(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5142998号
(P5142998)

(45)発行日　平成25年2月13日(2013.2.13)　(24)登録日　平成24年11月30日(2012.11.30)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | ZNAA |
| C07K 16/28 | (2006.01) | C07K | 16/28 | |
| C12P 21/08 | (2006.01) | C12P | 21/08 | |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | |

請求項の数 28　(全 54 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-522896 (P2008-522896)
(86)(22)出願日　平成18年7月18日 (2006.7.18)
(65)公表番号　特表2009-501549 (P2009-501549A)
(43)公表日　平成21年1月22日 (2009.1.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/027862
(87)国際公開番号　WO2007/011941
(87)国際公開日　平成19年1月25日 (2007.1.25)
審査請求日　平成20年3月6日 (2008.3.6)
(31)優先権主張番号　60/700,265
(32)優先日　平成17年7月18日 (2005.7.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(73)特許権者　504378238
メダレックス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニュージャージー州　プリンストン　ステイトロード　７０７
(74)復代理人　100135172
弁理士　野田　裕子
(74)復代理人　100118407
弁理士　吉田　尚美
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト抗Ｂ７ＲＰ１中和抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２７に記載のＣＤＲ１、配列番号２８に記載のＣＤＲ２、及び配列番号２９に記載のＣＤＲ３を含む重鎖と、
配列番号１５に記載のＣＤＲ１、配列番号１６に記載のＣＤＲ２、及び配列番号１７に記載のＣＤＲ３を含む軽鎖とを含む、
Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片。
【請求項２】
配列番号３０に記載のＣＤＲ１、配列番号３１に記載のＣＤＲ２、及び配列番号３２に記載のＣＤＲ３を含む重鎖と、
配列番号１８に記載のＣＤＲ１、配列番号１９に記載のＣＤＲ２、及び配列番号２０に記載のＣＤＲ３を含む軽鎖とを含む、
Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片。
【請求項３】
ａ）配列番号７に記載のアミノ酸配列と配列番号１に記載のアミノ酸配列を含むか；
ｂ）配列番号８に記載のアミノ酸配列と配列番号１に記載のアミノ酸配列を含むか；又は
ｃ）配列番号９に記載のアミノ酸配列と配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片。
【請求項４】

配列番号１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを含む抗体。

【請求項５】

軽鎖及び重鎖を含む抗体であって、前記軽鎖が、配列番号１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号４３のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域とを含み、前記重鎖が、配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号４１又は４２のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域とを含む、抗体。

【請求項６】

軽鎖及び重鎖を含む抗体であって、前記軽鎖が、配列番号１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号４３のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域とを含み、前記重鎖が、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号４１又は４２のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域とを含む、抗体。

【請求項７】

軽鎖及び重鎖を含む抗体であって、前記軽鎖が、配列番号２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号４３のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域とを含み、前記重鎖が、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号４１又は４２のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域とを含む、抗体。

【請求項８】

配列番号４５のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号４６又は７１のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗体。

【請求項９】

配列番号４５のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号４４又は７０のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗体。

【請求項１０】

配列番号４８のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号４７又は７２のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗体。

【請求項１１】

配列番号４５のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号４６のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗体。

【請求項１２】

前記重鎖及び前記軽鎖が一本鎖の抗体又はその抗原結合断片を含む請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項１３】

一本鎖のＦｖ抗体又はその抗原結合断片である請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項１４】

Ｆａｂ抗体又はその抗原結合断片である請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項１５】

Ｆａｂ’抗体又はその抗原結合断片である請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項１６】

（Ｆａｂ’）$_2$抗体又はその抗原結合断片である請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項１７】

完全にヒト抗体又はその抗原結合断片である請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項１８】

医薬的に許容される担体および請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又はその抗原結合断片の治療的に有効な量を含む医薬組成物。

【請求項１９】
自己免疫疾患または炎症性反応の治療に使用する請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
自己免疫疾患が、関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
炎症性反応が喘息である請求項１９に記載の組成物。
【請求項２２】
Ｂ７ＲＰ１依存的なＴ細胞活性化の阻害に使用するための請求項１８に記載の組成物。
【請求項２３】
生物学的試料中のＢ７ＲＰ１を検出する方法であり、
ａ）前記試料に、請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片を、前記抗体がＢ７ＲＰ１に結合できる条件下で接触させること；および
ｂ）前記試料中の結合した抗体又はポリペプチドのレベルを測定すること
を含む、方法。
【請求項２４】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする核酸分子。
【請求項２５】
請求項２４に記載の核酸分子を含む発現ベクター。
【請求項２６】
請求項２４に記載の核酸分子又は請求項２５に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項２７】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体を産生する細胞株。
【請求項２８】
請求項２６に記載の宿主細胞又は請求項２７に記載の細胞株を培養することと、
培地又は前記宿主細胞から抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体又はその抗原結合断片の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｂ７関連タンパク質－１（Ｂ７ＲＰ１）に結合するヒトモノクローナル抗体に関する。免疫抑制および免疫活性化に関連した疾患および障害を治療するための組成物および方法も記載されている。
【背景技術】
【０００２】
Ｔ細胞は、免疫応答を開始し、抗原特異的なエフェクター機能を媒介し、サイトカインの分泌による他の白血球の活性化を調節する。固有のＴリンパ球（Ｔ細胞）免疫応答の発生に関しては、２つのシグナルが抗原提示細胞（ＡＰＣ）によってＴ細胞に与えられなければならない。抗原は、特異性を決定する事象において、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）を介したＴ細胞受容体（ＴＣＲ）に提示されなければならない。Ｔ細胞は、ＡＰＣ上に提示された抗原を認識できるだけである。抗原受容体に加えて、固有のＴ細胞活性化はまた、Ｔ細胞およびＡＰＣ上の他の細胞表面分子の相互作用を必要とする。これらの分子は、共刺激性分子と呼ばれ、応答細胞上の受容体、および誘導細胞上に存在するリガンドからなる。この抗原の非依存的な共刺激シグナルは、ＡＰＣ上のＢ７ファミリーのメンバーとＴ細胞上のこれらの受容体とを結合させることによって発生されなければならない。生産的な免疫応答は、増殖、分化、クローン性増殖、およびエフェクター機能をもたらす。第２の共刺激シグナルがない場合、Ｔ細胞は、アネルギーと呼ばれる持続的な抗原特異的無応答の状態を被る。フェーズＩＩの臨床試験によって、１つの共刺激経路をブロックすることが、乾癬（Ａｂｒａｍｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｊ　ＥＸｐ　Ｍｅｄ．１９２：６８１－９４；Ａｂｒａｍｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．

１０３：１２４３－５２）および関節リウマチ（Ｋｒｅｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ３４９：１９０７－１５）の治療において効果的であることが示され、この一般的なストラテジーは免疫調節療法の良好な標的となることを示す。

【０００３】

特定の共刺激性Ｂ７分子であるＢ７関連タンパク質－１（Ｂ７ＲＰ１）は、アミノ末端にシグナル配列および細胞外ドメイン、２つのＩｇループを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびカルボキシ末端の細胞内ドメインを有する１型膜貫通型タンパク質である（ＰＣＴ出願公開ＷＯ００／４６２４０）。Ｂ７ＲＰ１は、Ｔ細胞の細胞表面に発現されるＩＣＯＳ（「ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ ｃｏｓｔｉｍｕｌａｔｏｒ」；Ｙｏｓｈｉｎｇａ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎ．１２：１４３９－１４４７）に選択的に結合する。ＩＣＯＳは、活性化されたＴ細胞による１型および２型サイトカインの両方の産生において重要な役割を果たす（Ｃｏｙｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １３：９５－１０５）。

【０００４】

Ｂ７ＲＰ１は、ＡＰＣ上に構成的に発現される唯一のリガンドであり（Ｙｏｓｈｉｎａｇａ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｎａｔｕｒｅ．４０２：８２７－３２）、ＩＣＯＳは、活性化したＴ細胞にのみ発現される（ＭｃＡｄａｍ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １６５：５０３５－４０）。Ｂ７ＲＰ１依存性シグナルは、エフェクター（即ち、完全に活性化された）Ｔ細胞の活性化、および未刺激の（ｎａｉｖｅ）前駆体からの成熟に必要である（Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ．２１：２５５－６０；Ｃｏｙｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．１３：９５－１０５）。結果として、Ｂ７ＲＰ１／ＩＣＯＳ相互作用は、固有のＴ細胞依存性リコール（ｒｅｃａｌｌ）免疫応答に必要である（Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ．２１：２５５－６０）。

【０００５】

同時刺激性Ｔ細胞経路を妨げようとする現在の試みは、主にＴ細胞活性化のみをブロックする同時刺激性ポリペプチドに焦点が合わせられているが、活性化および成熟化に重点が置かれていない。結果として、これらの治療法は、Ｔ細胞機能の一般的な阻害を提供する。対照的に、Ｂ７ＲＰ１／ＩＣＯＳ相互作用をブロックすることは、成熟エフェクターＴ細胞にのみ影響を及ぼすことによってＴ細胞機能のより特異的な阻害を提供する。したがって、臨床設定におけるＢ７ＲＰ１／ＩＣＯＳ相互作用をブロックすることは、未刺激のＴ細胞活性化だけをブロックする共刺激療法よりも限定された副作用プロフィールを提供するため、非常に望ましい。

【発明の開示】

【０００６】

本発明は、Ｂ７関連タンパク質－１（Ｂ７ＲＰ１）に結合するモノクローナル抗体を提供する。一実施形態において、このモノクローナル抗体は、Ｂ７ＲＰ１の生物学的活性を中和するヒトモノクローナル抗体であり、Ｂ７ＲＰ１の免疫共刺激活性を部分的にまたは完全に阻害するのに特に有用である。本発明によって、細胞、特に、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞もまた提供される。特定の態様では、本発明の抗体は、本明細書中に記載されるＢ７ＲＰ１のＨまたはＤ領域に特異的に結合する。

【０００７】

本発明は、さらに、抗体Ｆｃ領域の配列および配列番号１から配列番号４０として同定される１以上の配列を含む融合タンパク質を提供する。このような分子は、例えば、参照により本明細書中に組み込まれる国際特許出願公開ＷＯ００／２４７８２に記載される方法を用いて調製することができる。このような分子は、例えば、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（Ｃｈｉｎｅｓｅ Ｈａｍｓｔｅｒ Ｏｖａｒｙ）細胞）または細菌性細胞（例えば、大腸菌細胞）に発現させることができる。

【０００８】
ある種の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、重鎖は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡおよびＩｇＥ重鎖定常領域から選択される重鎖定常領域、またはこのいずれかの対立遺伝子変異体（Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，ＳＥＱＵＥＮＣＥＳ　ＯＦ　ＰＲＯＴＥＩＮＳ　ＯＦ　ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＩＣＡＬ　ＩＮＴＥＲＥＳＴ，Ｆｉｆｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｅｖｉｅｓ，ＮＩＨ公開第９１－３２４２号）を含み、この文献は、参照により本明細書中に組込まれ、並びに、重鎖の可変領域は、配列番号７から配列番号１４のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。本発明の抗体は、配列番号４１に記載のＩｇＧ２重鎖定常領域のアミノ酸配列またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片、または配列番号４２に記載のＩｇＧ１重鎖定常領域のアミノ酸配列またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片のいずれかを含む。ある種の実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、または好ましくはヒトモノクローナル抗体である。

【０００９】
ある種の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、軽鎖は、配列番号４３に記載のアミノ酸配列を有する定常領域またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１から配列番号６のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。ある種の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、または好ましくはヒトモノクローナル抗体である。

【００１０】
ある種の態様では、本発明の抗体は、重鎖および軽鎖を含み、重鎖の可変領域は、配列番号７もしくは配列番号８に記載のアミノ酸、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。他の態様では、軽鎖可変領域は、配列番号１に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。

【００１１】
他の態様では、本発明の抗体は、重鎖および軽鎖を含み、重鎖の可変領域は、配列番号９に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。他の態様では、軽鎖可変領域は、配列番号２に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。

【００１２】
更なる態様では、重鎖は、配列番号２７から配列番号４０のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。なお更なる態様では、軽鎖は、配列番号１５から配列番号２６のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する少なくとも１つのＣＤＲ、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。

【００１３】
本発明はまた、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体を提供し、重鎖は、配列番号７もしくは配列番号８に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む可変領域を含み、軽鎖は、配列番号１に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む可変領域を含む。

【００１４】
さらに、本発明は、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体を提供し、重鎖は、配列番号９に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む可変領域を含み、軽鎖は、配列番号２に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む可変領域を含む。

【００１５】
ある種の態様では、本発明はまた、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、重鎖は重鎖可

変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号７から配列番号１４のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含み、軽鎖は軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１から配列番号６のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含み、抗体は、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する。

【００１６】

本発明はまた、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体を提供し、重鎖は、配列番号４４もしくは配列番号４６に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含み、軽鎖は、配列番号４５に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。

【００１７】

本発明はまた、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体を提供し、重鎖は、配列番号４７に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含み、軽鎖は、配列番号４８に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む。

【００１８】

ある種の態様では、本発明はまた、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、重鎖は重鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号２７から配列番号４０のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を有する少なくとも１つのＣＤＲを含み、軽鎖は軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１５から配列番号２６に記載のアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有する少なくとも１つのＣＤＲを含み、抗体は、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する。

【００１９】

本発明はまた、一本鎖の抗体、一本鎖のＦｖ抗体、Ｆ（ａｂ）抗体、Ｆ（ａｂ）’抗体および$(Fab')_2$抗体を提供する。

【００２０】

特定の態様では、本発明は、配列番号１５から配列番号２６に記載のアミノ酸配列、またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む軽鎖を提供する。

【００２１】

さらに、本発明は、配列番号２７から配列番号４０のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む重鎖またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む重鎖を提供する。

【００２２】

本発明はまた、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する単離されたヒト抗体に関し、この抗体は、（ａ）ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖ＣＤＲ１領域、ヒト重鎖ＣＤＲ２領域、およびヒト重鎖ＣＤＲ３領域；および（ｂ）ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖ＣＤＲ１領域、ヒト軽鎖ＣＤＲ２領域、およびヒト軽鎖ＣＤＲ３領域を含む。ある種の態様では、ヒト重鎖ＣＤＲ１領域は、配列番号２７、３０、または３５のいずれかに示される重鎖ＣＤＲ１領域であり得、ヒト軽鎖ＣＤＲ１領域は、配列番号１５、１８、または２４のいずれかに示される軽鎖ＣＤＲ１領域であり得る。他の態様では、ヒト重鎖ＣＤＲ２領域は、配列番号２８、３１、３３、３６、または３９のいずれかに示される重鎖ＣＤＲ２領域であり得て、ヒト軽鎖ＣＤＲ２領域は、配列番号１６、１９、または２１のいずれかに示される軽鎖ＣＤＲ２領域であり得る。さらに他の態様では、ヒト重鎖ＣＤＲ３領域は、

配列番号２９、３２、３４、３７、３８または４０のいずれかに示される重鎖ＣＤＲ３領域であり、ヒト軽鎖ＣＤＲ３領域は、配列番号１７、２０、２２、２３、２５、または２６のいずれかに示される軽鎖ＣＤＲ３領域である。

【００２３】

本発明の抗体は、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する能力によって特徴付けられる。さらに、本発明の抗体は、Ｂ７ＲＰ１ポリペプチドに関連した少なくとも１つのインビトロおよび／またはインビボ活性を拮抗する能力を有する。本発明は、Ｂ７ＲＰ１ポリペプチドに高親和性で結合する単離された抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体を提供し、この抗体は、ヒトＢ７ＲＰ１ポリペプチドに結合し、ＫｉｎＥｘＡを用いて測定して、約$10^{-6}$Ｍ、$10^{-7}$Ｍ、$10^{-8}$Ｍ、$10^{-9}$Ｍ、$10^{-10}$Ｍ、$10^{-11}$Ｍ、$10^{-12}$Ｍ以下の解離定数（$K_D$）を有してヒトＢ７ＲＰ１ポリペプチドから解離し、または、インビトロの中和アッセイにおいて、約$10^{-6}$Ｍ、$10^{-7}$Ｍ、$10^{-8}$Ｍ、$10^{-9}$Ｍ、$10^{-10}$Ｍ、$10^{-11}$Ｍ、$10^{-12}$Ｍ以下の$EC_{50}$値で、Ｂ７ＲＰ１誘導生存を阻害する。

【００２４】

本発明はまた、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を提供し、この抗体または断片は、重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を含み、

ａ）重鎖ＣＤＲ１は、配列番号２７に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号２８に記載のアミノ酸配列を有し、および重鎖ＣＤＲ３は、配列番号２９に記載のアミノ酸配列を有し；

ｂ）重鎖ＣＤＲ１は、配列番号３０に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号３１に記載のアミノ酸配列を有し、および重鎖ＣＤＲ３は、配列番号３２に記載のアミノ酸配列を有し；

ｃ）重鎖ＣＤＲ１は、配列番号２７に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号３３に記載のアミノ酸配列を有し、および重鎖ＣＤＲ３は、配列番号３４に記載のアミノ酸配列を有し；

ｄ）重鎖ＣＤＲ１は、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号３６に記載のアミノ酸配列を有し、および重鎖ＣＤＲ３は、配列番号３７に記載のアミノ酸配列を有し；

ｅ）重鎖ＣＤＲ１は、配列番号２７に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号３３に記載のアミノ酸配列を有し、および重鎖ＣＤＲ３は、配列番号３８に記載のアミノ酸配列を有し；または

ｆ）重鎖ＣＤＲ１は、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を有し、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号３９に記載のアミノ酸配列を有し、および重鎖ＣＤＲ３は、配列番号４０に記載のアミノ酸配列を有する。

【００２５】

本発明はまた、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を提供し、この抗体または断片は、軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含み、

ａ）軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１５に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を有し、および軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１７に記載のアミノ酸配列を有し；

ｂ）軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１８に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１９に記載のアミノ酸配列を有し、および軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号２０に記載のアミノ酸配列を有し；

ｃ）軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１５に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号２１に記載のアミノ酸配列を有し、および軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号２２に記載のアミノ酸配列を有し；

ｄ）軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１８に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１９に記載のアミノ酸配列を有し、および軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号２３に記載の

アミノ酸配列を有し；
ｅ）軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号２４に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を有し、および軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号２５に記載のアミノ酸配列を有し；または
ｆ）軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号２４に記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を有し、および軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を有する。

【００２６】
本発明はまた、本明細書中に記載される抗体のＢ７ＲＰ１への結合と競合する抗体を提供する。ある種の態様では、本発明の競合抗体は、配列番号１から４０のいずれかを含む抗体のヒトＢ７ＲＰ１への結合と競合する。

【００２７】
抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体をコードするポリヌクレオチド配列、抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体をコードするポリヌクレオチドを組み込んでいるベクターを用いて形質転換される宿主細胞、抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体を含む製剤、およびこれを製造する方法および使用する方法も本発明の一部である。

【００２８】
本発明はまた、生物学的試料中のＢ７ＲＰ１を検出する方法を提供し、この方法は、試料と本発明の抗体またはこの抗原結合性とを接触させる工程を含む。本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、Ｂ７ＲＰ１の検出および定量に関して、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、免疫沈降アッセイおよび酵素連結免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）（Ｓｏｌａ，１９８７，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７－１５８，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．を参照されたい）などのいずれかの既知のアッセイ法で採用され得る。抗体は、採用されるアッセイ法に適している親和性でＢ７ＲＰ１に結合することができる。

【００２９】
さらに、本発明は、Ｂ７ＲＰ１産生の増加、Ｂ７ＲＰ１に対する感受性の増加に関連した疾患、および／またはＴ細胞応答の調節に関係する疾患を治療する方法を提供し、この方法は、本発明の少なくとも１つの抗体またはこの抗原結合性もしくは免疫学的機能性免疫グロブリン断片を含む医薬組成物の医薬的に有効な量をこれを必要とする個体に投与する工程を含む。

【００３０】
本発明の実施形態は、下記の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

【００３１】
（発明の詳細）
本明細書中で使用されるセクション見出しは、構成的な目的のためだけであり、説明した対象事項を限定するものとして解釈するべきではない。本出願において引用される全ての参考文献は、いずれかの目的のために参照により本明細書中に明確に組み込まれる。

【００３２】
定義
従来の技術は、組換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）に用いることができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の取扱説明書に従って、または当分野において通常達成されるようにもしくは本明細書に記載されるように行うことができる。前述の技術および手順は、一般に、当分野で周知な方法に従って、本明細書を通じて引用され検討されている種々の一般的およびより具体的な参考文献に記載される方法に従って行うことができる。例えば、いずれかの目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，３ｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ

Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．を参照されたい。特定の定義がなされない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、医学および薬化学と関連して利用される命名法、この実験室的手順および技術は、当分野で周知であり、一般的に用いられるものである。同様に、従来の技術は、化学合成、化学分析、医薬的調製、調合および輸送、並びに患者の治療のために用いられてよい。

【００３３】

本開示に従って利用される場合、下記の用語は、他に指示がない限り、下記の意味を有するものとして理解しなければならない。本発明の抗体に関して、句「生物学的特性」、「生物学的特徴」、および用語「活性」には、本明細書において互換可能に用いられ、限定されないが、エピトープ親和性および特異性（例えば、ヒトＢ７ＲＰ１に結合する抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体）、標的ポリペプチドの活性（例えば、Ｂ７ＲＰ１活性）を拮抗する能力、抗体のインビボでの安定性、および抗体の免疫原性が含まれる。当分野で認識される抗体の他の同定可能な生物学的特性または特徴は、例えば、交差反応性（即ち、一般的には、Ｂ７ＲＰ１のヒト以外のホモログ、または他のタンパク質もしくは組織との交差反応性）、および哺乳動物細胞においてタンパク質の高発現レベルを保存する能力が挙げられる。前述の特性または特徴は、当分野で認識される技術を用いて観察または測定することができ、限定されないが、ＥＬＩＳＡ、競合的ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴分析、インビトロおよびインビボの中和アッセイ（例えば、実施例２）、およびヒト、霊長類または任意の他の適切な供給源を含む種々の供給源からの組織切片での免疫組織化学が挙げられる。抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体の特定の活性および生物学的特性は、以下の実施例にさらに詳細に説明される。

【００３４】

用語「単離されたポリヌクレオチド」は、本明細書中で使用するとき、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、もしくは合成起源またはこれらのいくつかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味し、この起源によって、この単離されたポリヌクレオチドは、（１）この単離されたポリヌクレオチドが天然に見出されるポリヌクレオチドの全部または一部を伴わない、（２）天然には連結されないポリヌクレオチドと連結される、または（３）より大きい配列の一部として天然には存在しない。

【００３５】

用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書において言及するとき、少なくとも１０ヌクレオチドの長さの一本鎖または二本鎖の核酸ポリマーを意味する。ある種の実施形態では、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドまたはいずれかのタイプのヌクレオチドの改変形態であり得る。このような改変体は、ブロムウリジンなどの塩基改変体、アラビノシドおよび２’，３’－ジデオキシリボースなどのリボース改変体、およびヌクレオチド間連結改変体、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデートおよびホスホロアミデートが挙げられる。用語「ポリヌクレオチド」は、具体的には、ＤＮＡまたはＲＮＡの一本鎖形態および二本鎖形態を含む。

【００３６】

本明細書で言及する用語「オリゴヌクレオチド」は、天然に存在しおよび／または天然には存在しないオリゴヌクレオチド連結によって一緒に連結された天然に存在するヌクレオチドおよび改変されたヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、一般的に、一本鎖であり、２００ヌクレオチド以下の長さを有するメンバーを含むポリヌクレオチドサブセットである。ある種の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、１０から６０ヌクレオチドの長さである。ある種の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０から４０ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドは、例えば、遺伝子変異体の構築での使用のために、一本鎖であってもまたは二本鎖であってよい。本発明のオリゴヌクレオチドは、タンパク質をコードする配列に関連

してセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。

【００３７】

用語「天然に存在するヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。用語「改変されたヌクレオチド」は、修飾または置換された糖基などを有するヌクレオチドを含む。用語「オリゴヌクレオチド連結」は、オリゴヌクレオチド結合、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート、ホスホロアミデートなどを含む。例えば、これらの開示はいずらかの目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、ＬａＰｌａｎｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１４：９０８１；Ｓｔｅｃ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１０６：６０７７；Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：３２０９；Ｚｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ６：５３９；Ｚｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，ＯＬＩＧＯＮＵＣＬＥＯＴＩＤＥＳ ＡＮＤ ＡＮＡＬＯＧＵＥＳ：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ，ｐｐ．８７－１０８（Ｆ．Ｅｃｋｓｔｅｉｎ，Ｅｄ．），Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｅｎｇｌａｎｄ；Ｓｔｅｃ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，１５１，５１０号；Ｕｈｌｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｅｙｍａｎ，１９９０，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，９０：５４３を参照されたい。オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドまたはこのハイブリダイゼーションの検出を可能にする検出可能な標識を含むことができる。

【００３８】

本明細書において言及される用語「単離されたタンパク質」は、対象とするタンパク質が、（１）天然に見出される少なくともいくつかの他のタンパク質を含まない、（２）同じ供給源由来、例えば、同じ種由来の他のタンパク質を本質的に含まない、（３）異なる種由来の細胞によって発現される、（４）天然において会合している少なくとも約５０％のポリヌクレオチド、脂質、糖質もしくは他の物質から分離されている、（５）この「単離されたタンパク質」が天然に会合しているタンパク質の一部と（共有的および非共有的な相互作用によって）会合していない、（６）天然に会合していないポリペプチドと操作可能に（共有的または非共有的な相互作用によって）会合している、または（７）天然に存在しないことを意味する。このような単離されたタンパク質は、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡもしくは合成に由来する他のＲＮＡ、またはこれらの任意の組み合わせによってコードされ得る。一実施形態では、単離されたタンパク質は、この用途（治療、診断、予防、研究用途など）を妨げる天然の環境で見出されるタンパク質またはポリペプチドまたは他の混入物を実質的に含まない。

【００３９】

「単離された」抗体とは、同定され、この天然の環境の成分から分離され、および／または回収されたものである。この天然の環境の混入成分とは、抗体の診断または治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性物質が含まれてよい。ある種の実施形態では、抗体は、（１）Ｌｏｗｒｙ法によって測定した場合、抗体の９５重量％を超えるまたは９９重量％を超えるまで、（２）スピニング・カップ・シークエネーター（ｓｐｉｎｎｉｎｇ ｃｕｐ ｓｅｑｕｅｎａｔｏｒ）の使用によって、Ｎ末端もしくは内部のアミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るのに十分な程度まで、または（３）クマーシー・ブルーもしくは銀染色を用いて、還元もしくは非還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均一になるまで精製される。単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチューの抗体を含み、これは、この抗体の天然の環境のうちの少なくとも１つの成分が存在しないためである。

【００４０】

用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、天然のタンパク質、すなわち、天然に存在する細胞、および具体的には非組換え細胞によって産生されるタンパク質、または遺伝子操作されたもしくは組換え細胞によって産生されるタンパク質の配列を有する分子を

意味し、この天然のタンパク質のアミノ酸配列を有する分子、またはこの天然の配列からの１つ以上のアミノ酸の欠失、付加および／または置換を有する分子を含む。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、具体的には、抗Ｂ７ＲＰ１抗体、または抗Ｂ７ＲＰ１抗体からの１つ以上のアミノ酸の欠失、付加および／または置換を有する配列を包含する。

【００４１】

用語「ポリペプチド断片」は、アミノ末端の欠失、カルボキシル末端の欠失、および／または内部欠失を有するポリペプチドをいう。ある種の実施形態では、断片は、少なくとも５から約５００個のアミノ酸の長さである。ある種の実施形態では、断片は、少なくとも５、６、８、１０、１４、２０、５０、７０、１００、１１０、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００または４５０個のアミノ酸の長さであると理解される。特に有用なポリペプチド断片としては、結合ドメイン、特に抗原結合ドメインを含む機能的なドメインが挙げられ、特に、抗原はヒトＢ７ＲＰ１のエピトープである。抗Ｂ７ＲＰ１抗体の場合、有用な断片としては、限定されないが、ＣＤＲ領域、重鎖または軽鎖の可変領域、抗体鎖の一部、または２つのＣＤＲを含むまさにこの可変領域などが挙げられる。

【００４２】

用語「特異的な結合作用因子」は、標的に特異的に結合する天然または非天然に存在する分子をいう。特異的な結合作用因子の例としては、限定されないが、タンパク質、ペプチド、核酸、糖質および脂質が挙げられる。ある種の実施形態では、特異的結合作用因子は、抗体である。

【００４３】

用語「Ｂ７ＲＰ１に対する特異的な結合作用因子」は、Ｂ７ＲＰ１の任意の部分に特異的に結合する特異的な結合作用因子をいう。ある種の実施形態では、Ｂ７ＲＰ１に対する特異的な結合作用因子とは、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する抗体である。

【００４４】

一例として、抗体は、抗体が標識されている場合であって、対応する非標識抗体によってこの標的から離れて競合し得るとすれば、標的に「特異的に結合する」。

【００４５】

用語「免疫学的機能性免疫グロブリン断片」は、本明細書中で使用するとき、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の少なくともＣＤＲを含むポリペプチド断片をいう。本発明の免疫学的機能性免疫グロブリン断片は、抗原に結合することができる。ある種の実施形態では、この抗原はレセプターに特異的に結合するリガンドである。これらの実施形態では、本発明の免疫学的機能性免疫グロブリン断片の結合は、このレセプターへのリガンドの結合を防止し、このレセプターへのリガンドの結合から生じる生物学的応答を遮断する。一実施形態では、本発明の免疫学的機能性免疫グロブリン断片は、Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する。好ましくは、この断片はヒトＢ７ＲＰ１に特異的に結合する。

【００４６】

用語「天然に存在する」または「天然の」は、本明細書中で使用し、目的物に適用するとき、この目的物が天然に見出され得るという事実をいう。例えば、天然の供給源から単離可能であり、ヒトによって意図的に改変されていない生物（ウイルスを含む）に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。用語「天然に存在しない」または「非天然の」は、本明細書中で使用するとき、天然に見出されない物質、またはヒトによって構造的に改変されているかもしくは合成されている物質をいう。例えば、「天然に存在しない」とは、当分野において知られる突然変異技術を用いて生成することができるポリヌクレオチド変異体、またはこのようなポリヌクレオチド変異体によって生産されるポリペプチド変異体などの変異体を指し得る。このような変異体は、例えば、１以上のヌクレオチドを含み得るヌクレオチド置換、欠失または付加によって生産されるものを含む。ポリヌクレオチド変異体は、コード領域もしくは非コード領域またはこの両方において変更され得る。コード領域での変更は、保存的または非保存的アミノ酸の置換、欠失または付加を生じることができる。これらのうち、本発明のＢ７ＲＰ１抗体の特性お

よび活性を変更しないサイレントな置換、付加、欠失、および保存的置換が特に必然的である。当業者は、当分野において周知な方法を用いて、このような変異体の生成の仕方を容易に決定することができる。

【００４７】

用語「操作可能に連結された」は、この用語をあてはめられる成分が、適切な条件下でこの固有の機能を行うことを可能にする関係であることを意味する。例えば、タンパク質コード配列に「操作可能に連結された」制御配列は、制御配列の転写活性に適合する条件下でこのタンパク質のコード配列の発現が達成されるように連結されている。

【００４８】

用語「制御配列」は、本明細書中で使用するとき、これらが操作可能に連結されるコード配列の発現、プロセシングまたは細胞内局在化を達成し得るポリヌクレオチド配列をいう。このような制御配列の性質は、宿主生物に依存してよい。特定の実施形態では、原核生物の制御配列としては、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終止配列を挙げることができる。他の特定の実施形態では、真核生物の転写制御としては、転写因子の１つまたは複数の認識部位を含むプロモーター、転写エンハンサー配列、転写終止配列およびポリアデニル化配列を挙げることができる。ある種の実施形態では、「制御配列」とは、リーダー配列および／または融合パートナー配列を含むことができる。

【００４９】

用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を細胞に担持できる核酸分子を含む。ベクターの１つのタイプは、「プラスミド」であり、追加のＤＮＡセグメントが連結され得る環状二本鎖ＤＮＡループをいう。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、追加のＤＮＡセグメントがウイルスゲノム中に連結され得る。ある種のベクターは、これらが導入されている宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、これによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、これらが操作可能に連結されている遺伝子の発現を指向することができる。このようなベクターは、本明細書中では「組換え発現ベクター」（または、単に「発現ベクター」）と呼ばれる。一般的に、組換えＤＮＡ技術の実施に有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、互換可能に用いられ、これは、プラスミドがベクターの最も一般的に用いられる形態であるからである。しかしながら、本発明は、等価な機能を果たす、このような他の形態の発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を含むことが意図される。

【００５０】

句「組換え宿主細胞」（または、単に「宿主細胞」）は、組換え発現ベクターが導入されている細胞を含む。これは、特定の対象とする細胞だけでなく、このような細胞の子孫も指すことが意図されることを当業者は理解する。変異または環境的影響のいずれかに起因して、ある種の改変が後継世代において生じ得るため、このような子孫は、実際には、親細胞に対して同一でないかもしれないが、本明細書中に用いられる「宿主細胞」という用語の範囲内には依然として含まれる。細菌、酵母、バキュロウイルスおよび哺乳動物発現系（ならびにファージディスプレイ発現系）を含む広範な種々の宿主発現系が、本発明の抗体を発現させるために用いることができる。適切な細菌発現ベクターの例は、ｐＵＣ１９である。抗体を組換え的に発現させるために、宿主細胞は、この抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするＤＮＡ断片を担持する１以上の組換え発現ベクターでトランスフェクトされ、この結果、この軽鎖および重鎖はこの宿主細胞中で発現され、この宿主細胞が培養される培地中に分泌されて、この抗体はこの培地から回収することができる。標準的な組換えＤＮＡ方法論を用いて、抗体の重鎖および軽鎖の遺伝子を得て、これらの遺伝子を組換え発現ベクター中に組み込み、このベクターを宿主細胞、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ，Ａ　ＬＡ

ＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，（１９８９）およびＢｏｓｓらによる米国特許第４，８１６，３９７号に記載されたような宿主細胞中に導入する。

【００５１】

用語「形質導入」は、通常、ファージによって、１つの細菌から別の細菌への遺伝子の移入を指すために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および移入を指す。

【００５２】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来または外因性のＤＮＡの取り込みを指すために使用され、細胞は、外因性ＤＮＡが細胞膜の内側に導入されている場合、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当分野で周知であり、本明細書中に開示されている。例えば、Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．，１９７３，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２：４５６；Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６，ＢＡＳＩＣ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ；およびＣｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｇｅｎｅ １３：１９７を参照されたい。このような技術は、１以上の外因性ＤＮＡ部分を適切な宿主細胞に導入するために用いることができる。

【００５３】

用語「形質転換」は、本明細書中で使用するとき、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、細胞が新しいＤＮＡを含むように改変されている場合、この細胞は形質転換されている。例えば、細胞は、この天然の状態から遺伝的に改変されている場合、形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入の後、この形質転換ＤＮＡは、細胞の染色体への物理的な組み込みによって細胞のＤＮＡと組み換えられてもよく、または複製されることなしにエピソームエレメントとして一時的に維持されてもよく、またはプラスミドとして独立して複製されてよい。細胞の分裂とともにＤＮＡが複製される場合、細胞は、安定に形質転換されていると考えられる。

【００５４】

用語「抗原」は、選択的な結合因子、例えば抗体によって結合され、さらに動物において用いられて、この抗原のエピトープに結合できる抗体を産生することができる分子または分子の一部をいう。抗原は、１以上のエピトープを有してよい。

【００５５】

ある種の実施形態では、抗体変異体は、グリコシル化部位の数および／またはタイプが、親のポリペプチドのアミノ酸配列と比較して変更されているグリコシル化変異体を含む。ある種の実施形態では、タンパク質変異体は、天然のタンパク質よりも多いかまたは少ない数のＮ連結グリコシル化部位を含む。Ｎ連結グリコシル化部位は、配列：Ａｓｎ－Ｘａａ－ＳｅｒまたはＡｓｎ－Ｘａａ－Ｔｈｒによって特徴付けられ、Ｘａａとして指定されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であってよい。この配列を生じるアミノ酸残基の置換によって、Ｎ連結糖鎖の付加のための潜在的な新規な部位が提供される。または、この配列を排除する置換によって、既存のＮ連結糖鎖が除かれる。１以上のＮ連結グリコシル化部位（典型的には、天然に存在する部位）が排除されて、１以上の新規なＮ連結部位が作成されるＮ連結糖鎖の再配列もまた提供される。さらなる抗体変異体は、１以上のシステイン残基が、親のアミノ酸配列と比較して欠失されているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）で置換されているシステイン変異体を含む。システイン変異体は、不溶性の封入体の単離後などの生物学的に活性な高次構造に抗体が再折り畳みさせられなければならない場合に有用であり得る。システイン変異体は、一般に、天然のタンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、典型的には、不対のシステインから生

じる相互作用を最小化するために偶数のシステイン残基を有する。

【００５６】

さらなる実施形態では、抗体変異体は、改変Ｆｃ断片または改変重鎖定常領域を含む抗体を含むことができる。「結晶化する断片」を意味するＦｃ断片、または重鎖定常領域は、抗体に対して変化した結合特徴を付与するような突然変異によって改変されてよい。例えば、Ｂｕｒｔｏｎ ａｎｄ Ｗｏｏｆ，１９９２，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５１：１－８４；Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｂｏｌｌａｎｄ，２００１，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９：２７５－９０；Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２７６：６５９１－６６０４；Ｔｅｌｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｊｕｎｇｈａｎｓ，２０００，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １００：２４５－２５１；Ｍｅｄｅｓａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２８：２０９２－２１００（これら全ては、参照により本明細書中に組み込まれる）を参照されたい。このような変異は、置換、付加、欠失、またはこれらの任意の組み合わせを含み、典型的には、本明細書に記載した方法に従って、および当分野で知られている方法に従って（例えば、参照により本明細書中に組み込まれるＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，３ｒｄ Ｅｄ，２００１，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．ならびにＢｅｒｇｅｒ ａｎｄ Ｋｉｍｍｅｌ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ，Ｖｏｌｕｍｅ １５２，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１９８７，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡを参照されたい）、１以上の変異原性のオリゴヌクレオチドを用いて、部位特異的突然変異誘発によって生成される。

【００５７】

ある種の実施形態によれば、アミノ酸置換は、（１）タンパク質分解に対する感受性を減少させる、（２）酸化に対する感受性を減少させる、（３）結合親和性を変更させる、および／または（４）このようなポリペプチドに他の物理化学的特性または機能的特性を付与するかもしくは改変することができる。ある種の実施形態によれば、１個または複数のアミノ酸置換（ある種の実施形態では、保存的アミノ酸置換）は、天然に存在する配列において（ある種の実施形態では、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチドの一部において）作製されてよい。ある種の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、典型的には、親の配列の構造的特徴を実質的に変化させない（例えば、置換アミノ酸は、親の配列を特徴付ける二次構造、例えばヘリックスを破壊してはならず、または破壊する傾向であってもならない）。当分野で認識されるポリペプチドの二次構造および三次構造の例は、各々が参照により本明細書中に組み込まれるＰＲＯＴＥＩＮＳ，ＳＴＲＵＣＴＵＲＥＳ ＡＮＤ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＰＲＩＮＣＩＰＬＥＳ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．），１９８４，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ＩＮＴＲＯＤＵＣＴＩＯＮ ＴＯ ＰＲＯＴＥＩＮ ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ），１９９１，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．；ならびにＴｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５に記載されている。

【００５８】

「抗体」または「抗体ペプチド」は、無傷の抗体、または特定の結合に関して無傷の抗体と競合するこの結合断片をいう。ある種の実施形態では、結合断片は、組換えＤＮＡ技術によって生成される。更なる実施形態では、結合断片は、無傷の抗体の酵素的切断または化学的切断によって産生される。結合断片は、限定されないが、Ｆ（ａｂ）、Ｆ（ａｂ’）、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、および一本鎖抗体を含む。

【００５９】

本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体を提供し、重鎖および軽鎖は、一緒になって、Ｂ７ＲＰ１を特異的に結合することができる抗原結合構造を形成する。全長の重鎖は、可変領域ドメイン、$V_H$および３つの定常領域ドメイン$C_H1$、$C_H2$および$C_H3$を含む。

このＶ$_H$ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端であり、Ｃ$_H$３ドメインは、カルボキシル末端である。用語「重鎖」は、本明細書中で使用するとき、全長の重鎖およびこの断片を包含する。全長の軽鎖は、可変領域ドメインＶ$_L$、および定常領域ドメインＣ$_L$を含む。重鎖と同様、軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端である。用語「軽鎖」は、本明細書中で使用するとき、全長の軽鎖およびこの断片を包含する。Ｆ（ａｂ）断片は、１つの軽鎖ならびに１つの重鎖のＣ$_H$１および可変領域で構成される。Ｆ（ａｂ）分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。Ｆ（ａｂ’）断片は、１つの軽鎖および１つの重鎖を含み、この重鎖がＣ$_H$１ドメインとＣ$_H$２ドメインとの間にさらに定常領域を含有し、この結果、鎖間ジスルフィド結合が２つの重鎖の間で形成されて、Ｆ（ａｂ’）$_2$分子が形成され得る。このＦｖ領域は、重鎖および軽鎖の両方の可変領域を含むが、定常領域を欠如する。一本鎖の抗体は、Ｆｖ分子であり、ここでは重鎖および軽鎖の可変領域がフレキシブルなリンカーによって連結されて、抗原結合領域を形成する一本鎖ポリペプチド鎖を形成している。一本鎖の抗体は、国際特許出願公開ＷＯ８８／０１６４９、および米国特許第４，９４６，７７８号および同第５，２６０，２０３号において詳細に説明されている。

【００６０】

ある種の実施形態では、「多価特異的」抗体または「多機能性」抗体以外の二価抗体は、同一の抗原特異性を有する結合部位を含むことが理解される。

【００６１】

本発明によれば、抗体結合および特異性の評価において、抗体は、過剰の抗体がレセプターに結合するリガンドの量（とりわけ、インビトロ競合結合アッセイを用いて測定される）を少なくとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％以上まで低下させる場合、レセプターへのリガンドの付着を実質的に阻害する。

【００６２】

「中和抗体」とは、これが結合する標的抗原のエフェクター機能をブロックするかまたは実質的に低下させ得る抗体分子を意味する。したがって、「中和」抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、Ｂ７ＲＰ１のレセプター結合および／または細胞応答の誘発などのエフェクター機能をブロックするかまたは実質的に低下させ得る。「実質的に低下させる」とは、標的抗原（例えば、ヒトＢ７ＲＰ１）のエフェクター機能の少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％の低下を意味することが意図される。

【００６３】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたはＴ細胞レセプターに特異的に結合し得る抗原の任意の部位を含む。ある種の実施形態では、エピトープ決定基は、分子の化学的に活性な表面群、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基またはスルホニル基を含み、ある種の実施形態では、特異的な三次元構造特徴および／または特異的な荷電特徴を有してよい。エピトープは、抗体によって結合される抗原の領域である。ある種の実施形態では、抗体は、タンパク質および／または巨大分子の複雑な混合物において、この抗体が標的抗原を優先的に認識する場合、抗原に特異的に結合すると言われる。ある種の実施形態では、抗体は、平衡解離定数が約１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-8}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、または約１０$^{-12}$Ｍ未満である場合に、抗原に特異的に結合すると言われる。

【００６４】

２つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープを認識する場合、抗体は、参照抗体として、「本質的に同じエピトープ」に結合する。２つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープに結合するか否かを決定するための最も広範に用いられ、迅速な方法は、標識された抗原または標識された抗体のいずれかを用いて、全ての多くの異なる形式で構成され得る競合アッセイである。通常、抗原は、基板上に固定され、未標識の抗体が標識された抗体の結合をブロックする能力が、放射性同位体または酵素標識を用いて測定される。

【００６５】
用語「作用因子」は、本明細書中で使用するとき、化合物、化合物の混合物、生物学的な巨大分子、または生物学的な材料から作製される抽出物を示す。
【００６６】
用語「標識」または「標識された」は、本明細書中で使用するとき、例えば、放射線標識されたアミノ酸の取り込み、または標識されたアビジン（例えば、光学的な方法または比色定量的な方法によって検出可能である蛍光マーカー、化学発光マーカーまたは酵素活性などの検出可能なマーカーを含むストレプトアビジン）によって検出可能であるビオチン部分のポリペプチドに対する結合による検出可能なマーカーの取り込みをいう。ある種の実施形態では、この標識はまた治療剤であってよい。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する種々の方法は、当分野において知られ、本明細書に開示される方法において有利に用いることができる。ポリペプチドのための標識の例としては、限定されないが、放射性同位体または放射性核種、例えば、$^{3}$Ｈ、$^{14}$Ｃ、$^{15}$Ｎ、$^{35}$Ｓ、$^{90}$Ｙ、$^{99m}$Ｔｃ、$^{111}$Ｉｎ、$^{125}$Ｉ、$^{131}$Ｉ、蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、即ちＦＩＴＣ、ローダミン、またはランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光標識、ハプテン標識、例えば、ビオチニル基、および二次レポーターによって認識される予め決定されたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、またはエピトープタグ）が含まれる。ある種の実施形態では、標識は、種々の長さのスペーサーアーム（例えば、（$CH_2$）$_n$、ここで、ｎ＜約２０）によって結合され、可能性のある立体障害を減少させる。
【００６７】
用語「生物学的サンプル（ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｓａｍｐｌｅ）」は、本明細書中で使用するとき、限定されないが、生存物または以前に生存していた物由来の任意の量の物質を含む。このような生存物としては、限定されないが、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギおよび他の動物が挙げられる。このような物質は、限定されないが、血液、血清、尿、細胞、器官、組織、骨、骨髄、リンパ節および皮膚を含む。
【００６８】
用語「医薬的作用因子または薬物」は、本明細書中で使用するとき、患者に適切に投与されたとき、所望の治療効果を誘導し得る化合物または組成物をいう。本発明の抗体の１つまたは複数を含む医薬組成物に関して、「医薬的に有効な量」という表現は、本発明によれば、患者において、外部刺激に対する感度閾値の低下を無効にし得る医薬組成物の量であって、健康な被験体において観察される閾値に匹敵するレベルへの感度閾値の復元を伴う量を意味することが理解される。
【００６９】
「障害」は、本発明による処置から恩恵を受ける任意の状態である。「障害」および「状態」は、本明細書において互換可能に用いられ、哺乳動物を対象の障害に罹り易くさせる病理的状態を含む、不適切な免疫応答と関連した慢性および急性の免疫系障害または免疫系疾患を含む。本発明による処置から恩恵を受ける多数の状態および障害は、例えば、国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ００／０１８７１（公開ＷＯ００／４６２４０）に説明され、この開示は、参照により全体として組み込まれる。
【００７０】
用語「免疫系疾患」および「免疫系状態」は、Ｂ７ＲＰ１レベルの増加、Ｂ７ＲＰ１に対する感受性の増加、またはＴ細胞を媒介した疾患と関連した任意の医学的状態または障害を包含し、限定されないが、自己免疫疾患、移植片の生着、骨髄および臓器移植、輸血に起因した異種感作、毒素ショック症候群、Ｔ細胞依存性のＢ細胞媒介疾患、慢性免疫細胞不全と関連した慢性炎症性疾患、リンパ増殖障害（例えば、多発性骨髄腫、ワールデンストームマクログロブリン血症、およびクリオグロブリン血症）、および癌を含む。自己免疫疾患の非制限的な例としては、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、多発性硬化症、糖尿病、および乾癬が含まれる。慢性炎症性

疾患の非制限的な例としては、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、および潰瘍性大腸炎）、グレーブス病、ハシモト甲状腺炎、および真性糖尿病が挙げられる。

【００７１】

用語「免疫系疾患」および「免疫系状態」はまた、超過敏反応などの抗体産生の阻害によって改善される任意の臨床状態を包含する。超過敏反応は、例えば、花粉症、アレルギー、喘息、アトピー、および急性浮腫によって引き起こされ得る。抗体が媒介した超過敏反応を引き起こす疾患の非制限的な例としては、全身性エリテマトーデス、関節炎（例えば、関節リウマチ、反応性関節炎、乾癬性関節炎）、ネフロパシー（例えば、糸球体腎炎、膜質、膜性増殖性、巣状分節状、巣状壊死性、三日月形、および増殖性糸球体腎炎、例えばツブロパシー）、皮膚障害（例えば、天疱瘡および類天疱瘡、結節性紅斑）、内分泌障害（例えば、甲状腺炎、グレーブス病、ハシモト病、インスリン依存性真性糖尿病）、種々のニューモパシー（例えば、外因性肺胞炎）、種々の血管障害、セリアック病、ＩｇＡの異常産生を伴う疾患、多くの貧血および血小板減少症、ギラン・バレー症候群、および重症筋無力症が含まれる。

【００７２】

用語「有効量」および「治療的有効量」は、本明細書中で使用するとき、１以上の抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体を含むビヒクルまたは医薬組成物に関して用いる場合、所望の結果（すなわち、本発明のビヒクルまたは抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体での治療の場合、所望の結果とは、例えば、Ｔ細胞応答の所望の調節である）を生じ、またはＢ７ＲＰ１の１以上の生物学的活性のレベルにおける観察可能な低下を支持するのに十分な量または投薬量をいう。より具体的には、治療的有効量とは、上記作用因子を用いてインビボで処置される被験体において、問題の状態、例えば、免疫障害および疾患に関連する臨床的に規定される病理学的プロセスの１以上をある期間阻害するのに十分な抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体の量である。本発明では、「有効量」の抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、患者におけるＴ細胞応答を調節することができる。本発明の方法では、用語「制御」およびこの文法上の変形は、望ましくない事象、例えば、免疫応答の予防、部分的もしくは完全な阻害、軽減、遅延または緩徐化をいうために用いられる。有効量は、選択される特定のビヒクルまたは抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体に依存して変化させることができ、また、治療されるべき被験体に関連する種々の要因および状態、ならびに障害の重症度に依存する。例えば、ビヒクルまたは抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体がインビボで投与されると、患者の年齢、体重および健康状態のような要因、ならびに前臨床動物試験において得られた用量応答曲線および毒性データが考慮される。この作用因子が、インビトロで細胞と接触されると、当業者はまた、取り込み、半減期、用量、毒性などのパラメーターを評価するために、種々の前臨床インビトロ研究を設計する。所与の作用因子についての有効量または治療的有効量の決定は、当業者の能力の十分な範囲内にある。

【００７３】

用語「Ｂ７ＲＰ１関連タンパク質－１」および「Ｂ７ＲＰ１」は、本明細書中で使用するとき、全ての哺乳動物種の天然配列Ｂ７ＲＰ１として定義され、参照により本明細書中に組み込まれる国際特許出願公開ＷＯ００／４６２４０に説明されている。

【００７４】

用語「実質的に純粋な」または「実質的に精製された」は、本明細書中で使用するとき、主な種である化合物または種が存在する（即ち、モル基準で、この組成物における任意の他の個々の種よりもこれが豊富である）ことを意味する。ある種の実施形態では、実質的に精製されたフラクションとは、存在する全ての巨大分子種のうちの少なくとも約５０パーセント（モル基準で）でこの種が構成する組成物である。ある種の実施形態では、実質的に純粋な組成物は、この組成物中に存在する全ての巨大分子種のうち約８０％、８５％、９０％、９５％または９９％より多く含む。ある種の実施形態では、この種は、本質的に均一まで精製され（混入する種は、慣用的な検出法ではこの組成物中に検出することができない）、この組成物は、本質的に単一の巨大分子種からなる。

【００７５】

用語「患者」は、ヒトおよび動物の被験体を含む。

【００７６】

「処置」または「処置する」とは、治療的処置および予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）手段または予防的（ｐｒｅｖｅｎｔａｔｉｖｅ）手段の両方をいう。処置が必要なものとしては、既に障害を有するもの、ならびに障害を有する傾向にあるもの、または障害が防止されるべきものが挙げられる。

【００７７】

文脈によって他に必要とされない限り、単数形の用語は、複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。

【００７８】

本発明のある種の実施形態によれば、Ｂ７ＲＰ１に対する抗体は、限定されないが、上述したものを含む、免疫系障害および免疫系疾患を処置するために用いることができる。

【００７９】

本発明の一態様では、ヒトＢ７ＲＰ１に対して惹起され、これへの結合に関して生物学的および免疫学的特異性を有する完全なヒトモノクローナル抗体が提供される。本発明の別の態様では、重鎖および軽鎖免疫グロブリン分子のアミノ酸配列、特にこの可変領域に対応する配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。本発明のこの態様の特定の実施形態は、本発明によって提供される重鎖および軽鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）、具体的にはＣＤＲ１からＣＤＲ３に対応する配列である。本発明のさらに別の態様では、免疫グロブリン分子および抗体、例えば、本発明のモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞および細胞株が提供される。本発明はまた、生物学的および免疫学的に精製された抗体の調製物、例えば、ヒトＢ７ＲＰ１に対して惹起されて、これへの結合に関して生物学的および免疫学的特異性を有するモノクローナル抗体の調製物を提供する。

【００８０】

酵母人工染色体（ＹＡＣ）におけるメガベースサイズのヒト遺伝子座をクローニングおよび再構築し、マウス生殖系列にこれらを導入する能力によって、非常に大きいかまたはおおまかにマッピングされた遺伝子座の機能的構成要素を解明し、ヒト疾患の有用なモデルを生成するために有利なアプローチが提供される。さらに、ヒト同等物でのマウス遺伝子座の置換にこのような技術を利用することによって、発生中のヒト遺伝子産物の発現および調節、他の系とのこれらの関連、ならびに疾患誘導および進行におけるこの関与に対する固有の洞察が提供される。

【００８１】

このようなストラテジーの重要な実際的な適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内因性Ｉｇ遺伝子が不活性化されているマウスへのヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）遺伝子座の導入によって、抗体のプログラムされた発現およびアセンブリーの基調をなすメカニズム、ならびにＢ細胞発生におけるこの役割を研究する機会が与えられる。さらに、このようなストラテジーによって、完全なヒトモノクローナル抗体（ＭＡｂ）の産生の供給源が得られる。

【００８２】

用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に実質的に対応する可変領域および定常領域を有する抗体を含む。ある種の実施形態では、ヒト抗体は、限定されないが、マウスおよびラットなどのげっ歯類、およびウサギなどのウサギ目の動物を含む非ヒト哺乳動物において産生される。ある種の実施形態では、ヒト抗体は、ハイブリドーマ細胞において産生される。ある種の実施形態では、ヒト抗体は組換え的に産生される。

【００８３】

抗体に関連して用語「組換え体」は、組換え手段によって調製、発現、作製または単離される抗体を含む。代表的な例としては、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体、組換え体から単離された抗体、コンビナトリアル・ヒト抗体ライブラリー、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物

（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Ｔａｙｌｏｒ，ｅｔ　ａｌ．，１９９２，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２０：６２８７－６２９５を参照されたい）；または、他のＤＮＡ配列に対するヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを伴う任意の手段によって、調製、発現、作製または単離された抗体が挙げられる。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する。

【００８４】

ヒト抗体は、ヒトの治療において用いるために、非ヒト抗体およびキメラ抗体を超える少なくとも３つの利点を有する。

【００８５】

１）抗体のエフェクター部分がヒトであるため、ヒト抗体は、ヒト免疫系の他の部分と良好に相互作用することができる（例えば、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）または抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）によって標的細胞をより効率的に破壊する）；

２）ヒト免疫系は、ヒト抗体を外来としては認識しないはずであり、したがって、このような注射された抗体に対する抗体応答は、全体的に外来の非ヒト抗体または部分的に外来のキメラ抗体に対する場合よりも少ないはずである；

３）注射された非ヒト抗体は、ヒト抗体の半減期よりもかなり短いヒトの循環での半減期を有することが報告されている。注射されたヒト抗体は、天然に存在するヒト抗体に対して本質的に同一の半減期を有し、より少量で頻度の少ない投薬量で与えることが可能になる。

【００８６】

このようにして、完全なヒト抗体は、マウスまたはマウス由来のＭＡｂに固有の免疫原性およびアレルギー応答を最小化すること、これによって投与された抗体の有効性および安全性を増加することが期待される。したがって、本発明の完全なヒト抗体は、不適切な免疫応答と関連した疾患および障害の処置において用いることができ、この処置は反復性の抗体投与を必要とする。したがって、本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体の１つの特定の利点は、この抗体が完全なヒト抗体であり、ヒト抗マウス抗体または他の以前に記載された非ヒト種由来の不完全なヒト抗体と共通に関連する有害反応を最小限にしながら、非急性の方法で患者に投与できるということである。

【００８７】

当業者は、ヒトＩｇ遺伝子座の大きい断片を用いて、マウス抗体産生を欠損したマウス株を操作することが可能であり、この結果、このようなマウスは、マウス抗体の非存在下でヒト抗体を産生する。大きなヒトＩｇ断片は、可変性の大きい遺伝子多様性、ならびに抗体産生および発現の適切な調節を保存し得る。抗体多様化および選択ならびにヒトタンパク質に対する免疫学的寛容の欠失についてマウス細胞機構を利用することによって、これらのマウス株において再生されたヒト抗体レパートリーにより、ヒト抗原を含む目的の任意の抗原に対する高親和性抗体が得られる。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する抗原特異的ヒトＭＡｂを生成および選択することができる。

【００８８】

内因性の免疫グロブリン産生が存在しない状況において、ヒト抗体を産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用してよい。例えば、このような生殖細胞系列変異マウスにおけるヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入によって、抗原負荷の際にヒト抗体の産生が生じる（例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：２５５１－２５５５；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ　３６２：２５５－２５８；Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｙｅａｒ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎ．７：３３，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ　１４８：１５４７－１５５３，１９９６，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：８２６；Ｇｒｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｎａｔｕｒｅ　４０４：９９５－９９９；ならびに米国特許第５，８７７，３９７号、同第５，８７４，２９９号、同第５，８１４，３１８号、同第５，７８９，６

５０号、同第５，７７０，４２９号、同第５，６６１，０１６号、同第５，６３３，４２５号、同第５，６２５，１２６号、同第５，５６９，８２５号および同第５，５４５，８０６号（各々が、全ての目的のために全体として、参照により本明細書中に組み込まれる）を参照されたい）。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーで産生することもできる（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，１９９２，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１）。ＣｏｌｅらおよびＢｏｅｒｎｅｒらの技術はまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，１９８５，ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ ＴＨＥＲＡＰＹ ＡＬＡＮ Ｒ．Ｌｉｓｓ，ｐ．７７；およびＢｏｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：８６－９５）。

【００８９】

組換えヒト抗体はまた、インビトロ変異誘発（または、ヒトＩｇ配列に関してトランスジェニックな動物を用いる場合、インビボ体細胞変異）に供され、したがって、組換え抗体の$V_H$および$V_L$領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列の$V_H$および$V_L$配列に関連するアミノ酸配列に由来するが、インビボではヒト抗体の生殖細胞系列レパートリー内に天然では存在しない配列である。

【００９０】

ある種の実施形態では、当業者は、ヒト以外の種由来の定常領域をヒト可変領域とともにこのようなマウスに用いて、キメラ抗体を産生することができる。

【００９１】

二重特異性抗体または二機能性抗体は、２つの異なる重鎖／軽鎖の対および２つの異なる結合部位を有する人工的ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、限定されないが、ハイブリドーマの融合またはＦ（ａｂ’）断片の連結を含む様々な方法によって産生されてよい。例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ ａｎｄ Ｌａｃｈｍａｎｎ，１９９０，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５－３２１；Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３を参照されたい。

【００９２】

本発明は、ヒトＢ７ＲＰ１に結合する抗体を提供する。これらの抗体は、全長のＢ７ＲＰ１またはこの断片を用いた免疫によって産生され得る。本発明の抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体であってもよく、および／または組換え抗体であってよい。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、例えば、ヒト抗体を産生することができるトランスジェニック動物の免疫によって調製されるヒト抗体である（例えば、国際特許出願公開ＷＯ９３／１２２２７を参照されたい）。

【００９３】

本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体の軽鎖および重鎖の可変領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、同じ種または別の種由来のフレームワーク領域（ＦＲ）にグラフトされてよい。ある種の実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の軽鎖および重鎖の可変領域のＣＤＲは、コンセンサスなヒトＦＲにグラフトされてよい。コンセンサスなヒトＦＲを作製するために、いくつかのヒト重鎖または軽鎖のアミノ酸配列由来のＦＲを整列させて、コンセンサスなアミノ酸配列を同定する。抗Ｂ７ＲＰ１抗体の重鎖または軽鎖のＦＲは、異なる重鎖または軽鎖由来のＦＲで置換することができる。抗Ｂ７ＲＰ１抗体の重鎖および軽鎖のＦＲにおける稀なアミノ酸は、典型的には、置換されないが、残りのＦＲアミノ酸は置換されてよい。稀なアミノ酸とは、ＦＲにおいて、通常、見出されない位置にある特定のアミノ酸である。本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体由来のグラフトされた可変領域は、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の定常領域とは異なる定常領域とともに用いることができる。または、グラフトされた可変領域は、一本鎖のＦｖ抗体の一部である。ＣＤＲグラフティングは、任意の目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、例えば、米国特許第６，１８０，３７０号、同第５，６９３，７６２号、同第５，６９３，７６１号、同第５，５８５，０８９号および同第５，５３０，１０１号に説明されている。

【００９４】
本発明の抗体は、マウスの抗体産生細胞に挿入されたヒト抗体産生遺伝子座の実質的な部分を有しており、内因性マウス抗体の産生を欠損するようにさらに操作されているトランスジェニックマウスを用いて調製され得る。このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生することができ、マウスの免疫グロブリン分子および抗体を産生しないかまたはこの実質的に少ない量を産生する。この結果を達成するために利用される技術は、本明細書に開示された特許、出願および参考文献に開示されている。ある種の実施形態では、当業者は、任意の目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、国際特許出願公開ＷＯ９８／２４８９３に開示されるような方法を採用してよい。任意の目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、Ｍｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６－１５６も参照されたい。

【００９５】
本発明のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、慣例のモノクローナル抗体方法論、例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ 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を含む、種々の技術によって産生することができる。モノクローナル抗体を産生するための他の技術、例えば、Ｂリンパ球のウイルスまたは発癌性形質転換を使用することもできる。

【００９６】
ハイブリドーマを調製するための例示的な動物系は、マウスである。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、当分野において知られ、免疫化プロトコール、および融合のための免疫された脾細胞の単離技術はまた、当分野において知られている。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合手法はまた知られている。

【００９７】
ある種の実施形態では、Ｂ７ＲＰ１に指向するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を担持するトランスジェニックマウスを用いて生成することができる。これらのトランスジェニックマウスは、本明細書において「ＨｕＭａｂ」マウスと呼ばれ、再配列されていないヒト重鎖（μおよびγ）およびκ軽鎖の免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を、内因性μおよびκ鎖遺伝子座を不活性化する標的化変異とともに含む（Ｌｏｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６－８５９）。したがって、このマウスは、マウスＩｇＭまたはκの発現の低下を示し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖の導入遺伝子は、クラススイッチングおよび体細胞性の変異を受けて高親和性のヒトＩｇＧ κモノクローナル抗体を産生する（Ｌｏｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，上述；Ｌｏｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｈｕｓｚａｒ，１９９５，Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３；Ｈａｒｄｉｎｇ ａｎｄ Ｌｏｎｂｅｒｇ，１９９５，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７６４：５３６－５４６）。ＨｕＭａｂマウスの調製は、Ｔａｙｌｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：６２８７－６２９５；Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５：６４７－６５６；Ｔｕａｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：２９１２－２９２０；Ｌｏｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６－８５９；Ｌｏｎｂｅｒｇ，１９９４，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ １１３：４９－１０１；Ｔａｙｌｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６：５７９－５９１；Ｌｏｎｂｅｒｇ ＆ Ｈｕｓｚａｒ，１９９５，Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３；Ｈａｒｄｉｎｇ ＆ Ｌｏｎｂｅｒｇ，１９９５，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ７６４：５３６－５４６；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：８４５－８５１に詳細に説明され、これら全ての内容は、全体として参照により本発明中に組み込まれる。さらに、全てがＬｏｎｂｅｒｇおよびＫａｙに対する米国特許第５，５４５，８０６号；第５，５６９，８２５号；第５，６２５，１２６号；第５，６３３，４２５号；第５，７８９，

６５０号；第５，８７７，３９７号；第５，６６１，０１６号；第５，８１４，３１８号；第５，８７４，２９９号および第５，７７０，４２９号、ならびに、全ての開示が全体として参照により本明細書中に組み込まれる、Ｓｕｒａｎｉらの米国特許第５，５４５，８０７号；１９９３年6月２４日公開の国際特許出願公開ＷＯ９３／１２２７；１９９２年１２月２３日公開のＷＯ９２／２２６４６；および１９９２年3月１９日公開のＷＯ９２／０３９１８を参照されたい。または、以下の実施例に記載されたトランスジェニックマウス株が、ヒト抗Ｂ７ＲＰ１抗体を産生するために用いられてよい。

【００９８】

本発明は、生物活性のヒトＢ７ＲＰ１ポリペプチドに特異的であり、これを中和するヒトモノクローナル抗体を提供する。また、Ｂ７ＲＰ１ポリペプチドに非常に特異的であり、これに結合したときにこれを中和する、抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列も提供される。この高い特異性によって、抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体および同様の特異性を有するヒトモノクローナル抗体は、Ｂ７ＲＰ１関連疾患の有効な免疫療法となる。

【００９９】

一態様では、本発明は、本明細書に提供される１６Ｈ抗体と同じかまたは本質的に同じエピトープに結合する単離されたヒト抗体を提供する。

【０１００】

一態様では、本発明は、配列番号１から４０または４４から５８に示される少なくとも１つのアミノ酸配列を含む単離されたヒト抗体であって、高親和性でＢ７ＲＰ１ポリペプチドエピトープに結合し、Ｂ７ＲＰ１ポリペプチド活性を拮抗する能力を有する抗体を提供する。これらの抗体は、本明細書の実施例に示される抗Ｂ７ＲＰ１抗体と同じかまたは本質的に同じエピトープに結合することができる。

【０１０１】

ある種の実施形態では、単離された抗体は、約$10^{-6}$Ｍ、$10^{-7}$Ｍ、$10^{-8}$Ｍ、$10^{-9}$Ｍ、$10^{-10}$Ｍ、$10^{-11}$Ｍ以下の解離定数（$K_D$）でＢ７ＲＰ１ポリペプチドに結合して、約$10^{-6}$Ｍ、$10^{-7}$Ｍ、$10^{-8}$Ｍ、$10^{-9}$Ｍ以下の$EC_{50}$でインビトロ中和アッセイにおいてＢ７ＲＰ１誘導の生存を阻害する。前述の結合および中和基準を満たす抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体の実施例が、本明細書中に提供される。

【０１０２】

ある種の実施形態では、本発明の抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体は、本明細書中では、１６Ｈ、１６Ｈｇ（生殖細胞系列）、５Ｄ、２Ｈ、２Ｈｇ（生殖細胞系列）、１５Ｈ、４１Ｈ、および４３Ｈと呼ばれる。抗体１６Ｈは、それぞれ配列番号７および配列番号１に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。抗体１６Ｈｇは、それぞれ配列番号１および配列番号８に示される可変軽鎖（$V_L$）および可変重鎖（$V_H$）ポリペプチド配列を含む。抗体５Ｄは、それぞれ配列番号２および配列番号９に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。抗体２Ｈは、それぞれ配列番号３および配列番号１０に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。抗体２Ｈｇは、それぞれ配列番号３および配列番号１１に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。抗体１５Ｈは、それぞれ配列番号４および配列番号１２に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。抗体４１Ｈは、それぞれ配列番号５および配列番号１３に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。抗体４３Ｈは、それぞれ配列番号６および配列番号１４に示される$V_L$および$V_H$ポリペプチド配列を含む。本発明の抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体の特性は、実施例に具体的に開示されている。特に着目すべきことは、Ｂ７ＲＰ１ポリペプチドについての高親和性、および本明細書中に実証されるＢ７ＲＰ１ポリペプチド活性を拮抗する高い能力である。

【０１０３】

抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体の解離定数（$K_D$）は、以下の実施例に一般的に記載される表面プラズモン共鳴によって測定することができる。一般的には、表面プラズモン共鳴分析は、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）システム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いる表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって、リガ

ンド（バイオセンサーマトリックス上に固定された組換えＢ７ＲＰ１ポリペプチド）と分析物（溶液中の抗体）との間のリアルタイムの結合相互作用を測定する。表面プラズモン分析はまた、分析物（バイオセンサーマトリックス上の抗体）を固定して、リガンド（溶液中の組換え体Ｖ）を呈することによっても行うことができる。抗ヒトＢ７ＲＰ１ヒト抗体の解離定数（$K_D$）はまた、ＫｉｎＥｘＡ方法論を用いることによって測定することができる。本発明のある種の実施形態では、抗体は、約$10^{-5}$Ｍ、$10^{-6}$Ｍ、$10^{-7}$Ｍ、$10^{-8}$Ｍ、$10^{-9}$Ｍ、$10^{-10}$Ｍ、$10^{-11}$Ｍ、$10^{-12}$Ｍの$K_D$でＢ７ＲＰ１に結合する。用語「$K_D$」は、本明細書中で使用するとき、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指すことが意図される。本発明の目的のために、$K_D$は、以下の実施例に示されるように測定した。

【０１０４】

ある種の実施形態では、本発明の抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４アイソタイプの抗体である。抗体は、ＩｇＧ２またはＩｇＧ１アイソタイプであってよい。他の実施形態では、本発明の抗体は、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、またはＩｇＤアイソタイプであってよい。本発明のある種の実施形態では、この抗体は、ヒトカッパ軽鎖およびヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４重鎖を含む。ＩｇＧ１またはＩｇＧ２重鎖の定常領域を含む本発明の抗体の発現は、以下の実施例に記載されている。特定の実施形態では、抗体の可変領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４アイソタイプの定常領域以外の定常領域に連結される。ある種の実施形態では、本発明の抗体は、哺乳動物細胞における発現のためにクローニングされている。

【０１０５】

ある種の実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の重鎖および軽鎖に対する保存的改変（およびヌクレオチドをコードする対応する改変）は、本明細書に開示される抗Ｂ７ＲＰ１抗体の特徴に類似した機能的および化学的特徴を有する抗Ｂ７ＲＰ１抗体を生成する。対照的に、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の機能的および／または化学的特徴における実質的な改変は、（ａ）置換の領域における分子骨格の構造、例えば、シートまたはらせん構造、（ｂ）標的部位での分子の荷電もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のバルク、の維持に対する効果が有意に異なる重鎖および軽鎖のアミノ酸配列の置換を選択することによって達成することができる。

【０１０６】

例えば、「保存的アミノ酸置換」とは、この位置でのアミノ酸残基の極性または荷電に対して影響がほとんどないかまたは全くないような天然にない残基による天然のアミノ酸残基を置換することを含んでよい。さらに、ポリペプチド中の任意の天然の残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について前述している通りにアラニンで置換されてよい。

【０１０７】

アミノ酸置換（保存的であるかまたは非保存的であるかにかかわらず）は、このような置換が所望される時点で当業者によって決定することができる。ある種の実施形態では、アミノ酸置換を用いて、Ｂ７ＲＰ１に対する抗体の結合特異性および／または親和性に関与する抗Ｂ７ＲＰ１抗体のアミノ酸残基（例えば、特定のエピトープに対する抗体の結合に関与する残基）、例えば、本明細書に開示される軽鎖または重鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３領域におけるアミノ酸残基を同定することができる。このようなアミノ酸置換は、本明細書中に記載される抗Ｂ７ＲＰ１抗体の親和性を増加または低下させることができる。

【０１０８】

アミノ酸配列における些細な変化、例えば、１個、数個またはさらに複数個のアミノ酸の欠失、付加または置換は、実質的に同一の特性を有するもとのタンパク質の対立遺伝子型をもたらす。したがって、本明細書に具体的に記載される抗体に加えて、他の「実質的に相同な」抗体は、当業者に周知の種々の組換えＤＮＡ技術を利用して容易に設計し、製造することができる。一般的には、遺伝子の改変は、部位指向性変異誘発などの種々の周

知技術によって容易に達成することができる。したがって、本発明は、本明細書に開示される抗Ｂ７ＲＰ１ヒト抗体に実質的に類似した特徴を有する「改変体」または「変異体」の抗Ｂ７ＲＰ１ヒト抗体を意図する（例えば、全てが参照により本明細書中に組み込まれる国際公開ＷＯ００／５６７７２を参照されたい）。このように、抗Ｂ７ＲＰ１ヒト抗体に関して「改変体」または「変異体」という用語は、任意の結合分子（分子Ｘ）を意味し、（ｉ）重鎖の超可変領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３または軽鎖の超可変領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を全体として見れば、それぞれ配列番号１５から配列番号２６または配列番号２７から配列番号４０に示される超可変領域に対して、少なくとも約８０％相同であり、少なくとも約９０％相同であり、または少なくとも約９５％相同であり、（ｉｉ）改変体または変異体は、分子Ｘと同一のフレームワーク領域を有する参照の抗Ｂ７ＲＰ１ヒト抗体と同程度までヒトＢ７ＲＰ１の活性を阻害することができる。このような抗体は、ヒトＢ７ＲＰ１またはマウスＢ７ＲＰ１またはこの両方に結合することができる。マウスＢ７ＲＰ１配列は、参照により組み込まれる国際公開ＷＯ００／４６２４０に記載されている。

【０１０９】

通常、抗Ｂ７ＲＰ１ヒト抗体の改変体は、軽鎖および／または重鎖のＣＤＲであって、全体として見れば、それぞれ配列番号１５から配列番号２６および／または配列番号２７から配列番号４０に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、少なくとも約８５％の配列同一性、少なくとも約９０％の配列同一性、少なくとも約９１％の配列同一性、少なくとも約９２％の配列同一性、少なくとも約９３％の配列同一性、少なくとも約９４％の配列同一性、少なくとも約９５％の配列同一性、少なくとも約９６％の配列同一性、少なくとも約９７％の配列同一性、少なくとも約９８％の配列同一性、または少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有する前記ＣＤＲを有する。このような抗体は、ヒトＢ７ＲＰ１またはマウスＢ７ＲＰ１またはこの両方に結合することができる。

【０１１０】

抗Ｂ７ＲＰ１ヒト抗体の改変体は、軽鎖可変領域であって、全体として見れば、配列番号１から配列番号６に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、少なくとも約８１％の配列同一性、少なくとも約８２％の配列同一性、少なくとも約８３％の配列同一性、少なくとも約８４％の配列同一性、少なくとも約８５％の配列同一性、少なくとも約８６％の配列同一性、少なくとも約８７％の配列同一性、少なくとも約８８％の配列同一性、少なくとも約８９％の配列同一性、少なくとも約９０％の配列同一性、少なくとも約９１％の配列同一性、少なくとも約９２％の配列同一性、少なくとも約９３％の配列同一性、少なくとも約９４％の配列同一性、少なくとも約９５％の配列同一性、少なくとも約９６％の配列同一性、少なくとも約９７％の配列同一性、少なくとも約９８％の配列同一性、少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域、および／または重鎖可変領域であって、全体として見れば、配列番号７から配列番号１４に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約７０％のアミノ酸配列同一性、少なくとも約７５％の配列同一性、少なくとも約８０％の配列同一性、少なくとも約８１％の配列同一性、少なくとも約８２％の配列同一性、少なくとも約８３％の配列同一性、少なくとも約８４％の配列同一性、少なくとも約８５％の配列同一性、少なくとも約８６％の配列同一性、少なくとも約８７％の配列同一性、少なくとも約８８％の配列同一性、少なくとも約８９％の配列同一性、少なくとも約９０％の配列同一性、少なくとも約９１％の配列同一性、少なくとも約９２％の配列同一性、少なくとも約９３％の配列同一性、少なくとも約９４％の配列同一性、少なくとも約９５％の配列同一性、少なくとも約９６％の配列同一性、少なくとも約９７％の配列同一性、少なくとも約９８％の配列同一性、少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域を有する。このような抗体は、ヒトＢ７ＲＰ１および／またはマウスＢ７ＲＰ１に結合することができる。

【０１１１】

当業者に理解されるように、多くの潜在的なＣＤＲ接触残基は、他のアミノ酸による置

換の影響を受けやすく、なお抗体が抗原に対する実質的な親和性を保持することを可能にしている。同様に、重鎖および軽鎖におけるＣＤＲと接触していない多くのフレームワーク残基は、ヒト抗体の親和性または非免疫原性の有意な損失なしに、ヒトコンセンサスアミノ酸による他のヒト抗体の対応する位置からのアミノ酸置換、または他のマウス抗体からのアミノ酸置換が適応され得る。種々の別のアミノ酸の選択を用いて、親和性、特異性、非免疫原性、製造容易性、および他の所望の特性の種々の組み合わせを有する開示される抗Ｂ７ＲＰ１抗体およびこの断片のバージョンを生成することができる。

【０１１２】

ポリヌクレオチドに関して「改変体」とは、本発明のポリヌクレオチド配列と少なくとも約７５％の核酸配列同一性を有する核酸分子を指すことが意図される。通常、ポリヌクレオチド改変体は、本明細書に開示される新規な核酸配列に対して、少なくとも約７５％の核酸配列同一性、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、少なくとも約８１％の核酸配列同一性、少なくとも約８２％の核酸配列同一性、少なくとも約８３％の核酸配列同一性、少なくとも約８４％の核酸配列同一性、少なくとも約８５％の核酸配列同一性、少なくとも約８６％の核酸配列同一性、少なくとも約８７％の核酸配列同一性、少なくとも約８８％の核酸配列同一性、少なくとも約８９％の核酸配列同一性、少なくとも約９０％の核酸配列同一性、少なくとも約９１％の核酸配列同一性、少なくとも約９２％の核酸配列同一性、少なくとも約９３％の酸配列同一性、少なくとも約９４％の核酸配列同一性、少なくとも約９５％の核酸配列同一性、少なくとも約９６％の核酸配列同一性、少なくとも約９７％の核酸配列同一性、少なくとも約９８％の核酸配列同一性、または少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有する。

【０１１３】

代替の実施形態では、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株に発現させることができる。これらの実施形態では、適切な哺乳動物の宿主細胞の形質転換のために、特定の抗体をコードする配列を用いてよい。これらの実施形態によれば、米国特許第４，３９９，２１６号、同第４，９１２，０４０号、同第４，７４０，４６１号および同第４，９５９，４５５号（全てが任意の目的のために参照により本明細書中に組み込まれる）に例示されているように、例えば、ウイルス（またはウイルスベクター）にポリヌクレオチドを組み込んで、このウイルス（またはベクター）によって宿主細胞を形質導入する方法、または当分野において知られているトランスフェクション手法による方法などを含む宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する任意の既知の方法を用いて、形質転換を達成することができる。一般的に、用いられる形質転換手法は、形質転換されるべき宿主に依存し得る。哺乳動物細胞に異種ポリヌクレオチドを導入する方法は、当分野において周知であり、限定されないが、デキストラン媒介によるトランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介によるトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームへのポリヌクレオチドのカプセル化、および核へのＤＮＡの直接的なマイクロインジェクションを含む。

【０１１４】

本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体の重鎖定常領域、重鎖可変領域、軽鎖定常領域、または軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする核酸分子は、標準的な連結技術を用いて適切な発現ベクターに挿入される。一実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の重鎖または軽鎖の定常領域を適切な可変領域のＣ末端に付加して、発現ベクターに連結させる。このベクターは、典型的には、採用される特定の宿主細胞において機能的である（即ち、このベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が生じ得るように宿主細胞の機構に適切である）ように選択される。発現ベクターの概説については、ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ．ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５（Ｇｏｅｄｄｅｌ，ｅｄ．），１９９０，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０１１５】

典型的には、任意の宿主細胞において用いられる発現ベクターは、プラスミド維持のため、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。こ

のような配列は、総称的に「隣接配列」と呼ばれ、ある種の実施形態では、典型的には、下記のヌクレオチド配列の１以上を含む：プロモーター、１以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含有する完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択可能なマーカーエレメント。これらの配列の各々は、以下に検討される。

【０１１６】

場合により、ベクターは、「タグ」コード配列、即ち、抗Ｂ７ＲＰ１抗体ポリペプチドコード配列の５’末端または３’末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含んでよい；このオリゴヌクレオチド配列は、ポリＨｉｓ（例えば、ｈｅｘａＨｉｓ）、または別の「タグ」、例えば、ＦＬＡＧ、ＨＡ（インフルエンザウイルス血球凝集素）、またはｍｙｃをコードし、これらについては、市販の抗体が存在する。このタグは、典型的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの抗Ｂ７ＲＰ１抗体のアフィニティー精製または検出のための手段として役立つ。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティマトリックスとしてタグに対する抗体を用いるカラムクロマトグラフィーによって達成することができる。場合により、その後、タグは、種々の手段によって、例えば、切断のために特定のペプチダーゼを用いることによって、精製された抗Ｂ７ＲＰ１抗体ポリペプチドから取り出すことができる。

【０１１７】

隣接配列は、相同（即ち、宿主細胞と同種および／または菌株由来）、異種（即ち、宿主細胞種または菌株以外の種由来）、ハイブリッド（即ち、２以上の供給源由来の隣接配列の組み合わせ）、合成または天然であってよい。したがって、隣接配列の供給源は、この隣接配列が機能的であり、宿主細胞の機構によって活性化され得るという条件で、任意の原核生物であっても、または真核生物であっても、任意の脊椎動物もしくは無脊椎動物であっても、または任意の植物であってよい。

【０１１８】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当分野において周知の任意のいくつかの方法によって得ることができる。典型的には、本明細書において有用な隣接配列は、マッピングによって、および／または制限エンドヌクレアーゼ消化によってこれまでに同定されており、したがって、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な組織供給源から単離できる。ある場合には、隣接配列の全ヌクレオチド配列は知られてよい。ここでは、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために、本明細書中に記載される方法を用いて合成することができる。

【０１１９】

隣接配列の全てまたは一部だけが知られているかにかかわらず、これは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、および／または適切なプローブ、例えば、同種もしくは別の種由来のオリゴヌクレオチドおよび／または隣接配列断片を用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。隣接配列が知られていない場合、隣接配列を含有するＤＮＡの断片は、例えば、コード配列またはさらに別の遺伝子を含んでよいＤＮＡのより大きい小片から単離することができる。単離は、適切なＤＮＡ断片を生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化を行い、その後、アガロースゲル精製、Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）、または当業者に知られている他の方法を用いて単離することによって達成できる。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかとなる。

【０１２０】

複製起点は、典型的には、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は宿主細胞においてベクターの増幅を補助する。最適なベクターが複製起点の部位を含有しない場合、既知の配列に基づいて化学的に合成し、ベクターに連結してよい。例えば、プラスミドｐＢＲ３２２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）

由来の複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、種々のウイルス起点（例えば、ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）、またはＨＰＶまたはＢＰＶなどのパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点の構成要素は、哺乳動物の発現ベクターに必要ではない（例えば、ＳＶ４０起点は、多くの場合、ウイルス初期プロモーターも含有するため、単独で用いられる）。

【０１２１】

転写終結配列は、典型的には、ポリペプチドコード領域の末端に対して３’側に位置し、転写を終了させるように機能する。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、Ｇ－Ｃに富んだ断片であり、ポリＴ配列が続く。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされるかまたはベクターの一部として市販もされているが、本明細書に記載の方法などの核酸合成の方法を用いて容易に合成することもできる。

【０１２２】

選択マーカー遺伝子は、選択培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、（ａ）原核生物の宿主細胞では、抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、テトラサイクリンもしくはカナマイシンに対する耐性を付与する；（ｂ）細胞の栄養要求性欠損を補完する；または（ｃ）複合培地または合成培地から利用できない重要な栄養物を供給するタンパク質をコードする。例示的な選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびテトラマイシン耐性遺伝子である。有利には、ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物および真核生物の宿主細胞の両方における選択のために用いることができる。

【０１２３】

発現される遺伝子を増幅するために、他の選択遺伝子が用いられてよい。増幅とは、成長または細胞の生存に重要なタンパク質の産生に必要な遺伝子が、組換え細胞の連続的世代の染色体内において縦列で反復されているプロセスである。哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子およびプロモーターなしのチミジンキナーゼ遺伝子が挙げられる。ベクターに存在する選択遺伝子によって形質転換体だけが生存するように固有に適合されるという選択圧力下に、哺乳動物の細胞形質転換体を置く。選択圧力は、培地中の選択因子の濃度が連続的に増大される条件下で形質転換細胞を培養することによって付与され、これによって、選択遺伝子と別の遺伝子、例えば、Ｂ７ＲＰ１ポリペプチドに結合する抗体をコードするＤＮＡとの両方の増幅がもたらされる。結果として、抗Ｂ７ＲＰ１抗体などのポリペプチドの増加量は、増幅されたＤＮＡから合成される。

【０１２４】

リボソーム結合部位は、通常、ｍＲＮＡの翻訳開始に必要であり、シャイン・ダルガーノ配列（原核生物）またはＫｏｚａｋ配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、典型的には、プロモーターの３’側および発現されるべきポリペプチドのコード配列の５’側に位置される。

【０１２５】

真核生物の宿主細胞発現系においてグリコシル化が望まれる場合などのいくつかの場合においては、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列またはプロ配列を操作してよい。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更してもよく、またはグリコシル化に影響するプロ配列を付加してよい。最終のタンパク質産物は、（成熟タンパク質の第一アミノ酸に対して）－１位に、発現に付随する１以上のさらなるアミノ酸を有してもよく、これは全体的に除去されていなくてよい。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合されたペプチダーゼ切断部位に見出される１または２個のアミノ酸残基を有してよい。または、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、いくつかの酵素切断部位の使用によって、所望のポリペプチドのわずかに短縮された形態が生じ得る。

【０１２６】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、典型的には、宿主生物によって認識され、抗Ｂ７ＲＰ１抗体をコードする分子に操作可能に連結されているプロモーターを含有する。プロモーターは、この構造遺伝子の転写を調節する構造遺伝子の開始コドンに対して上流（即ち、５’側）（一般的には、約１００から１０００ｂｐ内）に位置する非転写配列である。プロモーターは、２つのクラス：誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターのうちの１つに従来分類される。誘導性プロモーターは、栄養物の有無または温度の変化などの培養条件におけるいくつかの変化に応答して、これらの制御下でＤＮＡから増加したレベルの転写を開始する。他方、構成的プロモーターは、これらが操作可能に連結されている遺伝子を均一に転写し、つまり、遺伝子発現に対する制御がほとんどないかまたは全くない。種々の潜在的な宿主細胞によって認識される多数のプロモーターは周知である。適切なプロモーターは、制限酵素消化によって供給源のＤＮＡからプロモーターを除去して、このベクターに所望のプロモーター配列を挿入することによって、本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体を含む重鎖または軽鎖をコードするＤＮＡに操作可能に連結される。

【０１２７】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターもまた、当分野において周知である。酵母エンハンサーは、有利には、酵母プロモーターとともに用いられる。哺乳動物の宿主細胞とともに使用に適切なプロモーターは周知であり、限定されないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）などのウイルスのゲノムから得られるプロモーターを含む。他の適切な哺乳動物プロモーターには、異種哺乳動物プロモーター、例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターが含まれる。

【０１２８】

対象となり得るさらなるプロモーターには、限定されないが、下記が含まれる。ＳＶ４０初期プロモーター（Ｂｅｒｎｏｉｓｔ ａｎｄ Ｃｈａｍｂｏｎ，１９８１，Ｎａｔｕｒｅ ２９０：３０４－１０）；ＣＭＶプロモーター（Ｔｈｏｍｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６５９－６６３）；ラウス肉腫ウイルスの３’長末端反復に含有されるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｃｅｌｌ ２２：７８７－９７）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：１４４４－４５）；メタロチオネイン遺伝子由来のプロモーターおよび調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｎａｔｕｒｅ ２９６：３９－４２）；ならびに原核生物プロモーター、例えば、β－ラクタマーゼプロモーター（Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，１９７８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，７５：３７２７－３１）；またはｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８０：２１－２５）。また対象となるものは、組織特異性を示し、トランスジェニック動物に利用されている、下記の動物転写制御領域である。膵臓の腺房細胞において活性であるエラスターゼＩ遺伝子制御領域（Ｓｗｉｆｔ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６３９－４６；Ｏｒｎｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．５０：３９９－４０９（１９８６）；ＭａｃＤｏｎａｌｄ，１９８７，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ７：４２５－５１５）；膵臓β細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Ｈａｎａｈａｎ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：１１５－２２）；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Ｇｒｏｓｓｃｈｅｄｌ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６４７－５８；Ａｄａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１８：５３３－３８；Ａｌｅｘａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７：１４３６－４４）；精巣、乳房、リンパ系細胞および肥満細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域（Ｌｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４５

：４８５－９５）；肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域（Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：２６８－７６）；肝臓において活性なα－フェト－プロテイン遺伝子制御領域（Ｋｒｕｍｌａｕｆ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，５：１６３９－４８；Ｈａｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５：５３－５８）；肝臓において活性なα１－抗トリプシン遺伝子制御領域（Ｋｅｌｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：１６１－７１）；骨髄性細胞において活性なβ－グロビン遺伝子制御領域（Ｍｏｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：３３８－４０；Ｋｏｌｌｉａｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４６：８９－９４）；脳における乏突起膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Ｒｅａｄｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃｅｌｌ ４８：７０３－１２）；骨格筋において活性であるミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域（Ｓａｎｉ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：２８３－８６）；および視床下部において活性な生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域（Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３４：１３７２－７８）。

【０１２９】

エンハンサー配列をベクターに挿入して、高等真核生物によって本発明の抗Ｂ７ＲＰ１抗体を含む軽鎖または重鎖をコードするＤＮＡの転写を増加することができる。エンハンサーは、プロモーター上で転写を増加するように作用する、通常、約１０から３００ｂｐの長さのＤＮＡのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、相対的に、配向および位置に依存し、転写単位の５’および３’の両方の位置で見出されている。哺乳動物の遺伝子から利用可能ないくつかのエンハンサー配列は知られている（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェト－プロテインおよびインスリン）。しかしながら、典型的には、ウイルス由来のエンハンサーが用いられる。当分野において知られるＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、ベクター中でコード配列の５’または３’のいずれに位置してよいが、典型的には、プロモーターから５’部位に位置する。

【０１３０】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターなどの開始ベクターから構築されてよい。このようなベクターは、所望の隣接配列の全てを含有してもよくまたは含有しなくてよい。本明細書中に記載される１以上の隣接配列は、既にベクターに存在しないが、この隣接配列を個々に入手してベクターに連結してよい。隣接配列の各々を得るために用いられる方法は、当業者に周知である。

【０１３１】

ベクターが構築され、軽鎖、重鎖、または抗Ｂ７ＲＰ１抗体を含む軽鎖および重鎖をコードする核酸分子が、このベクターの適切な部位に挿入された後、完成したベクターを増幅および／またはポリペプチド発現のために適切な宿主細胞に挿入してよい。選択された宿主細胞への抗Ｂ７ＲＰ１抗体についての発現ベクターの形質転換は、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、ＤＥＡＥデキストラン媒介のトランスフェクション、または他の既知の技術を含む周知方法によって達成することができる。選択される方法は、一部には、用いられる宿主細胞のタイプの作用である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（上述）に記載されている。

【０１３２】

宿主細胞は、適切な条件下で培養された場合、抗Ｂ７ＲＰ１抗体を合成し、その後、培地から（宿主細胞が培地中に抗体を分泌する場合）、またはこの抗体を産生する宿主細胞から直接（抗体が分泌されない場合）回収することができる。適切な宿主細胞の選択は、種々の要因、例えば、所望の発現レベル、活性のために所望されるかまたは必要であるポリペプチド改変（例えば、グリコシル化またはリン酸化）および生物学的に活性な分子へ

の折り畳みの容易さに依存する。

【０１３３】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物の細胞株は、当分野において周知であり、限定されないが、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手可能な不死化細胞株が挙げられ、限定されないが、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、ハムスター仔の腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Ｈｅｐ Ｇ２）および多数の他の細胞株が挙げられる。ある種の実施形態では、どの細胞株が高い発現レベルを有し、Ｂ７ＲＰ１結合特性を有する抗体を構成的に生成するかを決定することを通じて、細胞株を選択することができる。別の実施形態では、それ自体の抗体を生成しないが、異種の抗体を作製および分泌する能力を有するＢ細胞系列由来の細胞株を選択することができる。

【０１３４】

本発明の抗体は、生物学的サンプル中のＢ７ＲＰ１を検出するため、およびＢ７ＲＰ１タンパク質を産生する細胞または組織の同定のために有用である。Ｂ７ＲＰ１に特異的に結合する本発明の抗体は、Ｂ７ＲＰ１が介在した疾患の治療に有用であり得る。この抗体は、Ｂ７ＲＰ１を検出するため、およびＢ７ＲＰ１がＢ７ＲＰ１レセプターとの複合体を形成することを阻害するための結合アッセイにおいて用いることができる。Ｂ７ＲＰ１に結合して、他の結合化合物との相互作用をブロックするこの抗体は、Ｂ７ＲＰ１が介在した疾患の調節に治療的な用途を有し得る。ある種の実施形態では、Ｂ７ＲＰ１に対する抗体は、このレセプターに対するＢ７ＲＰ１結合をブロックし、Ｂ７ＲＰ１誘導性シグナル伝達カスケードの破壊を生じ得る。

【０１３５】

本発明はまた、本明細書に開示される障害または状態のいずれか１つなどの、患者におけるＢ７ＲＰ１発現の増加またはＢ７ＲＰ１に対する感受性の増加によって生じる障害または状態の処置のための薬物の製造における本発明の１つ以上の抗体の使用に関する。

【０１３６】

ある種の実施形態では、本発明は、医薬組成物であって、治療的に有効な量の１つまたは複数の本発明の抗体を、医薬的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存料および／またはアジュバントとともに含む医薬組成物を提供する。許容される製剤物質は、採用される投薬量および濃度において、レシピエントに非毒性である。好ましい実施形態では、治療的に有効な量の抗Ｂ７ＲＰ１抗体を含む医薬組成物が提供される。

【０１３７】

ある種の実施形態では、許容される製剤物質は、採用される投薬量および濃度でレシピエントに非毒性である。

【０１３８】

ある種の実施形態では、医薬組成物は、例えば、ｐＨ、浸透圧、粘度、清澄度、色調、等張性、臭気、無菌性、安定性、分解もしくは放出の速度、組成物の吸着もしくは浸透を、改変、維持または保存するための製剤物質を含んでよい。このような実施形態では、適切な製剤物質としては、限定されないが、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；抗菌剤；抗酸化剤（例えば、アルコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸、リン酸または他の有機酸）；バルク剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））；錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン）；充填剤；単糖類；二糖類；ならびに他の糖類（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；着色剤、香味料および希釈剤；乳化剤；親水性のポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；保存料（例えば、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパ

ラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）；溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール）；安定性強化剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）；等張化剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属、例えば塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール）；輸送ビヒクル；希釈剤；賦形剤および／または医薬的アジュバントが挙げられる。ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，１８$^{th}$　Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，ｅｄ．），１９９０，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙを参照されたい。

【０１３９】

ある種の実施形態では、最適な医薬組成物は、例えば、意図される投与経路、輸送様式および所望の投薬量に依存して、当業者によって決定される。例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（上述）を参照されたい。ある種の実施形態では、このような組成物は、本発明の抗体の物理的状態、安定性、インビボでの放出の速度、およびインビボでのクリアランスの速度に影響し得る。

【０１４０】

ある種の実施形態では、医薬組成物における主なビヒクルまたは担体は、現実には水性であっても非水性であってよい。例えば、適切なビヒクルまたは担体は、非経口投与のための組成物中に共通の他の物質で補充された可能性がある、注射用水、生理食塩水または人工的な脳脊髄液であってよい。中性の緩衝化食塩水、または血清アルブミンと混合された食塩水は、さらに例示的なビヒクルである。ある種の実施形態では、本発明の医薬組成物は、約ｐＨ７．０から８．５のＴｒｉｓ緩衝液、または約ｐＨ４．０から５．５の酢酸塩緩衝液を含み、さらにソルビトール、スクロース、Ｔｗｅｅｎ－２０および／またはこの適切な代替物を含んでよい。本発明のある種の実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を最適の処方剤（ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ、上述）とともに、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で混合することによって保存のために調製され得る。さらに、ある種の実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体産物は、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて凍結乾燥剤として調合されてよい。

【０１４１】

本発明の医薬組成物は、非経口送達のために選択することができる。または、この組成物は、吸入のために、または経口などの消化管を通じた輸送のために選択されてよい。このような医薬的に許容される組成物の調製は、当分野の技術の範囲内である。

【０１４２】

処方成分は、投与部位に許容される濃度で存在する。ある種の実施形態では、緩衝剤を用いて、組成物を生理学的なｐＨで、またはわずかに低いｐＨで、典型的には、約５から約８のｐＨ範囲内で維持される。

【０１４３】

非経口的投与を考慮する場合、本発明における使用のための治療組成物は、所望の抗Ｂ７ＲＰ１抗体を医薬的に許容されるビヒクル中に含む、発熱物質なしの非経口的に許容される水溶液の形態で提供されてよい。非経口注射のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、この滅菌蒸留水中に、抗Ｂ７ＲＰ１抗体が、適切に保存された無菌の等張性溶液として調合される。ある種の実施形態では、この調製物は、デポ注射を介して輸送できる産物の制御放出または徐放性放出を提供し得る、ある因子、例えば、注射用マイクロスフェア、生分解性（ｂｉｏ－ｅｒｏｄｉｂｌｅ）粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ酪酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソームとともに、所望の分子の調剤を含んでよい。ある種の実施形態では、循環中の持続期間を延長する効果を有する、ヒアルロン酸も用いることもできる。ある種の実施形態では、移植可能な薬物輸送デバイスを用

いて、所望の抗体分子を導入することができる。

【０１４４】

本発明の医薬組成物は、吸入のために調合することができる。これらの実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、乾燥した吸入可能な粉末として有利に調合される。ある種の実施形態では、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の吸入溶液はまた、エアロゾル輸送のための噴霧剤とともに調合されてよい。ある種の実施形態では、溶液は噴霧され得る。従って、肺投与および処方の方法はさらに、参照により組込まれ、化学的に修飾されたタンパク質の肺輸送を説明している国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ９４／００１８７５に記載されている。

【０１４５】

調合物は、経口的に投与できることも意図される。この様式で投与される抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、錠剤およびカプセルなどの固体投薬形態の配合に習慣的に用いられる単体と一緒に、または担体なしで調合され得る。ある種の実施形態では、カプセルは、生物学的利用能が最大化されて予備的な全身性の分解が最小化される場合、腸管におけるポイントでこの調合物の活性部位を遊離するように設計されてよい。抗Ｂ７ＲＰ１抗体の吸着を促進するためにさらなる因子が含まれてよい。希釈剤、香味料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤および結合剤も採用され得る。

【０１４６】

本発明の医薬組成物は、１または複数の抗Ｂ７ＲＰ１抗体の有効量を、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤と混合して含んで提供される。滅菌水、または別の適切なビヒクルに錠剤を溶解することによって、単位剤形で溶液を調製し得る。適切な賦形剤としては、限定されないが、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは重炭酸塩、ラクトースもしくはリン酸カルシウム；または結合剤、例えば、スターチ、ゼラチンもしくはアカシア；または潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、もしくはタルクが挙げられる。

【０１４７】

さらなる医薬組成物は、当業者に明らかであり、持続輸送または徐放性輸送の調合物を含む調合物に抗Ｂ７ＲＰ１抗体を含む。種々の他の持続輸送または徐放性輸送の手段、例えば、リポソーム担体、生分解性微粒子または多孔性ビーズおよびデポ注射剤を調合する技術も当業者には知られている。例えば、参照により組み込まれる、医薬組成物の輸送のための多孔性ポリマー微粒子の徐放性放出を説明している国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ９３／００８２９を参照されたい。持続放出調製物は、成形品の形態で、半透過性ポリマーマトリックス、例えばフィルムまたはマイクロカプセルを含んでよい。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ハイドロゲル、ポリアクチド（参照により各々が組み込まれる、米国特許第３，７７３，９１９号および欧州特許出願公開ＥＰ０５８４８１に開示される）、Ｌ－グルタミン酸とガンマエチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２：５４７－５５６）、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７－２７７およびＬａｎｇｅｒ，１９８２，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．１２：９８－１０５）、エチレン酢酸ビニル（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，上述）またはポリ－Ｄ（－）－３－ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開ＥＰ１３３，９８８）を含んでよい。持続放出組成物はまた、当分野において知られている任意のいくつかの方法によって調製することができるリポソームを含んでよい。例えば、Ｅｐｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：３６８８－３６９２；参照により組み込まれる、欧州特許出願公開ＥＰ０３６，６７６；ＥＰ０８８，０４６およびＥＰ１４３，９４９を参照されたい。

【０１４８】

インビボ投与に用いられる医薬組成物は、典型的には、滅菌調製物として提供される。滅菌は、滅菌濾過メンブレンを通した濾過によって達成することができる。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を用いる滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれに行われてよい。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液として保存さ

れてよい。非経口組成物は、一般的には、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、静脈内溶液バッグ、または皮下注射針によって穿通可能な栓を有するバイアルに入れられる。

【０１４９】

一度医薬組成物が調合されると、これは、滅菌バイアル中に、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体として、または脱水もしくは凍結乾燥された粉末として保存されていてよい。このような調合物は、即時使用（ｒｅａｄｙ－ｔｏ－ｕｓｅ）の形態、または投与の前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥された形態）のいずれで保存されてよい。

【０１５０】

本発明はまた、単回用量投与単位を生成するためのキットを提供する。本発明のキットは、各々が、乾燥されたタンパク質を有する第一の容器、および水性調合物を有する第二の容器の両方を含有することができる。本発明のある種の実施形態では、単一および複数のチャンバを有する事前充填シリンジ（例えば、液体シリンジおよび溶液シリンジ）を含有するキットが提供される。

【０１５１】

治療的に採用されるべき、有効量の抗Ｂ７ＲＰ１抗体を含有する医薬組成物は、例えば、治療の内容および目的に依存する。治療のために適切な投薬レベルは、部分的には、輸送される分子、抗Ｂ７ＲＰ１抗体が用いられている徴候、投与経路、ならびに患者のサイズ（体重、体表面積または器官サイズ）および／または状態（年齢および一般的な健康状態）に依存して変化することが当業者に理解される。ある種の実施形態では、最適の治療効果を得るために、臨床医が投薬量を設定して、投与経路を改変してよい。典型的な投薬量は、上述の要因に依存して、約０．１μｇ／ｋｇから約３０ｍｇ／ｋｇ以上の範囲でよい。ある種の実施形態では、投薬量は、０．１μｇ／ｋｇから約３０ｍｇ／ｋｇ；１μｇ／ｋｇから約３０ｍｇ／ｋｇ；または５μｇ／ｋｇから約３０ｍｇ／ｋｇの範囲であってよい。

【０１５２】

投与頻度は、用いられる調合物中の特定の抗Ｂ７ＲＰ１抗体の薬物動態パラメーターに依存する。典型的には、所望の効果を達成する投薬量が得られるまで、臨床医は組成物を投与する。したがって、組成物は、単回用量として、または２回以上の用量（これは同じ量の所望の分子を含んでいてもまたは含んでいなくてよい）として経時的に、または移植デバイスもしくはカテーテルを介した連続注入として投与されてよい。適切な投薬量のさらなる工夫は、当業者によって日常的に行われ、当業者によって日常的に行われる作業の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量応答データの使用を通じて得ることができる。ある種の実施形態では、本発明の抗体は、長期間にわたって患者に投与されてよい。本発明の抗体の慢性投与によって、ヒト以外の動物においてヒト抗原に対して惹起された抗体、例えば、ヒト以外の種で産生された不完全ヒト抗体に一般に関連する有害な免疫応答またはアレルギー応答が最小化される。

【０１５３】

医薬組成物の投与経路は、持続放出システムによるかまたは移植デバイスによる既知の方法、例えば、経口、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または病巣内の経路による注射を通じた方法に従う。ある種の実施形態では、組成物は、ボーラス注射によって投与されても、もしくは注入によって連続的に投与されても、または移植デバイスによって投与されてよい。

【０１５４】

組成物はまた、所望の分子がこの上に吸着されるかまたは封入されているメンブレン、スポンジまたは別の適切な物質の移植によって局所投与されてよい。ある種の実施形態では、移植デバイスを用いる場合は、デバイスは任意の適切な組織または器官に移植されてもよく、所望の分子の輸送は、拡散、持続放出ボーラス、または連続的投与を介してよい。

【０１５５】

本発明に係る抗Ｂ７ＲＰ１抗体の医薬組成物をエクスビボで用いることもまた所望される。このような場合、患者から取り出される細胞、組織または器官を、抗Ｂ７ＲＰ１抗体の医薬組成物に曝露して、その後に細胞、組織および／または器官を患者に移植して戻す。

【０１５６】

詳細には、抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、本明細書において記載される方法などの方法を用いて、ポリペプチドを発現および分泌するように遺伝子操作されているある種の細胞を移植することによって輸送することができる。ある種の実施形態では、このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であってもよく、および自家性、非相同性または異種性であってよい。ある種の実施形態では、細胞は不死化されてよい。他の実施形態では、免疫学的応答の機会を低下させるために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するためにカプセル化されてよい。さらなる実施形態では、カプセル化の物質は、典型的には、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるか、または周囲の組織からの他の有害な要因による細胞の破壊を妨げる生体適合性、半透性のポリマー封入物またはメンブレンである。

【０１５７】

（実施例）

下記の実施例は、行った実験および得られた結果を含んでいるが、これは、例示目的のためにのみ提供され、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例１】

【０１５８】

Ｂ７関連タンパク質－１（Ｂ７ＲＰ１）に対するヒトモノクローナル抗体の生成

抗原

精製した組換えヒトＢ７ＲＰ－１（ｈＢ７ＲＰ－１）は、参照により本明細書中に組み込まれる国際特許出願公開ＷＯ００／４６２４０に記載されるように調製し、またはｈＢ７ＲＰ－１を発現するようにトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を抗原として用いた。成熟ヒトＢ７ＲＰ－１は、配列番号１７としてＷＯ００／４６２４０に示される配列において３０２までの残基Ｘのアミノ酸配列を有し、Ｘは、１９、２０、２１、２２、２４または２８であり得る。

【０１５９】

トランスジェニックＨｕＭａｂマウス

Ｂ７ＲＰ－１に対する完全なヒトモノクローナル抗体は、ＨｕＭａｂトランスジェニックマウスのＨＣｏ７およびＨＣｏ１２菌株を用いて調製され、両者は、ヒト抗体遺伝子を発現する。これらのマウス菌株の両方においては、内因性マウスカッパ軽鎖遺伝子は、Ｃｈｅｎら（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ．１２：８１１－８２０において記載されるようにホモ接合的に分裂しており、内因性マウス重鎖遺伝子は、ＰＣＴ公開ＷＯ０１／０９１８７の実施例１に記載されるようにホモ接合的に分裂した。これらのマウスの菌株のそれぞれは、Ｆｉｓｈｗｉｌｄら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：８４５－８５１に記載されるように、ヒトカッパ軽鎖トランス遺伝子であるＫＣｏ５を担持している。ＨＣｏ７菌株は、米国特許第５，５４５，８０６号；同第５，６２５，８２５号；および同第５，５４５，８０７号に記載されるように、ＨＣｏ７ヒト重鎖トランス遺伝子を担持している。ＨＣｏ１２菌株は、ＰＣＴ公開ＷＯ０１／０９１８７の実施例２に記載されているように、ＨＣｏ１２ヒト重鎖トランス遺伝子を担持している。

【０１６０】

ＨｕＭａｂ免疫化：

Ｂ７ＲＰ－１に対する完全なヒトモノクローナル抗体を生じさせるために、ＨＣｏ７またはＨＣｏ１２菌株のＨｕＭａｂマウスは、精製した組換えＢ７ＲＰ－１またはＢ７ＲＰ－１を発現するようにトランスフェクトしたＣＨＯ細胞で免疫した。ＨｕＭａｂマウスのための一般的な免疫スキームは、Ｌｏｎｂｅｒｇら（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ ３６８（６４７４）：８５６－８５９；Ｆｉｓｈｗｉｌｄら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：８４５－８５１およびＰＣＴ公開ＷＯ９８／２４８８４に記

載されている。マウスは、最初の抗原投入の際には、６－１６週齢であった。Ｂ７ＲＰ－１抗原の精製した組換え調製物（５０μｇ）、またはトランスフェクトしたＣＨＯ細胞の調製物（３．５×１０$^{6}$から１×１０$^{7}$細胞）を用いて、腹腔内でＨｕＭａｂマウスを免疫した。

【０１６１】

トランスジェニックマウスは、完全なフロイントのアジュバントに含まれる精製した抗原で腹腔的に２回免疫し、その後、２週間、不完全なフロイントのアジュバントに含まれる精製した抗原でＩＰ免疫化（最大合計８回の免疫）を行った。Ｂ７ＲＰ－１を発現するようにトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を用いた免疫化は、完全なフロイントのアジュバントおよび不完全なフロイントのアジュバントが細胞と一緒に用いなかったことを除いては同じであった。免疫応答を後眼窩採血によってモニターした。血漿をＥＬＩＳＡ（下記に説明される）によってスクリーニングし、十分なタイターの抗Ｂ７ＲＰ－１ヒト免疫グロブリンで免疫したマウスを融合に用いた。マウスは、屠殺および脾臓の除去の３日前と２日前に抗原で静脈内に追加免疫を行った。典型的には、各抗原に対する１０－２０の融合を行った。数十匹のマウスを各抗原について免疫した。ＨＣｏ７およびＨＣｏ１２マウス菌株の計２８匹のマウスをＢ７ＲＰ－１で免疫した。

【０１６２】

抗Ｂ７ＲＰ－１抗体を産生するＨｕＭａｂマウスの選択：

Ｂ７ＲＰ－１に結合した抗体を産生するＨｕＭａｂマウスを選択するために、免疫したマウス由来の血清を、Ｆｉｓｈｗｉｌｄら（１９９６）によって説明されるように、ＥＬＩＳＡによって試験した。簡単には、マイクロタイタープレートをＰＢＳ中１から２μｇ／ｍｌ、５０μｌ／ウェルで精製した組換えＢ７ＲＰ－１を用いて被覆し、４℃で一晩インキュベートした。その後、ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ（０．０５％）の５％ニワトリ血清の２００μｌ／ウェルでブロックした。Ｂ７ＲＰ－１で免疫したマウス由来の血漿の希釈物を各ウェルに添加し、周囲温度で１から２時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで洗浄し、次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）とコンジュゲートしたヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃポリクローナル抗体とともに室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎを用いて洗浄して、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）と結合体化したヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異的ポリクローナル試薬とともに室温で１時間インキュベートした。洗浄後、このプレートをＡＢＴＳ基質（Ｓｉｇｍａ、Ａ－１８８８、０．２２ｍｇ／ｍＬ）を用いて発色させ、ＯＤ４１５－４９５ｎｍで分光光度計によって分析した。最大のタイターである抗Ｂ７ＲＰ－１抗体を発生させたマウスを融合に用いた。融合は、後述の通り行い、ハイブリドーマの上清をＥＬＩＳＡによる抗Ｂ７ＲＰ－１活性に関して試験した。

【０１６３】

Ｂ７ＲＰ－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生成

マウス脾臓細胞は、ＨｕＭａｂマウスから単離し、標準的なプロトコールに基づいて、マウス骨髄腫細胞株にＰＥＧを用いて融合させた。次に、得られたハイブリドーマは、抗原特異的抗体の産生に関してスクリーニングを行った。免疫したマウス由来の脾臓リンパ細胞の単一細胞の上清は、５０％　ＰＥＧ（Ｓｉｇｍａ）を用いて、ＳＰ２／０非分泌マウス骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ１５８１）の数の４分の１に融合した。細胞を平底マイクロタイタープレートに約１×１０$^{5}$／ウェルでプレーティングし、その後、１０％ウシ胎児血清、１０％　Ｐ３８８Ｄ１（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ　ＴＩＢ－６３）馴化培地、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含む）中の３から５％オリジン（ＩＧＥＮ）、および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）を含む選択培地で約２週間インキュベートした。１から２週間後、ＨＡＴをＨＴで置換した培地中で細胞を培養した。次に、個々のウェルは、ヒト抗Ｂ７ＲＰ－１モノクローナルＩｇＧ抗体についてＥＬＩＳＡ（上述される）によってスクリーニングを行った。一度、広範囲にハイブリドーマの成長

が起ると、通常、１０から１４日後に培地をモニターした。抗体を分泌するハイブリドーマを再度プレーティングし、再びスクリーングして、依然としてヒトＩｇＧに関して陽性である場合、抗Ｂ７ＲＰ－１モノクローナル抗体を少なくとも２回、限界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て、さらなる特徴付けのために組織培地中で少量の抗体を生成させた。

【実施例２】

【０１６４】

抗Ｂ７ＲＰ－１抗体の重鎖および軽鎖のクローニング

Ｂ７ＲＰ１を結合するモノクローナル抗体１６Ｈを発現するハイブリドーマを供給源として用い、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて総ＲＮＡを単離した。５’ＲＡＣＥ（ｃＤＮＡ末端の迅速増幅）オリゴヌクレオチド（５’－ ＣＧＡ ＣＵＧ ＧＡＧ ＣＡＣ ＧＡＧ ＧＡＣ ＡＣＵ ＧＡＣ ＡＵＧ ＧＡＣ ＵＧＡ ＡＧＧ ＡＧＵ ＡＧＡ ＡＡ－３’；配列番号６９）を、ＧｅｎｅＲａｃｅｒ（商標）Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）構成要素およびプロトコールを用いてＲＮＡに連結させた。第一鎖のｃＤＮＡを、伸長アダプター（５’－ ＧＧＣ ＣＧＧ ＡＴＡ ＧＧＣ ＣＴＣ ＣＡＮ ＮＮＮ ＮＮＴ－３’）（配列番号５９）とともにランダムプライマーを用いて合成し、５’ＲＡＣＥ（ｃＤＮＡ末端の迅速増幅）分取アッセイを、ＧｅｎｅＲａｃｅｒ（商標）Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、製造業者の使用説明書に従って行った。完全な軽鎖をコードするｃＤＮＡを調製するために、フォワードプライマーは、ＧｅｎｅＲａｃｅｒ（商標）ネスト化プライマーとし、リバースプライマーは、（５’－ ＧＧＧ ＧＴＣ ＡＧＧ ＣＴＧ ＧＡＡ ＣＴＧ ＡＧＧ－３’）（配列番号６０）とした。重鎖の可変領域をコードするｃＤＮＡを調製するために、フォワードプライマーは、ＧｅｎｅＲａｃｅｒ（商標）ネスト化プライマーとし、リバースプライマーは、（５’－ ＴＧＡ ＧＧＡ ＣＧＣ ＴＧＡ ＣＣＡ ＣＡＣ Ｇ－３’）（配列番号６１）とした。ＲＡＣＥ産物をｐＣＲ４－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にクローニングし、配列を決定した。コンセンサス配列を用いて、全長抗体鎖のＰＣＲ増幅用プライマーを設計した。

【０１６５】

抗Ｂ７ＲＰ１ １６Ｈカッパ軽鎖をコードするｃＤＮＡを調製するために、５’ＰＣＲプライマーは、シグナル配列のアミノ末端、ＸｂａＩ制限酵素部位、および最適化されたＫｏｚａｋ配列（５’－ＣＡＧ ＣＡＧ ＡＡＧ ＣＴＴ ＣＴＡ ＧＡＣ ＣＡＣ ＣＡＴ ＧＧＡ ＣＡＴ ＧＡＧ ＧＧＴ ＣＣＴ ＣＧＣ ＴＣＡ ＧＣＴ ＣＣＴ ＧＧＧ－３’）（配列番号６２）をコードした。３’プライマーは、カルボキシル末端および終止コドン、ならびにＳａｌＩ制限部位（５’－ＣＴＴ ＧＴＣ ＧＡＣ ＴＣＡ ＣＡ ＣＴＣ ＴＣＣ ＣＣＴ ＧＴＴ ＧＡＡ ＧＣＴ Ｃ－３’）（配列番号６３）をコードした。得られたＰＣＲ産物断片を精製し、ＸｂａＩおよびＳａｌＩで消化し、次に、ゲルを分離して、哺乳動物用発現ベクターｐＤＳＲα２０に連結した（いずれかの目的のために、参照により本明細書中に組み込まれる国際出願公開第ＷＯ９０／１４３６３号を参照されたい。ｐＤＳＲα２０は、部位特異的突然変異誘発による「グアノシン」から「アデノシン」へとｐＤＳＲａ１９のヌクレオチド２５６３を変えることによって生成した。）。

【０１６６】

抗Ｂ７ＲＰ１ １６Ｈ重鎖をコードするｃＤＮＡを調製するために、５’ＰＣＲプライマーは、シグナル配列のアミノ末端、ＸｂａＩ制限酵素部位、および最適化されたＫｏｚａｋ配列（５’－ＡＣＡ ＡＣＡ ＡＡＧ ＣＴＴ ＣＴＡ ＧＡＣ ＣＡＣ ＣＡＴ ＧＧＡ ＧＴＴ ＧＧＧ ＧＣＴ ＧＡＡ ＣＴＧ Ｇ－３’）（配列番号６４）をコードした。３’プライマーは、天然に存在するセンス鎖のＢｓｍＢＩ部位を含む可変領域のカルボキシル末端（５’－ ＧＴＧ ＧＡＧ ＧＣＡ ＣＴＡ ＧＡＧ ＡＣＧ ＧＴＧ ＡＣＣ ＡＧＧ ＡＴＴ ＣＣ －３’；配列番号６５）をコードした。得られた産物を精製し、ＸｂａＩおよびＢｓｍＢＩで消化し、次に、ゲルを分離して、ヒトＩｇＧ１定

常領域を含有するｐＤＳＲα２０に連結し、およびヒトＩｇＧ２定常領域を含有するｐＤＳＲα２０にも連結した。抗Ｂ７ＲＰ１重鎖可変領域を誘導する全てのハイブリドーマは、関連する天然の定常領域にかかわらず、上述したように、ヒトＩｇＧ１およびヒトＩｇＧ２定常領域を含有するｐＤＳＲα２０ベクターの両方にクローニングした。

【実施例３】

【０１６７】

チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞における抗Ｂ７ＲＰ１抗体の発現

リン酸カルシウム法を用いて、１６Ｈ－重鎖／ｐＤＳＲα１９　ＩｇＧ２　Ｂ７ＲＰ１カッパ／ｐＤＳＲα１９プラスミドを、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損（ＤＨＦＲ$^{-}$）無血清適合チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞中に同時トランスフェクションすることによって、１６Ｈ抗Ｂ７ＲＰ１　ｍＡｂの安定な発現を達成させた（全長１６Ｈ重鎖配列は、配列番号４４に示されている；１６Ｈカッパ鎖配列は、配列番号４５に示されている）。トランスフェクトされた細胞は、透析血清を含むが、ヒポキサンチン－チミジンを含有しない培地中で選択され、ＤＨＦＲ酵素を発現する細胞の増殖を確保した。馴化培地中で１６Ｈ抗Ｂ７ＲＰ１　ｍＡｂの発現を検出するために、トランスフェクトされたクローンをＥＬＩＳＡなどのアッセイを用いてスクリーニングした。最高に発現しているクローンをＤＨＦＲ増幅のためのメトトレキセート（ＭＴＸ）の濃度増加に供した。ＭＴＸで増幅したクローンは、馴化培地中で１６Ｈ抗Ｂ７ＲＰ１　ｍＡｂのより高い発現を検出するために、ＥＬＩＳＡなどのアッセイを用いてスクリーニングした。最高に発現しているクローンをサブクローニングに供して、相同な集団および細胞バンクの構築を得た。

【０１６８】

本発明の他の組換え抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、抗Ｂ７ＲＰ１モノクローナル抗体について上述したのと同じプロトコールを用いて、ＤＨＦＲ欠損のチャイニーズハムスター卵巣細胞において生成することができる。本発明の各抗Ｂ７ＲＰ１抗体の完全な重鎖または軽鎖をコードするＤＮＡ配列を発現ベクターにクローニングする。ＣＨＯｄ－細胞は、適切な抗Ｂ７ＲＰ１抗体の完全な重鎖を発現可能な発現ベクターおよび完全な軽鎖を発現する発現ベクターを用いて、同時トランスフェクトされる。例えば、抗Ｂ７ＲＰ１抗体を生成するために、配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含む完全な重鎖を発現可能なベクターおよび配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含む完全な軽鎖を発現可能なベクターを用いて、細胞を同時トランスフェクトする。表２は、ヒトＩｇＧ重鎖定常領域を有する抗Ｂ７ＲＰ１抗体についての典型的である完全な軽鎖および典型的である完全な重鎖を概要している。当業者は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ２が互いに置き換え可能であることを認識するであろう（即ち、ＩｇＧ１が表に列挙されている場合、ＩｇＧ２は、存在し得るし、この逆も同様である）。または、任意の他の免疫グロブリン（例えば、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥまたはＩｇＨ）は、本発明の抗体を生成するために用いることができる。

【０１６９】

【表１】

| 抗体 | 重鎖可変領域<br>＋<br>重鎖定常領域 | 完全な重鎖 |
|---|---|---|
| 16H(IgG2) | 配列番号 7+配列番号 41 | 配列番号 44 |
| 16H(IgG1) | 配列番号 7+配列番号 42 | 配列番号 70 |
| 16Hg(IgG2) | 配列番号 8+配列番号 41 | 配列番号 46 |
| 16Hg(IgG1) | 配列番号 8+配列番号 42 | 配列番号 71 |
| 5D(IgG1) | 配列番号 9+配列番号 42 | 配列番号 47 |
| 5D(IgG2) | 配列番号 9+配列番号 41 | 配列番号 72 |
| 2H(IgG2) | 配列番号 10+配列番号 41 | 配列番号 49 |
| 2H(IgG1) | 配列番号 10+配列番号 42 | 配列番号 73 |
| 2Hg(IgG2) | 配列番号 11+配列番号 41 | 配列番号 51 |
| 2Hg(IgG1) | 配列番号 11+配列番号 42 | 配列番号 74 |
| 43H(IgG2) | 配列番号 14+配列番号 41 | 配列番号 52 |
| 43H(IgG1) | 配列番号 14+配列番号 42 | 配列番号 75 |
| 41H(IgG2) | 配列番号 13+配列番号 41 | 配列番号 54 |
| 41H(IgG1) | 配列番号 13+配列番号 42 | 配列番号 76 |
| 15H(IgG2) | 配列番号 12+配列番号 41 | 配列番号 56 |
| 15H(IgG1) | 配列番号 12+配列番号 42 | 配列番号 57 |

| 抗体 | 軽鎖可変領域<br>＋<br>軽鎖定常領域 | 完全な軽鎖 |
|---|---|---|
| 16H | 配列番号 1+配列番号 43 | 配列番号 45 |
| 5D | 配列番号 2+配列番号 43 | 配列番号 48 |
| 2H | 配列番号 3+配列番号 43 | 配列番号 50 |
| 43H | 配列番号 6+配列番号 43 | 配列番号 53 |
| 41H | 配列番号 5+配列番号 43 | 配列番号 55 |
| 15H | 配列番号 4+配列番号 43 | 配列番号 58 |

【実施例４】

【０１７０】

抗Ｂ７ＲＰ１抗体の産生

抗Ｂ７ＲＰ１抗体は、ＣＨＯ細胞のクローン株における発現によって産生される。各産生の実施のために、単一バイアルの細胞を無血清細胞培地中に解凍させる。この細胞をＴフラスコ中で最初に増殖させ、その後、スピナーフラスコ中で増殖させる。次に、２０００Ｌのバイオリアクターにスケールアップするステンレススチールリアクター中で増殖させた。送り込みバッチ培養を用いて２０００Ｌのバイオリアクター中で産生を行い、この中に、濃縮された培地成分を含有する栄養源を添加し、細胞増殖および培養生存率を維持する。産生は約２週間続き、この間、前記細胞による抗Ｂ７ＲＰ１抗体を構成的に産生して、細胞培地に分泌させた。

【０１７１】

産生リアクターを所定のｐＨ、温度および溶存酸素レベルで調節する。ｐＨは、二酸化炭素ガスおよび炭酸ナトリウムの添加によって調節する；溶存酸素は、空気、窒素および酸素ガス流によって調節する。

【０１７２】

産生の最終に、細胞ブロスをディスクスタック遠心分離に供給して、培養上清を細胞から分離する。濃縮物をデプスフィルター、その後の０．２μｍフィルターを通過させてさらに清澄化する。次に、清澄化した馴化培地を接線流の限外濾過によって濃縮する。馴化培地を１５から３０倍に濃縮する。次に、得られる濃縮馴化培地を精製によって処理する

かまたは後日精製するために凍結する。

【実施例５】

【０１７３】

１６Ｈ　ｍＡｂの生殖細胞系列化

１６Ｈ抗体とヒト生殖細胞系列配列の配列の整列は、１６Ｈ抗体の可変領域におけるフレームワーク配列が、ほんの３個のアミノ酸の相違を有するが、$V_H$３－０７および$J_H$４生殖細胞系列配列にほとんど同一であることを示した（図１Ａ）。１６Ｈ抗体のＶＫ領域についてのフレームワーク配列は、ＶＫ１－Ｌ１５生殖細胞系列配列と同一であることがわかった。体細胞超変異が患者の免疫応答によって外来として認識されることは理論的には可能である；この場合、患者は、治療薬を中和することができる抗イディオタイプ応答を産生する。この可能性を減らすために、ＶＨフレームワーク領域における３個のアミノ酸変化を逆に$V_H$３－０７および$J_H$４生殖細胞系列配列に変換した（図１Ａ）。生殖細胞系列$V_H$および$J_H$遺伝子セグメントはすべてのヒトゲノムに存在するため、１６Ｈの生殖細胞系列バージョンは、投薬された患者の免疫応答によって外来として認識される可能性はない。プレート共刺激バイオアッセイは、生殖細胞系列化した抗体が、生殖細胞系列化していない抗体$IC_{50}$と類似した$IC_{50}$を有するＴ細胞増殖を誘導可能かどうかを決定するために行った。共刺激アッセイは、後述するように、抗ＣＤ３およびｈＢ７ＲＰ－１－Ｆｃ融合タンパク質を用いて行い、１６Ｈｇｅｒｍｌｉｎｅまたは１６Ｈｇと呼ばれるこの生殖細胞系列化した抗体が、この生物学的活性を保持していることを確かめた（図１Ｂ）。

【実施例６】

【０１７４】

Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）およびＫｉｎＥｘＡによるモノクローナル抗体の親和性測定

３種の抗体（実施例１で記載されるように調製した５Ｄおよび１６Ｈ、および実施例５で記載されるように調製した１６Ｈ生殖細胞系列）を精製し、結合親和性分析に従わせた。Ｂ７ＲＰ１－Ｆｃは、標準的なアミンカップリング化学を用いてＣＭ５センサーチップ上で高密度で固定した。次に、固定濃度のｍＡｂは、種々の濃度のＢ７ＲＰ－１またはＢ７ＲＰ１－Ｆｃと共に少なくとも室温で８時間インキュベートし、平衡に達するようにした。次に、試料をＢ７ＲＰ１－Ｆｃ上に注入し、観察される結合シグナルは、平衡での溶液中に残存する遊離抗体を示した。２種の異なる抗体濃度（０．２ｎＭおよび１ｎＭ）を用いることによって、特定のｍＡｂとリガンドとの間の相互作用の$K_D$は、二重曲線一部位相同性結合モデル（ｄｕａｌ－ｃｕｒｖｅ　ｏｎｅ－ｓｉｔｅ　ｈｏｍｏｇｅｎｏｕｓ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｍｏｄｅｌ）（Ａｄａｍｃｚｙｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．１０：１０３２－３７；Ａｄａｍｃｚｙｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０：３１９－２８）を用いて競合曲線の非直線回帰分析から算出した。図２および表３に示されるように、１６Ｈ、１６Ｈｇ、および５Ｄ　ｍＡｂの全ては、可溶性Ｂ７ＲＰ－１およびＢ７ＲＰ１－１－Ｆｃタンパク質に高親和性で結合した。さらに、結果は、１６Ｈ（非生殖細胞系列）および１６Ｈｇ（生殖細胞系列）が同様に反応することを示し、生殖細胞系列化は抗体とリガンドとの間の結合に有意に影響を与えなかったことを実証した。

【０１７５】

【表２】

表３

| $K_D$値の概要 | | |
|---|---|---|
| | B7RP-1 | B7RP1-Fc |
| 5D | 37pM | 1.6pM |
| 16H | 1.9nM | 27pM |
| 16H(生殖細胞系列) | 2.7nM | 17pM |

【０１７６】
５Ｄ、２Ｈ、および２Ｈ生殖細胞系列抗体の結合はまた、ＫｉｎＥｘＡ（動的排除アッセイ（ｋｉｎｅｔｉｃ　ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ　ａｓｓａｙ））技術を用いて試験した。このアッセイでは、ｈＢ７ＲＰ－１をアガロースビーズに結合させた。このビーズを用いてビーズカラムを作製した。抗体を固定濃度で含有する試料は、種々の濃度のｈＢ７ＲＰ－１で平衡に到達させるようにし、次に、ビーズカラムを通過させた。リガンドと複合化しなかった抗体は、被覆ビーズに結合した。
【０１７７】
蛍光体を付した抗ヒトＦｃ二次抗体を用いて、結合した試験抗体を検出した。得られたシグナルは、所定のリガンド濃度で溶液中の遊離抗体に比例した。２種の異なる抗体濃度を用いて、この相互作用の$K_D$は、二重曲線一部位相同性結合モデル（Ａｄａｍｃｚｙｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．１０：１０３２－３７；Ａｄａｍｃｚｙｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０：３１９－２８）を用いて競合曲線の非直線回帰分析から算出した。図３、４、および５は、抗体５Ｄ、２Ｈおよび２Ｈ（生殖細胞系列）についての二重曲線フィットを示す。この手法を用いて、約１０倍の差が、抗体５Ｄおよび２Ｈに関する$K_D$において見られた。
【０１７８】
Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）およびＫｉｎＥｘＡアッセイの結果は、抗体５Ｄが２Ｈまたは１６ＨのいずれかよりもｈＢ７ＲＰ－１に対してより高い親和性を有することを実証した。また、抗体２Ｈの生殖細胞系列バージョンは、生殖細胞系列化していない構築物との有意な相違を示さない。
【実施例７】
【０１７９】
抗Ｂ７ＲＰ１抗体の機能的特徴付け
本発明のＢ７ＲＰ－１抗体の機能的特徴付けは、結合競合アッセイ、インビトロ共刺激アッセイ、およびインビトロ破傷風トキソイドアッセイを用いて評価した。
【０１８０】
結合競合試験
結合競合試験は、１６Ｈ　ｍＡｂを用いて行われ、Ｂ７ＲＰ－１に対するＩＣＯＳ結合と競合し得ることを実証した。全長ヒトＢ７ＲＰ－１をコードする遺伝子でトランスフェクトしたＣＨＯ細胞は、最初に、量を減少させた非標識の１６Ｈ　ｍＡｂと共にインキュベートし、その後、蛍光標識したＩＣＯＳ－Ｆｃ融合タンパク質を用いて染色した。次に、細胞をフローサイトメトリーを用いて分析した。図６に示されるように、ＩＣＯＳ　Ｆｃは、Ｂ７ＲＰ－１をトランスフェクトしたＣＨＯ細胞を染色した；０．４μｇ／ｍｌの１６Ｈ　ｍＡｂは、ＩＣＯＳ－Ｆｃ結合に影響を及ぼさなかった。しかしながら、６および２５μｇ／ｍｌの１６Ｈは、ＩＣＯＳ－Ｆｃ結合に効果的に競合し、１６Ｈ　ｍＡｂが実際にＢ７ＲＰ－１へのＩＣＯＳ結合を競合したことを示した。
【０１８１】
共刺激アッセイ
細胞培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、カタログＮｏ．３５３０７７、Ｕ底）を１μｇ／ｍｌの抗ヒトＣＤ３抗体（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎカタログＮｏ．５５５３３６）および１０μｇ／ｍｌ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ特異的、ＳｉｇｍａカタログＮＯ．Ｉ３３９１）で被覆した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中の抗ＣＤ３抗体および抗ヒト免疫グロブリンを各ウェルに添加した（１００μｌ／ウェル）。被覆したプレートは、４℃で一晩または室温で２時間インキュベートした。次に、プレートをＰＢＳで２回洗浄した。洗浄後、それぞれＰＢＳ中に希釈した１μｇ／ｍｌのヒトＢ７－２Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ，カタログＮｏ．１４１－Ｂ２）または５μｇ／ｍｌのｈＢ７ＲＰ１Ｆｃを各ウェルに添加した（１００μｌ／ウェル）。次に、プレートを室温で３時間インキュベートし、その後、ＰＢＳで２回洗浄した。精製したヒトＴ細胞を培地（１０％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）、ペニシリン－ストレプトマイシン－Ｌ－グルタミン（ＰＳＧ）、β－メルカプトエタノール（２

－ＭＥ）、Ｎ－アセチルアスパラギン酸塩（ＮＡＡ）およびピルビン酸ナトリウム（Ｎａｐｙｒｕｖａｔｅ）を補足したＲＰＭＩ　１６４０）２００μｌの容積で添加し（１×１０$^{5}$／ウェル）、３７℃、５％　ＣＯ$_{2}$で４８時間インキュベートした。$^{3}$－Ｈチミジン（ＩＣＮカタログＮｏ．２４０４２０５）を１μＣｉ／ウェルで添加し、細胞を３７℃、５％　ＣＯ$_{2}$で一晩インキュベートした。次に、細胞を回収し、計算した。

【０１８２】

細胞培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、カタログＮｏ．３５３０７７、Ｕ底）を上記のように０．１μｇ／ｍｌの抗ヒトＣＤ３で被覆した。ｈＢ７ＲＰ１でトランスフェクトしたＣＨＯ細胞（５０００ＲＡＤで照射）は、２×１０$^{4}$／ウェルで添加され、その後、精製したヒトＴ細胞を１×１０$^{5}$／ウェル、２００μｌの容積で添加した。上記の通り、プレートを３７℃、５％　ＣＯ$_{2}$で４８時間インキュベートした。$^{3}$－Ｈチミジンを１μＣｉ／ウェルで添加した。上記の通り、細胞を一晩インキュベートし、回収し、計算した。

【０１８３】

破傷風トキソイドアッセイ

下記のようなＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）勾配を用いてヒト血液からＰＢＭＣを精製した。血液をＰＢＳで１：２に希釈し、希釈した血液は、Ｆｉｃｏｌｌの上部に積層させ（１／３室温Ｆｉｃｏｌｌ＋２／３希釈した血液）、室温で３０分間、２５００ｒｐｍで遠心分離し、上層（血漿および血小板）を吸引して取り出し、単核細胞層を新しい５０ｍｌチューブに移した。単離したＰＢＭＣをＰＢＳ（単核細胞層の３倍量）で洗浄し、室温で１０分間、１３００ｒｐｍで遠心分離し、上記のように洗浄した。ＰＢＭＣを培地（ＲＰＭＩ　１６４０＋１０％加熱不活性化したＦＢＳ＋１×ＰＳＧ＋１×ＮＥＡＡ＋５５μＭ　２－ＭＥ）に再懸濁させ、細胞をカウントした。

【０１８４】

ＰＭＢＣを９６ウェル丸底プレートのウェルに１００μｌＰＢＭＣ／ウェル（３×１０$^{6}$／ｍｌ）で添加した。破傷風トキソイド（２０μｇ／ｍｌ；マサチューセッツ大学）を最終濃度５μｇ／ｍｌとなるように添加した。細胞を３日間３７℃でインキュベートした；１００μｌの上清を回収し、１μＣｉ／ウェルの$^{3}$Ｈ－チミジン（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）の存在下でさらに６から８時間インキュベートした。次に、細胞を回収し、カウントした。

【０１８５】

表４は、上述したアッセイを用いて測定したように、本発明の特定の抗体の機能的特徴付けを要約している。

【０１８６】

【表３】

**表４**

| | プレート | Biacore Fc | Biacore モノ | CHO | 破傷風トキソイド |
|---|---|---|---|---|---|
| 2H | 43 | 89 | | 1445 | 15 |
| 15H | 36 | | | | 141 |
| 16H | 53 | 27 | 1900 | 276 | 27 |
| 16Hg | 32 | 17 | 2700 | 523 | |
| 41H | 52 | | | | 115 |
| 43H | 46 | | | | 35 |
| 5D | 55 | 1.6 | 37 | 1456 | 15 |
| ICOS-Fc | 200-1000 | 1000 | | 10,672 | |
| α-CD86 | | | | | 40 |

*$EC_{50}$/KD値（pM）

【実施例８】
【０１８７】
エピトープマッピング
１６Ｈ／１６Ｈｇおよび５Ｄモノクローナル抗体が結合するＢ７ＲＰ－１上の領域を同定するために実験を行った。これをするために、新規な蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）結合アッセイを開発した。Ｂ７ＲＰ１のヒト細胞外ドメイン（ＥＣＤ）（配列番号６６）ならびにＩｇ１（ＩｇＶ様；配列番号６７）またはＩｇ２（ＩｇＣ様；配列番号６８）のいずれかを含有するＢ７ＲＰ－１の切断形態が、Ｎ末端の、ニワトリアビジンとのインフレーム融合物として発現された。
【０１８８】
【化８】

**配列番号 66 (ECD):**

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMS
PAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTF
TCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQN
LTVGSQTGNDIGERDKITENP

**配列番号 67 (IgV-like):**

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMS
PAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTF
T

**配列番号68 (IgC-like):**

LGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDT
VFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENP

【０１８９】
これらの融合タンパク質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターは、個別に、２９３Ｔ細胞に一過性にトランスフェクトし、これらの細胞株からの馴化培地を融合タンパク質の供給源として用いた。アビジン－タグを用いて、ビオチン被覆ビーズを用いた溶液由来のＢ７ＲＰ１融合タンパク質を捕捉した。融合タンパク質は、蛍光標識した１６Ｈもしくは５Ｄ　ｍＡｂまたは蛍光標識したＩＣＯＳ－Ｆｃ融合タンパク質のいずれかと一緒にインキュベートし、ビオチン被覆ビーズと共にインキュベートした。このビーズを回収し、Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ＦＡＣＳｃａｎ（ＢＤ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）でフローサイトメトリーを用いて分析した。図９Ａに示されるように、ビーズの蛍光染色は、Ｂ７ＲＰ－１の全ＥＣＤが結合した場合に１６Ｈ、５Ｄ、およびＩＣＯＳ試薬を用いて検出され、これら３種の試薬全てがＢ７ＲＰ－１のＥＣＤに結合できたことを示した。同様に、３種全ての試薬は、Ｉｇ１ドメインだけを含有するアビジン融合タンパク質に結合し、ＩＣＯＳおよびブロッキング抗Ｂ７ＲＰ－１　ｍＡｂの両方がこの領域に結合できたことを示した。対照的に、ＩＣＯＳおよび抗Ｂ７ＲＰ－１　ｍＡｂともに、膜に近接したＩｇ２ドメインだけを含有する融合タンパク質に結合できなかった。したがって、Ｂ７ＲＰ－１上のＩＣＯＳ、１６Ｈ、および５Ｄ結合領域は、Ｉｇ１ドメインに位置していた。
【０１９０】
実施例１において上述したように生成され、アビジン融合結合アッセイを用いた結合について試験された抗体は、表５に示されるように、２つのエピトープクラス、ＨおよびＤに分類することができた。Ｂ７ＲＰ１に結合する能力に基づいて初期に選択された１００種の抗体のうち、１５種は、アビジン融合結合アッセイでは、大部分が分解の可能性があるために、結合しなかった。

【０１９１】
【表４】

表５

| ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟによるmAbの分類 | |
|---|---|
| 分類 | # |
| Hｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ | 75 |
| Dｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ | 10 |
| 新規ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ、ICOSﾌﾞﾛｯｶｰ | 0 |
| 新規ｴﾋﾟﾄｰﾌﾟ、ICOSﾌﾞﾛｯｶｰでない | 0 |
| 検出不能な結合 | 15 |

【実施例９】
【０１９２】
ＳＮＰ同定および機能的分析
１つの主要な一塩基多型（ＳＮＰ）変異体が、Ｂ７ＲＰ－１において同定され、対立遺伝子頻度が２８．４％である集団において存在している（図７）。この変異体は、成熟タンパク質をコードする配列内で同定された。全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）データバンクのサーチにより、第二の潜在的なＳＮＰ変異体が明らかになった；第二の変異体は、１．５個別（３つの染色体）の分析において同定された。第一のＳＮＰ変異体（Ｖ１２８Ｉ）は、第一のＩｇＶ様ドメインに位置するが、一方、ＮＣＢＩ　ＳＮＰ変異体（Ｌ２２１Ｆ）は、第二のＩｇＣ様ドメインに位置していた。
【０１９３】
上記で検討したように、１６Ｈおよび５Ｄモノクローナル抗体の両方は、第一のＩｇＶ様ドメインに結合し、これは、後者のＬ２２１Ｆ変異体が、１６Ｈまたは５Ｄ　ｍＡｂ結合または融合に影響を及ぼすことは不可能である。それにもかかわらず、これらのＳＮＰ変異体のいずれかが、１６Ｈまたは５Ｄ結合および／または融合に影響を及ぼすかどうかを決定するために、２つの異なる実験を行った。第一の実験では、アビジン融合タンパク質は、２つのＳＮＰ変異体を用いて構築され、上記したようにフローサイトメトリーアッセイにおいて１６Ｈまたは５Ｄ抗体に対する結合について試験した。ＨおよびＤエピトープクラス由来のこれらの代表的なｍＡｂは、野生型Ｂ７ＲＰ－１と類似した有効性でＳＮＰ変異体に結合した（図９Ｂ）。これらのデータは、ＨおよびＤエピトープクラスの両方からの抗体は、Ｂ７ＲＰ－１　ＳＮＰ変異体に結合することを示唆した。
【０１９４】
第二のアプローチでは、Ｆｃ融合タンパク質は、Ｂ７ＲＰ－１　ＳＮＰ変異体配列を用いて構築され、プレート共刺激アッセイにおいてＴ細胞を刺激するこれらのタンパク質の能力を比較した（図９Ｃ）。１６Ｈおよび５Ｄ抗体の両方は、野生型融合タンパク質として、同様の$EC_{50}$を有するＳＮＰ変異体Ｆｃ融合タンパク質によって媒介される共刺激を阻害した。総合してみると、これらのデータは、２つの潜在的なＢ７ＲＰ－１　ＳＮＰ変異体が本発明の抗体によって認識されたことを示した。したがって、本発明の抗体は、これらのＳＮＰ変異体を含有する患者の標的に結合することができる。
【実施例１０】
【０１９５】
インビボにおける動物有効性モデル
免疫応答を阻害するＢ７ＲＰ－１抗体の能力は、マウス化ラット抗マウスＢ７ＲＰ－１モノクローナル抗体（１Ｂ７ｖ２）を用い、ＢＡＬＢ／ｃマウスをキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）で負荷を与えて解析した。
【０１９６】
マウス化ラット抗マウスＢ７ＲＰ－１モノクローナル抗体１Ｂ７ｖ２の生成
全長マウスＢ７ＲＰ－１を過剰発現しているチャイニーズハムスター卵巣細胞株を一次免疫としてラットに注射し、その後、免疫応答を上げるためにマウスＢ７ＲＰ－１－Ｆｃ

融合タンパク質で注射した。静脈内ブーストの３または４日後に脾臓を回収し、脾臓Ｂ細胞をＹ３－Ａｇ１．２．３ラット骨髄腫株（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６３１）と融合した。次に、細胞をヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン（ＨＡＴ）を補足した培地中で２週間選択し、その後、限界希釈法によって単一細胞をサブクローニングした。これらの手法は、“Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２ｎｄ　ｅｄ．”Ｌｅｓｌｉｅ　Ｈｕｄｓｏｎ　ａｎｄ　Ｆｒａｎｋ　Ｃ．Ｈａｙ；Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ　１９８０に記載されている。

【０１９７】

１Ｂ７免疫グロブリンをコードする遺伝子は、標準的な手法（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ，３ｄ　ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．）を用いて１Ｂ７細胞株からクローニングした。ヒト抗ｈｕＢ７ＲＰ１　ＭＡｂのアイソタイプスイッチは、ＸｂａＩおよびＢｓｍＢＩ末端も有するヒトＩｇＧ１またはｈｕＩｇＧ２定常領域を用いてＸｂａＩおよびＢｓｍＢＩ制限酵素部位付着末端を含有する可変領域断片をｐＤＳＲａベクターにクローニングすることによって達成させた。１Ｂ７ラット抗ｍｕＢ７ＲＰ１に関して、３工程重複ＰＣＲプロセスによってキメラを形成させた。ラット可変領域は、マウス定常領域部分の約２５から３５ヌクレオチドを含有する３’プライマーを用いてＰＣＲ増幅させた。マウス定常領域は、ラット可変領域部分の２５－３５ヌクレオチドを含有する５’プライマーを用いて増幅させた。次に、この２つの断片は、鋳型として用い、５’ラット可変領域（ＸｂａＩ含有）およびマウス３’定常領域（ＳａｌＩ含有）プライマーを用いて、完全な軽鎖および重鎖を生成させた。次に、軽鎖および重鎖ＰＣＲ産物は、ＸｂａＩおよびＳａｌＩで消化し、ｐＤＳＲａ１９にクローニングした。全量２５μｇの直鎖状にしたＤＮＡ（１２．５μｇ　ｐＤＣ３２３ＢＬＣ＋１２．５μｇ　ｐＤＣ３２４　ＨＣ）をエレクトロポレーションを用いてＣＳ－９細胞にトランスフェクトし、ＤＨＦＲ補足培地で選択した。

【０１９８】

１Ｂ７ｖ２　ｍＡｂの有効性を試験するために、プレート共刺激アッセイはこのｍＡｂを用いて行った。結果は、他の抗マウスＢ７ＲＰ－１　ｍＡｂと比較した（図１０Ａ）。上記で検討したように、１Ｂ７は、元々のハイブリドーマ産生ｍＡｂである；２つの異なる調製物（１．３３および７．４と標識）を試験した。５Ｅ１および１１Ｇ１０は、上述した融合において生成した他の抗ｍＢ７ＲＰ－１モノクローナルであった。最後に、ＨＫ５．３は、市販されている抗ｍＢ７ＲＰ－１（ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ＃１６－５９８５－８５）であった。

【０１９９】

１Ｂ７ｖ２　ｍＡｂは、いずれの他のｍＡｂと等しくまたはこれらよりも良好に、このアッセイにおいてＴ細胞活性をブロックし、したがってさらなる試験で代理治療薬として選択された。

【０２００】

マウスにおける抗原負荷

キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）は、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）から購入した。投薬液＃１（１ｍｇ／マウスＡＬＵＭのＫＬＨ　５ｍｇ／ｋｇ）は、等しい割合の２×ＡＬＵＭ（５００ｍｇのＡＬＵＭおよび５０ｍｌ　ＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水））および２×ＫＬＨ（２０ｍｇの凍結乾燥したＫＬＨと混合した２．０ｍｌ　ｄＨ２０（ＲＮＡｓｅ不含）、１×ＰＢＳで２０ｍｌとした）を用いて調製した。投薬液＃２（１ｍｇ／マウスＡＬＵＭのＫＬＨ　１ｍｇ／ｋｇ）は、１部の２×ＫＬＨと４部の１×リン酸緩衝生理食塩水とを混合して調製した。

【０２０１】

雌性ＢＡＬＢ／ｃマウスは、１ｍｇ／ｋｇのＫＬＨ／ａｌｕｍで刺激し、２１日目に再

度免疫するか、または５ｍｇ／ｋｇのＫＬＨだけで刺激し、これらは腹腔内注射によって取り込まれた。マウスは、最終容積２００μｌで１Ｂ７ｖ．２、アイソタイプ対照抗体（抗ＡＧＰ３　ＰＢ）またはビヒクル（ＰＢＳ）単独によって、第１日目（ＫＬＨ／ａｌｕｍでの刺激１日前）に開始し、５日ごとに刺激した。

【０２０２】

マウスは、７日ごとに後眼窩から出血させ（約２００μｌ）、抗原特異的血清ＩｇＭ（図１０Ｂ）、ＩｇＧ２（図１０Ｃ）、およびＩｇＧ１（図１０Ｄ）の分析のために、約５０から１００μｌの血清を得た。アイソタイプ対照およびビヒクル処置マウスの両方は、有意な一次および二次免疫応答を示した。ＩｇＭ応答は、処置による影響はなかったが、一方、１Ｂ７ｖ２を用いたＢ７ＲＰ－１－ＩＣＯＳの遮断は、統計学的に有意な様式で一次および二次ＩｇＧ２ａおよびＩｇＧ１応答を減少させた。

【０２０３】

ＩＬ－５は、Ｂ細胞分化および機能を誘導する抗原刺激に応答してＴ細胞によって放出されるサイトカインである。Ｂ７ＲＰ－１／ＩＣＯＳ相互作用は、Ｔ細胞依存的Ｂ細胞機能に重要であると信じられているため、血清ＩＬ－５レベルを測定することは、Ｂ７ＲＰ－１／ＩＣＯＳ軸の阻害が実際にＴ細胞機能に影響を及ぼすかどうかを決定するために用いられた。期待されるように、Ｂ７ＲＰ－１の遮断はまた、抗原誘導の血清ＩＬ－５レベルを阻害した。第２１日で抗原負荷後の２４時間を概要した抗原負荷実験のマウスから血清を回収し、血清ＩＬ－５レベルをＥＬＩＳＡによって測定した。図１１に示されるように、ＩＬ－５レベルの上昇が、負荷後９時間程度の初期に試験マウスで検出された；このレベルは、４８時間まで下降し始め、７２時間までに基底まで回復した。１Ｂ７ｖ２　ｍＡｂを用いたマウスの処理は、２４時間でＩＬ－５の統計学的に有意な抑制をもたらした。

【実施例１１】

【０２０４】

カニクイザルＢ７ＲＰ－１への結合

抗ｈＢ７ＲＰ－１　ｍＡｂがまたカニクイザルのＢ７ＲＰ－１に結合するかどうかを測定するために、フローサイトメトリー染色実験を１６Ｈ　ｍＡｂ、ならびにカニクイザルおよびヒトから精製したＢ細胞を用いて行った。図１２Ａに示されるように、蛍光標識した１６ＨをカニクイザルのＢ細胞に添加した結果、染色され、１６Ｈが実際にカニクイザルＢ７ＲＰ－１（右パネル）に結合することを示した。期待されたように、１６Ｈはまたヒト Ｂ細胞を染色した（左パネル）。さらに、１６Ｈ、１６Ｈｇ、および５Ｄは、カニクイザルのＴ細胞、カニクイザルのＢ７ＲＰ－１－Ｆｃ、および抗ＣＤ３　ｍＡｂを用いてプレート共刺激アッセイで試験された。図１２Ｂに示されるように、３種のｍＡｂの全ては、カニクイザルのＢ７ＲＰ－１依存的なカニクイザルのＴ細胞活性化を阻害し、これらのｍＡｂは、カニクイザルのＩＣＯＳ－Ｂ７ＲＰ－１相互作用をブロックすることを示した。

【実施例１２】

【０２０５】

抗Ｂ７ＲＰ－１抗体の投与後のカニクイザルにおけるＴ細胞依存的な抗原応答

カニクイザル試験は、２つの抗Ｂ７ＲＰ－１モノクローナル抗体である１６Ｈおよび５Ｄを用いて行い、抗原特異的抗体の血清レベルによって測定されるＴ細胞依存的なＢ細胞抗原応答を阻害するこれらの抗体の能力を評価した。簡単には、抗キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）および抗破傷風トキソイド抗体応答は、カニクイザルにおけるＢ７ＲＰ－１抗体の存在下で抗原負荷後に試験した。

【０２０６】

試験項目１は、１６Ｈであり、試験項目２は、５Ｄであった。対照項目は、Ｂ７ＲＰ－１抗体のためのビヒクルであった（０．０１酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０、５％ソルビトール、０．００４％　Ｔｗｅｅｎ　２０）。キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）は、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉ

ｓ）から購入した。

【０２０７】

ＫＬＨは、無菌水で再構成によって調製し、１０ｍｇ／ｍＬ保存液を得た。保存液を無菌水で希釈し、１ｍｇ／ｍＬ投薬液を得た。これらの実験に用いられる破傷風トキソイドは、Ｓｕｐｅｒ－Ｔｅｔ（登録商標）Ｔｅｔａｎｕｓ Ｔｏｘｏｉｄ ｗ／Ｈａｖｌｏｇｅｎ（登録商標）であり、Ｉｎｔｅｒｖｅｔ（商標）Ｉｎｃ．（Ｍｉｌｓｂｏｒｏ，Ｄｅｌａｗａｒｅ）から購入した。これらの実験のための投薬レベルは、７５ＩＵ（１５０ＩＵ／ｍＬの０．５ｍＬ）であった。

【０２０８】

表６は、２８匹のカニクイザルの処置群分布を示す。

【０２０９】

【表５】

表６

| ｸﾞﾙｰﾌﾟ No. | 雄／雌の数 | 試験項目 | 経路 | 投薬量 レベル (mg/kg) | 投薬量 容積 (mL/kg) | 投薬溶液 濃度(mg/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2/2 | 対照 | IV | 0 | 1 | 0 |
| 2 | 2/2 | B7RP-1 5D | IV | 0.1 | 1 | 0.1 |
| 3 | 2/2 | B7RP-1 5D | IV | 1.0 | 1 | 1.0 |
| 4 | 2/2 | B7RP-1 5D | IV | 8.0 | 1 | 10.0 |
| 5 | 2/2 | B7RP-1 16H | IV | 0.1 | 1 | 0.1 |
| 6 | 2/2 | B7RP-1 16H | IV | 1.0 | 1 | 1.0 |
| 7 | 2/2 | B7RP-1 16H | IV | 8.0 | 1 | 10.0 |

【０２１０】

試験項目の投薬量は、第１、８、１５、２２、２９、３６、４３、および５０日目に、全ての動物に静脈注射により投与した。グループ１－４における検視のために予定されている動物（１／性別／グループ）は、第５７日目で追加の投薬量を受けた。免疫応答の評価は、ＫＬＨおよび破傷風トキソイド抗原での免疫を介した全ての動物に行われ、抗原特異的免疫グロブリン（ＩｇＭおよびＩｇＧ）についての血液をサンプリングした。

【０２１１】

タイター値は、ＫＬＨおよび破傷風抗原の両方の一次投与後に存在していた。ＫＬＨについては、一次タイター値はＩｇＭおよびＩｇＧの両方に対して０から９００の範囲であった。一次ＫＬＨ負荷が試験項目投与前に投与されたので、Ｂ７ＲＰ－１抗体の効果を評価しなかった。破傷風トキソイドについて、一次タイター値は、ＩｇＭについては０から５０、ＩｇＧについては０から４０５０の範囲であった。Ｂ７ＲＰ－１抗体グループと対照グループとの間の破傷風トキソイドに対する一次応答では差異がなかった。

【０２１２】

期待されたように、ＩｇＧに関するタイター値は、一次タイター値と比較した場合、ＫＬＨおよび破傷風抗原の両方の二次投与後に増加した。ＫＬＨについては、二次タイター値は、ＩｇＭについては０から３００、ＩｇＧについては０から８１００の範囲であった。しかしながら、ＫＬＨ二次応答の阻害がＢ７ＲＰ－１抗体の投与に起因するという証拠はなかった。

【０２１３】

破傷風トキソイドについては、二次タイター値は、ＩｇＭについては５０を下回り、ＩｇＧについては１３５０から３６４５０の範囲であった。個々の動物の結果およびグループの平均値は、第４２日に破傷風トキソイドで二次負荷後の第５３日および第５７日目について、図１３Ａ（１６Ｈ抗体）および図１３Ｂ（５Ｄ抗体）に示している。

【０２１４】

第５３日目に、ピーク応答に到達している動物の数は、２／４の対照動物と比べて、１６Ｈの０．１、１、および８ｍｇ／ｋｇ投薬レベルでそれぞれ３／４、１／４、および１

／４であり、５Ｄの０．１、１、および８ｍｇ／ｋｇ投薬レベルでそれぞれ１／４、１／４、および１／４であった。したがって、一般的には、第５３日目で高いタイターに到達している動物の数は、Ｂ７ＲＰ－１抗体処置群で減少した。第５７日で、タイター値は、対照動物で維持され、Ｂ７ＲＰ－１抗体で処置したいくつかの動物のタイター値は、第５３日の値から低下した。第５７日目に高いタイターである動物の数は、２／４の対照動物と比べて、１６Ｈの０．１、１、および８ｍｇ／ｋｇ投薬レベルでそれぞれ０／４、０／４、および１／４であり、５Ｄの０．１、１、および８ｍｇ／ｋｇ投薬レベルでそれぞれ０／４、０／４、および０／４であった。

【０２１５】

これらの結果は、２種のＢ７ＲＰ－１抗体である１６Ｈおよび５Ｄが、破傷風トキソイド特異的な抗体の血清レベルによって測定されるように、カニクイザルにおけるＴ細胞依存的Ｂ細胞抗原応答を阻害したことを示した。さらに、Ｂ７ＲＰ－１抗体の存在は、二次負荷後の効果を検出するために、一次応答の間のＢ７ＲＰ－１－ＩＣＯＳ相互作用の遮断について重要であった。

【０２１６】

これらの結果および実施例１０の結果は、代理治療薬および治療候補薬が、マウスおよびサルのモデル系においてＴ細胞およびＢ細胞依存的な免疫応答をブロックしたことを示し、この共刺激軸をブロックすることは、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、喘息、および関節リウマチ（ＲＡ）などのＢ細胞媒介の疾患の治療に有効であり得ることを示している。

【０２１７】

前述の開示は、本発明の特定の実施形態を強調し、この全ての修飾または代替の同等物が、添付の特許請求の範囲に記載される発明の精神および範囲内にあることを理解しなければならない。

【図面の簡単な説明】

【０２１８】

【図１】図１Ａは、１６Ｈ抗体可変領域配列（配列番号７）および対応する１６Ｈ可変領域生殖細胞系列（１６Ｈｇ）配列（配列番号８）を示す。図１Ｂは、抗ＣＤ３、および１６Ｈと対比して１６Ｈｇが生物学的活性を保持していることを示すｈＢ７ＲＰ１－Ｆｃ融合タンパク質を用いた共刺激アッセイの結果を示す。

【図２】１６Ｈ、１６Ｈｇ、および５Ｄ抗体を用いたＢｉａｃｏｒｅ（登録商標）結合アッセイの結果を示す。

【図３】５Ｄ抗体を用いたＫｉｎＥｘＡ結合アッセイの結果を示す。

【図４】２Ｈ抗体を用いたＫｉｎＥｘＡ結合アッセイの結果を示す。

【図５】２Ｈ生殖細胞系列（２Ｈｇ）抗体を用いたＫｉｎＥｘＡ結合アッセイの結果を示す。

【図６】１６Ｈ抗体がＢ７ＲＰ－１上のＩＣＯＳ－Ｆｃの結合と競合することを示す結合競合アッセイの結果を示し、フローサイトメトリーによって分析した。

【図７】Ｂ７ＲＰ－１の一塩基多型（ＳＮＰ）分析の概要を示す。

【図８】ＥＬＩＳＡ競合アッセイにおける一連の抗ヒトＢ７ＲＰ－１モノクローナル抗体の分析の概要を示す。示される値は、ＩＣＯＳ－Ｆｃ融合タンパク質の結合阻害に関する$IC_{50}$である。

【図９】図９Ａは、標識した１６Ｈ、５Ｄ、およびＩＣＯＳ抗体を用いたＢ７ＲＰ１細胞外ドメイン（ＥＣＤ）の蛍光染色を示す。図９Ｂは、Ｂ７ＲＰ１のＳＮＰ変異体に対する１６Ｈおよび５Ｄ抗体の同様の結合有効性を示す。図９Ｃは、１６Ｈまたは５Ｄ抗体およびＳＮＰ変異体を用いた共刺激アッセイの結果を示す。

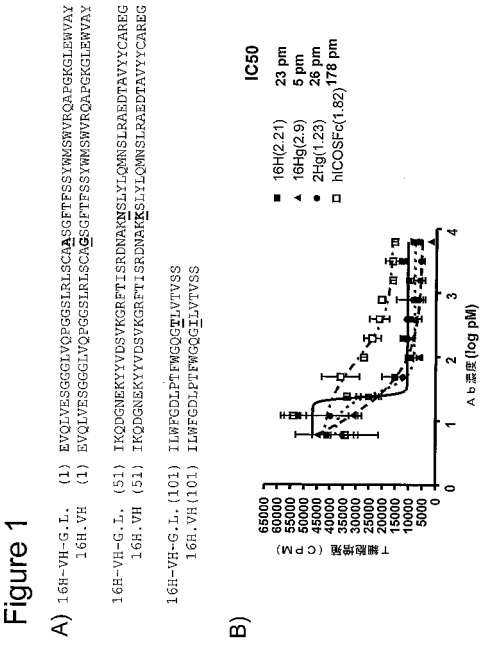
【図１０Ａ】多数の異なる抗マウスＢ７ＲＰ－１モノクローナル抗体と比較した１Ｂ７ｖ２モノクローナル抗体を用いたプレート共刺激アッセイの結果を示す。

【図１０Ｂ】抗原負荷実験の結果を示し、抗原特異的血清ＩｇＭ（図１０Ｂ）、ＩｇＧ２ａ（図１０Ｃ）、およびＩｇＧ１（図１０Ｄ）に関して分析した。

【図１０Ｃ】抗原負荷実験の結果を示し、抗原特異的血清ＩｇＭ（図１０Ｂ）、ＩｇＧ２ａ（図１０Ｃ）、およびＩｇＧ１（図１０Ｄ）に関して分析した。
【図１０Ｄ】抗原負荷実験の結果を示し、抗原特異的血清ＩｇＭ（図１０Ｂ）、ＩｇＧ２ａ（図１０Ｃ）、およびＩｇＧ１（図１０Ｄ）に関して分析した。
【図１１】血清ＩＬ－５レベルが１Ｂ７ｖ２抗体によって抑制されることを示すＥＬＩＳＡの結果を示す。
【図１２】図１２Ａは、１６Ｈ抗体が、カニクイザルＢ７ＲＰ１（右パネル）およびヒトＢ７ＲＰ１（左パネル）に結合できることを示す。図１２Ｂは、１６Ｈ、１６Ｈｇ、および５Ｄ抗体は、カニクイザルＢ７ＲＰ１／ＩＣＯＳ依存性Ｔ細胞活性化を阻害できることを示す。
【図１３Ａ】１６Ｈ抗体で処理した動物における４２日目に破傷風トキソイドで二次負荷後の５３日目および５７日目の個々のカニクイザルおよびグループ平均タイター値を示す。
【図１３Ｂ】５Ｄ抗体で処理した動物における４２日目に破傷風トキソイドで二次負荷後の５３日目および５７日目の個々のカニクイザルおよびグループ平均タイター値を示す。

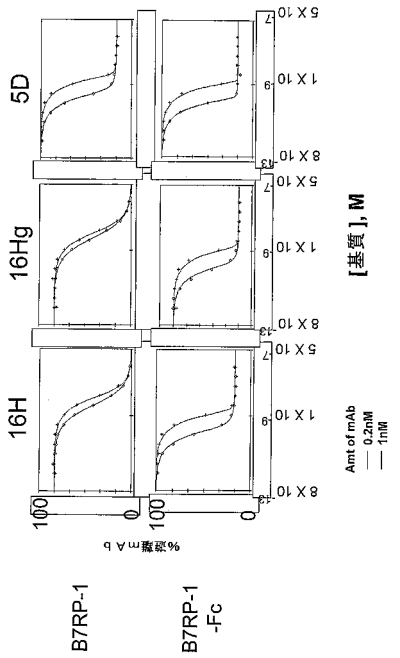
【図１】

Figure 1




【図２】

Figure 2



【図３】

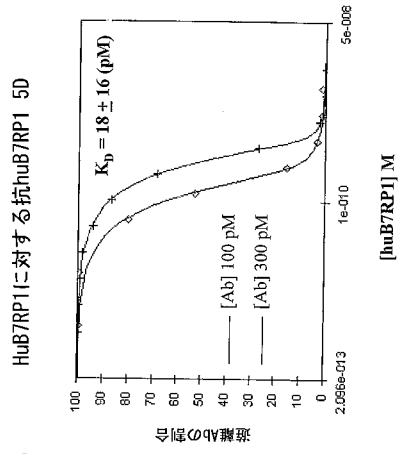



Figure 3

【図４】

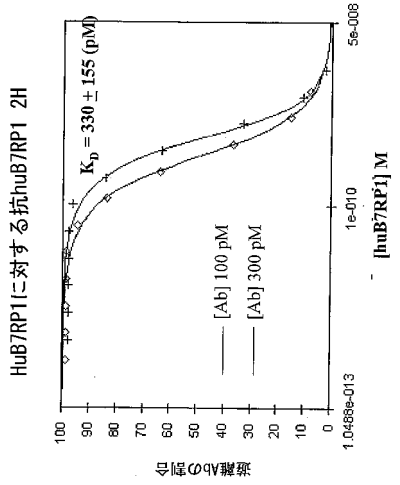



Figure 4

【図５】

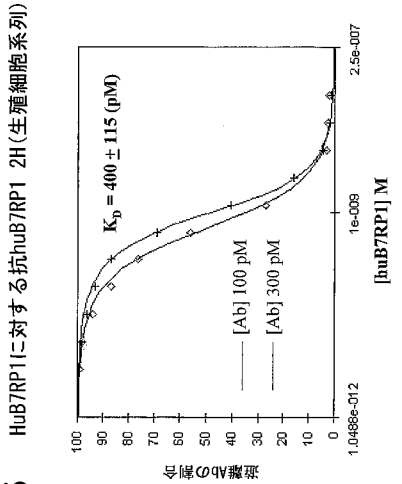



Figure 5

【図６】

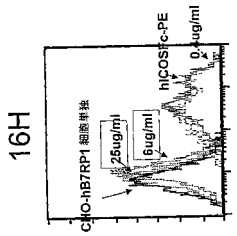



Figure 6

【図７】

Figure 7

| 配列決定したｸﾗﾝﾌﾟ数* | cDNAにおける位置 | 塩基変化 | 同型接合体の数 | 異型接合体の数 | 代替の対立遺伝子頻度 | AA変化 | ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ配列の位置 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 70 | 22 | G→C | 4 | 31 | 27.9% | L→V | 8(sig pep) |
| 70 | 31 | G→T | 6 | 48 | 42.9% | L→M | 11(sig pep) |
| 88 | 382 | G→A | 5 | 40 | 28.4% | V→I | 128(IgV様) |
| 1.5 | 661 | T→C | ? | ? | ? | L→F | 221(IgC様) |

*個体数。染色体数は、この量の２倍である。

【図８】

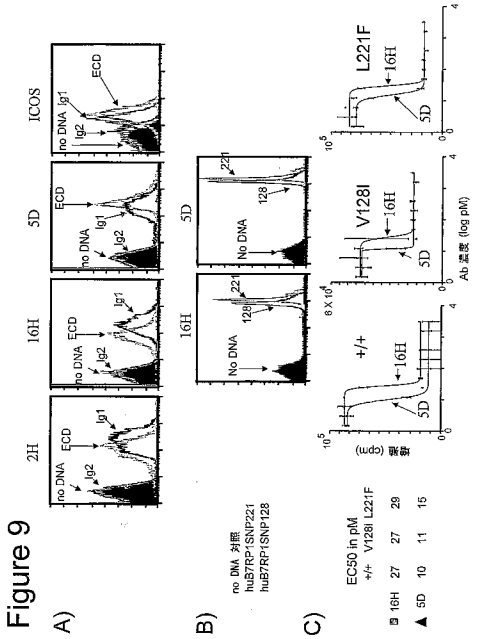
Figure 8

| mAb | IC50 |
|---|---|
| 33H | 8.3 |
| 34H | 14.4 |
| 38H | 8.6 |
| 39H | 12.6 |
| 41H | 5.9 |
| 43H | 8.0 |
| 44H | 9.2 |
| 45H | 10.5 |
| 2K | 17.0 |
| 3K | 10.0 |
| 4K | 15.1 |
| 5K | 18.9 |
| ICOS | 9.5 |

| mAb | IC50 |
|---|---|
| 2H | 6.6 |
| 4H | 9.3 |
| 6H | 11.2 |
| 8H | 8.8 |
| 10H | 11.1 |
| 15H | 8.2 |
| 16H | 6.3 |
| 18H | 12.7 |
| 21H | 8.7 |
| 25H | 12.6 |
| 31H | 10.0 |
| 32H | 11.6 |
| ICOS | 9.5 |

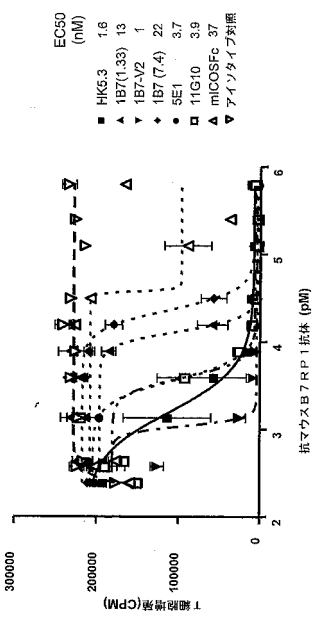
【図９】

Figure 9

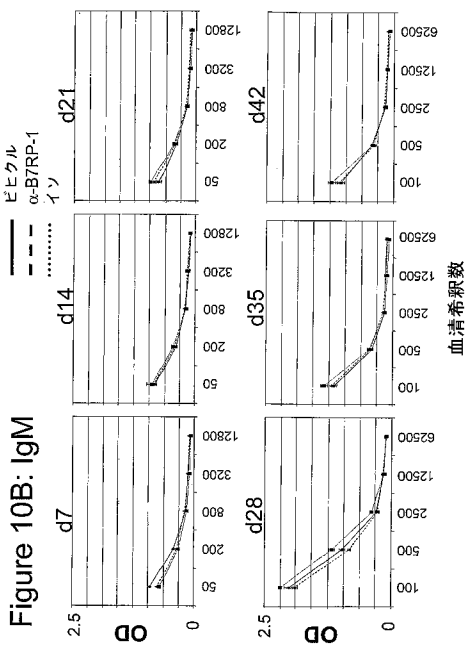



【図１０Ａ】

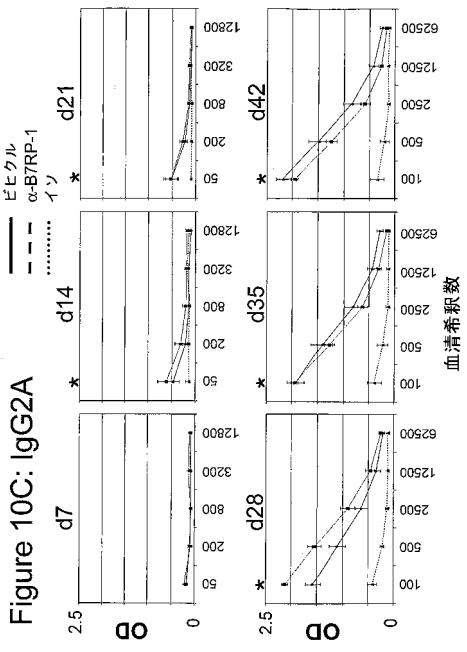
Figure 10A



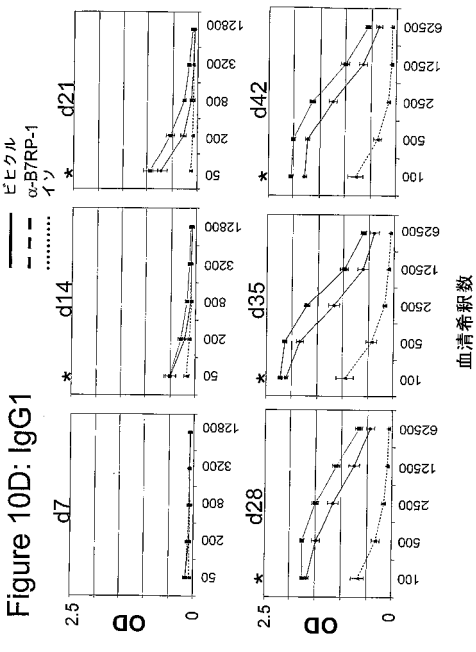
【図１０Ｂ】



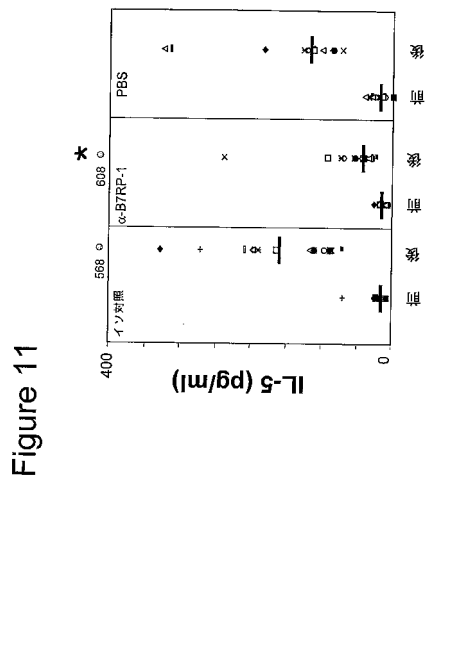

【図１０Ｃ】



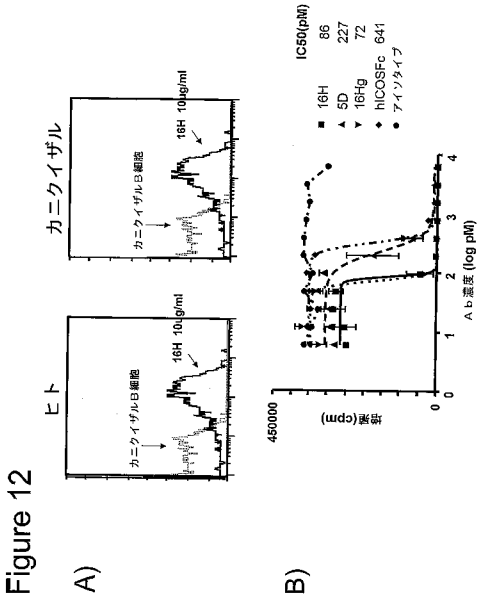

【図１０Ｄ】



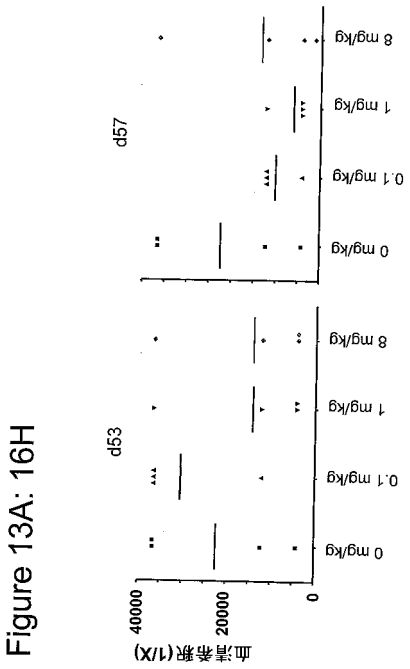

【図１１】



【図１２】




【図１３Ａ】




【図１３Ｂ】



【配列表】
0005142998000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *C12N* | *1/21* | *(2006.01)* | C12N | 1/21 | |
| *C12N* | *5/10* | *(2006.01)* | C12N | 5/00 | 101 |
| *A61K* | *39/395* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | N |
| *A61P* | *37/06* | *(2006.01)* | A61P | 37/06 | |
| *A61P* | *29/00* | *(2006.01)* | A61P | 29/00 | |
| *A61P* | *19/02* | *(2006.01)* | A61P | 29/00 | 101 |
| *A61P* | *37/02* | *(2006.01)* | A61P | 19/02 | |
| *A61P* | *11/06* | *(2006.01)* | A61P | 37/02 | |
| *G01N* | *33/53* | *(2006.01)* | A61P | 11/06 | |
| *G01N* | *33/577* | *(2006.01)* | G01N | 33/53 | D |
| | | | G01N | 33/577 | B |

(74)代理人 100114188
弁理士 小野 誠
(74)代理人 100140523
弁理士 渡邉 千尋
(74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 シユウ，ジエラルド
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９０４０３、サンタ・モニカ、カリフオルニア・アベニユー・１７３０、ナンバー・５
(72)発明者 シユン，ウエンヤン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４３０６、パロ・アルト、ブライアント・ストリート・３４５６
(72)発明者 ヨシナガ，ステイーブン・キヨシ
アメリカ合衆国、カルフオルニア・９１３６０、サウザンド・オークス、カジエ・サルト・１８９６
(72)発明者 ホワン，ハイチユン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９４５３９、フレモント、スエーニヨ・ウエイ・２４２５

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表２００２－５３９７７０（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５２０８１９（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－３５６４４３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)