５０６（１９８５）、”Ａｎａｌｙｓｉｓ、Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ“、ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂａｌｄｗｉｎら（編著）、ｐｐ．３０３－１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ１９８５）、ａｎｄ Ｔｈｏｒｐｅら、”Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ“、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅ

ｖ．、６２：１１９－５８（１９８２）を参照できる。

【０１８５】

二重特異性分子

別の面において、本発明は、本発明の抗ＳＤＦ－１抗体またはその断片を含む二重特異性分子を特徴とする。本発明の抗体またはその抗原結合部分は誘導体化することができ、または、例えば、別のペプチドまたはタンパク質（例えば、別の抗体またはレセプターに対するリガンド）のような別の機能分子に連結することによって、少なくとも２つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を作製できる。本発明の抗体は、実際に、誘導体化することもできあるいは１つ以上の他の機能分子に連結することによって、２つ以上の異なる結合部位および／または標的分子に結合する多重特異性分子を作製することができる。このような多重特異性分子も、本文中、用語“二重特異性分子”に含まれるものとする。本発明の二重特異性分子を作製するため、二重特異性分子ができるように本発明の抗体を別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物のような１つ以上の結合分子に機能的に（例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合またはその他で）連結することができる。

【０１８６】

したがって、本発明には、ＳＤＦ－１に対する少なくとも１つの第一の結合特異性と第二の標的エピトープに対する第二の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。本発明の特定の態様において、第２標的エピトープは、例えば、ヒトＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）またはヒトＦｃαレセプター（ＣＤ８９）のようなＦｃレセプターである。したがって、本発明は、ＦｃγＲＩまたはＦｃαＲを発現するエフェクター細胞（例えば、単球、マクロファージまたは多形核細胞（ＰＭＮｓ））およびＳＤＦ－１を発現している標的細胞の両者に結合できる二重特異性分子を含む。これらの二重特異性分子は、ＳＤＦ－１発現細胞をエフェクター細胞の標的とし、ＳＤＦ－１発現細胞の食作用、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、サイトカイン放出またはスーパーオキサイドアニオン産生のようなＦｃレセプターを介したエフェクター細胞活性を惹起する。

【０１８７】

二重特異性分子が多重特異的である本発明の態様において、さらに、当該分子は、抗Ｆｃ結合特異性と抗ＳＤＦ－１結合特異性の他に、第三の結合特異性を含むことができる。一つの態様において、第三の結合特異性は抗増強因子（ＥＦ）部分であり、例えば、細胞傷害活性に関与し、それによって標的細胞に対する免疫応答を増強する表面タンパク質に結合する分子である。“抗増強因子部分”とは、例えば、抗原またはレセプターのようなある分子に結合し、その結果、Ｆｃレセプターまたは標的細胞抗原の結合決定基の効果を増強する抗体、抗体の機能的断片またはリガンドであってもよい。“抗増強因子部分”は、Ｆｃレセプターまたは標的細胞抗原に結合できる。これとは別に、抗増強因子部分は、第１および第２結合特異性が結合する物質とは異なる物質に結合してもよい。例えば、抗増強因子部分は、細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ２８、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＩＣＡＭ－１または標的細胞に対する免疫応答を増強するような他の免疫細胞を介して）に結合することができる。

【０１８８】

一つの態様において、本発明の二重特異性分子は、結合特異性として、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖまたは一重鎖Ｆｖを含む少なくとも一つの抗体またはその抗体の断片からなる。また、本抗体は、軽鎖もしくは重鎖ダイマー、Ｆｖのようなその最小断片もしくはその内容を本文で断って参考として引用しているＬａｄｎｅｒらの米国特許４，９４６，７７８に記載の一本鎖構築物であってもよい。

【０１８９】

一つの態様において、Ｆｃγレセプターに対する結合特異性はモノクローナル抗体によって提供され、その結合は、ヒトイムノグロブリンＧ（ＩｇＧ）によって阻害されない。本文中、用語“ＩｇＧレセプター”は、第１染色体上に位置する８個のγ鎖遺伝子のいずれかを示す。これらの遺伝子は、総計１２個の膜貫通型または可溶化型レセプターのアイ

ソフォームをコードし、それらは、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の３種のＦｃγクラスに分けられる。一つの好適な態様としては、当該Ｆｃγレセプターはヒト高親和性ＦＣγＲＩである。ヒトＦｃγＲＩは７２ｋＤａの分子であり、ＩｇＧ単量体に対して高親和性を示す（10^{8}－$10^{9}M^{-1}$）。

【０１９０】

好適な抗Ｆｃγモノクローナル抗体の作製と特異性解析には、ＦａｎｇｅｒらのＰＣＴ公報ＷＯ８８／００００５２および米国特許４，９５４，６１７に記載されているが、これらの開示は全て本文で参考文献として引用している。これらの抗体は、レセプターのＦｃγ結合部位から離れた部位で、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩまたはＦｃγＲＩＩＩのエピトープに結合し、従って、それらの結合が生理学的レベルのＩｇＧによっては実質的に阻害されない。本発明で有用な特異的抗ＦｃγＲＩ抗体は、ｍＡｂ２２、ｍＡｂ３２、ｍＡｂ４４、ｍＡｂ６２およびｍＡｂ１９７である。ｍＡｂ３２産生ハイブリドーマは、アメリカンタイプカルチャーコレクションからＡＴＣＣ　寄託番号ＨＢ９４６９として入手可能である。他の態様において、抗Ｆｃγレセプター抗体は、モノクローナル抗体２２のヒト型抗体である（Ｈ２２）。Ｈ２２抗体の産生と特異性解析は、Ｇｒａｚｉａｎｏ，Ｒ．Ｆ．らの（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１５５（１０）：４９９６－５００２およびＰＣＴ公報ＷＯ９４／１０３３２に記載されている。Ｈ２２抗体産生細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクションにＨＡ０２２ＣＬ１として寄託され、寄託番号ＣＲＬ１１１７７を有している。

【０１９１】

さらに、他の好適な態様において、Ｆｃレセプターに対する結合特異性は、例えば、Ｆｃ－αレセプター（ＦｃαＲＩ（ＣＤ８９））のようなヒトＩｇＡレセプターに結合する抗体によって付与され、その結合は、好適には、ヒトイムノグロブリンＡ（ＩｇＡ）によって阻害されない。用語“ＩｇＡレセプター”は、第１９染色体に位置する１個のα－遺伝子（ＦｃαＲＩ）の遺伝子産物を含むことを意味する。この遺伝子は、５５～１１０ｋＤａの数個のオルタナティブスプライシングされた膜貫通型アイソフォームをコードすることが知られている。ＦｃαＲＩ（ＣＤ８９）は、単球／マクロファージ、好酸球性および好中球性顆粒球上で構成的に発現されるが、非エフェクター細胞群上では発現しない。ＦｃαＲＩは、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２の両者に対して中程度の親和性（約$5\times10^{7}M^{-1}$）を有しており、Ｇ－ＣＳＦまたはＧＭ－ＣＳＦのようなサイトカインにさらされて増加する（Ｍｏｒｔｏｎ，Ｈ．Ｃ．ら（１９９６）Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１６：４２３－４４０）。４個のＦｃαＲＩ特異的モノクローナル抗体はＡ３、Ａ５９、Ａ６２およびＡ７７として同定されており、それらはＩｇＡリガンド結合ドメインの外側でＦｃαＲＩを結合することが記載されている（Ｍｏｎｔｅｉｒｏ，Ｒ．Ｃ．ら（１９９２）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１４８：１７６４）。

【０１９２】

ＦｃαＲＩおよびＦｃγＲＩは、本発明の二重特異性分子として用いる場合、好適なトリガーレセプターであり、その理由としては、それらが、（１）主に、例えば、単球、ＰＭＮ、マクロファージおよび樹状細胞のような免疫エフェクター細胞で発現されること、（２）高レベルで発現すること（例えば、５，０００－１００，０００／細胞）、（３）細胞傷害活性の媒介するもの（例えば、ＡＤＣＣ、食作用）、（４）自己抗原を含むそれらを標的化した抗原の抗原提示増強を介することが挙げられる。

【０１９３】

ヒトモノクローナル抗体が好適であるが、本発明の二重特異性分子で使用できる他の抗体は、マウス、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体である。

【０１９４】

本発明の二重特異性分子は、例えば、抗ＦｃＲおよび抗ＳＤＦ－１結合特異部分のような構成要素となる結合特異部分を当業者における公知の方法を用いて結合することによって調製できる。例えば、二重特異性分子の各結合特異部分を別々に作製し、その後互いに

連結できる。その結合特異部分がタンパク質またはペプチドである時、様々なカップリングまたは架橋剤を共有結合に使用できる。架橋剤の例として、プロテインＡ、カルボジイミド、Ｎ－サクシンイミジル－Ｓ－アセチル－チオアセテート（ＳＡＴＡ）、５，５′－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ）、ｏ－フェニレンジマレイミド（ｏＰＤＭ）、Ｎ－サクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）およびスルホスクインイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）（例えば、Ｋａｒｐｏｖｓｋｙら（１９８４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．　１６０：１６８６、Ｌｉｕ，ＭＡら（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：８６４８を参照）が含まれる。他の方法には、Ｐａｕｌｕｓ（１９８５）Ｂｅｈｒｉｎｇ　Ｉｎｓ．Ｍｉｔｔ．　Ｎｏ．７８、１１８－１３２、Ｂｒｅｎｎａｎら（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：８１－８３、およびＧｌｅｎｎｉｅら（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１３９：２３６７－２３７５に記載のものが含まれる。好適な結合剤は、ＳＡＴＡおよびスルホ－ＳＭＣＣであり、両者ともにＰｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）から入手可能である。

【０１９５】

結合特異部分が抗体である時、それらは、２個の重鎖Ｃ末端ヒンジ領域のスルフィドリル結合により結合できる。特に好適な態様において、結合させる前にヒンジ領域を奇数の、好適には１つのスルフィドリル残基を含むように修飾する。

【０１９６】

あるいは、両結合特異部分を同一ベクター中でコードでき、同一宿主細胞中で発現させ構築できる。この方法は、二重特異性分子がｍＡｂ×ｍＡｂ、ｍＡｂ×Ｆａｂ、Ｆａｂ×Ｆ（ａｂ’）$_2$またはリガンド×Ｆａｂ融合タンパク質である場合に特に有効である。本発明の二重特異性分子は、一重鎖抗体および結合決定基を含む一重鎖分子であるか、または２個の結合決定基を含む一重鎖二重特異性分子であってもよい。二重特異性分子は、少なくとも２個の一重鎖分子を含むこともできる。二重特異性分子の調製方法は、例えば、米国特許５，２６０，２０３、５，４５５，０３０、４，８８１，１７５、５，１３２，４０５、５，０９１，５１３、５，４７６，７８６、５，０１３，６５３、５，２５８，４９８、５，４８２，８５８に記載されており、そのすべてがここに引例として明確に含まれている。

【０１９７】

二重特異性分子のそれらの特異的標的への結合は、例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ＦＡＣＳ分析、バイオアッセイ（例えば、増殖阻害）またはウェスタンブロットアッセイにより確認できる。これらのそれぞれのアッセイは、一般に、特に問題となっているタンパク質－抗体複合体の存在を問題の複合体に特異的な標識試薬（例えば、抗体）を用いて検出する。例えば、ＦｃＲ－抗体複合体は、例えば、抗体－ＦｃＲ複合体を認識して特異的に結合する酵素結合抗体または抗体断片を用いて検出できる。あるいは、当該複合体は、様々な他のイムノアッセイのいずれかを用いて検出できる。例えば、抗体を放射性標識し、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）で使用できる（例えば、本文で参考として引用したＷｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ．、Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ　Ｔｒａｉｎｉｎｇ　Ｃｏｕｒｓｅ　ｏｎ　Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ　Ａｓｓａｙ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，　Ｔｈｅ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ　Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｍａｒｃｈ、１９８６を参照）。放射性同位元素は、γカウンターまたはシンチレーションカウンターを用いてまたはオートラジオグラフィーのような手段により検出できる。

【０１９８】

薬剤組成物

別の側面において、本発明は、例えば、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を１種またはその組み合わせを含有し、薬学的に許容できる担体とともに処方された医薬組成物を提供する。このような組成物は、本発明の（例えば、２種以上の異なる）抗体、または免疫複合物または二重特異性分子を１個、またはその組み合わせを含んでい

てもよい。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するかまたは補完的活性を有する抗体（または免疫複合物または二重特異性抗体）の組み合わせを含むことができる。

【０１９９】

本発明の医薬組成物は、併用療法、すなわち他の物質と組み合わせて投与することもできる。例えば、併用療法は、その他の抗炎症剤または免疫抑制剤と少なくとも１つ組み合わせた本発明の抗ＳＤＦ－１抗体を含んでいてもよい。併用療法で使用できる治療物質の例として、本発明の抗体使用についての下記章においてより詳細に説明されている。

【０２００】

本文中、“薬学的に許容できる担体”には、いかなる溶媒、分散剤、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延物質等が全て含まれ、それらは生理的に両立できる。好適には、当該担体は、（例えば、注入または点滴による）静注、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与に適している。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち、抗体、免疫複合物または二重特異性分子は、化合物を不活性化する可能性のある酸の作用や他の自然条件から化合物を保護する物質で被覆することもできる。

【０２０１】

本発明の医薬組成物は、１種以上の薬学的に許容できる塩を含むことができる。“薬学的に許容できる塩”とは、親化合物が目的とする生物活性を保持するが、目的としない毒性効果を全く示さない塩を称する（例えば、Ｂｅｒｇｅｓ，Ｓ．Ｍ．ら（１９７７）Ｊ．Ｐｈａｒｍａ．Ｓｃｉ．　６６：１－１９を参照）。このような塩の例として、酸付加塩および塩基付加塩を含む。酸付加塩は、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、燐等のような無毒性の無機酸由来ならびに脂肪族モノ－およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸等のような無毒性の有機酸に由来するものが含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のようなアルカリ土金属ならびにＮ，Ｎ’－ジベンチルエチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等のような無毒の有機アミン由来のものが含まれる。

【０２０２】

また、本発明の薬剤組成物は薬学的に許容できる抗酸化剤を含むことができる。薬学的に許容できる抗酸化剤の例として、（１）アスコルビン酸、システインハイドロクロライド、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等のような水溶性抗酸化剤、（２）アスコルビルパルミテート、ブチル化ハイドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ハイドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、プロピルガレート、α－トコフェロール等のような油溶性抗酸化剤、および（３）クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸等のような金属キレート剤が含まれる。

【０２０３】

本発明の薬剤組成物に使用できる適切な水性および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、およびその適切な混合物、オリーブオイルのような植物油およびエチルオレイン酸のような注射可能な有機エステルが含まれる。適切な流動性は、レシチンのような被覆物質を使用すること、分散体の場合必要な粒子径を保持することおよび界面活性剤を使用することによって保持することができる。

【０２０４】

これらの組成物は、保存剤、湿潤化剤、乳化剤および分散剤のようなアジュバントも含むことができる。微生物存在の防止は、殺菌操作、同上のように、および、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等のような様々な抗菌剤および抗真菌剤を包含させることによって確保できる。糖、塩化ナトリウム等のような等張化剤を当該組成物に含ませることも望ましい。さらに、注射製剤の吸収性を持続させることは、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅らせる物質を包含させることに

よって実現することができる。

【０２０５】

薬学的に許容できる担体には、無菌の注射用溶液または分散体を即時調製するための無菌水溶液または分散体および無菌粉末が含まれる。このような媒体および物質を薬学的に活性の物質のために使用することが当該技術において知られている。これまで従来の媒体または物質が当該活性化合物と両立できなかったので、本発明の薬剤組成物中でそれを使用することを検討している。補助的な活性化合物もまた、当該組成物中に組み込むことができる。

【０２０６】

治療用組成物は、通常、製造および保存条件下では無菌かつ安定でなければならない。当該組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、リポゾームまたはその他高濃度の薬物に適した、しつらえた構造体として製剤化できる。当該担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）およびその適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であってもよい。適切な流動性は、レシチンのようなコーティング剤を使用すること、分散体の場合必要な粒子径を保持することおよび界面活性剤を使用することによって保持できる。多くの場合、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコールまたは塩化ナトリウムのような等張化剤を当該組成物に含有させることが望ましい。モノステアリン酸アルミニウム塩およびゼラチンのような吸収を遅らせる物質をその組成物に包含させることによって、注射用組成物の吸収を持続させることができる。

【０２０７】

無菌の注射用溶液は、必要量の活性化合物を、上記に述べた成分の一つまたはそれらの組み合わせとともに適切な溶媒中に組み込み、必要に応じて無菌的精密ろ過をすることにより調製できる。一般的に、分散体は、基本的分散媒体と上記に述べたものの中から必要な他の成分を含む無菌媒体中に活性化合物を組み込むことによって調製する。無菌の注射用溶液調製のための無菌粉末の場合、好適な調製方法は真空乾燥および凍結乾燥（凍結乾燥）であり、活性成分に事前に無菌ろ過した溶液からのあらゆる所望の追加成分を加えた粉末を産生できる。

【０２０８】

一単位投与形態を作製するために担体物質と組み合わせられる活性成分の量は、治療すべき対象と特定の投与様式に応じて変わる。一単位投与形態を作製するために担体物質と組み合わせられる活性成分の量は、一般的に、治療効果をもたらす組成物量である。一般的に、この量は、１００％のうち、薬学的に許容できる担体との配合中、活性成分の約０．０１％～約９９％、好適には約０．１％～約７０％、さらに好適には約１％～約３０％の範囲である。

【０２０９】

用法・用量は、目的とする最適な応答（例えば、治療応答）をもたらすように調整される。例えば、単回のボーラスで投与することができるか、数回に投与量を分けて時間をかけて投与することもでき、または治療状況の緊急性に応じて投与量を減ずるかまたは増量することもできる。特に、投与の容易性および投与量の均一性のため、非経口組成物を単位投与形態として製剤化するのが好都合である。本文中、一単位投与形態とは、治療対象に対する単位投与として適した物理的に分離した単位を指し、各単位は、必要な薬剤担体と関連させて所望の治療効果をもたらすよう計算され、あらかじめ決定された量の活性化合物を含む。本発明の単位投与形態の仕様は、（ａ）活性化合物の独自の特異性と目的とする特定の治療効果、および（ｂ）個人への治療感受性のため、そのような活性化合物を調剤する技術に固有の限界により規定されかつ直接それらに依存する。

【０２１０】

抗体投与のための当該投与量は、約０．０００１～１００ｍｇ／ｋｇ、さらに一般的には０．０１～５ｍｇ／ｋｇ患者体重の範囲である。例えば、投与量は、約０．３ｍｇ／ｋｇ体重、１ｍｇ／ｋｇ体重、３ｍｇ／ｋｇ体重、５ｍｇ／ｋｇ体重または１０ｍｇ／ｋｇ

体重であるかまたは１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲である。典型的な治療方法には、例えば、週１回投与、２週間おきに１回投与、３週おきに１回投与、４週おきに１回投与、月１回投与、３ヶ月おきに１回投与または３～６ヶ月おきに１回投与を伴う。本発明の抗ＳＤＦ－１抗体の好適な用法・用量は、静注投与により、１ｍｇ／ｋｇ体重または３ｍｇ／ｋｇ体重であり、当該抗体は、下記の投与スケジュール、すなわち、（ｉ）投与６回を４週おきに、次に３週おき、（ｉｉ）３週おき、（ｉｉｉ）３ｍｇ／ｋｇ体重を１回、次に３週おきに１ｍｇ／ｋｇ体重の一つを用いて投与される。

【０２１１】

ある方法では、異なる結合特異性を有する２種以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合、投与した各抗体の投与量は、例示した範囲内に入る。通常、抗体は複数回投与される。単回投与の間隔は、例えば、毎週、毎月、３カ月おきまたは１年おきとすることができる。また、患者の標的抗原に対する抗体の血中レベルを測定することによって示唆されるように、不定期とすることもできる。血漿中の抗体濃度を約１～１０００μｇ／ｍＬとなるように調整する方法や、約２５～３００μｇ／ｍＬとなるように調整する方法もある。

【０２１２】

あるいは、抗体は徐放性製剤として投与することもでき、この場合、投与頻度を少なくすることが必要となる。投与量と頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変わる。一般的に、ヒト抗体の半減期が最も長く、次に、ヒト化抗体、キメラ抗体、非ヒト抗体が続く。投与量と投与頻度は、治療が予防なのか治療なのかにより変わる。予防的用途においては、比較的低用量が比較的頻度が低く、長期にわたり投与される。寿命のある限り治療を受けることになる患者もいる。治療的用途では、疾患進行を遅らせるかまたは停止させるまで、好ましくは、患者が部分的または完全に疾患症状の改善を示すまで、比較的高用量を比較的短期間に必要とすることがある。その後、患者には予防的方法で投与される。

【０２１３】

本発明の医薬組成物中における活性成分の実際の投与レベルを変化させることで、毒性を起こすことなしに、特定の患者、組成物および投与様式に対して目的とする治療応答を得る有効な活性成分量を決めることができる。選択した投与量は、本発明で使用した特定組成物、そのエステル、その塩若しくはそのアミドの活性、投与経路、投与時間、使用した特定化合物の排泄速度、治療期間、他の薬物、化合物および／または使用した特定組成物と併用使用した物質、治療患者の年齢、性別、体重、状態、全般的健康および既往歴および医療技術において周知の因子を含む様々な薬物動態因子に左右される。

【０２１４】

本発明の抗ＳＤＦ－１抗体の“治療有効投与量”は、疾患症状の重篤度の低下、疾患に由来する症状が消失する期間の頻度と期間の増加、または疾患に罹患したことによる不全または障害の予防につながるものである。例えば、ＳＤＦ－１陽性癌の治療のための“治療有効投与量”は、未処理被験者に比較して、好適には少なくとも約２０％、さらに好適には少なくとも約４０％、はるかに好適には約６０％、さらに好適には約８０％まで細胞増殖すなわち腫瘍増殖を阻害する。化合物の腫瘍増殖阻害能は、ヒト腫瘍における有効性を予測できる動物モデル系で評価できる。これとは別に、このような組成物の特性は、当業者に公知のアッセイによって化合物の細胞増殖阻害活性、例えば、インビトロにおける阻害を調べることによって評価することができる。治療化合物の治療有効投与量は、腫瘍の大きさを減じるか、またはそうでなければ、被験者の症状を改善させる。当業者は、被験者の大きさ、被験者の症状の重篤度、および特定組成物または選択した投与経路のような要素に基づき量を決定することができる。

【０２１５】

本発明の組成物は、当該技術で公知の１つ以上の様々な方法を用いて、１種以上の投与経路にて投与することもできる。当業者には明らかであろうが、投与経路および／または様式は目的とする結果に応じて変わる。本発明の抗体の好適な投与経路は、例えば、注射

または輸液によって、静脈内、筋肉内、皮膚内、腹腔内、皮下、脊髄投与または他の非経口投与経路を含む。本文中、用語“非経口投与”とは、腸および局所投与以外の投与様式を意味し、通常は注射であるが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腹腔内、被膜内、眼窩内、心臓内、皮膚内、腹腔内、経気管的、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注入および点滴が含まれるが、これらに限定されない。

【０２１６】

あるいは、本発明の抗体は、局所、上皮もしくは粘膜のような非経口投与経路、例えば、鼻腔内、口腔内、膣内、直腸内、舌下または局所的に投与できる。

【０２１７】

活性化合物は、インプラント、経皮パッチおよびミクロカプセル包含デリバリシステムを含む徐放性製剤のような、迅速放出に対して当該化合物を保護する担体とともに調製できる。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステルおよびポリ乳酸といった生分解性、生体適合性ポリマーも使用できる。このような製剤の調製方法は多くが特許を得ているかあるいは当業者に一般に公知である。例えば、Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ編著，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９７８参照。

【０２１８】

治療用組成物は、当該技術において公知の医療用具により投与できる。例えば、好適な態様において、本発明の治療組成物は、米国特許５，３９９，１６３、５，３８３，８５１、５，３１２，３３５、５，０６４，４１３、４，９４１，８８０、４，７９０，８２４または４，５９６，５５６に開示された用具のような針のない皮下注入用具により投与できる。本発明で有用な公知のインプラントおよびモジュールの例として、制御された速度で医薬を投薬するためのインプラント可能なミクロインフィージョンポンプを開示した米国特許４，４８７，６０３、皮膚から医薬を投与するための治療用具を開示した米国特許４，４８６，１９４、精密な点滴速度で医薬を運搬するための医薬インヒュージョンポンプを開示した米国特許４，４４７，２３３、連続的薬物運搬のための可変フローインプラント可能な点滴装置を開示した米国特許４，４４７，２２４、複数チャンバーコンパートメントを有する浸透圧ドラッグデリバリシステムを開示した米国特許４，４３９，１９６および浸透圧ドラッグデリバリシステムを開示した米国特許４，４７５，１９６が含まれる。これらの特許は参考として本文に組み込まれている。他にも多くのインプラント、デリバリシステムおよびモジュールが当業者に公知である。

【０２１９】

ある態様において、本発明のヒトモノクローナル抗体を製剤化して、インビボにおける適切な分布を確保することができる。例えば、血液－脳関門（ＢＢＢ）バリアは、多くの高親和性化合物を排除する。本発明の治療化合物がＢＢＢを（もし望むならば）確実に通過できるようにするため、それらを、例えば、リポソーム中に処方することができる。リポゾーム製造方法については、例えば、米国特許４，５２２，８１１；５，３７４，５４８；および５，３９９，３３１を参照できる。当該リポソームは、特定細胞または臓器に選択的に運搬される一種以上の分子を含むことができ、それによって標的ドラッグデリバリを増強できる（例えば、Ｖ．ＶＲａｎａｄｅ（１９８９）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２９：６８５を参照）。典型的な分子の例として、葉酸またはビオチン（例えば、Ｌｏｗらによる米国特許５，４１６，０１６を参照）、マンノシド（Ｕｍｅｚａｗａら（１９８８）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１５３：１０３８）、抗体（Ｐ．Ｇ．Ｂｌｏｅｍａｎら（１９９５）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３５７：１４０、Ｍ．Ｏｗａｉｓら（１９９５）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．３９：１８０）、界面活性剤プロテインＡレセプター（Ｂｒｉｓｃｏｅら（１９９５）Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２３３：１３４）、ｐ１２０（Ｓｃｈｒｅｉｅｒら（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：９０９０）が含まれ、また、Ｋ．Ｋｅｉｎａｎｅｎｎ；Ｍ．Ｌ．Ｌａｕｋｋａｎｅｎ（１９９４）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．

３４６：１２３、Ｊ．Ｊ．Ｋｉｌｌｉｏｎ；Ｉ．Ｊ．Ｆｉｄｌｅｒ（１９９４）Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ　４：２７３を参照することができる。

【０２２０】

用途および方法

抗体、特に、本発明のヒト抗体、抗体組成物および方法は、ＳＤＦ－１介在疾患の診断および治療に関連する、様々なインビトロおとびインビボ診断および治療的用途を含む。例えば、これら分子は、例えば、様々な疾患を治療、予防および診断するために、培養細胞にはインビトロもしくはエキソビボで、またはヒト患者に対しては、例えば、インビボで投与することができる。本文中、用語“患者”とは、ヒトおよび非ヒト動物を含むものとする。非ヒト動物には、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等のような、哺乳類および非哺乳類である全脊椎動物類が含まれる。好適な被験者には、ＳＤＦ－１活性により介在される疾患を持つヒト患者が含まれる。当該方法は、異常なＳＤＦ－１発現に関連する疾患を有するヒト患者治療に特に適している。ＳＤＦ－１に対する抗体を別の物質とともに投与するときには、それらは順番にまたは同時に投与できる。

【０２２１】

本発明の抗体のＳＤＦ－１に対する特異的結合によって、本発明の抗体は、細胞表面に発現するＳＤＦ－１を特異的に検出するのに使用され、さらには免疫学的アフィニティー精製を介してＳＤＦ－１を精製するのに使用できる。

【０２２２】

乳癌浸潤は、局所リンパ節、骨髄、肺および肝臓において異なるパターンで起こる。ＣＸＣＲ４の発現は、初期および浸潤性のヒト乳癌細胞において高いが、通常の乳房組織では検出できない（Ｍｕｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　４１０：５０－６）。ＳＤＦ－１は、非小細胞性肺癌の浸潤においての役割も示唆されており、その癌細胞はＳＤＦ－１に応答して遊走する（Ｐｈｉｌｌｉｐｓ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ａｍ　Ｊ　Ｒｅｓｐｉｒ　Ｃｒｉｔ　Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ　１６７：１６７６－８６）。ＳＤＦ－１は、乳癌細胞や、肺および肝臓抽出物において高レベルのＦ－アクチン重合や仮足形成を誘導すると考えられており、これはインビトロでの乳癌細胞の指向性遊走を促す。この乳癌細胞の遊走は、ＣＸＣＲ４またはＣＣＬ２１に対する抗体によって阻害されることが、以前示されている。ＳＤＦ－１は、肝内胆管癌（ＩＣＣ）での役割もあることが示されている（Ｏｈｉｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）Ａｍ　Ｊ　Ｐａｔｈｏｌ　１６８：１１５５－６８）。さらに、ＳＤＦ－１とＣＸＣＲ４の相互作用の阻害は、幹細胞の動因に関連することが分っており、例えば、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫（Ｆｒｉｃｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）文献の冒頭において公開された；Ｆｒｕｅｈａｕｆ　ａｎｄ　Ｓｅｅｇｅｒ（２００５）Ｆｕｔｕｒｅ　Ｏｎｃｏｌ　１：３７５－８３）のような他の様々な癌の治療に有用である。

【０２２３】

好ましくは、本発明の抗体によってその増殖が阻害される癌には、典型的には、免疫療法に応答する浸潤性腫瘍および癌が含まれる。治療可能な癌は特に限定されないが、乳癌、多発性骨髄腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、中枢神経原発リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫）が含まれる。本発明の方法により治療されるその他の癌の例として、メラノーマ（例えば、
転移性悪性メラノーマ）、腎癌（例えば、腎細胞癌）、脳腫瘍、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性もしくは急性白血病、鼻咽頭癌、前立腺癌、大腸癌、肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭頸部癌、進行期悪性黒色腫もしくは眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、睾丸癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、頸癌、膣癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎皮質癌、軟部腫瘍、尿道癌、陰茎癌、小児固形癌、膀胱癌、腎臓もしくは尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（ＣＮＳ）腫瘍、腫瘍の血管新生、脊髄腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、扁平上皮癌、扁平上皮癌、アスベストによって誘発される癌、例えば

、中皮腫を含む環境誘発性癌およびそれらの組合せが含まれる。

【０２２４】

さらに、本発明のヒト抗体、抗体組成物および方法は、例えば、乳癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、明細胞ＲＣＣのような腎細胞癌（ＲＣＣ）、グリア芽腫、乳癌、脳腫瘍、鼻咽頭癌、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、バーキットリンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫（ＡＬＣＬ）、皮膚T細胞性リンパ腫、結節性小付着細胞リンパ腫、リンパ性白血病、末梢性Ｔ細胞リンパ腫、レンネルトリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、成人T細胞白血病リンパ種（ＡＴＬＬ）、成人T細胞白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、中心芽球／胚中心細胞型（ｃｂ／ｃｃ）濾胞性リンパ腫、Ｂ細胞のびまん性大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球性（ＡＩＬＤ）様T細胞性リンパ腫、ＨＩＶ関連体腔性リンパ腫、胎児性癌、鼻咽腔の未分化癌（例えば、シュミンケ腫瘍）、キャッスルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症およびその他のＢ細胞リンパ腫に挙げられる、ＳＤＦ－１発現腫瘍細胞の存在により特徴付けられる疾患のような腫瘍性疾患の患者の治療に使用できる。

【０２２５】

従って、ある態様において、本発明は、抗ＳＤＦ－１抗体またはその抗原結合部位の治療的有効量を患者に投与することからなる、患者の癌細胞の成長を阻害する方法を提供する。好ましくは、その抗体は、ヒト抗ＳＤＦ－１抗体（ここに記載されているヒト抗ヒトＳＤＦ－１抗体のいずれか）である。さらに、またはこれとは別に、その抗体はキメラまたはヒト化抗ＳＤＦ－１抗体であってもよい。

【０２２６】

ＳＤＦ－１は、リウマチ関節炎（ＲＡ）および変形性関節症（ＯＡ）の滑膜部位の、血管内膜を含む過形成内膜ならびに細胞外マトリックスおよび血管周囲内膜でも検出されている（Ｐａｂｌｏｓ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １７０：２１４７－５２）。ＯＡおよびＲＡ線維芽細胞様滑膜細胞のノーザンブロット解析によって、炎症性サイトカイン、血管新生因子あるいは低酸素によって誘導されないＳＤＦ－１発現が検出される。内皮細胞からのヘパラン硫酸分子の遊離は、それら細胞でのＳＤＦ－１免疫染色を除去するため、ＳＤＦ－１は内皮細胞表面に蓄積すると考えられる。ＲＡ滑膜中のＳＤＦ－１の産生増加は、内皮細胞のヘパリチナーゼ応答因子の蓄積を誘導し、ＳＤＦ－１が慢性炎症に関連する血管新生に関与していると考えられる。ＳＤＦ－１は、喘息患者の気管支粘膜の血管新生を誘導することも示されており、ＳＤＦ－１受容体であるＣＸＣＲ－４の阻害は、アレルギー性肺炎症、アレルギー性気道疾患、気道過敏性および過敏性型肺肉芽腫形成を軽減させる（Ｈｏｓｈｉｎｏ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｅｕｒ Ｒｅｓｐｉｒ Ｊ ２１：８０４－９； Ｌｕｋａｃｓ ｅｔ ａｌ．（２００２） Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １６０：１３５３－６０； Ｇｏｎｚａｌｏ ｅｔ ａｌ．（２０００） Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６５：４９９－５０８； Ｈｕ ｅｔ ａｌ．（２００６） Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １６９：４２４－３２）。

【０２２７】

本発明のヒト抗体、抗体組成物および方法それ自体、例えば、リウマチ関節炎（ＲＡ）、骨関節症（ＯＡ）、実験的自己免疫性脳脊髄炎、喘息およびアレルギー性肺炎症、アレルギー性気道疾患、気道過敏性および過敏性型肺肉芽腫形成のようなアレルギー性炎症のようなＳＤＦ－１の存在によって特徴付けられる疾患である自己免疫疾患患者の治療に使用することができる。また、本発明の抗体が使用できる自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス、インシュリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）、炎症性大腸炎（ＩＢＤ）（クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病を含む）、多発性硬化症（ＭＳ）、乾癬、自己免疫性甲状腺炎および糸球体腎炎が含まれるが、これらに限定されない。さらに、本発明の抗体は移植片拒絶の治療に使用することができる。

【０２２８】

従って、ある態様において、本発明は、抗ＳＤＦ－１抗体またはその抗原結合部位の治療的有効投与量を患者に投与することからなる自己免疫疾患患者の治療方法を提供する。

好ましくは、抗体はヒト抗ＳＤＦ－１抗体（ここに記載されているヒト抗ヒトＳＤＦ－１抗体のいずれかのような）である。さらに、またはこれとは別に、その抗体はキメラもしくはヒト化抗ＳＤＦ－１抗体であってもかまわない。

【０２２９】

増殖性の糖尿病性網膜症患者では、ＳＤＦ－１濃度が硝子体において有意に増加しており、症状の重傷度に相関していることが示されている（Ｂｕｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １１５：８６－９３）。トリアムシノロンによる患者の治療は、硝子体におけるＳＤＦ－１レベルを減少させ、疾患を著しく改善し、ＳＤＦ－１と血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）レベルを減少させ、びまん性黄斑浮腫を減退させ、血管新生の活性化を抑制する（Ｂｒｏｏｋｓ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ａｒｃｈ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ １２２：１８０１－７）。増殖性の糖尿病性網膜症のマウス動物モデルでは、患者のＳＤＦ－１レベルに対応したレベルでは、マウスに対して網膜症を誘導し、ＳＤＦ－１に対する阻害抗体の硝子体内注射は網膜の血管新生を阻害した。ＳＤＦ－１とＣＸＣＲ４の両発現は、加齢性黄斑変性症の眼球において認められている（Ｂｈｕｔｔｏ ｅｔ ａｌ．（２００６） Ｂｒ Ｊ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ ９０：９０６－１０）。

【０２３０】

従って、ある態様において、本発明は、抗ＳＤＦ－１抗体またはその抗原結合部位の治療的有効量を患者に投与することからなる、増殖性の糖尿病性網膜症、類嚢胞黄斑浮腫または加齢性黄斑変性症の患者の治療法を提供する。好ましくは、抗体はヒト抗ＳＤＦ－１抗体（例えば、ここに記載されているヒト抗ヒトＳＤＦ－１抗体のいずれか）である。さらに、またはこれとは別に、その抗体はキメラまたはヒト化抗ＳＤＦ－１抗体であってもよい。

【０２３１】

ＣＤ４５＋、コラーゲンＩ＋、ＣＸＣＲ４＋線維細胞の循環プールは肺繊維症を含む繊維症部位に輸送されることが示されている。抗ＳＤＦ－１抗体による治療は、ＣＤ４５＋、コラーゲンＩ＋、ＣＸＣＲ４＋線維細胞の肺内への補充を阻害し、肺繊維症を減退させることが示されている（Ｐｈｉｌｌｉｐｓ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １１４：４３８－４６）。

【０２３２】

従って、ある態様において、本発明は、抗ＳＤＦ－１抗体またはその抗原結合部位の治療的有効量を患者に投与することからなる、肺繊維症のような繊維症の患者の治療法を提供する。好ましくは、その抗体はヒト抗ＳＤＦ－１抗体（例えば、ここに記載されているヒト抗ヒトＳＤＦ－１抗体のいずれか）である。さらに、またはこれとは別に、その抗体はキメラまたはヒト化抗ＳＤＦ－１抗体であってもよい。

【０２３３】

ＣＸＣＲ４へのＳＤＦ－１の結合は、虚血誘導性血管新生や冠微小血管梗塞を含む虚血事象においての役割も示されている（Ｍｉｅｎｏ ｅｔ ａｌ．（２００６） Ａｎｎ Ｔｈｏｒａｃ Ｓｕｒｇ ８２：６５７－６３）。従って、ある態様において、本発明は、抗ＳＤＦ－１抗体またはその抗原結合部位の治療的有効量を患者に投与することからなる、虚血、虚血誘導性血管新生あるいは冠微小血管梗塞の患者の治療法を提供する。好ましくは、その抗体はヒト抗ＳＤＦ－１抗体（例えば、ここに記載されているヒト抗ヒトＳＤＦ－１抗体のいずれか）である。さらに、またはこれとは別に、その抗体はキメラまたはヒト化抗ＳＤＦ－１抗体であってもよい。

【０２３４】

ある態様において、本発明の抗体（例えば、ヒトモノクローナル抗体、多価特異的、二価特異的分子および組成物）は、ある疾患の症状と関連するＳＤＦ－１レベルあるいはその表面膜上にＳＤＦ－１を持つ細胞のレベルを検出するのに使用できる。あるいは、抗体は、ある疾患の症状の阻害あるいは改善に関連し、それゆえにその疾患のメディエーターとして関係するＳＤＦ－１機能を阻害あるいはブロックするのに使用できる。これは、抗

体とＳＤＦ－１が複合体を形成できる条件下で、抗ＳＤＦ－１抗体とサンプルおよび対照サンプルを接触させることによって実施できる。抗体とＳＤＦ－１との間で形成されるいずれの複合体も検出でき、サンプルと対照において比較される。

【０２３５】

別の態様において、本発明の抗体（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子ならびに組成物）は、まず、インビトロの治療的あるいは診断的使用に関連する結合活性で試験できる。例えば、本発明の組成物は、下記実施例に記載のフローサイトメトリーで試験できる。

【０２３６】

本発明の抗体（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子、免疫抱合体ならびに組成物）は、ＳＤＦ－１関連疾患の治療および診断に追加的に使用される。例えば、ヒトモノクローナル抗体、多価特異的および二価特異的分子および免疫抱合体は、以下の一以上のインビボあるいはインビトロの生物学的活性：ＳＤＦ－１発現細胞の増殖を阻害および／または死滅させること、ヒトエフェクター細胞の存在下で、ＳＤＦ－１発現細胞の食菌作用あるいはＡＤＣＣを仲介すること、またはＳＤＦ－１リガンドのＳＤＦ－１に対する結合を阻害することを引き出すために使用できる。

【０２３７】

特別な態様において、抗体は（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子ならびに組成物）様々なＳＤＦ－１関連疾患を治療、予防あるいは診断するためにインビボで使用される。ＳＤＦ－１関連疾患の例として、とりわけ、乳癌、リウマチ関節炎、骨関節症、増殖性糖尿病性網膜症、自己免疫疾患、癌、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、バーキットリンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫（ＡＬＣＬ）、多発性骨髄腫、皮膚T細胞性リンパ腫、結節性小付着細胞リンパ腫、リンパ性白血病、末梢性Ｔ細胞リンパ腫、レンネルトリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、成人T細胞白血病リンパ種（ＡＴＬＬ）、成人T細胞白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、中心芽球／胚中心細胞型（ｃｂ／ｃｃ）濾胞性リンパ腫、Ｂ細胞のびまん性大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球性（ＡＩＬＤ）様T細胞性リンパ腫、ＨＩＶ関連体腔性リンパ腫、胎児性癌、鼻咽腔の未分化癌（例えば、シュミンケ腫瘍）、キャッスルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症およびその他のＢ細胞リンパ腫が含まれる。

【０２３８】

本発明の抗体組成物（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子ならびに免疫抱合体）のインビボあるいはインビトロでの適切な投与経路は、従来技術としてよく知られており、当業者によって選択できる。例えば、抗体組成物は、注射（例えば静脈あるいは皮下）に投与できる。使用の本分子の適切な用量は、患者の年齢および体重、抗体組成物の濃度および／または剤型に依存する。

【０２３９】

先にも述べたように、本発明のヒト抗ＳＤＦ－１抗体は、細胞毒性物質、放射性毒性物質または免疫抑制物質のような一種以上の他の治療物質とともに共投与できる。抗体は、当該物質に（免疫複合体として）連結させることができ、または、当該物質とは別々に投与できる。後者の場合（別々の投与の場合）、抗体は当該物質の前、後または同時に投与できるか、または、例えば、放射線のような抗癌療法のような他の公知の療法とともに共投与できる。このような治療物質には、特に、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチンブレオマイシン硫酸塩、カルムスチン、クロラムブシル、デカルバチンおよびシクロホスファマイドヒドロキシウレアのような抗腫瘍物質が含まれるが、それらはそれ自体、患者にとって有毒であるかまたは準毒性であるレベルでのみ有効である。シスプラチンは、１００ｍｇ／投与で４週間間隔に静注し、アドリアマイシンは、６０～７５ｍｇ／ｍＬ投与として２１日間間隔に静注する。本発明のヒト抗ＳＤＦ－１抗体またはその抗原結合部分の化学療法剤との共投与は、異なるメカニズムで作用する二種の抗癌剤を提供し、それらはヒト腫瘍細胞に対して細胞毒性効果をもたらす。このような共投与は、薬物

耐性の進展または抗体に反応しなくなるという腫瘍細胞の抗原性の変化に起因する問題を解決できる。

【０２４０】

標的特異的なエフェクター細胞、例えば、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子）に関連するエフェクター細胞も治療剤として使用できる。ターゲッティングのためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球または単球のようなヒトリンパ球である。他の細胞として、好酸球、ナチュラルキラー細胞および他のＩｇＧあるいはＩｇＡ受容体を持つ細胞が含まれる。必要ならば、エフェクター細胞は処方される被験者から得ることができる。標的特異的エフェクター細胞は、生理学的に許容しうる溶液中での細胞懸濁として投与することができる。投与される細胞数は、10^8～10^9オーダーであり、治療目的に応じて変更される。一般的に、その量は、標的細胞、例えば、ＳＤＦ－１発現癌細胞に局在させ、例えば、食作用のように細胞を死滅させるのに十分であろう。投与ルートも変更され得る。

【０２４１】

標的特異的エフェクター細胞での治療は、標的細胞の他の分離技術と組み合わせて実施できる。例えば、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子）あるいはそれら組成物を備えるエフェクター細胞での抗癌治療は、化学療法と組み合わせて使用できる。さらに、併用免疫療法は、異なる２つの細胞傷害性エフェクターを癌細胞拒絶に向けさせるために使用できる。例えば、抗ＦｃγＲＩまたは抗ＣＤ３に結合した抗ＳＤＦ－１抗体は、ＩｇＧ－またはＩｇＡ受容体特異的結合剤との組み合わせで使用できる。

【０２４２】

本発明の二価特異的および多価特異的分子は、例えば、細胞表面の受容体を覆い、排除することによるエフェクター細胞のＦｃγＲあるいはＦｃγＲレベルの調節にも使用できる。抗Ｆｃ受容体の混合物はこの目的にも使用できる。

【０２４３】

補体に結合するＩｇＧ１、－２、－３またはＩｇＭの部分のような補体結合部位を持つ本発明の組成物（例えば、ヒト、ヒト化もしくはキメラ抗体、多価特異的および二価特異的分子ならびに免疫抱合体）は、補体の存在下においても使用できる。ある態様において、本発明の結合剤の標的細胞と適切なエフェクター細胞からなる細胞集団のエキソビボ処置は、補体あるいは補体含有血清の添加によって補強される。本発明の結合剤でコートされた標的細胞の食作用は、補体タンパク質の結合によって改善できる。また、別の態様において、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多価特異的および二価特異的分子）でコートされた標的細胞も補体によって溶解される。さらに、別の態様において、本発明の組成物は補体を活性化しない。

【０２４４】

本発明の組成物（例えば、ヒト、ヒト化もしくはキメラ抗体、多価特異的および二価特異的分子ならびに免疫抱合体）は、補体とともに投与され得る。ある態様において、本開示は、ヒト抗体、多価特異的または二価特異的分子および血清もしくは補体からなる組成物を提供する。補体がヒト抗体や多価特異的または二価特異的分子の近傍に位置しているとき、このような組成物は有利である。あるいは、本発明のヒト抗体、多価特異的または二価特異的分子および補体または血清は、別々に投与されてもよい。

【０２４５】

本発明の範囲には、本発明の抗体組成物（例えば、ヒト抗体、二重特異性若しくは多重特異性分子または免疫複合物）と使用説明書を含むキットも含まれる。当該キットは、さらに、免疫抑制剤、細胞毒性物質、放射性毒性物質のような一以上の付加的試薬または一以上の本発明の付加的ヒト抗体（例えば、第１ヒト抗体と異なるＳＤＦ－１抗原エピトープに結合する相補性活性を有するヒト抗体）を含むことができる。

【０２４６】

従って、本発明の抗体組成物で治療される患者には、さらに、ヒト抗体の治療的効果を

促進しもしくは増強する細胞毒性もしくは放射毒性物質のような別の治療剤を（本発明のヒト抗体投与前、投与時あるいは投与後）追加的に投与できる。

【０２４７】

他の態様において、例えば、患者へのサイトカインの投与のように、患者は、ＦｃγまたはＦｃγ受容体の発現もしくは活性を、例えば促進あるいは阻害する調節物質で追加的に治療できる。多価特異的分子での処置の間に投与される好ましいサイトカインとしては、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）が挙げられる。

【０２４８】

本発明の補体（例えば、ヒト抗体、二重特異性および多重特異性分子）は、ＦｃγＲまたはＳＤＦ－１を発現する標的細胞を、例えば、標識するために使用することもできる。そのような使用において、結合剤は検出分子に結合できる。従って、本発明は、ＦｃγＲのようなＦｃ受容体またはＳＤＦ－１をエキソビボまたはインビボで発現する細胞を局限する方法を提供する。その検出標識として、例えば、放射性同位体、蛍光物質、酵素または酵素共役因子が挙げられる。

【０２４９】

特別な態様において、本発明は、抗体もしくはその部分とＳＤＦ－１とが複合体を形成できるような条件下で、サンプルおよび対照サンプルをＳＤＦ－１と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体もしくはその抗原結合部位と接触させることからなる、サンプル中のＳＤＦ－１抗原の存在を検出あるいはＳＤＦ－１抗原量を測定する方法を提供する。複合体の形成が検出できると、対照サンプルに対するサンプル間の複合体形成の相違は、サンプル中のＳＤＦ－１抗原の存在を示すものとなる。

【０２５０】

さらに、別の態様において、本発明の免疫抱合体は、抗体に対する化合物の結合によって、ＳＤＦ－１細胞表面受容体を持つ細胞に化合物（例えば、治療剤、標識、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剤など）をダーゲットするのに使用できる。例えば、抗ＳＤＦ－１抗体は、米国特許番号６，２８１，３５４および６，５４８，５３０、米国特許公開番号２００３００５０３３１、２００３００６４９８４および２００４００８７４９７に記載され、ＷＯ０３／０２２８０６で公開される毒性化合物のいずれかに結合することができる。従って、本発明は、ＳＤＦ－１発現細胞（例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、酵素共役分子のような検出標識）のエキソビボもしくはインビボでの局在を検出する方法も提供する。あるいは、免疫抱合体は、ＳＤＦ－１に対する細胞毒素または放射性毒素のターゲッティングによって、ＳＤＦ－１細胞表面受容体を持つ細胞を死滅させるのに使用できる。

【０２５１】

２００６年８月１１日に出願された米国特許出願番号６０／８３７００４の内容は、そのまま参照されることによって、ここに明確に含まれている。

【０２５２】

さらに、本発明は、以下の実施例によって例証されるが、これは更なる限定として構成されるものでない。この出願において引用される、すべての図、参考文献、特許および公開特許出願の内容は、参照されることによってここに明確に含まれている。

【実施例】

【０２５３】

実施例１：ＳＤＦ－１に対するヒトモノクローナル抗体の製造

抗体は、安定的に遺伝子組み換えされたマウスシステムで完全ヒト抗体を製造するＵｌｔｉＭＡｂ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｓｙｓｔｅｍ（登録商標）と、カスタム抗体ライブラリーを製造し、抗体重鎖および軽鎖のコンビナトリアルライブラリーから選択することを可能とするＯｍｎｉｃｌｏｎａｌ（登録商標）ファ

ージティスプレイシステムの組合せからなる、Ｔｒａｎｓ－Ｐｈａｇｅ^{SM}技術で製造した。

【０２５４】

遺伝子組み換えＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）およびＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）

ＳＤＦ－１に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、それぞれがヒト抗体遺伝子を発現する遺伝子組み換えＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）のＨＣｏ７系と遺伝子組み換えトランス染色体マウスのＫＭ系を用いて調製した。これらのマウス系のそれぞれにおいて、内因性マウスκ軽鎖遺伝子を、Ｃｈｅｎら（１９９３）ＥＭＢＯ　Ｊ．　１２：８１１－８２０に記載のようにホモ接合により破壊し、内因性マウス重鎖遺伝子は、ＰＣＴ公報ＷＯ０１／０９１８７の実施例１に記載のようにホモ接合により破壊した。これらのマウス系のそれぞれは、Ｆｉｓｈｗｉｌｄら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：８４５－８５１に記載されているように、ヒトκ軽鎖導入遺伝子ＫＣｏ５を有している。ＨＣｏ７系は、米国特許５，５４５，８０６、５，６２５，８２５、および５，５４５，８０７に記載されているように、ＨＣｏ７ヒト重鎖導入遺伝子を有している。ＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）系は、ＰＣＴ公報ＷＯ０２／４３４７８に記載されているように、ＳＣ２０トランス染色体を含んでいる。

【０２５５】

ＨｕＭａｂおよびＫＭの免疫

ＳＤＦ－１に対する完全ヒトモノクローナル抗体を産生するため、ＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）およびＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）のマウスを、精製組み換えＳＤＦ－１α（Ｐｅｐｔｒｏｔｅｃｈ；Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）で免疫した。ヒトアイソフォームＳＤＦ－１α、ＳＤＦ－１βおよびＳＤＦ－１γは、その細胞外ドメインが同じなので、交互に使用できる。ＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）の一般的免疫スキームは、Ｌｏｎｂｅｒｇ、Ｎ．ら（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ　３６８（６４７４）：８５６－８５９；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ，Ｄ．ら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：８４５－８５１およびＰＣＴ公報ＷＯ９８／２４８８４に記載されている。当該マウスは、最初の抗原注入時に６－１６週齢であった。ＳＤＦ－１α精製組み換え調製物（５～５０μｇ）を用いて、ＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）およびＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）をそれぞれ免疫するのに使用した。

【０２５６】

遺伝子組み換えマウスは、完全フロイントアジュバントまたはＲｉｂｉアジュバント中の抗原で、腹腔内（ＩＰ）、皮下（Ｓｃ）あるいは足蹠（ＦＰ）のいずれかに２回免疫し、次に不完全フロイントアジュバントまたはＲｉｂｉアジュバント中の抗原で（総計１１回まで）、ＩＰ、ＳｃあるいはＦＰに３～２１日間免疫した。免疫応答は眼窩後方出血によりモニタリングした。血漿は、ＥＬＩＳＡ（下記に説明）によりスクリーニングし、抗ＳＤＦ－１ヒトイムノグロブリンの十分な力価をもつマウスを融合に用いた。屠殺３および２日前にマウスに抗原を静注によりブーストし、脾臓を除去した。

【０２５７】

抗ＳＤＦ－１抗体産生ＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）またはＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）の選択

ＳＤＦ－１に結合する抗体を産生するＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）またはＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）を選択するため、免疫マウス由来の血清をＦｉｓｈｗｉｌｄ，Ｄ．ら（１９９６）に記載のようにＥＬＩＳＡによって試験した。簡単に述べると、マイクロタイタープレートに、ＰＢＳ中１～２μｇ／ｍＬで精製組み換えＳＤＦ－１をコートし、５０μＬ／ウェルを４℃で一晩インキュベーションし、次に、２００μＬ／ウェルのＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ（０．０５％）中の５％ウニワトリ血清によりブロックした。ＳＤＦ－１免疫マウス由来の血清希釈物を各ウェルに添加し、室温で１～２時間インキュベーションした。このプレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで洗浄した後、西洋わさびパーオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃポリクローナル抗体とともに室温で１時間イン

キュベーションした。洗浄後、プレートをＡＢＴＳ基質（Ｓｉｇｍａ，Ａ－１８８８，０．２２ｍｇ／ｍＬ）で発色させ、分光光度計によりＯＤ４１５－４９５で分析した。最大力価の抗ＳＤＦ－１抗体を産生したマウスを抗体製造に使用した。

【０２５８】

ファージーディスプレイ　コンビナトリアル　ライブラリーの作製およびスクリーニング

抗体可変領域の初回ｃＤＮＡライブラリーを、ＳＤＦ－１で免疫したＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）またはＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）のいずれかの脾臓で構築した。次に、抗体可変領域はファージ発現ベクターにクローニングした。ファージ選択は、ビオチン化ＳＤＦ－１を用いたＯｍｎｉｃｌｏｎａｌ（登録商標）ファージ選択法（Ｂｉｏｓｉｔｅ　Ｉｎｃ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）で実施し、ナノモルアフィニティー（ＫＭ脾臓）あるいはナノモル以下のアフィニティー（ＨｕＭａｂ脾臓）をもつ可変領域断片をスクリーニングした。問題の可変領域断片は、Ｆａｂ発現ベクターに再クローニングされ、そのＦａｂの結合アフィニティーおよび機能アフィニティーについて再試験した。プライマーをコードする可変領域のＮ末端部位は、各可変領域についての生殖細胞系列配列に対して戻し変異させた。抗体全体は、高アフィニティーの抗ＳＤＦ－１　Ｆａｂから標準的な分子生物学的技術により作製した。

【０２５９】

ＳＤＦ－１に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの産生

代替法として、標準的プロトコールによるＰＥＧまたはＣｙｔｏ　Ｐｕｌｓｅ大型チェンバー細胞融合エレクトポレータ（Ｃｙｔｏ　Ｐｕｌｓｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇｌｅｎ　Ｂｕｒｎｉｅ，ＭＤ）を用いる電場に基づくエレクトロフュージョンを用いて、ＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）またはＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）から単離したマウス脾臓細胞を、マウス骨髄細胞株にＰＥＧで融合させた。次に、生成したハイブリドーマを抗原結合抗体の産生でスクリーニングした。免疫マウスからの脾臓細胞の単細胞懸濁物を、５０％ＰＥＧ（Ｓｉｇｍａ）により、その４分の１数のＳＰ２／０非分泌性マウス骨髄細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ１５８１）に融合させた。細胞を、約1×10^{5}／ウェルで平底マイクロタイタープレートに接種し、１０％ウシ胎児血清、１０％Ｐ３８８Ｄ１（ＡＴＣＣ，ＣＲＬ　ＴＩＢ－６３）調製培地、ＤＭＥＭ（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ，ＣＲＬ　１００１３、高グルコース、Ｌ－グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを有する）中３～５％オリゲン（ＩＧＥＮ）及び５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．０５５ｍＭ　２－メルカプトエタノール、５０ｍｇ／ｍＬ　ゲンタマイシンおよび１×ＨＡＴ（Ｓｉｇｍａ、ＣＲＬ　Ｐ－７１８５）を含む選択培地中で約２週間インキュベーションした。１～２週後、ＨＡＴからＨＴに置き換えた培地中で、細胞を培養した。次に、ヒト抗ＳＤＦ－１モノクローナルＩｇＧ抗体について、それぞれのウェルをＥＬＩＳＡ（上記で記載）でスクリーニングした。いったん強いハイブリドーマ増殖が起こった場合、培地を通常１０～１４日後にモニタリングした。抗体分泌ハイブリドーマを再度接種し、再度スクリーニングし、もしヒトＩｇＧがまだ陽性であれば、抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体を少なくとも２回、限定希釈によってサブクローニングした。次に、安定なサブクローンをインビトロで培養し、少量の抗体を組織培地に産生させ、さらに特性解析した。

【０２６０】

ＫＭ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）から生成されたハイブリドーマクローン１Ｄ３および１Ｈ２と、ＨｕＭａｂ　Ｍｏｕｓｅ（登録商標）から生成された１Ｃ６および２Ａ５を選択し、さらに分析した。

【０２６１】

実施例２：ヒトモノクローナル抗体１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５の構造特性解析

１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５の重鎖および軽鎖可変領域をコードするｃＤＮＡ配列を、標準的ＰＣＲ技術を用いて１Ｄ３、１Ｈ２、１Ｃ６および２Ａ５ハイブリドーマからそれぞれ得て、標準的ＤＮＡ配列決定技術を用いて配列決定した。

【０２６２】

１Ｄ３の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図１Ａおよび配列番号：３

３および１にそれぞれ示した。
【０２６３】
１Ｄ３の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図１Ｂおよび配列番号：３７および５にそれぞれ示した。
【０２６４】
１Ｄ３重鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン重鎖配列と比較し、１Ｄ３重鎖がヒト生殖細胞系列V_H１－２４由来のV_H部分、ヒト生殖細胞系列６－１９由来のＤ部分、およびヒト生殖細胞系列ＪＨ６ｂ由来のＪＨ部分を利用することを明らかにした。１Ｄ３　V_H配列の生殖細胞V_H１－２４配列への配列比較を図５に示した。さらに１Ｄ３　V_H配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図１Ａおよび５ならびにそれぞれ配列番号：９、１３および１７に示した重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。
【０２６５】
１Ｄ３軽鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン軽鎖配列と比較し、１Ｄ３軽鎖がヒト生殖細胞系列V_KＬ１８由来のV_L部分およびヒト生殖細胞系列ＪＫ４由来のＪＫ部分を利用することを明らかにした。１Ｄ３　V_L配列の生殖細胞V_KＬ１８配列への配列比較を図７に示した。さらに１Ｄ３　V_L配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図１Ｂおよび７ならびにそれぞれ配列番号：２１、２５および２９に示した軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。
【０２６６】
１Ｈ２の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図２Ａおよび配列番号：３４および２にそれぞれ示した。
【０２６７】
１Ｈ２の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図２Ｂおよび配列番号：３８および６にそれぞれ示した。
【０２６８】
１Ｈ２重鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン重鎖配列と比較し、１Ｈ２重鎖がヒト生殖細胞系列V_H１－２４由来のV_H部分、ヒト生殖細胞系列６－１９由来のＤ部分、およびヒト生殖細胞系列ＪＨ６ｂ由来のＪＨ部分を利用することを明らかにした。１Ｈ２　V_H配列の生殖細胞V_H１－２４配列への配列比較を図５に示した。さらに１Ｈ２　V_H配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図２Ａおよび５ならびにそれぞれ配列番号：１０、１４および１８に示した重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。
【０２６９】
１Ｈ２軽鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン軽鎖配列と比較し、１Ｈ２軽鎖がヒト生殖細胞系列V_KＬ１８由来のV_L部分およびヒト生殖細胞系列ＪＫ４由来のＪＫ部分を利用することを明らかにした。１Ｈ２　V_L配列の生殖細胞V_KＬ１８配列への配列比較を図７に示した。さらに１Ｈ２　V_L配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図２Ｂおよび７ならびにそれぞれ配列番号２２、２６および３０に示した軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。
【０２７０】
１Ｃ６の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図３Ａおよび配列番号：３５および３にそれぞれ示した。
【０２７１】
１Ｃ６の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図３Ｂおよび配列番号：３９および７にそれぞれ示した。
【０２７２】
１Ｃ６重鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン重鎖配列と比較し、１Ｃ６重鎖がヒト生殖細胞系列V_H３－７由来のV_H部分、ヒト生殖細胞系列７－２７由来のＤ部分およびヒト生殖細胞系列ＪＨ６ｂ由来のＪＨ部分を利用することを

明らかにした。１Ｃ６　V_H配列の生殖細胞V_H３－７配列への配列比較を図６に示した。さらに、１Ｃ６　V_H配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図３Ａおよび６ならびにそれぞれ配列番号：１１、１５および１９に示した重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。

【０２７３】

１Ｃ６軽鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン軽鎖配列と比較し、１Ｃ６軽鎖がヒト生殖細胞系列V_KＬ１８由来のV_L部分およびヒト生殖細胞系列ＪＫ１由来のＪＫ部分を利用することを明らかにした。１Ｃ６　V_L配列の生殖細胞V_KＬ１８配列への配列比較を図８に示した。さらに１Ｃ６　V_L配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図３Ｂおよび８ならびにそれぞれ配列番号：２３、２７および３１に示した軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。

【０２７４】

２Ａ５の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図４Ａおよび配列番号：３６および４にそれぞれ示した。

【０２７５】

２Ａ５の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図４Ｂおよび配列番号：４０および８にそれぞれ示した。

【０２７６】

２Ａ５重鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン重鎖配列と比較し、２Ａ５重鎖がヒト生殖細胞系列V_H３－７由来のV_H部分、ヒト生殖細胞系列７－２７由来のＤ部分、およびヒト生殖細胞系列ＪＨ６ｂ由来のＪＨ部分を利用することを明らかにした。２Ａ５　V_H配列の生殖細胞V_H３－７配列への配列比較を図６に示した。さらに２Ａ５　V_H配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図４Ａおよび６ならびにそれぞれ配列番号：１２、１６および２０に示した重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。

【０２７７】

２Ａ５軽鎖イムノグロブリン配列を公知のヒト生殖細胞系列イムノグロブリン軽鎖配列と比較し、２Ａ５軽鎖がヒト生殖細胞系列V_KＬ１８由来のV_L部分およびヒト生殖細胞系列ＪＫ１由来のＪＫ部分を利用することを明らかにした。２Ａ５　V_L配列の生殖細胞V_KＬ１８配列への配列比較を図８に示した。さらに２Ａ５　V_L配列をＣＤＲ領域決定のＫａｂａｔシステムを用いて分析し、図４Ｂおよび８ならびにそれぞれ配列番号：２４、２８および３２に示した軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤ３領域を図示した。

【０２７８】

実施例３：抗ＳＤＦ－１ヒトモノクローナル抗体の結合特性および結合動態の特性解析

この実施例では、抗ＳＤＦ－１抗体の結合特性および結合動態をビアコア分析およびウエスタン・イムノブロットアッセイにより調べた。

【０２７９】

結合親和性と動態

抗ＳＤＦ－１抗体を、ビアコア分析（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）によって親和性と結合動態について特性解析した。精製抗ＳＤＦ－１抗体を、１級アミンによりＣＭ５チップ（カルボキシメチルデキストラン塗布チップ）に標準的アミンカップリング化学およびビアコアが提供しているキットを用いて共有結合させた。結合は、濃度４０、３０、２０、１０および５ｎＭでかつフロー速度７５μＬ／分でＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）中にＳＤＦ－１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）を流すことによって測定した。ＳＤＦ－１は、二量体集団を最大化する希釈ののち、すぐにインジェクトした。抗原抗体会合動態は２分間追跡し、解離動態は８分間追跡した。会合および解離曲線は、ＢＩＡ評価ソフトウェア（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）を用いて、１：１ラングミュア結合モデルに適合した。決定したK_D、k_{on}およびk_{off}値を表３に示した。

【表３】

表３　ＳＤＦ－１　ＨｕＭＡｂｓについてのビアコア結合データ

抗SDF-1抗体	結合活性 K_D x 10^{-9} (M)	On rate k_{on} x 10^5 (1/Ms)	Off rate k_{off} x 10^{-4} 1/s
1D3	0.63	8.0	5.0
1H2	1.32	6.0	8.4
1C6	0.46	14	6.4
2A5	0.37	29	11

【０２８０】

ＳＤＦ－１の免疫沈降およびウエスタンブロット

免疫沈降およびそれに続くウエスタンブロット解析によって、抗ＳＤＦ－１抗体を天然ＳＤＦ－１への結合で特徴づけした。

【０２８１】

４．５×１０^{8}個の血小板の調製を行い、９０－９５％コンフルエントの状態のＣＨＯ－ＳＤＦ、ＣＨＯ－ＳおよびＭＣＦ７細胞の細胞をＴ７５フラスコで調製した。その細胞を冷ＰＢＳで２回洗浄した。その細胞を１．５ｍｌの溶解緩衝液（Ｒｏｃｈｅ　Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ，Ｃａｔ＃１７１９３９４）で溶解して、氷上で、ｆｉｖｅ　１－ｓｅｃｏｎｄ　ｂｕｒｓｔｓで超音波処理して破壊した。その混合物を１０分間、１２０００×ｇで遠心分離し、その上清を回収した。タンパク質濃度は、Micro BCA タンパク質アッセイキット（ＰＩＥＲＣＥ，Ｃａｔ＃２３２３５）で決定した。その混合液に５０μＬプロテインＧアガロースを添加して事前除去し、３時間２－８℃下でインキュベートした。５μｇの抗ＳＤＦ－１抗体２Ａ５またはアイソタイプコントロール抗体を５００μｇの血小板およびＣＨＯ－ＳＤＦ、ＣＨＯ－ＳおよびＭＣＦ７細胞溶解物の一つに添加し、ロッキングプラットフォーム上、２－８℃下で１時間インキュベートした。ビーズを１２，０００×ｇ、１分間の遠心分離で沈殿させた。次にビーズは洗浄緩衝液（Ｒｏｃｈｅ　Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ，Ｃａｔ＃１７１９３９４）で６回洗浄した。ウエスタン解析については、各サンプルに６０μｌのＬＤＳローディング緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｔ＃ＮＰ０００７）を添加し、３分間１００℃で熱処理し、タンパク質を変性させた。標準的なウエスタンブロット技術を使用して、３μｇ／ｍｌ　２Ａ５マウスキメラ抗体で、室温下、１時間ブロットした。その結果、抗ＳＤＦ－１抗体は、ＳＤＦ－１の分子量に一致する約８ＫＤａのバンドに結合することが示された。

【０２８２】

実施例４：ＳＤＦ－１のオリゴマー状態の同定のためのビアコアおよび蛍光分光的手法

ＳＤＦ－１のオリゴマー状態は、蛍光異方性および蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）実験で決定した。両実験は、Ｓｐｅｘ　Ｆｌｕｏｒｏｌｏｇ　３．２装置（Ｓｐｅｘ，Ｅｄｉｓｏｎ，ＮＪ）で実施した。

【０２８３】

蛍光異方性実験では、蛍光標識したＳＤＦ－１を使用した。実験は、４９４ｎｍでの励起および５１４ｎｍでの発光をモニターして、５ｎｍ帯域通過にセットされたスリットで実施した。これら実験において、１２．５μＭ　ＳＤＦ－１溶液を５０ｎＭに希釈して、経時的に異方性を測定した。これら実験は、ＰＢＳ、ＰＢＳおよび１ｍＭ　塩化カルシウム中で実施した。異方性は、分子複合体の全重量および形態の機能であり、塩化カルシウムがない場合減少し、１ｍＭ　塩化カルシウム添加で定常状態となる。

【０２８４】

ＦＲＥＴ実験には、ダンシル標識ＳＤＦ－１およびフルオレセイン標識ＳＤＦ－１を使

用した。これら実験は、３３５ｎｍでの励起および５２０ｎｍでの発光で行い、分光計スリットは５ｎｍにセットした。これら実験においては、１２．５μＭ　ＳＤＦ－１溶液を５０ｎＭに希釈し、ＦＲＥＴシグナルは経時的に測定された。これら実験はＰＢＳおよびＰＢＳ＋１ｍＭ　塩化カルシウム中で実施した。その結果を図９に示す。図９Ａは、異方性測定に基づき、希釈後の経時的なＳＤＦ－１二量体の消失における１ｍＭ　塩化カルシウムの効果を示す。図９Ｂは、ＦＲＥＴ測定に基づき、希釈後の経時的なＳＤＦ－１二量体の消失における１ｍＭ　塩化カルシウムの効果を示す。蛍光異方性法およびＦＲＥＴ実験は、１ｍＭ　塩化カルシウム添加ＰＢＳ緩衝液中でなく、ＰＢＳ緩衝液への希釈後の経時的なＳＤＦ－１二量化の消失を示している。

【０２８５】

実施例５：示差走査熱量測定による抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体の熱安定性

抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体の熱安定性を、抗体の融解温度の熱量分析で決定した。

【０２８６】

融解温度（T_m）の熱量測定は、オートサンプラー（ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＬＬＣ，Ｎｏｒｔｈａｍｐｔｏｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）と組み合わせたＶＰ－キャピラリーＤＳＣ走査示差熱量計プラットフォームで実施した。サンプルセル容量は０．１４４ｍＬである。変性データは１℃／分の速度で、３０から９５℃に、２．０μＭ濃度のサンプルを熱処理することによって得られた。タンパク質サンプルはｐＨ７．４のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中にある。同じ緩衝液を、比較によるモル熱容量取得のための参照セルで使用した。観察されたサーモグラムは、非２段階モデルに基づいて、ソフトウェアＯｒｉｇｉｎ　ｖ７．０を使用して、解析データをベースライン修正および正規化された。そのデータを表４に示した。抗ＳＤＦ－１抗体２Ａ５は、示差走査熱量測定によって、１Ｃ６、１Ｈ２および１Ｄ３に比べより安定である。

【表４】

表４　ＳＤＦ－１　ＨｕＭＡｂｓ　示差走査熱量測定データ

抗SDF-1抗体	T_m1 (℃)	T_m2 (℃)
1D3	57.8	65.8
1H2	59.9	65.7
1C6	59.6	66.8
2A5	68.6	75.0

【０２８７】

実施例６：化学変性下での物理的安定化方法

抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体の安定性を、蛍光分光法により化学変性の中間点を測定して比較した。

【０２８８】

化学変性の蛍光測定は、Ｍｉｃｒｏｍａｘプレートリーダー（ＳＰＥＸ，Ｅｄｉｓｏｎ，ＮＪ）にインストールされているＳＰＥＸ　Ｆｌｕｏｒｏｌｏｇ　３．２２で実施した。その測定は、１６種の異なる濃度の塩酸クアニジウムＰＢＳ緩衝液に平衡化するため、抗体サンプルを２４時間放置して行った。測定は、黒色、低容量、非吸着性表面３８４ウェルプレート中で行い、１ウェル当り１２μＬ中に１μＭの抗体を必要とした。蛍光は、２８０ｎｍで励起され、３００から４００ｎｍ間の発光スペクトルで測定した。走査速度は、ｎｍ当り１秒で、スリットは５ｎｍ通過幅で設定した。緩衝液ブランクはＰＢＳを使用し、データから自動的に差し引かれた。データは、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ソフトウェアを使用して、２状態変性モデルに適用した。そのデータを表５に示した。

【表５】

表５：蛍光分光測定により決定された抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体の化学変性

クローン	アンフォールディング中間点 (M)
Z2/A5	2.63
B1/H2	1.96
Z1/C6	1.94
B1/D3	1.94

【０２８９】

実施例７：質量分析法およびビアコアによる天然および合成ペプチドに基づくエピトープ・マッピング法

ケモカインの分子エピトープの質量分光学的配列同定には、二つのアプローチ：エピトープ抽出およびエピトープ除去がある。エピトープ抽出では、まず、ケモカインを酵素消化し、その後、ペプチド断片を抗ケモカイン抗体結合ＰＯＲＯＳ樹脂と混合し、結合剤で確認した。一方、エピトープ除去では、その消化はケモカインが抗体に結合している間、イン・サイチュで実施する。

【０２９０】

質量分析法によるモノクローナル抗体に結合する合成ペプチドの研究方法

非結合剤を洗い除いた後、抗体樹脂にまだ結合しているペプチドを含むエピトープは、直接、ともにＭＡＬＤＩ－ＭＳ分析あるいは抗体から溶出分離させ、ＥＳＩ－ＭＳ解析した。

【０２９１】

いくつかのペプチド断片パターンが全ケモカイン配列を網羅するよう、様々なプロテアーゼを使用して生成した。様々な重複はあるが、還元および天然型の両ケモカインペプチドをエピトープ結合試験に付した。エピトープ領域の近くを厳格に切断するためには、多数の酵素の組合せあるいはシリーズが必要とされるかもしれない。

【０２９２】

抗体に結合するものとして質量分析法で同定されているペプチドはケモカインの三次元構造上に同定されて、Ｘ線結晶解析によって決定され、公共ドメイン（）上で利用できる。この手順によって、例えば、抗体によって認識される中核エピトープに対してかなり末端であれば、偽陽性として質量分析法によって同定されるアミノ酸の長さを短くすることができる。従って、マッピングされたエピトープに基づいて、合成ペプチドのためのアミノ酸配列を設計することができる。エピトープ（機能的エピトープ）中の重要な残基をさらに同定するために、重要な位置をアラニンに置換したペプチドをその合成のために設計することもできる。そのような合成ペプチドに結合する抗体はビアコアおよび／または質量分析機で試験した。

【０２９３】

ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ

【０２９４】

ビアコアによるモノクローナル抗体に結合する合成ペプチドの研究方法

抗体をビアコアＣＭ５チップに共有結合させた。ペプチドは、１０μｇ／ｍＬの濃度で、ｐＨ７．０の２０ｍＭ酢酸アンモニウムに用時調製した。そのようなペプチドを、１５分間、１０μＬ／分の流速で抗体表面上に流した。

【０２９５】

アイソタイプコントロールに対するペプチドの結合は、ブランクシグナルとして使用した。このアプローチに基づいて、天然の抗原配列とアラニン置換を持つペプチドで、抗体

に結合するものを同定した。

【０２９６】

二つの分子エピトープは、ｍＡｂＺおよびｍＡｂＢと呼ばれるハイブリドーマによって産生されるｈｕＭＡｂの異なる二つの集団から同定された。各２つの抗体グループは、単体または二量体ＳＤＦ－１αのいずれに対しても選択的に結合する。抗ＳＤＦ－１抗体１Ｄ３および１Ｈ２はｍＡｂＢグループ抗体である。抗ＳＤＦ－１抗体１Ｃ６および２Ａ５は、ｍＡｂＺグループ抗体である。ｍＡｂＺグループは２つのエピトープペプチドを認識し、一つは受容体結合部位としても知られるＮ末端領域アミノ酸残基７－１９の近く、一方は、３７－５０残基間の第三ベータシート上である。ｍＡｂＢグループは、ＳＤＦ－１α二量体接触面であるヘパリン結合部位をブロックする。ビアコアデータからの推測により、ｍＡｂＢは、ヘパリンも結合する第一および第二単体の２４～３０残基間の二量体接触面に優位に結合する。ｍＡｂＺとの結合エピトープに関係する一つの重要な残基Ａｒｇ８も、質量分析的アッセイで同定された。

【０２９７】

実施例８：以下の条件が変更された場合のＳＤＦ－１多量化状態およびｍＡｂ結合の変化を測定するビアコアおよび蛍光分光的手法

単体ＳＤＦ－１への抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体の結合を測定するために、ＣＭ５チップに低密度で共有結合させたＳＤＦ－１を用いたビアコア実験を行った。１Ｃ６および２Ａ５については、ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）中、５０、４０、３０、２０および１０ｎＭ濃度のＳＤＦ－１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）を流し、その結合を測定した。１Ｄ３および１Ｈ２については、ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）中、５００、４００、３００、２００および１００ｎＭ濃度のＳＤＦ－１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）を流し、その結合を測定した。表６にそのデータを示す。１Ｃ６および２Ａ５は、単体ＳＤＦ－１に対して、より高い結合活性を示した。

【表６】

表６：単体ＳＤＦ－１に対するモノクローナル抗体の結合

抗 SDF-1 抗体	結合活性 K_D x 10^{-9} (M)	On rate k_{on} x 10^4 (1/Ms)	Off rate k_{off} x 10^{-4} 1/s
1D3	151	1.1	17
1H2	176	0.91	16
1C6	3.6	11	4.0
2A5	4.6	9.6	4.5

【０２９８】

モノクローナル抗体への結合について、ＳＤＦ－１希釈の効果を、抗ＣＨ１チップ上に抗体を捕獲することによって測定し、希釈から２分後の経時的はＳＤＦ－１結合応答を測定した。それら実験は、ＰＳＢ（ｐＨ７．４）中の１Ｄ３および１Ｃ６モノクローナル抗体を使用して行い、ＳＤＦ－１は１２．５μＭから１００ｎＭに希釈した。

【０２９９】

ＳＤＦ－１への抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体の結合に対するｐＨ、Ca^{2+}およびＥＤＴＡの効果を決定するために、ビアコア解析を行った。抗ＳＤＦ－１モノクローナル抗体は、ＣＭ５チップ（ビアコア）に共有結合させ、各緩衝液中で１００ｎＭ　ＳＤＦ－１をチップ全体にわたって流し、希釈から２分間の経時的な結合相の応答を測定した。使用した緩衝液は、ＨＢＳ－ＢＰ（ビアコア）、ＨＢＳ－Ｐ（ＥＤＴＡ欠如）、ＰＢＳ、ＰＢＳ＋１ｍＭ　塩化カルシウムおよび酢酸ナトリウム　ｐＨ５．５＋１５０ｍＭ　塩化ナトリウムである。

【０３００】

ヘパリン硫酸へのＳＤＦ－１の結合阻害は、ストレプトアビジンチップ（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）上でビオチン化ヘパリン硫酸塩（Ｓｉｇｍａ）を捕獲することによって決定し、過剰量のモノクローナル抗体（１Ｈ２および２Ａ５）の存在下および非存在下でのＳＤＦ－１結合を測定した。実験はＰＢＳ中で行った。

【０３０１】

実施例９：^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１αの細胞への結合を阻害することにより測定される機能的活性

ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１結合阻害についての抗ＳＤＦ－１抗体の比較は、標準的な放射標識リガンド結合アッセイで行った。抗ＳＤＦ－１α抗体は、４０ｎＭから２ｐＭの濃度範囲で、１：３で系列希釈した。抗体は、２０００Ｃｉ／ｍｍｏｌの特異的活性を持つ１００ｐＭ ^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１（アマシャムカタログ＃ＩＭ３１４－２５ＵＣＩ）存在下でＣＥＭ細胞に添加した。同じアイソタイプの無関係な抗体をネガティブコントロールとして使用した。放射標識リガンドに結合し得る全量は、抗体の非存在下で、^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１をＣＥＭ細胞に結合させることによって決定した。放射標識リガンドの非特異的結合は、１μＭ　非標識ＳＤＦ－１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　カタログ＃３００－２８Ａ）の存在下、^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１を結合させることによって決定した。その結果を図１０に示す。

【０３０２】

実施例１０：抗ＳＤＦ－１抗体はＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１誘導カルシウム流入を阻害する。

【０３０３】

ＣＥＭ細胞を蛍光カルシウム染色、Ｃａｌｃｉｕｍ３（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）によって標識した。抗ＳＤＦ－１抗体は、濃度範囲が１００ｎＭから１ｐＭとなるように１：３で系列希釈して滴下して、Ｆｌｅｘｓｔａｔｉｏｎ　ｍａｃｈｉｎｅ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）に導入する前に、５０ｎＭ　ＳＤＦ－１α（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）と混合した。ネガティブコントロールとして、同じアイソタイプの無関係の抗体を使用した。その後、細胞をＳＤＦ－１α／抗体混合物で刺激した。最大となるカルシウム流入シグナルを達成するため、抗体非存在下での細胞を（０．１％ＢＳＡまたはＨＢＳ含有ハンクス緩衝生理食塩水で調製した）ＳＤＦ－１αで刺激した。ベースラインを決定するため、細胞は０．１％ＢＳＡ含有ＨＢＳで刺激した。ＳＤＦ－１α刺激によるカルシウム放出は、経時的なカルシウム依存性蛍光で測定した。その結果生じた蛍光トレースの曲線下の領域は、カルシウム流入の指標として報告される。抗ＳＤＦ－１抗体によるカルシウム流入の阻害を図１１に表す。データをプロットし、ＥＣ５０は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアおよび非線形曲線適合、シグモイド用量反応式を使用して計算した。

【０３０４】

実施例１１：抗ＳＤＦ－１抗体はＣＥＭ細胞のＳＤＦ－１誘導遊走を阻害する。

【０３０５】

ＣＥＭ細胞をＰｅｒｋｉｎ　ＥｌｍｅｒのＢＡＴＤＡ試薬で標識した。１００ｎＭから１ｐＭの濃度範囲となるよう、抗ＳＤＦ－１抗体の１：３系列希釈を滴下し、５ｎＭ　ＳＤＦ－１α（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）を混合した。ネガティブコントロールとして、同じアイソタイプの無関係な抗体を使用した。抗体の存在あるいは非存在下で組み換えヒトＳＤＦ－１αを、１ウェル当り直径５．７ｍｍフィルターを備える９６ウェルＮｅｕｒｏｐｒｏｂｅ遊走プレートの下方チャンバーに５ｎＭで添加した。各ウェルは５μｍ細孔を有する。標識されたＣＥＭ細胞は、１ウェル当り５０万個の濃度でフィルター上に導入した。遊走プレートを３７℃下、２．５時間インキュベートした。遊走細胞は、プレートの下方チャンバーに捕らえられ、溶解後、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒによるユーロピウム検出溶液で検出した。化学発光シグナルは、Ｆｕｓｉｏｎ装置に記録される。抗ＳＤＦ－１抗体によるＳＤＦ－１α誘導性遊走の阻害を図１２に示す。

【０３０６】

実施例１２：抗ＳＤＦ－１抗体を使用した抗体誘発関節炎の治療

マウス・コラーゲン誘発関節炎（ＣＩＡ）は、ヒトのリウマチ関節炎の実験的スクリーニングモデルとして広く使用されている。このモデルマウスは、タイプＩＩコラーゲンで免疫され、タイプＩＩコラーゲン分子の特異的領域に対する抗体の産生を誘導する。疾患の発症は徐々に生じ、６週間が典型的なＣＩＡモデルでの最短期間である。さらに最近では、タイプＩＩコラーゲンの４つの自己抗原エピトープが同定され、それらエピトープに対して生成される４つのモノクローナル抗体カクテルを関節炎誘導に使用した。抗コラーゲン抗体投与３日後のＬＰＳ注入は、疾患の急速な発症を誘発した。この抗体誘発モデルでは、疾患の発症は急激であり、全研究が２週間以内に完了できる。この抗体誘発モデルは、滑膜や関節腔への炎症細胞広範な浸潤、パンヌス形成、骨および関節組織の顕著な破壊といった典型的なＣＩＡモデルで認められるのと同様の特徴を示す。故に、このモデルは、典型的なモデルよりもより短期間で、同様の方法によって抗炎症物質の効果を評価するのに使用できる。

【０３０７】

この実験では、６～８週例のＢａｌｂ／ｃマウスを使用した。０日目に、４ｍｇの抗コラーゲン抗体カクテル（Ａｒｔｈｒｏｇｅｎ）をマウスに注射し、２日目に２５μｇ ＬＰＳを注射した。１、４、７および１０日に、抗ＳＤＦ－１抗体、アイソタイプコントロール抗体、ＰＢＳまたはコルチコステロイド、デキサメタゾンを、抗体については１５ｍｇ／ｋｇ、デキサメタゾンについては０．３ｍｇ／ｋｇを処置した。この試験で試験された抗ＳＤＦ－１抗体は、クローン１Ｈ２、２Ａ５および１Ｃ６である。関節炎の発症は、３、５、８、１０、１２および１５日目に、０～４段階の臨床的観察（発赤および腫脹）でスコア付けされた。重傷度スコアは、正常はゼロ、足首もしくは手首の明瞭な発赤もしくは軽度の腫脹または一つの指趾の腫脹は１、一以上の指趾の発赤および腫脹は２、脚全体、中足部、踝関節および／または腕節の発赤および腫脹は３、複数の関節を含んだ前脚の炎症、腫脹あるいは奇形は４である。重傷度スコアは、各動物に全スコア１６として、すべての４つの脚について評価した。すべての４つの脚の腫脹（脚の厚さ）は、３、５、８、１０、１２および１５日での高精度カリパスで測定した。

【０３０８】

血清調製物中の血液検体は、２回：処置開始前および検死前にすべてのマウスから回収した。１５日目に動物を解剖し、２つの後ろ足を足首の上約０．５ｃｍのところで切断し、組織分析のために１０％ホルマリン中性緩衝液で保存した。

【０３０９】

その結果を図１３－１から１３－３に示した。図１３－１は、各マウスについて、平均スコア（Ａ）および平均の脚幅（Ｂ）を示している。図１３－２は、１５日目の平均スコア（Ｃ）および平均脚（厚）（Ｄ）を示している。図１３－３は平均病理スコア（Ｅ）および２４日目の平均病理スコア（Ｆ）を示している。２Ａ５（黒塗上向三角）を処置したマウスは、アイソタイプコントロール（灰色下向三角）で処置したマウスほど優位に重症とならなかった。アイソタイプコントロールグループの疾患の重症度と脚の炎症は、ポジティブコントロールであるデキサメタゾン（大四角）と同程度であった。しかしながら、１Ｈ２グループおよび１Ｃ６グループは、抗体処置により何れの効果も示さず、アイソタイプコントロールと同等であった。そのような知見の有意さを推定するための統計解析により、Ｚ２Ａ５グループの効果はＰ値０．０００６で有意であり、一方、Ｂ１Ｈ２グループの効果は有意でなかった（Ｐ＝０．３４６）。

【０３１０】

実施例１３：マウス空気嚢モデルにおける抗ＳＤＦ－１抗体の効果

抗ＳＤＦ－１抗体の効果を試験するため、空気嚢モデルを開発した。このインビボモデルでは、多種類の細胞がＳＤＦ－１に応答して遊走し、その空気嚢は細胞遊走のためのインビボ微小環境を提供する。主に、マウスを麻酔し、滅菌空気を注射することによって空気嚢を作製した。試験日に、空気嚢に抗ＳＤＦ－１抗体の存在あるいは非存在下で組み換えヒトＳＤＦ－１αを注射した。抗体の効果を評価した。この実施例では、抗ＳＤＦ－１

抗体２Ａ５、１Ｃ６、１Ｄ３および１Ｈ２を試験した。

【０３１１】

８～１２週例（ＣＲＬ）の雌Ｃ５７ＢＬ／６マウスをイソフルランで麻酔し、マウスの背中の皮下に５ｍＬの滅菌空気を注射することによって空気嚢を形成した。３日後、さらに３ｍＬの滅菌空気を注射した。７日目に、ＰＢＳあるいはＳＤＦ－１αのみ（２００ｎｇ　ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）、ＳＤＦ－１α＋ヒトＩｇＧ４アイソタイプコントロールもしくはＳＤＦ－１α＋５０μｇもしくは１００μｇ抗ＳＤＦ－１抗体１ｍＬを注射した。各試験群には５匹のマウスを使用した。４時間後、マウスをCO_2で窒息死させ、嚢を２ｍＬのＰＢＳ／５ｍＭ　ＥＤＴＡで洗浄し、続いて、さらに３ｍＬのＰＢＳ／５ｍＭＥＤＴＡで２回洗浄した。浸出物を室温下５００×ｇで５分間遠心分離した。細胞を血球計で計測し、リンパ球下位集団の血球百分率をｃｙｔｏｓｐｉｎ法で実施し、Ｋｗｉｋ－Ｄｉｆｆ染色キットで染色した（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）。

【０３１２】

その結果を図１４に示す。４００ｎｇのＳＤＦ－１αで、空気嚢への白血球の遊走が誘導され、典型的に白血球の全細胞数がＰＢＳ投与空気嚢の場合に比べて２～３倍増加している。抗ＳＤＦ－１抗体を１００μｇ／ｍＬ濃度で投与した場合、ＰＢＳのみで認められたレベルまで細胞遊走は完全に阻害された（図１４Ａ）。アイソタイプコントロール抗体は全く効果を示さなかった。図１４Ｂで、遊走した好中球（Ｎｅｕ）または単球／リンパ球（その他）の割合を測定した。好中球に代表される遊走細胞の大半は、抗ＳＤＦ－１抗体で阻害される。同様に、単球およびリンパ球も阻害される。この抗体濃度で、試験した抗体の阻害活性に違いは認められなかった。

【０３１３】

次の試験で、遊走を誘導するのに使用されたＳＤＦ－１の濃度を２００ｎｇに低減させ、抗体濃度を１００μｇ／ｍＬと５０μｇ／ｍＬの低いレベルで試験した。２Ａ５および１Ｃ６は５０μｇと１００μｇで、好中球、リンパ球および単球の遊走を阻害した（図１５）。好中球、リンパ球および単球の数は、ＰＢＳレベルまで完全に低下した。この濃度での力価は二つの抗体で同程度であった。１００μｇのアイソタイプコントロールには効果はなかった。

【０３１４】

結局、抗ＳＤＦ－１抗体、２Ａ５、１Ｃ６、１Ｈ２および１Ｄ３はインビボでの細胞遊走の有望な阻害剤である。

【０３１５】

実施例１４：蛍光微量アッセイ技術ＦＭＡＴ試験

この実施例において、ＨｕＶＥＣ細胞存在下でのＳＤＦ－１に対する抗ＳＤＦ－１抗体結合を試験した。ＨｕＶＥＣ細胞はＳＤＦ－１が結合するグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）を含む。

【０３１６】

ＨｕＶＥＣ（ヒト臍帯血管内皮細胞，Ｃａｍｂｒｅｘ，Ｐ／Ｎ　ＣＣ－２５１９）細胞は、９６ウェル黒色、透明底、不透明プレート上ウェル当り２００μＬ培地中で、ウェル当り1×10^4細胞播種して、３７℃、CO_2下で一晩培養した。慎重に細胞上清を取り除いて下さい。抗原と抗体を４×濃度で希釈して下さい。５０μＬアッセイ緩衝液（ＰＢＳ＋０．５％ＦＢＳ）、５０μＬ　ｒｈ　ＳＤＦ－１α（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｐ／Ｎ　３００－２８Ａ）、５０μＬ抗体および５０μＬ　１：３０００希釈Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｐ／Ｎ　２１４４５）またはヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｐ／Ｎ　２１２３５）を添加してください。ホイルでプレートを覆い、室温下で２時間培養して下さい。Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＦＭＡＴ　８２００で測定してください。その結果を図１６に示す。この実験により、抗ＳＤＦ－１抗体１Ｃ６および２Ａ５が、ＧＡＧ－結合ＳＤＦ－１に、抗ＳＤＦ－１抗体１Ｄ３および１Ｈ２よりもより結合することが示され、

これは抗体１Ｄ３および１Ｈ２がＧＡＧ結合部位が重複するエピトープ領域に結合することを提案するものである。

【０３１７】

実施例１５：非ＣＸＣＲ４発現細胞上のＧＡＧへの^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１α結合の阻害

この実施例において、ＳＤＦ－１αの非特異的グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）への結合阻害について、抗ＳＤＦ－１抗体を用いて試験した。

【０３１８】

ＡＴＣＣ（ｃａｔ＃　ＣＲＬ－１７３０）からのＨｕＶＥＣ細胞に対するＳＤＦ－１結合阻害における抗ＳＤＦ－１抗体の比較を、標準的な放射標識リガンド結合アッセイで実施した。抗ＳＤＦ－１抗体を、１０ｎＭから０．５ｐＭの濃度範囲となるよう、１：３で系列希釈した。その抗体を２０００Ｃｉ／ｍｍｏｌの特異的活性をもつ１００ｐＭ^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１α（Ａｍｅｒｓｈａｍ　ｃａｔａｌｏｇ　＃　ＩＭ３１４－２５ＵＣＩ）の存在下、ＨｕＶＥＣ細胞に添加した。ネガティブコントロールとして、同じアイソタイプの無関係な抗体を使用した。放射標識リガンドが結合し得る全量を、抗体の非存在下、ＨｕＶＥＣ細胞に^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１αを結合させることで決定した。放射標識リガンドの非特異的結合は、１μＭの非標識組み換えヒトＳＤＦ－１α（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　ｃａｔａｏｌｏｇ　＃　３００－２８Ａ）の存在下、^{125}Ｉ－ＳＤＦ－１αを結合させることにより決定した。ＨｕＶＥＣ細胞はＣＸＣＲ４を発現しないので、おそらくＳＤＦ－１αのそれら細胞への非特異的結合はＧＡＧを介したものである。その結果を図１７に示す。

【０３１９】

実施例１６：抗ＳＤＦ－１抗体は、ＨｕＶＥＣによる毛細血管形成を阻害する。

【０３２０】

この実施例において、ＨｕＶＥＣ細胞間の毛細血管形成の結合ポイントにおける抗ＳＤＦ－１抗体の効果を試験した。

【０３２１】

マトリゲルをＲＰＭＩと１：１で希釈し、９６ウェルプレートのウェルに広げ、３７℃下、３０分間重合させた。８０％コンフルエントのＨｕＶＥＣ（Ｃａｍｂｒｅｘ　ｃａｔ．＃ＣＣ－２５１９）をトリプシンで消化し、０．５％ＦＢＳ含ＲＰＭＩに1×10^{6}細胞／ｍＬで懸濁した。抗体を最終濃度３μｇ／ｍＬとなるようＨｕＶＥＣと混合し、室温下、３０分間インキュベートした。ネガティブコントロールとして、同じアイソタイプの無関係は抗体あるいは培地を使用した。血管形成阻害のポジティブコントロールとして、マウス抗ヒトαＶβ３（ＣＤ５１／ＣＤ６１）抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ｃａｔ＃ＭＡＢ３０５０）を使用した。抗体の存在あるいは非存在下、ＨｕＶＥＣをマトリゲルコートウェル上に広げ、３７℃下、１８時間インキュベートした。

【０３２２】

培地またはアイソタイプコントロールで培養したＨｕＶＥＣは毛細血管を形成し、細胞当り３～５ポイントの結合あるいは分岐点でプレートを横断する結合細胞を出現させた。抗ＳＤＦ－１抗体または抗αＶβ３抗体のいずれかとともに培養したＨｕＶＥＣは毛細血管を形成しなかった。細胞は分離しているように見え、分岐点がほとんどないか全くない。抗ＳＤＦ－１抗体１Ｈ２では分岐点がほとんどなかったが、一方、２Ａ５は数パーセントの細胞でいくつかの分岐点を生成した。

【０３２３】

以下に配列表の配列リストのまとめを示す。

【０３２４】

配列番号：	配列	配列番号：	配列
1	VH a.a. 1D3	21	VK CDR1 a.a. 1D3
2	VH a.a. 1H2	22	VK CDR1 a.a. 1H2
3	VH a.a. 1C6	23	VK CDR1 a.a. 1C6
4	VH a.a. 2A5	24	VK CDR1 a.a. 2A5
5	VK a.a. 1D3	25	VK CDR2 a.a. 1D3
6	VK a.a. 1H2	26	VK CDR2 a.a. 1H2
7	VK a.a. 1C6	27	VK CDR2 a.a. 1C6
8	VK a.a. 2A5	28	VK CDR2 a.a. 2A5
9	VH CDR1 a.a. 1D3	29	VK CDR3 a.a. 1D3
10	VH CDR1 a.a. 1H2	30	VK CDR3 a.a. 1H2
11	VH CDR1 a.a. 1C6	31	VK CDR3 a.a. 1C6
12	VH CDR1 a.a. 2A5	32	VK CDR3 a.a. 2A5
13	VH CDR2 a.a. 1D3	33	VH n.t. 1D3
14	VH CDR2 a.a. 1H2	34	VH n.t. 1H2
15	VH CDR2 a.a. 1C6	35	VH n.t. 1C6
16	VH CDR2 a.a. 2A5	36	VH n.t. 2A5
17	VH CDR3 a.a. 1D3	37	VK n.t. 1D3
18	VH CDR3 a.a. 1H2	38	VK n.t. 1H2
19	VH CDR3 a.a. 1C6	39	VK n.t. 1C6
20	VH CDR3 a.a. 2A5	40	VK n.t. 2A5
41	VH 1-24 生殖細胞系列 a.a.	42	VH 3-7 生殖細胞系列 a.a.
43	VK L18 生殖細胞系列 a.a.	44	SDF-1 α a.a.
45	SDF-1 β a.a.	46	SDF-1 γ a.a.
47	JH6b 生殖細胞系列 a.a.	48	JH6b 生殖細胞系列 a.a.
49	JK4 生殖細胞系列 a.a.	50	JK1 生殖細胞系列 a.a.
51	合成 Gly-Ser リンカー a.a.		

【図１Ａ】

抗SDF-1 1D3 VH
V セグメント: 1-24
D セグメント: 6-19
J セグメント: JH6b

プライマー・コード

```
                                                
```

【図３Ａ】

抗SDF-1 1C6 VH
V セグメント: 3-7
D セグメント: 7-27
J セグメント: JH6b

プラーマー・コード

```
                                                                  CDR1
                                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
 E  V  Q  L  V  E  S  G  R  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R
 1  GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG AGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA
                                                                  CDR2
                                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
 L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  W  M  S  W  V  R
58  CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC
                                                                  CDR2
                                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
 Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  N  M  N  Q  D  G  S  E
115 CAG GCT CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC ATG AAT CAA GAT GGA AGT GAG
          CDR2
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
 K  Y  Y  V  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  A  K
172 AAA TAC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG
 N  S  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y
229 AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC
                                                                  CDR3
                                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
```

【図5】

抗SDF-1 1D3 および 1H2 VH 領域

```
                 _ プライマー・コード __                                                  __CDR1__
1-24 生殖細胞系列 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G Y T L T E L S M H W
1D3 VH           E - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - K - - V - -
1H2 VH           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - F - K - - V - -
                                                 ____________CDR2____________________
1-24 生殖細胞系列 V R Q A P G K G L E W M G G F D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T M T E
1D3 VH           - - - - - - - - - - - - - - S - - - - - - - - - - - S - R - - - - - - - - -
1H2 VH           - - - - - - - - - - - - - - S - - - - - - - - - - - S - R - - - - - - - - -
                                                                                 ________CDR3________
1-24 生殖細胞系列 D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A T
JH6b 生殖細胞系列                                                                          Y Y G
1D3 VH           - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - - E G Q W L V A - - -
1H2 VH           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - E G Q W L V A - - -

JH6b 生殖細胞系列 M D V W G Q G T T V T V S S
1D3 VH           - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
1H2 VH           - - - - - - - - - M - - - - - (JH6b)
```

【図6】

抗SDF-1 1C6 および 2A5 VH 領域

```
                 _ プライマー・コード __                                                  __CDR1__
3-7 生殖細胞系列 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M S W
1C6 VH           - - - - - - - - - R - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A5 VH           Q - - - - Q - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
                                                 ____________CDR2____________________
3-7 生殖細胞系列 V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R
1C6 VH           - - - - - - - - - - - - - - - M N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A5 VH           - - - - - - - - - - - - - - - M N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                                 ________CDR3________
3-7 生殖細胞系列 D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
JH6b 生殖細胞系列                                                                          Y Y Y Y
1C6 VH           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D L T G P Y - - D -
2A5 VH           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D L T G P Y - - D -
                 ___CDR3__
JH6b生殖細胞系列 Y G M D V W G Q G T T V T V S S
1C6 VH           - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
2A5 VH           - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
```

【図7】

抗SDF-1 1D3 および 1H2 VK 領域

```
                 _ プライマー・コード __                                                  __CDR1__
L18 生殖細胞系列 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
1D3 VK           E - V - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
1H2 VK           E - V - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
                 _____                                   ___CDR2_____
L18 生殖細胞系列 A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F
1D3 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
1H2 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
                                                                                 __CDR3___
L18 生殖細胞系列 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N N
1D3 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S
1H2 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S

                 _______
L18 生殖細胞系列 Y P
JK4 生殖細胞系列 L T F G G G T K V E I K
1D3 VK           - - - - - - - - - - - - - - (JK4)
1H2 VK           - - - - - - - - - - - - - - (JK4)
```

【図8】

抗SDF-1 1C6 および 2A5 VK 領域

```
                 _ プライマー・コード __                                                  __CDR1__
L18 生殖細胞系列 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
1C6 VK           - - R M - - - - - - V - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A5 VK           D - - M I - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
                 _____                                   ___CDR2_____
L18 生殖細胞系列 A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F
1C6 VK           - - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A5 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
                                                                                 __CDR3___
L18 生殖細胞系列 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N N
1C6 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S
2A5 VK           - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S

                 _______
L18 生殖細胞系列 Y P
JK1 生殖細胞系列 W T F G Q G T K V E I K
1C6 VK           - - R - - - - - - - - - - - (JK1)
2A5 VK           - - R - - - - - - - - - - - (JK1)
```

【図９】

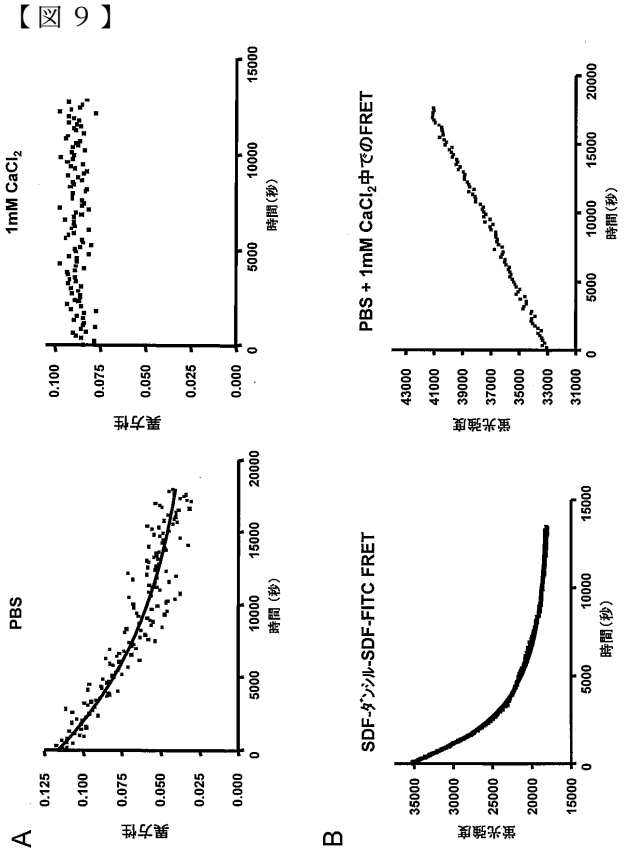
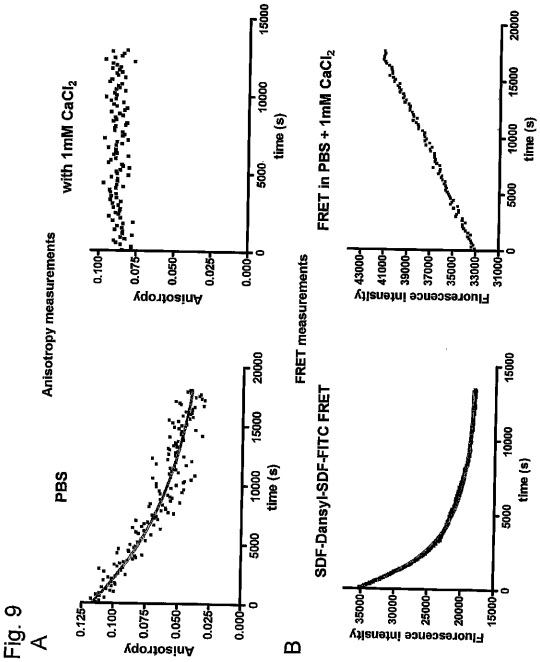
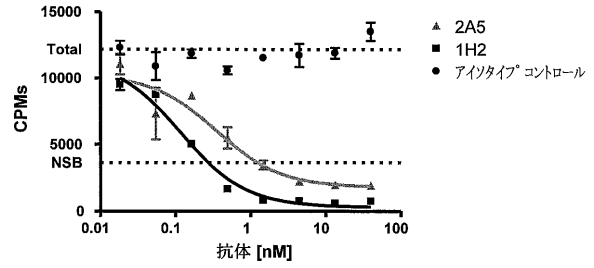


Fig. 9



【図１０】

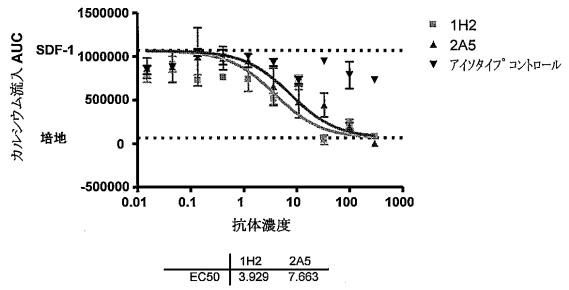
CEM細胞への^{125}I-SDF-1の阻害



	2A5	1H2
EC50	0.3467	0.1166

【図１１】

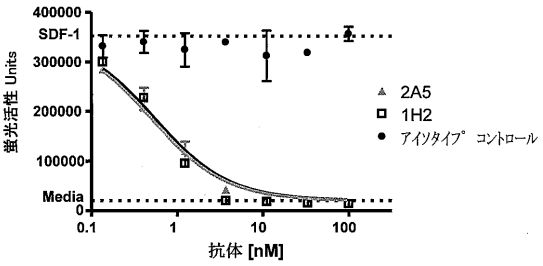
CEM細胞でのSDF-1誘導性カルシウム流入の阻害



	1H2	2A5
EC50	3.929	7.663

【図１２】

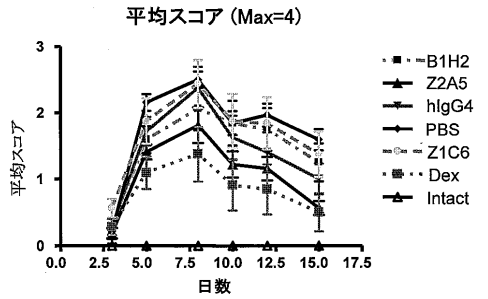
SDF-1αへのCEM細胞の遊走



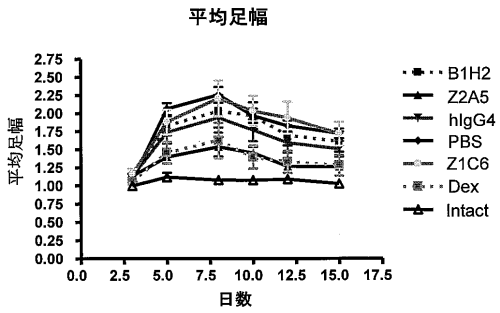
	2A5	1H2
EC50	0.5433	0.4982

【図１３－１】

A

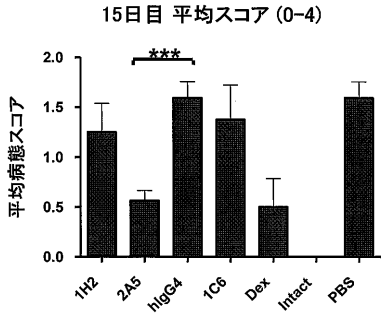


B

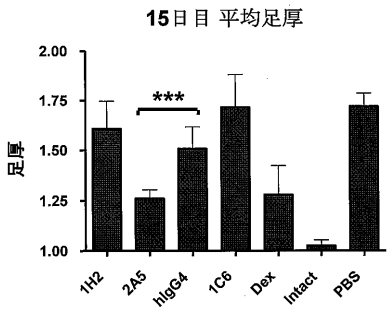


【図１３－２】

C

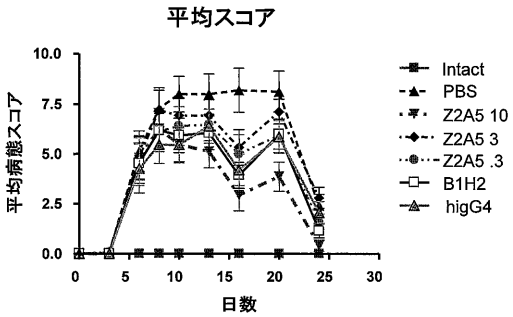


D

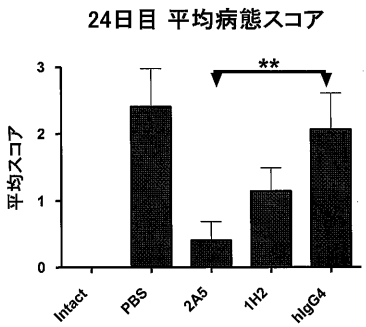


【図１３－３】

E

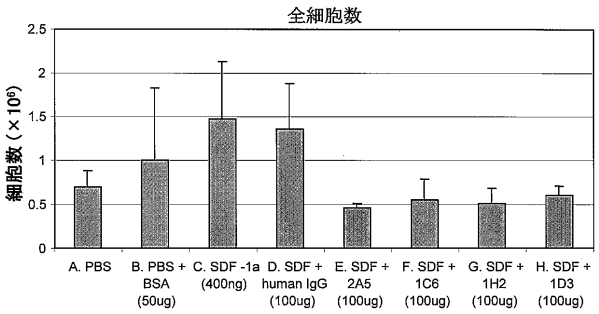


F

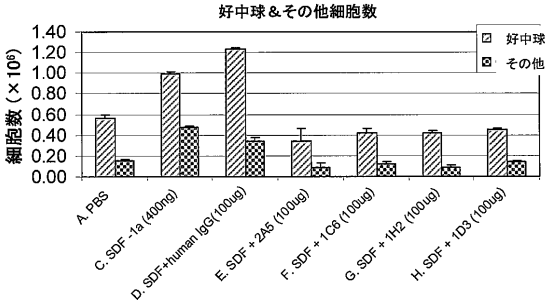


【図１４】

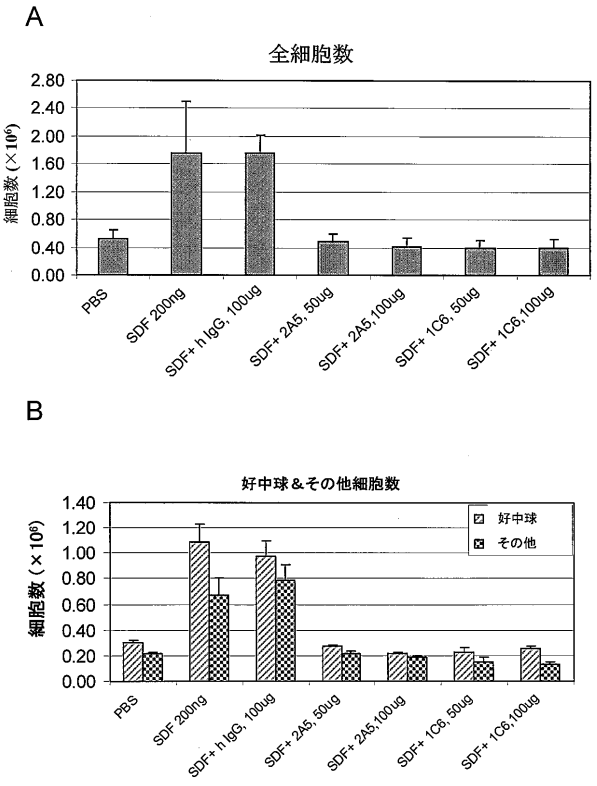
A



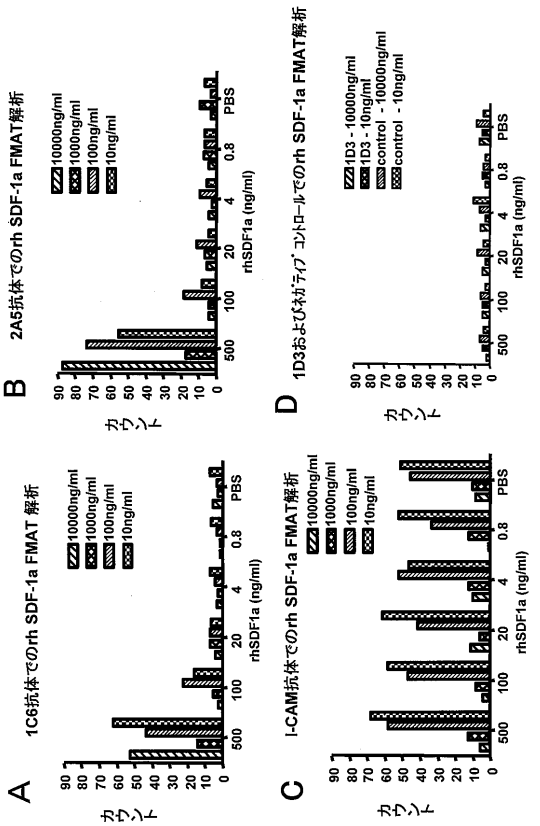
B



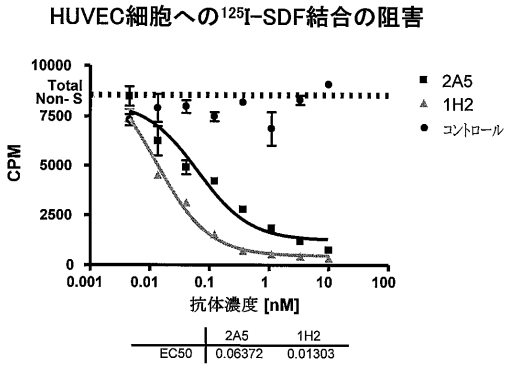
【図１５】


A
全細胞数
細胞数（×10⁶）
2.80
2.40
2.00
1.60
1.20
0.80
0.40
0.00
PBS
SDF 200ng
SDF+ h IgG, 100ug
SDF+ 2A5, 50ug
SDF+ 2A5,100ug
SDF+ 1C6, 50ug
SDF+ 1C6,100ug
B
好中球＆その他細胞数
細胞数（×10⁶）
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
好中球
その他
PBS
SDF 200ng
SDF+ h IgG, 100ug
SDF+ 2A5, 50ug
SDF+ 2A5,100ug
SDF+ 1C6, 50ug
SDF+ 1C6,100ug

【図１６】


A
1C6抗体でのrh SDF-1a FMAT 解析
10000ng/ml
1000ng/ml
100ng/ml
10ng/ml
カウント
rhSDF1a (ng/ml)
PBS
B
2A5抗体でのrh SDF-1a FMAT解析
C
I-CAM抗体でのrh SDF-1a FMAT解析
D
1D3およびネガティブコントロールでのrh SDF-1a FMAT解析
1D3 - 10000ng/ml
1D3 - 10ng/ml
control - 10000ng/ml
control - 10ng/ml

【図１７】


HUVEC細胞への125I-SDF結合の阻害
CPM
10000
Total
Non- S
7500
5000
2500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体濃度 [nM]
2A5
1H2
コントロール
2A5
1H2
EC50
0.06372
0.01303

【配列表】
2010500005000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成21年2月13日(2009.2.13)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号：１、２、３および４からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：５、６、７および８からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなり、
ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２】
（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項３】
（ａ）配列番号：２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項４】
（ａ）配列番号：３のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：７のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項５】
（ａ）配列番号：４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる請求項１記載の抗体。
【請求項６】
（ａ）ＫＤが　1×10^{-7}以下でヒトＳＤＦ－１に結合し；
（ｂ）免疫沈降アッセイで検出可能なようにヒトＳＤＦ－１に結合する、
参照抗体によるＳＤＦ－１への結合を交差競合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項７】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項８】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：２のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項９】
参照抗体が、
（ａ）配列番号：３のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：７のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１０】
参照抗体が、

（ａ）配列番号：４のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および
（ｂ）配列番号：８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる、請求項６記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１１】
（ａ）ＫＤが　１×１０$^{-7}$以下でヒトＳＤＦ－１に結合し；
（ｂ）免疫沈降アッセイで検出可能なようにヒトＳＤＦ－１に結合する
単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１２】
ヒト抗体である請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１３】
キメラもしくはヒト化抗体である請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１４】
ＩｇＧ１、ＩｇＧ２もしくはＩｇＧ４アイソタイプの全長抗体である請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１５】
抗体断片もしくは単鎖抗体である請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１６】
前記抗体が、K_Dが１×１０$^{-8}$Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１７】
前記抗体が、K_Dが１×１０$^{-9}$Ｍ以下でヒトＳＤＦ－１に結合する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１８】
前記抗体が、５７℃以上の融解温度をもつ請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項１９】
前記抗体が、６８℃以上の融解温度をもつ請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２０】
前記抗体が、ＣＥＭ細胞へのＳＤＦ－１結合を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２１】
前記抗体が、ＣＥＭ細胞でのＳＤＦ－１誘導性カルシウム流入を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２２】
前記抗体が、ＣＥＭ細胞のＳＤＦ－１誘導性遊走を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２３】
前記抗体がＨｕＶＥＣ細胞の毛細血管形成を阻害する請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２４】
ヒトＳＤＦ－１が、配列番号：４［Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ＿０００６０９］記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる請求項１２記載の抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２５】
ヒトV_H１－２４遺伝子もしくはV_H３－７遺伝子の産物もしくは由来の重鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２６】
ヒトV_KＬ１８遺伝子の産物もしくは由来の軽鎖可変領域からなり、ＳＤＦ－１に特異的

に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２７】
さらに、ヒトV_H１－２４遺伝子もしくはV_H３－７遺伝子の産物もしくは由来の重鎖可変領域からなる請求項２６記載の単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部位。
【請求項２８】
（ａ）配列番号９からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１３からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号１７からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２１からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２５からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号２９からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項２９】
（ａ）配列番号１０からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１４からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号１８からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２２からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２６からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号３０からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項３０】
（ａ）配列番号１１からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１５からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号１９からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２３からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２７からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号３１からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項３１】
（ａ）配列番号１２からなる重鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｂ）配列番号１６からなる重鎖可変領域ＣＤＲ２、
（ｃ）配列番号２０からなる重鎖可変領域ＣＤＲ３、
（ｄ）配列番号２４からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ１、
（ｅ）配列番号２８からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ２および
（ｆ）配列番号３２からなる軽鎖可変領域ＣＤＲ３
からなる請求項１１記載の抗体。
【請求項３２】
請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３３】
治療剤を結合した請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位からなる免疫抱合体。
【請求項３４】
請求項３３記載の免疫抱合体および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３５】
治療剤が細胞毒素である請求項３３記載の免疫抱合体。
【請求項３６】
請求項３３記載の免疫抱合体および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３７】
治療剤が放射性同位体である請求項３３記載の免疫抱合体。
【請求項３８】

請求項３７記載の免疫抱合体および薬学的に許容しえる担体からなる組成物。
【請求項３９】
請求項１１記載の抗体またはその抗原結合部位をコードする単離核酸分子。
【請求項４０】
請求項３９記載の核酸分子からなる発現ベクター。
【請求項４１】
請求項４０記載の発現ベクターからなる宿主細胞。
【請求項４２】
請求項４０記載の宿主細胞で抗体を発現させ、その宿所細胞からその抗体を単離することからなる抗ＳＤＦ－１抗体を調製する方法。
【請求項４３】
請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を有効成分として含む癌治療剤。
【請求項４４】
癌が、乳癌、多発性骨髄腫およびリンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、中枢神経原発リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫）からなる群から選択される請求項４３記載の癌治療剤。
【請求項４５】
癌細胞が、乳癌細胞である請求項４４記載の癌治療剤。
【請求項４６】
癌細胞が、多発性骨髄腫細胞である請求項４４記載の癌治療剤。
【請求項４７】
癌細胞が、非ホジキンリンパ腫細胞である請求項４４記載の癌治療剤。
【請求項４８】
請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を有効成分として含む自己免疫疾患治療剤。
【請求項４９】
自己免疫疾患が、リウマチ関節炎（ＲＡ）、骨関節症（ＯＡ）、実験的自己免疫性脳脊髄炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、インシュリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）、炎症性大腸炎（ＩＢＤ）（クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病を含む）、多発性硬化症（ＭＳ）、乾癬、自己免疫性甲状腺炎、糸球体腎炎移および移植片拒絶からなる群から選択される請求項４８記載の自己免疫疾患治療剤。
【請求項５０】
自己免疫疾患が、リウマチ関節炎（ＲＡ）である請求項４９記載の自己免疫疾患治療剤。
【請求項５１】
自己免疫疾患が、骨関節症（ＯＡ）である請求項４９記載の自己免疫疾患治療剤。
【請求項５２】
請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を有効成分として含む移植拒絶治療剤。
【請求項５３】
請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を有効成分として含む増殖性糖尿病性網膜症治療剤。
【請求項５４】
請求項１～３２記載のいずれかの抗体またはその抗原結合部位を有効成分として含む幹細胞を動員するための医薬。
【請求項５５】
単量体および二量体のＳＤＦ－１の両方に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５６】
ＳＤＦ－１タンパク質の受容体結合部位に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル

抗体。
【請求項５７】
ＳＤＦ－１タンパク質のアミノ酸残基７～１９に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５８】
ＳＤＦ－１タンパク質のアミノ酸残基３７～５０に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項５９】
単量体ＳＤＦ－１でなく、二量体ＳＤＦ－１に結合する請求項１１記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項６０】
ＳＤＦ－１ヘパリン結合部位に結合する請求項５９記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項６１】
ＳＤＦ－１の二量化接触面に結合する請求項５９記載の単離モノクローナル抗体。
【請求項６２】
ＳＤＦ－１のアミノ酸残基２４～３０に結合する請求項５９記載の単離モノクローナル抗体。

【国際調査報告】

INTERNATIONALSEARCHREPORT

International application No.
PCT/JP2007/065991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C07K14/00-19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JDream2), JMEDPlus(JDream2), Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Data Base

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	SHIROZU Michio, et al., Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene., Genomics., 1995, Vol.28, No.3, pages 495-500	1,6-16,18-19, 24-42,58 20-23,55-57, 59-62 2-5,17
Y A	CRUMP, Matthew P., et al., Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1., The EMBO journal., 1997, Vol.16, No.23, pages 6996-7007	20-23,55-57, 59-62 2-5,17
A	SURATT, Benjamin T., et al., Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis., Blood., 2004, Vol.104, No.2, pages 565-571	1-42,55-62

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19.09.2007	16.10.2007

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Shinji Shimizu 4B 3535 Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/065991

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/24(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,
A61P9/10(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P37/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C12P21/08(2006.01)i

INTERNATIONALSEARCHREPORT

International application No.
PCT/JP2007/065991

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☑ Claims Nos.: 43-54
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 43-54 are deemed to be concerned with a therapeutic method for the human body. Consequently, these claims are relevant to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

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

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

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

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

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

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

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

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　1/19	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ　1/21	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ　5/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ａ	
Ａ６１Ｋ　39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｋ　47/48	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/48		
Ａ６１Ｋ　47/42	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/42		
Ａ６１Ｋ　38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ａ６１Ｋ　51/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	43/00		
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｐ　19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ　25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ　37/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ　3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ　1/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｐ　1/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00		
Ａ６１Ｐ　17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ａ６１Ｐ　5/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/14		
Ａ６１Ｐ　13/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ　27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ　43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	

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

(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(72)発明者　ポーグ　サラ　エル
アメリカ合衆国　９４５５５　カリフォルニア州、フレモント、ミッデイ　コモンズ　５４７１
(72)発明者　コーマン　アラン　ジェイ
アメリカ合衆国　９４６１１　カリフォルニア州、ピエドモント、オークランド　アベニュー　１２０７
(72)発明者　カルダレッリ　ジョセフィーヌ　エム
アメリカ合衆国　９４０７０　カリフォルニア州、サンカルロス、レスリードライブ　１２６
(72)発明者　スリニバサン　モハン
アメリカ合衆国　９５１２９　カリフォルニア州、サンジョセ、アーリントンレーン　１０４４
(72)発明者　チェン　ビング
アメリカ合衆国　９４５０２　カリフォルニア州、アラメダ、ローレンスロード　１１８
(72)発明者　ベル　アレスダー　エフ
アメリカ合衆国　９４０４１　カリフォルニア州、マウンテンヴュー、アパートメント　２１３５、ハイスクールウェイ　９００

Ｆターム(参考) 4B024 AA01　BA43　CA01　GA11　HA01

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C076 AA12 AA95 BB11 CC01 CC09 CC10 CC16 CC17 CC18 CC21
CC27 CC29 CC30 EE41M EE59M FF31 FF68 FF70 GG41
4C084 AA01 AA02 AA03 AA12 BA01 BA08 BA22 BA23 DA01 DA25
DA26 MA01 MA02 MA05 MA17 MA66 NA10 NA13 NA14 ZA02
ZA33 ZA66 ZA68 ZA81 ZA89 ZA96 ZB05 ZB08 ZB15 ZB26
ZC02 ZC06 ZC35
4C085 AA14 CC03 DD61 EE01 EE03 GG01
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74