(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3593343号
(P3593343)
(45)発行日　平成16年11月24日(2004.11.24)　(24)登録日　平成16年9月3日(2004.9.3)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
A61K 39/395	A61K	39/395	D
A61K 38/00	A61K	39/395	N
A61P 3/10	A61P	3/10	
// C12N 15/09	A61K	37/02	
C12P 21/08	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 19　(全 40 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-518333
(86)(22)出願日　平成6年2月9日(1994.2.9)
(65)公表番号　特表平8-508719
(43)公表日　平成8年9月17日(1996.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/001456
(87)国際公開番号　WO1994/017828
(87)国際公開日　平成6年8月18日(1994.8.18)
審査請求日　平成12年9月14日(2000.9.14)
(31)優先権主張番号　08/029,330
(32)優先日　平成5年2月9日(1993.2.9)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
バイオジェン　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ，ケンブリッジ，ケンブリッジ　センター　１４
(74)代理人
弁理士　倉内　基弘
(74)代理人
弁理士　風間　弘志
(72)発明者　バークリー，リンダ　シー．
アメリカ合衆国　０２１６５　マサチューセッツ，ウエスト　ニュートン，ウインスロプ　ストリート　３４

審査官　内田　俊生

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インシュリン依存型糖尿病の治療

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
前糖尿病の個体におけるインシュリン依存型（Ｉ型）糖尿病の予防において使用するための医薬の製造のための抗VLA4抗体の使用方法。
【請求項２】
抗VLA4抗体をHP1/2、HP2/1、HP2/4、L25及びP4C2からなる群より選択する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
抗VLA4抗体がHP1/2、又はVLA4に結合し得るその断片である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
抗VLA4抗体がヒト化HP1/2抗体、又はVLA4に結合し得るその断片である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
医薬を、前糖尿病の個体の重量に基づいて約0.1～10mg/kgで与えるような投与量で投与する、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
医薬を、１～14日の期間にわたって末梢血液中のVLA4陽性細胞を被覆するのに有効な量で投与する、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
医薬を、前糖尿病の個体における血漿中の抗体レベル少なくとも１μg/mlを与えるのに有

効な量で投与する、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
医薬を、約250mg/dL未満の血清グルコースレベルの測定により明白な糖尿病の発達の前に投与する、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前糖尿病の個体がヒトである、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
糖尿病の治療において使用するための医薬の製造のための、抗体、組換え抗体、キメラ抗体若しくはこれらの断片又はこれらのものの任意の組合せの使用方法であって、これらの各抗体若しくはそれらの断片がVLA4のα$_4$サブユニットに結合する、上記の使用方法。
【請求項１１】
抗体を、モノクローナル抗体HP1/2、かかる抗体のFab、Fab'、Ｆ（ab'）$_2$若しくはＦ（ｖ）断片から選択する、請求項10に記載の方法。
【請求項１２】
医薬が複数の抗VLA4モノクローナル抗体又はそのVLA4結合性断片を含む、請求項10に記載の方法。
【請求項１３】
医薬を、感受性の哺乳動物の重量に基づいて、約0.1～10mg/kgの抗体、抗体断片を与えるような投与量で投与する、請求項10に記載の方法。
【請求項１４】
医薬を、１～14日の期間にわたって、末梢血液中のVLA4陽性細胞を被覆するのに有効な量で投与する、請求項10に記載の方法。
【請求項１５】
医薬を、１～14日の期間にわたって、哺乳動物の血漿中の抗体レベル少なくとも１μg/mlを与えるのに有効な量で投与する、請求項10に記載の方法。
【請求項１６】
本質的に、製薬上許容し得るキャリアー中のVLA4を認識するモノクローナル抗体からなる、糖尿病の発症の予防を与えるための製薬組成物。
【請求項１７】
VLA－４のα$_4$サブユニットに結合する可溶性V CAM－１又はフィブロネクチンポリペプチドの、糖尿病の治療において使用する医薬の製造のための使用方法。
【請求項１８】
医薬を、感受性の哺乳動物の重量に基づいて、約0.1～10mg/kgのポリペプチドを与えるような投与量で投与する、請求項17に記載の方法。
【請求項１９】
可溶性VCAM－１ポリペプチドがVCAM 2D－IgGを含む、請求項17に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
技術の分野
本発明は、インシュリン依存型（Ｉ型）糖尿病の治療に関するものである。特に、この発明は、糖尿病の予防における、インテグリンVLA4（very late antigen 4）を認識する抗体の利用に関するものである。
発明の背景
インシュリン依存型糖尿病（Ｉ型糖尿病とも呼ばれ、以前は若年性糖尿病と呼ばれた）は、過去20年の間に慢性自己免疫疾患として分類された。この病気においては、膵島内でインシュリンを産生する細胞（β細胞）が、膵臓の細胞性浸潤物により、選択的に標的とされ破壊される。この島に影響を与える炎症性浸潤は、インシュリン炎と呼ばれる。インシュリンを産生する細胞は、島細胞の大部分を含むが、全膵臓塊の２％未満である（Castano及びEisenbarth,1990,［１］;Fujita等、1982［２］;Foulis等、1986［３］）。Ｉ型糖尿病の発達は、概念的に、６段階に分けることが出来、遺伝的感受性にて始まり、完全なβ細胞破壊で終る（Eisenbarth,1986［４］）。第Ｉ段階は、遺伝的感受性であり、これ

は、この病気の発達に必要な条件であるが十分ではない。仮説の引き金事象（第II段階）が、β細胞に対する活性な自己免疫へと導く（第III段階）。第III段階において、β細胞塊は減退するという仮説が立てられており、免疫異常例えばインシュリン及び島細胞質抗原に対する自己抗体等が見出される。刺激されたインシュリン分泌は、この段階で未だ保存されている。しかしながら、数年間にわたって、β細胞の進行性の喪失が、その個体が未だ血糖正常であるにもかかわらず、静脈内グルコース負荷試験（IVGTT）で、減少したインシュリン分泌へと導く（第IV段階）。明白な糖尿病（即ち、糖尿病発症又は高血糖による病気の臨床的明示）は第Ｖ段階であり、数年後膵臓のβ細胞の90％が破壊されたときに生じ得る。第Ｖ段階で明白な糖尿病が最初に認められたときに、幾らかの残存インシュリン産生は残っている（プロインシュリンの結合ペプチドであるＣペプチドの血清中での存在により示される）が、その個体は、通常、生きるために外来のインシュリンを必要とする。最終的に、第VI段階においては、残存β細胞さへ破壊され、もはや循環中にＣペプチドは検出し得ない。

開始因子及び糖尿病へ導く特異的連鎖（種々の細胞型及びサイトカインの重要性を含む）は、未だ、広く議論されているが、鍵となる役割は、一般に、自己抗原反応性Ｔ細胞について認められている（Miller等、1988［５］;Harada及びMakino,1986［６］;Koike等、1987［７］;Makino等、1986［８］）。Ｔリンパ球に加えて、インシュリン炎は、マクロファージ、樹状細胞（Voorbij等、1989［９］）及びＢ細胞により特徴付けられ、これらは、専門の抗原提示細胞（APC）として働き得る。マクロファージは又、サイトカイン又はフリーラジカルの放出によって島β細胞自身をも破壊し得る（Nomikos等、1986［10］）。従って、自己免疫糖尿病は、細胞移動及び新たに存在する細胞の免疫刺激の両方に依存する。

炎症部位への細胞交通は、リンパ球（LFA－１、VLA4）及びマクロファージ（Mac－１、VLA4）の表面上の付属分子LFA－１、MAC－１及びVLA4（Larson及びSpringer,1990［11］;Hemler等、1990［12］）及びそれらと対となるリガンドICAM（LFA－１及びMAC－１に対する）及びVCAM（VLA4に対する）により調節されるが、これらは、血管内皮においてサイトカインによって調節されない（Larson及びSpringer,1990［11］;Lobb,1992［13］;Osborn,1990,［14］）。更に、VLA4は、細胞外マトリックス成分、フィブロネクチン（FN）のCS－１ドメインに結合する（Wayner等、1989［15］）。これらの経路例えばリンパ球におけるLFA－１及びVLA4又は単核球におけるMAC－１及びVLA4の細胞移動の制御における相対的重要性は、未だ研究の主題である。イン・ビトロのデータは、これらの経路の異なる利用が白血球及び内皮細胞の両方の活性化状態に依存するらしいことを示唆している（Shimizu等、1991［16］）。それらのイン・ビボでの炎症部位への細胞移動を制御する能力は、種々の動物疾患モデルを阻止するICAM、MAC－１又はVLA4に対するモノクローナル抗体（mAB）を用いて直接的に示された（Barton等、1989［17］，ホルボールエステル誘導したウサギ肺炎症;Issekutz及びIssekutz,1991［18］，遅延型過敏症;Issekutz,1991［19］，アジュバント誘導した関節炎;Yednock等、1992［20］，実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）の伝達;Lobb,1992［21］，喘息）。

ICAM及びVCAMは又、リンパ組織におけるマクロファージ及び樹状細胞の表面にも見出される（Dustin等、1986［22］;Rice等、1990［23］;Rice等、1991［24］）。これらの専門のAPCにおけるそれらの分布は、Ｔ細胞活性化におけるLFA－１及びVLA4の役割を示す機能データ（Shimuzu等、1990［25］;Burkly等、1991［26］）と一致する。しかしながら、CD4/MHCクラスII及びCD8/MHCクラスＩ（Rudd等、1989［27］）、CD2/LFA－３（Moingeon等、1989［287］）、CD28/B7（Harding等、1992［29］）を含む多くの他のレセプター－リガンド対も又、T/APC又はT/標的細胞相互作用の間、接着を支持し且つＴ細胞を同時刺激し得る。糖尿病の発達におけるこれらの多くの経路の特異的寄与は、未解決である。細胞接着及びＴ細胞活性化のための多くの分子経路があるので、これらの経路の１つ以上における干渉が糖尿病の発症又は激烈さに影響するかどうか、特にこの病気過程に重要であるか又は関連するこれらの経路の干渉がその発症又は激烈さに影響するかどうかを予想することは不可能である。

Ｔ細胞に対する抗体は、自発性糖尿病及び養子免疫伝達糖尿病のマウス又はラットモデルにおいてＴ細胞を枯渇させ、そうして病気を阻止するために用いられている（例えば、Harada及びMakino,1986［６］，抗Thyl.2;Koike等、1987［７］,Miller等、1988［５］及びShizuru等、1988［30］，抗CD4;Barlow及びLike,1992［31］，抗CD2;Like等、1986［32］，抗CD5及び抗CD8を参照されたい）。更に、マクロファージ上の３型補体レセプター（CR3）分子又はMAC－１に対する抗体は、病気のマウス養子免疫伝達モデルの膵臓組織のマクロファージ及びＴ細胞浸潤を阻止するために用いられている（Hutchings等、1990［33］）。VLA4がインシュリン炎に又は膵臓内に位置させた後に島特異的細胞の活性に関連するのかどうかは知られていない。

Ｉ型糖尿病に対して提案されている現在の治療プロトコールは、Federlin及びBecker［34］により要約されたある種の免疫調節剤を含み、本明細書中に参考として援用する。免疫異常及び進行性β細胞破壊を伴う長期の前糖尿病期は、免疫干渉によってβ細胞喪失を停止させることが可能であることを示唆する（Castano及びEisenbarth）。

示唆された薬剤／プロトコールは、ある種の免疫調節剤及び免疫抑制剤：レバミゾール、テオフィリン、胸腺ホルモン、シアメクソン、抗胸腺細胞グロブリン、インターフェロン、ニコチンアミド、ガンマーグロブリン輸液、血球返還採血法又は白血球輸血を含んでいる。Ｔ細胞活性化及びＴ細胞発生をそれぞれ害するシクロスポリンＡ、アザチオプリン等の薬剤が臨床的試みにおいて用いられてきた（Zielasek等、1989［35］）。最も有望な結果は、シクロスポリンＡを用いて達成された（Castano及びEisenbarth,1990［35］）。しかしながら、Federlin及びBecker,1990［34］は、シクロスポリンＡは、少なくとも高投与量で与えた場合には毒性の副作用のために、一般的又は長期の使用には勧められないということを示唆している。シクロスポリンＡの高投与量又は他の免疫抑制剤との組合せ或はその両方は、リンパ種の発生及び不可逆的な腎臓障害と関係している（Eisenbarth,1986［４］;Eisenbarth,1987［36］）。他の示唆された薬剤についての更なる研究が、安全性及び効果を評価するために必要である。シクロスポリンＡの研究でさへ、その糖尿病の緩解を維持する効力が、１年間で新たな糖尿病の発症の約30～60%であることを示している。しかしながら、緩解は、３年以内に、殆ど常に失われる（Castano及びEisenbarth,1990［１］）。病気の発症後の治療プロトコールは、例えば、糖尿病が診断された時点で、インシュリン炎は、典型的には、既に進行していてβ細胞の80%より多くが失われているので、特に問題である。従って、シクロスポリンＡはβ細胞の更なる破壊を阻止することは出来るが、糖尿病の発症の時点で僅かのβ細胞しか存在しえないのでそれらは長期にわたって非糖尿病状態を維持することが出来ないということはあり得る（Castano及びEisenbarth,1990［１］）。インシュリン炎の抑制及び／又は病気の予防は、治療をもっと初期の段階即ち病気の発症の前に開始することが出来れば一層上首尾に行なうことが出来る。

如何なる糖尿病の予防処置を開発するためにも２つの主要な前提条件がある：（１）前糖尿病の個体を正確に同定する能力及び（２）安全で特異的且つ効果的な予防処置の開発。有意の進歩が前糖尿病の個体を同定することにおいて為されたが、Eisenbarthと共同研究者（例えば、Ziegler及びEisenbarth,1990［37］;Zienler等、1990［38］;Zienler等、1990［39］を参照されたい）により討論され総説されているように安全で特異的且つ効果的な予防処置については多くの仕事が残っている。Ｉ型糖尿病についてある種の危険因子及び危険状態にあるグループを同定し、それにより臨床的疾病へと進むことが最もありそうな個体を予想しこれらの個体における病気の発症の凡その割合を見積もることは可能となっている。遺伝学的（HLA分類）、免疫学的（島及びインシュリン自己抗体）及び代謝的（高血糖の発達に先行する静脈内グルコースへの第１段階インシュリン分泌）マーカーの組合せによって、糖尿病に対する感受性を有する個体を同定し又は前臨床段階でＩ型糖尿病を予想する能力は、β細胞破壊が部分的であるならば、自己免疫病過程の発展中における予防免疫治療剤の同定及び利用を可能にする。しかしながら、今日まで、ヒトの糖尿病の治療は殆ど成功していない。一般に、ヒトの治療は、糖尿病の発症後にのみ為されるので、治療は、何人かの患者についてのみ一時的に完全な又は部分的な緩解を生じるだけであった。免疫抑制機構がインシュリン炎及び／又は糖尿病を阻止し得るので、前糖尿病段

階における利用のための免疫抑制成分の要求がある。特に、一層安全で且つ特異的に作用する成分例えば、エフェクター細胞の膵臓への侵入を阻止し又は既にランゲルハンス島に侵入したこれらの細胞の機能を阻止するモノクローナル抗体の要求がある。
この度、驚くべきことに、ゲッ歯類の糖尿病モデルにおいて、抗VLA4抗体の投与が糖尿病の発病率を有意に減じることが発見された。NODマウス糖尿病モデルは、ヒトのＩ型糖尿病に正に匹敵する十分確立されたモデルである。養子免疫伝達した病気の実験用プロトコールを用いて、照射した糖尿病でないNODマウスに、病気の急性伝達のために、自発的糖尿病のNODマウスから脾臓細胞を投与した。これらの脾臓細胞を投与前に抗VLA4抗体で処理し且つレシピエントも伝達後に抗VLA4抗体で様々な期間にわたって処理した。

発明の要約

従って、本発明は、前糖尿病における、インシュリン依存型（Ｉ型）糖尿病の治療のための新規な方法を提供する。特に、本発明は、抗VLA4抗体例えば抗体HP1/2又はHP1/2から誘導したヒト化抗VLA4抗体を前糖尿病の個体に投与するステップを含むインシュリン依存型糖尿病の予防のための方法を提供する。糖尿病の治療における抗VLA4抗体の作用を真似る類似の抗体、抗体断片、可溶性蛋白質及び低分子の利用も又企図する。更に、本発明は、ヒトを含む糖尿病に感受性の哺乳動物に、VLA4のα４サブユニットに結合し得る抗体を糖尿病の発症を阻止するのに十分な量で投与することによる糖尿病の治療法法を提供する。更に、α4/VLA4に結合することの出来る組換え及びキメラ抗体、かかる抗体の断片、ポリペプチド又は低分子の利用も又企図される。VLA4に対する天然の可溶型結合蛋白質も又企図される（可溶性VCAM－１、VCAM－１ペプチド又はVCAM－１融合蛋白質並びにフィブロネクチン、別のスプライシングを受けた非III型結合セグメントを有するフィブロネクチン及びアミノ酸配列EILDV又は類似の保存的置換されたアミノ酸配列を含むフィブロネクチンペプチドを含む）。これらの薬剤は、VLA4に対する細胞表面結合蛋白質と競争することによって作用する。

【図面の簡単な説明】

図１は、膵臓細胞の養子免疫伝達後の糖尿病の阻止についての抗VLA4抗体（R1－２）及び対照の効果を描いたグラフであり、糖尿病になったレシピエントの頻度及び病気発症までの日を、処理してない（塗りつぶした丸）、非特異的ラットIgG2b処理した（塗りつぶした三角形）及びR1－２抗VLA4処理した（塗りつぶした菱形）糖尿病（Ｄ）のNODドナーからの２×10^7の脾臓細胞の移植について並びに糖尿病でない（Ｙ）NODドナー（塗りつぶしてない正方形）からの脾臓細胞の移植について示してある。これらの脾臓細胞を、R1－２若しくはラットIgG2bと共に又はmAbを伴わずに移植し、次いで、R1－２若しくはラットIgG2bを移植後12日間にわたって１日おきに注射した（全グループについてｎ＝８～10）。
図２は、脾臓細胞の養子免疫伝達後の糖尿病の阻止についての抗VLA4抗体（R1－２）及び対照の効果を描いたグラフであり、糖尿病になったレシピエントの頻度及び病気発症までの日を、処理してない（塗りつぶした丸）、非特異的ラットIgG2b処理した（塗りつぶした三角形）及びR1－２抗VLA4処理した（塗りつぶした菱形）糖尿病（Ｄ）のNODドナーからの３×10^7の脾臓細胞の移植について並びに糖尿病でない（Ｙ）NODドナー（塗りつぶしてない正方形）からの脾臓細胞の移植について示してある。これらの脾臓細胞を、R1－２若しくはラットIgG2bと共に又はmAbを伴わずに移植し、次いで、R1－２若しくはラットIgG2bを移植後25日間にわたって3.5日毎に注射した（全グループについてｎ＝４～５）。
図３は、脾臓細胞の養子免疫伝達後の糖尿病の阻止についての抗VLA4抗体（R1－２）及び対照の効果を描いたグラフであり、糖尿病になったレシピエントの頻度及び病気発症までの日を、処理してない（塗りつぶした丸）、非特異的ラットIgG2b処理した（塗りつぶした三角形）及びR1－２抗VLA4処理した（塗りつぶした菱形）糖尿病（Ｄ）のNODドナーからの２～３×10^7の脾臓細胞の移植について並びに糖尿病でない（Ｙ）NODドナー（塗りつぶしてない正方形）からの脾臓細胞の移植について又はPBS単独（塗りつぶしてない丸）について示してある。これらの脾臓細胞を、R1－２若しくはラットIgG2bと共に又はmAbを伴わずに移植し、次いで、R1－２若しくはラットIgG2bを移植後25日間にわたって3.5日毎に注射した（全グループについてｎ＝５）。

図４は、脾臓細胞の養子免疫伝達後のインシュリン炎の程度についての抗VLA4抗体（R1－２）及び対照の効果を描いた棒グラフであり、R1－２、ラットIgG2bで処理した又はmAbを伴わない細胞を移植し、次いでR1－２若しくはラットIgG2bを25日間にわたって3.5日毎にマウスに注射し、マウスが糖尿病になったとき又は移植後26日目に殺して、浸潤されなかった島（０～Ｉ級浸潤、点を付けた棒）及び浸潤された島（II～IV級インシュリン炎、塗りつぶした棒）の頻度を定量して示した。ｎ＝４～５のマウスからの膵臓の切片を、各実験グループ、即ち、糖尿病でないレシピエント（Ｙ）へのＹ→Ｙ（糖尿病でないドナーの細胞の移植）又はＤ→Ｙ（糖尿病ドナーの細胞の移植）（mAb処理をしないで、ラットIgG2bで処理して又はR1－２で処理して）について評点した。

図５は、脾臓細胞の養子免疫伝達後のインシュリン炎の程度についての抗VLA4抗体（R1－２）及び対照の効果を描いた棒グラフであり、R1－２、ラットIgG2bで処理した又はmAbを伴わない細胞を移植し、次いでR1－２若しくはラットIgG2bを移植後12日間にわたって１日おきに注射し、その後は更なるmAb注射をせずに維持し、マウスが糖尿病になったとき又は移植後29日目に殺して、浸潤されなかった島（０～Ｉ級浸潤、点を付けた棒）及び浸潤された島（II～IV級インシュリン炎、塗りつぶした棒）の頻度を定量して示した。ｎ＝４～５のマウスからの膵臓の切片を、各実験グループ、即ち、糖尿病でないレシピエント（Ｙ）へのＹ→Ｙ（糖尿病でないドナーの細胞の移植）又はＤ→Ｙ（糖尿病ドナーの細胞の移植）（mAb処理をしないで、ラットIgG2bで処理して又はR1－２で処理して）について評点した。

図６は、自発的糖尿病モデルにおける病気の阻止についての抗VLA4抗体（R1－２）及び対照の効果を描いたグラフであり、糖尿病になったレシピエントの頻度及び病気の発症までの日を、処理してない（塗りつぶした正方形）、非特異的ラットIgG2b処理した（塗りつぶした丸）及びR1－２抗VLA4処理した（塗りつぶした三角形）NODマウスについて示してある。R1－２又はラットIgG2bを８週間にわたってNODマウスに注射し、４～12週齢では週２回注射した。

図７は、脾臓細胞の養子免疫伝達後の糖尿病の阻止についてのVCAM2C－IgG融合蛋白質及び対照の効果を描いたグラフであり、糖尿病になったレシピエントの頻度及び病気の発症までの日を、無関係のラットLFA－3Ig融合蛋白質処理した（塗りつぶした正方形）及びVCAM2D－IgG処理した（塗りつぶしてない丸）糖尿病（Ｄ）のNODドナーからの2×10^7の脾臓細胞の移植について、或は細胞を移植せずPBSだけを受けたレシピエント（塗りつぶした三角形）の発症頻度を示してある。これらの脾臓細胞は、VCAM2D－IgG又はラットLFA－3Igと共に移植し、その後VCAM2D－IgG又はラットLFA－3Igを移植後17日間にわたって１日おきに注射した（すべてのグループについてｎ＝５）。

図８は、実施例５に記載したVCAM2DIgG融合蛋白質の構造を描いた図式表示である。VCAM2D－IgGは、VLA4に対するリガンド（VCAM1）の可溶性形態であり、ヒトIgG1重鎖定常領域配列（ヒンジ、C_H2及びC_H3）に融合した２つのVCAM1のＮ末端ドメインからなる。

発明の詳細な説明

この発明は、インシュリン依存型（Ｉ型）糖尿病の予防を含む治療に関するものである。特に、この発明は、前糖尿病の個体における糖尿病の治療におけるVLA4に対する抗体の利用に関係する。用語「前糖尿病」は、明白な糖尿病又は糖尿病の発症前の病気過程の如何なる段階であっても糖尿病の発達の危険にある（例えば、遺伝的に病気にかかり易い）個体を意味することを意図している。用語「糖尿病」は、明白な高血糖（即ち、空腹時血糖レベル≧250mg/dL）を有する個体を意味することを意図している。用語「明白な糖尿病」又は「糖尿病の発症」は、膵臓島細胞が破壊され明白な高血糖（即ち、空腹時血糖レベル≧250mg/dL）により臨床的に明白である病気状態を意味することを意図する。

第１の面において、この発明は、リンパ球及びマクロファージを含むVLA4陽性細胞の表面上のVLA4抗原に結合する（ブロックし又は被覆することを含む）ことの出来る組成物を投与するステップを含む糖尿病の治療方法を提供する。この発明の目的に関して、用語「VLA4抗原に結合する」は、細胞上のVLA4抗原と反応性であり、それにより、VLA4抗原と他の細胞表面上のVCAM－１又はフィブロネクチンの何れかとの相互作用を妨害し、又はそれに

よりVLA4陽性細胞の機能変化を誘導することを意味することを意図している。ここに示すように、VLA4抗原のかかる結合（ブロック又は被覆することを含む）は、糖尿病の発生に対する予防又は防護を生じる。この例示は、VLA4に対するモノクローナル抗体をVLA4抗原を効果的にブロックし又は被覆する結合剤として利用した。当業者は、この例示を与えられれば、VLA4抗原に結合し得る薬剤（ブロック又は被覆し得るものも含む）が、この発明の方法において上首尾に利用し得ることを認識するであろう。従って、この発明の目的に関して、VLA4を有する細胞の表面上のVLA4抗原に結合し得る任意の薬剤及びVLA4抗原を効果的にブロックし又は被覆することの出来る任意の薬剤は、本明細書の実施例で用いられているモノクローナル抗体の同等物であると考えられる。例えば、この発明は、少なくとも、VLA4を有する細胞の表面上のVLA4抗原に結合することの出来るペプチド、ペプチド類似物、炭水化物及び低分子を、結合性同等物として企図する。

好適具体例において、細胞表面VLA4抗原に結合する（ブロック及び被覆を含む）この発明の方法において利用する薬剤は、モノクローナル抗体又は抗体誘導体である。治療時にヒトの治療のための好適な抗体誘導体は、ヒト化組換え抗体、キメラ組換え抗体、Fab、Fab'、F（ab'）$_2$及びF（v）抗体断片、並びに抗体重鎖若しくは軽鎖のモノマー若しくはダイマー又はこれらの混合物を含む。従って、VLA4に対するモノクローナル抗体は、この発明による方法における好適結合剤である。

モノクローナル抗体を生成するための技術は、周知である。簡単に言えば、不滅化細胞系統（典型的には、ミエローマ細胞）を、所定の抗原例えばVLA4を発現している全細胞で免疫した哺乳動物からのリンパ球（典型的には、脾臓細胞）と融合させ、その結果生成したハイブリドーマ細胞の培養上清をその抗原に対する抗体についてスクリーニングする（一般的には、Kohler等、1975［40］を参照されたい）。

免疫化は、標準的手順を用いて達成することが出来る。単位投与量及び免疫化管理は、免疫化する哺乳動物種、その免疫状態、その哺乳動物の体重等に依存する。典型的には、免疫した哺乳動物から採血し、各血液試料からの血清を適当なスクリーニング用アッセイを用いて特定の抗体についてアッセイする。例えば、抗VLA4抗体は、VLA4発現細胞からの^{125}I標識した細胞溶解物の免疫沈降によって同定することが出来る（Sanchez－Madrid等、1986［41］及びHemler等、1987［42］を参照されたい）。抗VLA4抗体は又、フローサイトメトリーにより例えばVLA4を認識すると考えられる抗体と共にインキュベートしたRamos細胞の蛍光染色を測定することにより同定することも出来る（Elices等、（1990）［43］を参照されたい）。ハイブリドーマ細胞の生成に典型的に利用されるリンパ球は、血清が抗VLA4抗体の存在について陽性であることをかかるスクリーニングアッセイを用いて既に試験してある免疫化哺乳動物から単離される。

典型的には、不滅化細胞系統（例えば、ミエローマ細胞系統）を、リンパ球と同じ哺乳動物種から誘導する。好適不滅化細胞系統は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地（「HAT培地」）に感受性のマウスミエローマ細胞系統である。

典型的には、HAT感受性マウスミエローマ細胞を、分子量1500のポリエチレングリコール（「PEG1500」）を用いて、マウス脾臓細胞と融合させる。この融合から生成したハイブリドーマ細胞を、次いで、未融合の又は非産生的に融合したミエローマ細胞を殺すHAT培地を用いて選択する（未融合の脾臓細胞は、トランスフォームされていないので数日後に死ぬ）。所望の抗体を産生するハイブリドーマを、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出する。例えば、抗VLA4抗体を産生するために調製したハイブリドーマを、組換えα$_4$サブユニット発現細胞系統例えばトランスフェクトしたH－562細胞に結合する能力を有する分泌された抗体についてハイブリドーマ培養上清を試験することによってスクリーニングすることが出来る（Elices等、［43］を参照されたい）。

抗VLA4抗体を生成するために、かかるスクリーニングアッセイで試験して陽性のハイブリドーマ細胞を、栄養培地中で、ハイブリドーマ細胞がモノクローナル抗体を培養培地中に分泌するのに十分な条件及び時間で培養した。これらのハイブリドーマ細胞に適した培養技術及び培養培地は、周知である。調整したハイブリドーマ培養上清を集め、抗VLA4抗体を適宜更に周知の方法によって精製することが出来る。

或は、所望の抗体を、ハイブリドーマ細胞を非免疫化マウスの腹膜腔に注入することによって生成することが出来る。これらのハイブリドーマ細胞は、腹膜腔内で増殖して抗体を分泌し、それは腹水液として蓄積する。注射器で腹膜腔から腹水液を回収することにより抗体を採取することが出来る。

幾つかのマウス抗VLA4モノクローナル抗体が以前に記載された（例えば、Sanchez－Madrid等、1986［41］;Hemler等、1987［42］;Pulido等、1991［44］を参照されたい）。これらのVLA4のα鎖を認識することの出来る抗VLA4モノクローナル抗体例えばHP1/2及び他の抗VLA4抗体（例えば、mAbHP2/1、HP2/4、L25、P4C2、P4G9）は、本発明による治療方法において有用である。VCAM－１及びフィブロネクチンリガンドへの結合に関与するVLA－α_4鎖エピトープを認識する抗VLA4抗体（即ち、リガンド認識に関与する部位でVLA4に結合してVCAM－１及びフィブロネクチン結合をブロックすることの出来る抗体）は、好適である。かかる抗体は、Ｂエピトープ特異的抗体（B1又はB2）として規定されており（Pulido等、（1991）［36］を参照されたい）、本発明による好適抗VLA4抗体である。ここに記載のように利用したR1－２抗体は、Ｂエピトープ型抗体である。

VLA4に対するヒトモノクローナル抗体は、この発明の方法においてVLA4抗原をブロック又は被覆することの出来る他の好適結合剤である。これらは、Boerner等、1991［45］により記載されたように、イン・ビトロでプライムしたヒト脾臓細胞を用いて調製することが出来る。或は、それらを、Persson等、1991［46］又はHuang及びStollar,1991［47］により記載されたようにレパートリークローニングによって調製することが出来る。この発明の方法においてVLA4抗原をブロック若しくは被覆し得る他の好適結合剤は、抗VLA4特異性とヒト抗体定常領域とを有するキメラ組換え抗体である。この発明の方法においてVLA4抗原をブロック若しくは被覆することの出来る更に他の好適結合剤は、抗VLA4特異性を有するヒト化組換え抗体である。ヒト化抗体は、Jones等、1989［48］;Riechmann,1988［49］;Queen等、1989［50］；及びOrlandi等、1989［51］に例示されたようにして調製することが出来る。Ｂエピトープ特異性を有するキメラ組換え抗体及びヒト化組換え抗体を含む好適結合剤は、同時継続中の同時譲渡された米国特許出願第08/004,798号（1993年１月12日出願）［52］にて調製され且つ説明されている。キメラ（マウスＶ－ヒトＣ）及びヒト化抗VLA4抗体の調製のための出発物質は、以前に記載されたようなマウスモノクローナル抗VLA4抗体、市販のモノクローナル抗VLA4抗体（例えば、HP2/1、メイン、Westbrook,Amac,International,Inc.）又は本明細書の教示に従って調製したモノクローナル抗VLA4抗体であってよい。例えば、抗VLA4抗体HP1/2の重鎖及び軽鎖の可変領域が、クローン化され、配列決定され且つヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の定常領域と組合せて発現された。かかるキメラHP1/2抗体は、マウスHP1/2抗体に対して特異性及び効力において類似しており、本発明による治療方法において有用であり得る。HP1/2V_HDNA配列及び翻訳されたアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:2に示す。HP1/2V_KDNA配列及びその翻訳されたアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:3及びSEQ ID NO:4に示す。同様に、ヒト化組換え抗VLA4抗体は、これらの方法において有用であり得る。好適なヒト化組換え抗VLA4抗体は、AS/SVMDY抗体であり、例えば、1992年11月３日にATCCに寄託して受託番号CRL11175を受けた細胞系統により産生されるAS/SVMDY抗体である。AS/SVMDYヒト化抗体は、少なくとも、マウスHP1/2抗体と同じ効力を有するか又は恐らくは一層強力である。AS V_HDNA配列及びその翻訳されたアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:5及びSEQ ID NO:6。SVMDY V_KDNA配列及びその翻訳されたアミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO:7及びSEQ ID NO:8に示す。

当業者は、任意の上記の抗体又は抗体誘導体結合剤がこの発明の方法においてVLA4のレセプターに結合することによっても作用することが出来、細胞表面VLA4抗原をブロック若しくは被覆することが出来ることを認めるであろう。従って、この発明による抗体及び抗体誘導体結合剤は、VCAM－１若しくはフィブロネクチンに対する結合特性を有する具体例を含み得る（何故なら、これらの分子は、粘着細胞若しくは細胞外マトリックスにおいて重要であるか又は細胞の組織及び血液中の交通を妨害するかの何れかであるらしいから）。或は、この発明による方法において用いられるこれらの結合剤は、抗体若しくは抗体誘導

体ではなくて、VLA4に対する天然の結合蛋白質の可溶性形態であってよい。これらの結合剤は、可溶性VCAM－１、VCAM－１ペプチド又はVCAM－１融合蛋白質並びにフィブロネクチン、別のスプライシングを受けた非III型結合セグメントを有するフィブロネクチン及びアミノ酸配列EILDV若しくは類似の保存的に置換されたアミノ酸配列を含むフィブロネクチンペプチドを含む。これらの結合剤は、VLA4に対する細胞表面結合蛋白質と競争することによって作用する。

この発明の第１の面によるこの方法において、VLA4結合剤は、好ましくは、非経口的に投与する。これらのVLA4結合剤は、好ましくは、製薬上許容し得るキャリアーを含む無菌の製薬組成物として投与する（該キャリアーは、多くの周知のキャリアー例えば水、塩類溶液、リン酸緩衝塩溶液、デキストロース、グリセロール、エタノール等、又はこれらの組合せの何れであってもよい）。好ましくは、VLA4結合剤は、抗体若しくは抗体誘導体であるならば、約0.1～20mg/kg体重／日の範囲、好ましくは、約0.1～10mg/kg体重／日の範囲の投与量及び各１～14日の間隔で投与する。抗体若しくは抗体誘導体でない結合剤については、投与量範囲は、好ましくは、これらの抗体量に対するモル当量の範囲である。好ましくは、抗体組成物を少なくとも１μg/mlの血漿レベルの抗体を与えるのに有効な量で投与する。投与量の最適化は、結合剤の投与及び、その後の、所定投与量をイン・ビボ投与した後の長期間にわたる薬剤によるVLA4陽性細胞の被覆の評価によって決定することが出来る。個体の末梢血液試料に含まれる末梢血液単核細胞は、この薬剤の存在について、イン・ビトロ（又はex vivo）で、投与した薬剤を検出するための第２の試薬を用いてプローブ検出されるはずである。例えば、これは、投与した薬剤に特異的な蛍光色素標識した抗体であってよく、次いで、それを標準的FACS（蛍光活性化セルソーター）分析により測定する。或は、投与した薬剤の存在は、個体の細胞の標識（例えば、蛍光色素標識）した同じ薬剤に対する結合不能又は結合能力の減少によって、イン・ビトロ（又はex vivo）で検出することが出来る。好適な投与量は、大多数のVLA4陽性細胞の検出可能な被覆を被覆を生成するはずである。好ましくは、被覆は、モノクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体誘導体の場合には、１～14日間にわたって維持される。

この発明の実施において、VLA4結合剤での治療は、好ましくは、前糖尿病患者が上記のような多くの公知のマーカーにより反映されるような安定な血糖正常の血漿レベル及び安定な前糖尿病状態を維持する限り継続する。後述の実施例において、抗VLA4mAb例えばR1－2mAbの投与は、治療中の糖尿病の発症を阻止し且つ治療の残留の有益な結果がR1－２治療を停止した後２か月間に及ぶということが見出された。しかしながら、糖尿病発症に対するVLA4結合剤の完全な防御効果を維持するためには、これらの結合剤での連続的治療が好ましい。

本発明の方法は、前糖尿病の個体に抗VLA4抗体を含む組成物を投与することを含む。後述の実施例は、ゲッ歯動物病気モデルにおいて観察された結果を示す。これらの結果は、この病気の急性伝達モデルにおける病気の発症における抗VLA4抗体の防御効果を示している。非肥満性糖尿病（NOD）マウスは、Makino等、1980［７］により導入されて以来、Ｉ型即ちインシュリン依存型糖尿病の重要なモデルとなっており、ヒトの糖尿病と特に関連するモデルとして記載された（例えば、Castano及びEisenbarth［１］,Miller等、1988［５］,Hutchings等、1990［33］及び本明細書中で引用している文献を参照されたい）。NODマウス及びヒトにおいて示された糖尿病の症状が類似していることが、幾つかの系統の証拠によって示された。例えば、NODマウス及びヒトの両者において［１］、糖尿病と主要組織適合性複合体の遺伝子座とは強い遺伝的関係がある。更に、例えば、両種において、自己免疫病因論は、（ｉ）β細胞の選択的破壊を媒介する膵臓の島におけるリンパ球性炎症（即ち、インシュリン炎）の存在、（ii）抗島細胞抗体の存在、及び（iii）シクロスポリンＡの調節効果によって明示されている。糖尿病の自己免疫病因論についてのNODマウスにおける更なる証拠は、（ｉ）糖尿病ドナーからの脾臓細胞（精製脾臓Ｔ細胞を含む）を用いて糖尿病を伝達する能力、（ii）Ｔ細胞に対して特異的な抗体を用いるイン・ビボ治療による糖尿病の阻止、及び（iii）NOD遺伝的バックグラウンドを有する胸腺ヌードマウスでは糖尿病を発達させることが出来ないことである（例えば、Miller等、1988［５

］,Hutchings等、1990［33］及び本明細書で引用されている文献を参照されたい）。
糖尿病を生じる正確な事象は不明なままであるが、NODマウスにおいては、膵臓の進行性炎症応答が、脈管周囲の単核細胞浸潤として３～４週齢で始まる最初の組織的病変であるらしい。約４～６週齢において、インシュリン炎が観察され得、約12週齢での明白な糖尿病の開始（即ち、糖尿のアッセイ用のTestape（インジアナ、Indianapolis在、Eli Lilly）を用いて首尾一貫した１＋以上の値、又は、血漿グルコースをモニターした際に250mg/dLを超える値）が起きる。動物の免疫状態の変動を避けるために、NODマウスを病原体を有しない特別の集団から得、それらは、安定な、高発病率の糖尿病を、雌の約80％及び雄の約20％で示す（典型的には、約20週齢で糖尿病になる）。ここに記載した実験で用いるNODマウスの好ましい供給源は、Taconic Farms（ニューヨーク、Germantown在）である。
特にBBラット及びNODマウスの研究からの多くのデータは、Ｉ型糖尿病がＴ細胞媒介の病気であることを示した。今日までの証拠は、両主要Ｔ細胞サブポピュレーション（CD4/L3T4及びCD8/Ly2）の、ヒト及びNODマウスにおける糖尿病の発達における重要な役割を示唆している。糖尿病におけるＴ細胞の本質的役割を支持するデータは、Ｔリンパ球が他の細胞（例えば、マクロファージ）をβ細胞破壊に対する最終的エフェクターとして補充するという可能性を排除しない。マクロファージは、浸潤された島に存在していること及び長期のシリカ治療の病気を阻止する能力に基づいて病気過程に関係付けられている（例えば、Hutchings等、1990［33］及び本明細書中で引用されている文献を参照されたい）。
NOD系統のマウスを用いて、研究者は、自発的な病気モデルに匹敵する病気の急性伝達モデルを開発したが、該モデルにおいては、糖尿病誘発性NODマウスから誘導した伝達された細胞が病気過程を媒介し、それは、インシュリン炎及び島β細胞特異的な破壊を媒介する免疫反応性細胞により特徴付けられる。更に、このモデルにおいて、Ｔ細胞に対するある種のモノクローナル抗体（例えば、Miller等、1988［５］参照）及びマクロファージ（例えば、Hutchings等、1990［33］参照）は、病気の発症を排除することが示された。かかるモノクローナル抗体は、自発的病気及び養子免疫伝達された病気の治療に利用された。例えば、抗CD4抗体は、両モデルにおいて病気を排除することが示された（Miller等、1988［５］及びShizuru等、1988［30］）。養子免疫伝達モデル又は自発的病気モデルにおける治療結果は、ヒトの病気過程を調節する薬剤の能力を暗示する。

実施例１

病気の養子免疫伝達に対する抗VLA4抗体処理の効果

糖尿病実験の養子免疫伝達のために、NODマウスをTaconic Farms（ニューヨーク、Germantown）又はJoslin Diabetes Center（マサチューセッツ、Boston）から入手した。最近発症した自発性糖尿病（Ｄ）の雌（13～20週齢）を脾臓細胞ドナーとして用い、８週齢の糖尿病でない（Ｙ）雌をレシピエントとして供した。病気を伝達し得ない４週齢の糖尿病でない（Ｙ）雌ドナーからの脾臓細胞を負の対照として用いた。
高線量照射（Gamma Cell 1000 Cesium^{137}線源、カナダ国、Ontario在、Nordion International,Inc.）後の腸内感染の発病率を最小にするために、レシピエントマウスを１週間酸性水（濃HClを水で1:8400に稀釈したもの）中に置いてから準致死的照射（775ラド）を分割線量（300ラド、300ラド及び175ラド）にて３日間（－２日、－１日及び伝達の日）で行なった。脾臓を糖尿病のドナー及び糖尿病でない対照から採取し、細胞懸濁液を作成し、Hemolytic Geys溶液を用いて赤血球を溶解させた。脾臓細胞を、75μｇのR1－２モノクローナル抗体（mAb）、75μｇのラットIgG2bで予備処理し又はしないで静脈注射した（0.2mlPBS中２～３×10^7）。抗体処理のために、細胞を単に375μg/mlのmAbと懸濁して１～1.5×10^8細胞/mlとし、注射まで氷上に置いた。注射のタイミングは、最後の照射の後３時間以内であった。何匹かのレシピエントは、PBSだけを受けた。抗VLA4mAbR1－２及びイソタイプ適合のラットIgG2bをPharmingen（カリフォルニア、La Jolla在）から購入した。R1－２（ラット抗マウス）抗VLA4mAbは、最初、Holzmann等、1989［53］により記載された。R1－２抗VLA4mAbは、VLA4のそのリガンドへの結合をブロックし（Hession等、1992［54］）、それ故、定義によりＢグループに属する（Pulido等、1991［44］）即ち、ＢグループのヒトVLA4mAb（例えば、HP1/2又はHP2/1）と同等である。

R1－2mAb又はラットIgG2bを、２～３日毎に、75μg/0.2mlの投与量で腹腔内投与した。投与用管理（regimen）は、末梢血液、リンパ様器官及び骨髄においてVLA4陽性細胞の最大被覆（末梢血液細胞及びこれらの器官から調製した単一細胞懸濁のR1－2mAbに特異的な蛍光色素標識したmAbでの染色及び蛍光色素陽性細胞を測定するFACS分析により検出）を維持するように決めた。注射を、伝達の後、12日又は24日間続けた。マウスを、TesTape（インディアナ、Indianapolis在、Eli Lilly）を用いて糖尿について試験することにより及び血漿グルコースレベル（Glucometer,3 Blood Glucose Meter,インディアナ、Elkhart在、Miles,Inc.）により糖尿病についてモニターし、２回連続尿試験陽性［Testape値［＋１］以上］又は血漿グルコースレベル＞250mg/dLの後で糖尿病と見なした。

NOD糖尿病ドナーから単離した脾臓細胞を飽和量の抗VLA4mAbR1－２で処理し、その後、上記のように、糖尿病でない照射した宿主に移植し、次いで、末梢血液及びリンパ様器官中のすべてのVLA4陽性細胞の最大被覆を２週間維持するために、R1－2mAbを12日間１日おきに投与した場合に、抗VLA4mAbの糖尿病発症に対する予防効果が示された。図１は、糖尿病になったレシピエントの頻度及びNODドナー（Ｄ→Ｙ）からの2×10^7の脾臓細胞を、（ｉ）処理なし（塗りつぶした丸）で；（ii）ラットIgG2b処理して（塗りつぶした三角形）及び（iii）R1－２抗VLA4処理（塗りつぶした菱形）して移植した場合、並びに糖尿病でないNODドナー（Ｙ→Ｙ）からの脾臓細胞（塗りつぶしてない正方形）の移植後の病気発症までの日数を示している。PBSだけの注射は、０％の発病率を与えた。これらの条件下で、８匹のR1－2mAb処理した各レシピエントの内、１匹だけが移植後29日に糖尿病を発症した。対照してみると、mAbで処理しなかった又は非特異的なラットIgG2bで処理した糖尿病ドナーからの脾臓細胞を受けた個体は、それぞれ、6/10及び5/9が糖尿病になった。図１に示したように、無関係のラットIgG2bの移植は発症を幾らか遅らせはしたが、移植後14日という早さで糖尿病の発症が起きた。

これらのデータは、R1－2mAbのVLA4に対する特異性に依存した防護効果を示している。糖尿病でないマウスからの脾臓細胞又はPBSのみのレシピエントは糖尿病にならなかった。従って、抗VLA4抗体での処理は、移植後30日間における糖尿病の頻度を減少させた。

図１に示した結果は臨床的糖尿病が抗VLA4処理した動物８匹中１匹にのみ生じたことを示しているが、抗VLA4抗体が単に糖尿病の発症を少し遅らせたに過ぎないということはあり得た。如何なる血糖レベルの増加をも定量しそれにより臨床的糖尿病への進行を検出するために、血漿グルコースレベルを尿中グルコースと並行して監視した。図１に示した抗VLA4抗体処理したグループの内、すべてのマウスは、29日目において未だ平均血漿グルコース値100±7mg/dL（ｎ＝７）を有して血糖正常であった（但し、１個体は、尿試験及び500mg/dLを超える血漿グルコースにより臨床的糖尿病として評点された）。従って、病気の進行は、移植後29日、最後の抗VLA4抗体注射の丸２週間後にて図１に示した他の抗VLA4抗体処理したレシピエントの何れにおいても明らかではなかった。これらのマウスからの血清の分析は、抗VLA4mAbが移植後18～21日までに低レベル又は検出不能なレベルにまで低下することを確実にした。

抗VLA4mAbが糖尿病の移植に対して防護となることを確認するために更なる細胞移植を行なった。これらの実験において、抗VLA4抗体処理を、移植後25日まで延長したが、3.5日毎に投与しそれによりR1－2mAb又はラットIgG2bの飽和レベルを膵臓組織を取るためにマウスを殺す26日目まで維持した。これらの条件下で、糖尿病の発症に対する抗VLA4mAbの阻止効果は又、脾臓細胞移植及びR1－２処理に対しても示された。図２は、糖尿病になったレシピエント（各グループについてｎ＝４～５）の頻度及び糖尿病NODドナー（Ｄ→Ｙ）からの3×10^7の脾臓細胞を（ｉ）処理しないで（塗りつぶした丸）で、（ii）IgG2b処理（塗りつぶした三角形）して及びR1－２抗VLA4処理（塗りつぶした菱形）して移植した場合、並びに糖尿病でないNODドナー（塗りつぶしてない正方形）からの脾臓細胞の移植後の病気の発症までの日数を示している。PBSだけの注射は、０％の発病率を与えた。図２は、５匹のR1－2mAb処理したマウスの内の１匹だけが移植後22日までに糖尿病になったが、R1－2mAb処理しなかったレシピエントの4/4及びラットIgG2bで処理したレシピエントの5/5において糖尿病が伝達された。病気の発症は、移植後13日の早さで起きた。これら

の実験は、個別に及び集合的に、抗VLA4mAbが再現性をもって急性伝達病気モデルにおける糖尿病の発達に対する防護を与えることを示している。
更なる実験を行なって、抗VLA4mAbが単に処理期間中病気の発症を遅らせただけなのか或は長期の防護効果を達成し得るのかを決定した。図３は、R1－２注射（3.5日毎に25日まで）後の長期にわたるマウスの糖尿病の発症を示しているが、移植後35日及び38日（最後のR1－２注射後10～13日）に2/5のマウスが糖尿病になっただけである。対照してみると、未処理及びIgG2b処理したグループにおいては、移植後11日の早さで、18～21日目までに100％の発症率で糖尿病が起きた。驚くべきことに、R1－２処理したグループにおける発病率は、最後のR1－２注射の後２か月の長期間においてさえ増加しなかった。この期間中並行して監視した血漿グルコース値は、これらの３匹の個体が一貫して血糖正常であったことを示している。この時点（即ち、移植後約３か月）の後は、PBSのみ又は糖尿病でない細胞を受けた負の対照グループでさえ自発的な病気の発達が始まる。要約すると、VLA4特異的mAbは、糖尿病伝達の発病率を減少させる。更に、病気に対するその防護効果は、更なるmAb処理がなくても維持される。

実施例２

膵臓インシュリン炎に対する抗VLA4mAbの効果

組織学的分析のために、この実施例では、上記のように移植後２～４週にてマウスを殺して、10％ホルマリン緩衝塩溶液中で膵臓を採取してパラフィン包埋切片用とし、該切片を、組織学用にヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。インシュリン炎の程度を次のように評点した：等級0:インシュリン炎なし［全く炎症のない島］；等級I:周囲インシュリン炎［島の周辺に位置する炎症性単核細胞］；等級II:25％未満の浸潤［25％の島内部がリンパ球性炎症性細胞を含む］；等級III:25～50％の浸潤［リンパ球性の浸潤］；等級IV:50％を超える浸潤。次いで、各等級の島の試験した島の総数に対する相対的パーセントを計算した。組織学的切片を試験して、抗VLA4mAb処理を伴う又は伴わないNOD脾臓細胞の養子免疫伝達後のインシュリン炎の程度を評点して結果を表にした。特に、浸潤されてない島（等級０～Ｉの浸潤）及び等級II～IVのインシュリン炎（上記の通り）を有する島を計量した。各実験グループについて、ｎ＝４～５のマウスからの膵臓切片を評点した。
様々な期間にわたって抗VLA4mAbで処理したレシピエントから、島特異的な細胞性浸潤の確立に対するその効果の問題を扱うために、膵臓組織を回収した。マウスを非特異的なラットIgG2b又はR1－2mAbで3.5日毎に、殺した14日目まで処理した。同様に、マウスを25日目まで処理して、糖尿病と診断されるか又は移植の26日後に殺した。移植後14日間にわたってR1－2mAbで連続的に処理したマウスは、高頻度（76％）の未浸潤の島を維持し、等級II～IVのインシュリン炎に進行したのは24％だけであった。対照してみると、非特異的なラットIgG2bで処理したものは、74％の重症のインシュリン炎を有して、逆のパターンを示している。同様に、25日目までR1－２で処理したマウス（20％糖尿病、図２で示したマウスから単離した膵臓）において、図４に示したように、若いNOD脾臓細胞の糖尿病でないレシピエントにおける頻度（55％）と類似して、高頻度（58％）の未浸潤の島が保存された。対照してみると、未処理の又はIgG2b処理したマウスの両者は、28％の未浸潤の島を有するだけであり、逆に、増加したインシュリン炎（72％）を有した。従って、抗VLA4mAb処理は、糖尿病誘発性脾臓細胞の養子免疫伝達によるインシュリン炎の発達を特異的に阻止し、或は遅延させるらしい。
これらの選択肢を区別するために、移植の４週間後のインシュリン炎パターンを、マウスをラットIgG2b又はR1－2mAbで12日目まで処理し、その後は更なる処理をしないで維持した場合について測定した。糖尿病が診断されるか又は移植後29日目にマウスを殺した。これらのマウスからの血清の分析は、循環抗VLA4mAbが移植後18～21日までに検出不能なレベルまで低下することを確実にした。このプロトコールを用いて、R1－２処理したグループのインシュリン炎の程度（69％インシュリン炎、25％糖尿病）は、図５に示したように、ラットIgG2b処理したマウスのそれ（96％インシュリン炎、75％糖尿病）よりは低いが、未処理のレシピエントのそれ（73％インシュリン炎、60％糖尿病）と類似していた。有

意に、インシュリン炎の激烈さは、R1－２処理、未処理及びラットIgG2b処理したグループ間で類似しており、それぞれ、平均57%、47%、64%の等級III/IVの浸潤を有した。糖尿病でないR1－２処理した個体だけを考えても、やはりそれらは、52%の等級III/IV浸潤を伴う59%のインシュリン炎を示した。糖尿病誘発性でないNOD脾臓細胞のレシピエントは、７%の等級III/IV浸潤を有しただけであった。逆に、図５は、塩溶液又は非糖尿病誘発性脾臓細胞のレシピエントと比較して、浸潤されてない島の頻度がR1－２処理したマウスにおいて減少したことを示している。従って、インシュリン炎の程度は、R1－２処理を維持したマウス（図４）に比較して、これらのR1－２処理したマウスにおいて進行して（図５）、未処理又はラットIgG2b処理した対照グループのそれに近づいた。ひとまとめにして考えると、これらのデータは、抗VLA4mAb投与が病気の急性伝達モデルにおいてインシュリン炎の進行を遅延させることが出来ることを示している。

実施例３

糖尿病の養子免疫伝達に対する種々の抗VLA4抗体処理の比較

この実施例は、実施例１に記載の養子免疫伝達モデル及び手順を用いて、PS/2、抗VLA4抗体とR1－２の比較用の効果の結果を提供する。NODマウスを（ａ）無関係の対照用抗体（D/ラットIgG2b、ｎ＝19マウス）；（ｂ）R1－２抗体（D/R1－2mAb、ｎ＝24マウス）；（ｃ）PS/2mAb（D/PS/2mAb、ｎ＝５マウス）で処理し、又は（ｄ）処理しなかった（NONE、ｎ＝26マウス）。脾臓細胞を静脈注射し（0.2mlのPBS中の２～３×10^7）、75μｇのR1－2mAb、75μｇのPS/2mAb、75μｇのラットIgG2bの何れかで予備処理し又は処理しなかった。PS/2抗VLA4mAbの単離精製は、最初に、Miyake等、1991［55］により記載された。

R1－2mAb、PS/2mAb又はラットIgG2bを、75μg/0.2mlの投与量で２～３日毎に腹腔内投与した。投与用管理は、末梢血液、リンパ様器官及び骨髄においてVLA4陽性細胞の最大被覆（末梢血液細胞及びこれらの器官から調製した単一細胞懸濁のR1－２及びPS/2mAbに特異的な蛍光色素標識したmAbでの染色及び蛍光色素陽性細胞を測定するFACS分析により検出）を維持するように決めた。注射を、伝達の後、22～25日間続けた。マウスを、TesTape（インディアナ、Indianapolis在、Eli Lilly）を用いて糖尿について試験することにより及び血漿グルコースレベル（Glucometer,3 Blood Glucose Meter,インディアナ、Elkhart在、Miles,Inc.）により糖尿病についてモニターし、２回連続尿試験陽性［Testape値［＋１］以上］又は血漿グルコースレベル＞250mg/dLの後で糖尿病と見なした。

NOD糖尿病ドナーから単離した脾臓細胞を飽和量の抗VLA4mAbR1－２又はPS/2で処理し、その後、上記のように、糖尿病でない照射した宿主に伝達し、次いで、末梢血液及びリンパ様器官中のすべてのVLA4陽性細胞の最大被覆を約２週間維持するために、R1－2mAb又はPS/2を22～25日間１日おきに投与した場合に、抗VLA4mAbの糖尿病発症に対する予防効果が示された。表１は、糖尿病になったレシピエントの頻度及びNODドナーからの脾臓細胞を、（ｉ）処理なし（Ｄ）で；（ii）ラットIgG2b処理して（D/非特異的なラットIgG2b）；（iii）R1－２抗VLA4処理（D/R1－2mAb）して；（iv）PS/2処理（D/PS/2mAb）して移植した場合、並びに糖尿病でないNODドナーからの脾臓細胞（non－Ｄ）の移植後の病気発症までの日数を示している。PBSを受けて脾臓細胞を受けてない糖尿病でないマウスを対照として含めた。PBSだけの注射は、４%の発病率を与えた。これらの条件下で、24匹のR1－2mAb処理した各レシピエントの内、１匹だけが移植後22日に糖尿病を発症し、他方、５匹のPS/2mAb処理したレシピエントは何れも糖尿病にならなかった。対照してみると、mAbで処理しなかった又は非特異的なラットIgG2bで処理した糖尿病ドナーからの脾臓細胞を受けた個体は、16/19が糖尿病になった。表１に示したように、無関係のラットIgG2bの移植は発症を１日だけ遅らせはしたが、移植後14日という早さで糖尿病の発症が起きた。

これらのデータは、R1－2mAb及びPS/2のVLA4に対する特異性に依存した防護効果を示している。糖尿病でないマウスからの脾臓細胞又はPBSのみのレシピエントは糖尿病にならなかった。従って、抗VLA4抗体での処理は、移植後30日間における糖尿病の頻度を減少させた。これらのマウスからの血清の分析は、R1－２及びPS/2抗VLA4mAbのレベルが移植後26～34日で検出不能になることを確実にした。

表１

抗ＶＬＡ４ｍＡｂは、ＮＯＤマウスにおける糖尿病の養子免疫伝達を阻止する

移植／処理された細胞*	糖尿病個体数／レシピエントの総数+		発症までの日数 X ±SEM
ＮＯＮＥ	1/26	(4%)	34
Ｎｏｎ－Ｄ	1/15	(7%)	15
Ｄ	16/19	(84%)	14 ± 0.2
Ｄ／非特異的ラットＩｇＧ２ｂ	16/19	(84%)	15 ± 0.9
Ｄ／Ｒ１－２ｍＡｂ	1/24	(4%)	22
Ｄ／ＰＳ／２ｍＡｂ	0/5	(0%)	

*４週齢の糖尿病でない（ＮＯＮ－Ｄ）又は新たに発症した糖尿病（Ｄ）のＮＯＤ雌からの脾臓細胞を、移植前にｍＡｂ若しくはラットＩｇＧに懸濁したＤ細胞を用いて又はｍＡｂを伴わないで移植し、レシピエントを２２～２５日にわたって週２回処理した。マウスを、移植後１か月間監視した。データは５つの実験から集めたものである。

+Ｄ／Ｒ１－２及びＤ／ＰＳ／２ｍＡｂ処理グループは、Ｄ及びＤ／ラットＩｇＧ２ｂ処理グループと、次のイェーツの修正を用いるカイ二乗検定によって有意に異なっている：Ｒ１－２対ＩｇＧ２ｂ処理及びＤグループ、ｐ＜０．０００１；ＰＳ／２対ＩｇＧ２ｂ処理及びＤグループ、ｐ＜０．００３。

実施例４

自発的糖尿病モデルに対する抗VLA4抗体処理の効果

この実施例には、NODマウスを用いた自発的糖尿病モデルにおけるR1－2mAbを用いた効果の結果を記載した。NODマウスを８週間にわたって（ａ）無関係の対照用抗体（NOD/ラットIgG2b、ｎ＝10マウス）；（ｂ）R1－２抗体（NOD/R1－２、ｎ＝20マウス）で処理し；又は（ｃ）は処理しなかった（NOD、ｎ＝10マウス）（４週齢で始めて12週齢まで行なった）。mAbを0.2mlPBS中の75μｇの投与量にて、週２回静脈投与した。マウスを、前記のように、糖尿用のTesTapeによって、糖尿病事象について監視した。

図６は、２つの対照用グループと比較して、R1－２投与後に糖尿病発症の顕著な遅延（12～16週間の遅延）を示している。無関係なIgG2bmAbを受けたか又は処理を受けてないNODマウスは、13週の早さで糖尿病が発達した。これらの自発的病気モデルの結果は、図１に

説明したR1－２を伴う養子免疫伝達の結果と同様であり、抗VLA4抗体が糖尿病の発症に対する防護となることを直接的に示している。

実施例５

糖尿病の養子免疫伝達に対するVCAM－Ig融合蛋白質の効果

実施例１に記載した養子免疫伝達実験を、抗VLA4mAbの代わりにVCAM－Ig融合蛋白質（VCAM2D－IgG）を用いて繰り返した。VCAM2D－IgGは、VLA4に対するリガンド（VCAM1）の可溶性形態であって、ヒトIgG1重鎖定常領域配列（ヒンジ、C_H2及びC_H3）に融合したVCAM1の２つのＮ末端ドメインからなる。VCAM2D－IgGDNA配列及びその翻訳アミノ酸配列をSEQ ID NO:9に示す。図８は、融合蛋白質構造を説明するものである。この融合蛋白質を、下記の組換え技術によって構築した。

ヒトIgG重鎖領域のcDNAの単離とプラスミッドpSAB144の構築

ヒトIgG1重鎖領域のcDNAコピーを単離するために、プラスミッドVCAM1－IgG1（pSAB133としても知られる）によって一時的にトランスフェクトしたCOS7細胞からRNAを調製した。プラスミッドVCAM1－IgG1の構築は、PCT特許出願WO90/13300に記載されている。このRNAを、逆転写酵素及びランダムヘキサマー（プライマーとして）を用いて逆転写してcDNAを生成した。42℃で30分経過後、逆転写反応を、反応物を95℃で５分間のインキュベーションにより停止させた。次いで、このcDNAを、次のキナーゼ処理したプライマーを用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応、例えば、Sambrook等、Molecular Cloning,Vol.3,pp.14.1－14.35（Cold Spring Harbor;1989）を参照）により増幅した：

３７０－３１（SEQ ID NO:１０）：

5'TCGTC GAC AAA ACT CAC ACA TGC C

Asp Lys Thr His Thr Cys

これは、Sal I部位を含む、及び

３７０－３２（SEQ ID NO:１１）：

5' GTAAATGAGT GCGGCGGCCG CCAA,

これは、IgG1重鎖定常領域のカルボキシ末端リジンをコードし、Not I部位が続く。

PCR増幅したcDNAを、プラスミッドpNN03でのクローン化のためにアガロースゲル電気泳動及びガラスビーズ溶出により精製した。プラスミッドpNN03を、市販のプラスミッドpUC8（ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）から、制限エンドヌクレアーゼ消化によって合成ポリリンカー配列を除去し、下記の新規な配列（SEQ ID NO:12）を有する合成ポリリンカー配列により置換することによって構築した：

GCGGCCGCGG TCCAACCACC AATCTCAAAG CTTGGTACCC GGGAATTCAG

ATCTGCAGCA TGCTCGAGCT CTAGATATCG ATTCCATGGA TCCTCACATC

CCAATCCGCG GCCGC.

精製したPCR増幅したcDNA断片を、EcoR Vで開裂して脱リン酸化したpNN03にライゲートし、低融点アガロースゲル電気泳動により精製した。ライゲーション反応を用いて大腸菌JA221をトランスフォームし、生じたコロニーを、約700bpの挿入物を含むプラスミッドについてスクリーニングした。正しい挿入物の同一性をDNA配列分析により確認し、このプラスミッドをpSAB144と呼んだ。

プラスミッドpSAB142の構築

プラスミッドpSAB142を次のようにして構築した。pSAB133でトランスフェクトしたCOS細胞から（前節に記載のようにして）調製したcDNAを、オリゴヌクレオチド370－01及び370－29を用いるPCR増幅にかけた。オリゴヌクレオチド370－01はNot I部位及びVCAM－１シグナル配列のアミノ酸１～７に対応するヌクレオチド（SEQ ID NO:13）を含む：

5' GAGCTCGAGGCGGCCGCACCATGCCTGGGAAGATGGTCGTG

MetProGlyLysMetValVal

オリゴヌクレオチド370－29は、VCAM－１アミノ酸214～219に対応し且つSal I部位（SEQ ID NO:14）を含む：

5' AA GTC GAC TTG CAA TTC TTT TAC

増幅したDNA断片を、EcoR Vにより開裂したpNO3のベクター断片にライゲートした。

pSAB132の構築

pJOD－Ｓ（Barsoum,J.,DNA and Cell Biol., ９,pp.293－300（1990））を、アデノウイルス主要後期プロモーターからのユニークなNot I部位下流を挿入するように改変し、Not I断片が発現ベクター中に挿入され得るようにした。pJOD－Ｓを、プラスミッドDNAのNot I開裂によって線状化した。突き出ている5'末端を、ヤエナリ（Mung Bean）ヌクレアーゼを用いて鈍端化し、この線状化DNA断片を低融点アガロースゲル電気泳動により精製した。DNA断片をT4DNAリガーゼを用いて再結合した。このライゲートした分子を、次いで、大腸菌JA221中にトランスフォームした。コロニーをNot I部位の不在についてスクリーニングした。その結果のベクターをpJOD－ＳデルタNot Iと呼んだ。pJOD－８デルタNot Iを、Sal Iを用いて線状化し、5'末端を仔ウシアルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化した。線状化DNA断片を低融点アガロースゲル電気泳動により精製し、リン酸化オリゴヌクレオチドACE175の存在にてライゲートした。該オリゴヌクレオチドは、次の配列（SEQ ID NO:15）を有する：

TCGACGCGGC CGCG

ライゲーション混合物を大腸菌JA221中にトランスフォームし、コロニーをNot I部位を有するプラスミッドの存在についてスクリーニングした。所望のプラスミッドをpMDR901と命名した。

DHFRcDNA、pMDR901及びpJODΔｅ－tPA（Barsoum,DNA and Cell Biol., ９,pp.239－300（1990））の転写を制御するSV40プロモーター中の２つのSV40エンハンサー反復を削除するために、両者をAst II及びDra IIIで開裂した。pMDR901からの2578bpのAst II－Dra III断片及びpJODΔｅ－tPAからの5424bpのAst II－Dra III断片を、低融点アガロースゲル電気泳動により単離し、１つにライゲートした。大腸菌JA221へのトランスフォーメーションの後に、生成したプラスミッドpMDR902を単離した。次いで、pSAB132を、アデノウイルス主要後期プロモーターを含むpMDR902のEcoR I－Not I断片を除去し、それを、ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター及びエンハンサーを含むプラスミッドpCMV－Ｂ（カリフォルニア、Palo Alto在、Clontech）からの83bpのEcoR I－Not I断片で置換することによって形成した。

pSAB146の構築

pSAB144をSal I及びNot Iで開裂し、693bp断片を単離した。pSAB142をNot I及びSal Iで開裂させて664bp断片を単離した。これらの２つの断片を、Not Iで開裂し且つ仔牛アルカリホスファターゼにより脱リン酸化したpSAB132にライゲートした。その結果生成したプラスミッドpSAB146は、VCAM－１シグナル配列、成熟VCAM－１のアミノ末端の219アミノ酸、IgG1のヒンジ領域の10アミノ酸並びにIgG1のC_H2及びC_H3定常ドメインをコードするDNA配列を含んだ。

安定にトランスフォームしたCHO細胞系統からのVCAM2D－IgGの産生

組換えVCAM2D－IgG発現ベクターを下記のようにして構築し、CHO細胞中にトランスフェクトしてVCAM2D－IgGを連続的に分泌する細胞系統を生成した。

pSAB146のVCAM2D－IgGコード配列を含む1.357kbのNot I断片を、アガロースゲル電気泳動によって精製した。この断片を、発現ベクターpMDR901のNot Iクローニング部位にライゲートした（該ベクターは、異種遺伝子発現のためのアデノウイルス２主要後期プロモーター及び選択可能で増幅可能なジヒドロ葉酸レダクターゼ（dhfr）マーカーを利用する）。このライゲートしたDNAを用いて大腸菌DH5をトランスフォームした。所望の正しい向きの挿入物を有するプラスミッドを含むコロニーを、Hind IIIでの消化における5853及び3734

bp断片の存在、及びBgl IIでの消化における4301、2555、2293及び438bp断片の存在により同定した。その結果生成した組換えVCAM2D－IgG発現ベクターをpEAG100と呼んだ。この正しい挿入物の同一性をDNA配列分析により確認した。
組換え発現プラスミッドpEAG100をJ.Barsoumの公表されたプロトコール（DNA Cell Biol 9:293－300,1990）に従って、dhfr－欠乏CHO細胞中に電気穿孔法で挿入した（但し、200μgのPvu I線状化pEAG100プラスミッド及び200μgの超音波処理したサケ精子DNAをこの電気穿孔法プロトコールにおいて用いた）。更に、細胞を、200nMメトトレキセートを補ったアルファ完全培地にて選択した。
分泌されたVCAM2D－IgGの発現レベルを測定するために、クローンを平底の96ウェルミクロ滴定プレートに移して、集密になるまで生育させ、下記のようにELISAによりアッセイした。
Immulon 2プレート（バージニア、Chantilly在、Dynatech）の各ウェルを、100μlの抗VCAM4B9MAb（0.05M炭酸ナトリウム／重炭酸塩緩衝液（pH9.6）中で10μg/mlに稀釈したもの）を用いて抗VCAMMAb4B9（Carlos等、1990［56］により記載されたようにしてプロテインAセファロース上で単離精製したもの）で被覆し、パラフィルムでカバーして4℃で一晩インキュベートした。翌日、プレートの中身を落として、2μのフィルターを通して濾過した200μl/ウェルのブロック用緩衝液（1×PBS中の5％ウシ胎児血清）でブロックした。室温で1時間のインキュベーションの後に緩衝液を除去し、プレートを1×PBS中の0.05％Tween－20溶液で2回洗った。調整培地を種々の稀釈にて加えた。陽性対照として、抗マウスIgも又含めた。ブロック用緩衝液及びLFA－3TIPは、陰性対照を構成した。試料及び対照を室温で2時間インキュベートした。
次いで、これらのプレートを1×PBS中の0.05％Tween－20溶液で2回洗った。次いで、陽性対照のウェルを除いて、各ウェルを50μlのブロック用緩衝液中の1:2000稀釈のHRP－ロバ抗ヒトIgG（H＋L）（ペンシルベニア、West Grove在、Jackson Immune Research Laboratories）で満たした。陽性対照のウェルは、50μlのブロック用緩衝液中の1:2000稀釈のHRP－ヤギ抗マウスIgG（H＋L）（ペンシルベニア、West Grove在、Jackson Immune Research Laboratories）を満たした。次いで、これらのプレートを1時間室温でインキュベートした。
HRP結合Ab溶液を除去して、これらのウェルを1×PBS中の0.05％Tween－20溶液で2回洗った。次いで、100μlのHRP基質緩衝液を各ウェルに室温で加えた。HRP基質緩衝液を次のように調整した:0.5mlのDMSO（Aldrich）中の42mM 3,3',5,5'－テトラメチルベンジジン（TMB）（サウスカロライナ、Lisle在、ICN Immunobiologicals,カタログ番号980501）を50mlの基質緩衝液（0.1M酢酸ナトリウム／クエン酸、pH4.9）にゆっくりと加え、その後、7.5μlの30％過酸化水素（Sigma,カタログ番号H－1009）を加えた。
各ウェル内の青色の発色を、ミクロ滴定プレートリーダーで650nmにてモニターした。7～10分後に、100μlの2N硫酸の添加によって発色を停止させた。その結果生じた黄色をミクロ滴定プレートリーダーで450nmにて読んだ。陰性対照用ウェルをこの機械用のブランクとして用いた。
VCAM2D－IgGの精製
VCAM2D－IgGを発現しているCHO細胞を、ローラーボトル中でコラーゲンビーズ上で生育させた。調整培地（5リットル）を、Amicon S1Y10らせん限外濾過カートリッジ（マサチューセッツ、Danvers在、Amicon）を用いて500mlに濃縮した。濃縮物を、1リットルのPierceプロテインA結合用緩衝液（イリノイ、Rockford在、Pierce）で稀釈し、重力により10mlのプロテインAカラム（Sepharose 4 Fast Flow,ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）に載せた。このカラムを、10mlのプロテインA結合用緩衝液で9回洗い、次いで、10mlのPBSで7回洗った。25mM H_3PO_4（pH2.8）、100mM NaClを含む12の5mlステップでVCAM2D－IgGを溶出した。溶出した試料を、0.5M Na_2HPO_4（pH8.6）を25mMまで加えることによって中和した。画分を、280nmの吸光度及びSDS－PAGEにより分析した。最高純度の3つのピーク画分をプールして濾過し、アリコートを取って－70℃に保持した。SDA－PAGEによれば、生成物は95％より高い純度であった。幾つかの例においては、プロテイ

ンＡ溶出生成物を更にＱ－Sepharose FF（Pharmacia）にて生成することが必要であった。プロテインＡ溶出物を、３倍容の25mMトリスHCl（pH8.0）で稀釈し、樹脂1ml当り10mgのVCAM2D－IgGにてＱ－Sepharose FFカラムに載せた。次いで、VCAM2D－IgGをPBSでＱ－Sepharoseから溶出した。

VCAM2D－IgGの評価

脾臓細胞懸濁液を、上記のように、糖尿病のドナー又は糖尿病でない対照から調製した。脾臓細胞を静脈注射（0.2mlPBS中の２～３×10^7）し且つ100μｇのVCAM2D－IgG又は100μｇの無関係のLFA－3Ig融合蛋白質対照で予備処理した。他のグループは、PBSのみを受け、細胞の移植はしなかった。融合蛋白質LFA－3Ig（LFA－3TIP）を、PCT US92/02050及びMiller等、1993［57］に記載のようにして単離精製した。VCAM2D－IgG融合蛋白質又は無関係のLFA－3Ig蛋白質を100μg/0.2mlの投与量で17日目まで週２回腹腔内投与した。この濃度は、VLA4陽性細胞を飽和させるのに十分な融合蛋白質の血清レベルを与えるのに十分であった（血清レベルは、上記のようにELISAによって測定した）。糖尿病の発症を、上記のようにして監視した。

評価の結果を図７に示す。この図に示したように、VCAM2D－IgG融合蛋白質（D/VCAM－Ig、塗りつぶしてない丸）は、糖尿病ドナー（データは示さない）からの細胞とLFA－3Ig無関係対照Ig融合蛋白質（D/LFA－3Ig）とを受けたマウスが移植後15日目で既に60％の発病率に達したのに比べて、糖尿病ドナーマウスからの細胞のレシピエントにおける糖尿病の発症を有意に阻止し、移植後30日目までで60％の発病率である。細胞を受けなかったマウス（PBSのみ）は、病気を起こさなかった。実験グループ当りのマウス数は、ｎ＝５であった。

要約すると、ヒトの糖尿病に対するマウスモデルを用いて、VLA4結合剤例えば抗VLA4抗体は、糖尿病の発症に対して防御力があり（実施例１、３及び４）、インシュリン炎の進行を遅らせるのに有効であった（実施例２）。他のVLA4結合剤例えば可溶性VCAM誘導体（VCAM2D－IgG）も又、糖尿病発症に対する防御において有用であった（実施例５）。上記の実施例は、本発明の方法を説明することを意図しており、後記の請求の範囲に記載の発明の制限として提供するものではない。上記の開示から、この発明の多くの変法及び更なる具体例が当業者には明らかとなるであろう。例えば、実際に用いる投与量、使用する抗体若しくは抗体断片の型、投与形式、正確な組成、治療用の投与の時間及び方法、並びに他の多くのすべての特徴は、上記の説明から離れずに変更することが出来る。かかるすべての変法及び更なる具体例は、この発明の企図する内にあり、添付の請求の範囲の内にある。

引用文献のリスト

[1] Castano and Eisenbarth, 1990, Annu. Rev. Immunology 8: 647-79, "Type I Diabetes: A Chronic Autoimmune Disease of Human, Mouse, and Rat"

[2] Fujita et al., 1982, Biomed. Res. 3: 429-436, "Lymphocytic Insulitis in a Non-obese Diabetic (NOD) Strain of Mice: An Immunohistochemical and Electron Microscope Investigation"

[3] Foulis et al., 1986, Diabetologia 29: 267, "The histopathology of the pancreas in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom"

[4] Eisenbarth, 1986, New Engl. J. Med. 314:1360-1368, "Type I Diabetes Mellitus - A Chronic Autoimmune Disease"

[5] Miller et al., 1988, J. Immunol. 140: 52-58, "Both the Lyt-2+ and L3T4+ T Cell subsets are required for the transfer of diabetes in Nonobese diabetic mice"

[6] Harada and Makino, 1986, Exp. Anim. 35: 501, "Suppression of overt diabetes in NOD mice by Anti-thymocyte serum or anti-Thy 1.2 antibody"

[7] Koike et al., 1987, Diabetes 36: 539, "Preventive effect of monoclonal anti-L3T4 antibody on development of diabetes in NOD mice"

[8] Makino et al., 1986, Exp. Anim. 35: 495, "Absence of insulitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background"

[9] Voorbij et al., 1989, Diabetes 35: 1623-1629, "Dendritic cells and scavenger macrophages in pancreatic islets of prediabetic BB rats"

[10] Nomikos et al., 1986, Diabetes 35: 11302-1304, "Combined treatment with nicotinamide and desferrioxamine

prevents islet allograft destruction in NOD mice"

[11] Larson and Springer, 1990, Immunol. Rev. 114: 181-217, "Structure and Function of Leukocyte Integrins"

[12] Hemler et al., 1990, Immunol. Rev. 114: 45-66, "Structure of the Integrin VLA-4 and its Cell-Cell and Cell-matrix adhesion functions"

[13] Lobb, R.R., 1992, Adhesion: Its Role in Inflammatory Diseases. ed. J.M. Harlan and D.Y. Liu, New York: W. H. Freeman. 1-18.

[14] Osborn, L., 1990, Cell 62: 3-6, "Leukocyte Adhesion to Endothelium in Inflammation"

[15] Wayner et al., 1989, J. Cell. Biol. 109: 1321-1330, "Identification and Characterization of the T Lymphocyte Adhesion Receptor for an Alternative Cell Attachment Domain (CS-1) in Plasma Fibronectin"

[16] Shimizu et al., 1991, J. Cell Biol. 113: 1203, "Four molecular pathways to T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1 VCAM-1 and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions"

[17] Barton et al., 1989, J. Immunol. 143: 1278, "The effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 on phorbolester-induced rabbit lung inflammation"

[18] Issekutz, T.B. and Issekutz, A.C., 1991, Clinical Immunol. and Immunopathol. 138: 300-312, "T lymphocyte migration to arthritis joints and dermal inflammation in the rat: differing migration patterns and the involvement of VLA-4"

[19] Issekutz, T.G., 1991, J. Immunol 147: 4178-4184, "Inhibition of In Vivo Lymphocyte Migration to Inflammation and Homing to Lymphoid Tissues by the TA-2

Monoclonal Antibody - A Likely Role for VLA-4 In Vivo"

[20] Yednock, et al., 1992, Nature 356: 63-66, "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against α4β1 integrin"

[21] Lobb, U.S. Patent Application Serial No. 07/821,768 filed January 13, 1992, "Treatment for Asthma"

[22] Dustin et al., 1986, J. Immunol. 137: 245-254 "Induction by IL-1 and Interferon-γ Tissue Distribution, Biochemistry, and Function of a Natural Adherence Molecule (ICAM-1)"

[23] Rice et al., 1990, J. Exp. Med. 171: 1369, "Inducible Cell Adhesion Molecule 110 (INCAM-110) Is An Endothelial Receptor for Lymphocytes - A CD11/CD18-Independent Adhesion Mechanism"

[24] Rice et al., 1991, Am. J. Path. 138: 385393, "Vascular and Nonvascular Expression of INCAM-110"

[25] Shimuzu et al., 1990, Immunol. Rev. 114: 109-144, "Roles of Adhesion Molecules in T-cell recognition: Fundamental Similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding and costimulation"

[26] Burkly et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21: 2871-2875, "Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA4 promotes CD3-dependent T cell proliferation"

[27] Rudd et al., 1989, Immunol. Rev. 111: 225-266, "Molecular Interactions, T-Cell Subsets, and a Role of the CD4/CD8:p56^{lck} Complex in Human T-Cell Activation"

[28] Moingeon et al., 1989, Immunol. Rev. 111: 111-144, "The Structural Biology of CD2"

[29] Harding et al., 1992, Nature 356: 607-609, "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of energy in T cell clones"

[30] Shizuru et al., 1988, Science 240: 659-662, "Immunotherapy of the Nonobese Diabetic Mouse: Treatment with an Antibody to T-Helper Lymphocytes"

[31] Barlow and Like, 1992, Amer. J. Pathol. 141: 1043-1051, "Anti-CD2 Monoclonal Antibodies Prevent Spontaneous and Adoptive Transfer of Diabetes in the BB/Wor Rat"

[32] Like et al., 1986, J. Exp. Med. 164: 1145-1159, "Prevention of Diabetes in Biobreeding/Worchester Rats with Monoclonal Antibodies that Recognize T Lymphocytes or Natural Killer Cells"

[33] Hutchings et al., 1990, Nature 348: 639-642, "Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages"

[34] Federlin and Becker, 1990, Klin. Wochenschr. 68: Suppl. XXI 38-43, "Specific Therapeutic Attempts in Experimental and Clinical Type-I Diabetes"

[35] Zielasek et al., 1989, Clin. Immunol. Immunopathol. 52: 347-365, "The Potentially Simple Mathematics of Type I Diabetes"

[36] Eisenbarth, 1987, Hosp. Prac. 22:167-183, "Type I Diabetes: Clinical Implication of Autoimmunity"

[37] Ziegler and Eisenbarth, 1990, Horm. Res. 33: 144-150, "Multiple Target Antigens in Pre-Type I Diabetes: Implications for Prediction"

[38] Ziegler et al., 1990, Diabetes Care 13: 762-765, "Predicting Type I Diabetes"

[39] Ziegler et al., 1990, J. Autoimmun. 3 Suppl. 1: 69-74, "Type I Diabetes:

polygenic inheritance, multiple autoantigens and 'dual' parameter prediction"

[40] Kohler, G. and Milstein, 1975, C. Nature 265: 295-497, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity"

[41] Sanchez-Madrid et al., 1986, Eur. J. Immunol., 16: 1343-1349, "VLA-3: A novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization"

[42] Hemler et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 11478-11485, "Characterization of the cell surface heterodimer VLA4 and related peptides"

[43] Elices et al., 1990, Cell 60: 577-584, "VCAM-1 on Activated Endothelium Interacts with the Leukocyte Integrin VLA4 at a Site Distinct from the VLA4/Fibronectin Binding Site"

[44] Pulido et al., 1991, J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245, "Functional Evidence for Three Distinct and Independently Inhibitable Adhesion Activities Mediated by the Human Integrin VLA-4"

[45] Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95, "Production of Antigen-specific Human Monoclonal Antibodies from In Vitro-Primed Human Splenocytes"

[46] Persson et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2432-2436, "Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning"

[47] Huang and Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141: 227-236, "Construction of representative immunoglobulin variable region cDNA libraries from human peripheral blood lymphocytes without in vitro stimulation"

[48] Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525, "Replacing the complementarity-

determining regions in a human antibody with those from a mouse"

[49] Riechmann, 1988, Nature 332: 323-327, "Reshaping human antibodies for therapy"

[50] Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029, "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor"

[51] Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833 "Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction"

[52] U.S. Patent Application Serial No. 08/004,798, filed January 12, 1993, "Recombinant Anti-VLA4 Antibody Molecules"

[53] Holzmann et al, 1989, Cell 56: 37-46, "Identification of a Murine Peyer's Patch-Specific Lymphocyte Homing Receptor as an Integrin Molecule with α Chain Homologous to Human VLA-4α"

[54] Hession et al., 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun. 183: 163-169, "Cloning of Murine and Rat Vascular Cell Adhesion Molecule-1"

[55] Miyake et al., 1991, J. Exp. Med. 173: 599-607.

[56] Carlos et al., 1990, Blood 17: 965, "Vascular Cell Adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediates Lymphocyte Adherence to Cytokine-activated Cultured Human Endothelial Cells."

[57] Miller et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 211.

上記の文献を全体として本明細書中に参考として援用する。

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Burkly, Linda C.

(ii) TITLE OF INVENTION: Treatment for Insulin Dependent Diabetes

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 15

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Allegretti & Witcoff, Ltd.
(B) STREET: 10 South Wacker Drive, Suite 3000
(C) CITY: Chicago
(D) STATE: IL
(E) COUNTRY: US
(F) ZIP: 60606

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Word Perfect 5.1

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: 08/029,330
(B) FILING DATE: 9 February 1993
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Miao, Emily
(B) REGISTRATION NUMBER: 35,285
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 92,749-A; D015 CIP PCT

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: 312-715-1000
(B) TELEFAX: 312-715-1234

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 360 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG159 insert: HP1/2 heavy chaih variable region; amino acid 1 is Glu (E) but Gln (Q) may be substituted"

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1-360

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```
GTC AAA CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG CCA GGG GCC  45
Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
  2                6                  11                  16

TCA GTC AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC  90
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
                21                  26                  31

ACC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG GAG 135
Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
                36                  41                  46

TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC GAT ACT AAA TAT GAC 180
Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
                51                  56                  61

CCG AAG TTC CAG GTC AAG GCC ACT ATT ACA GCG GAC ACG TCC TCC 225
Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser
                66                  71                  76

AAC ACA GCC TGG CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT 270
Asn Thr Ala Trp Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr
                81                  86                  91

GCC GTC TAC TAC TGT GCA GAC GGA ATG TGG GTA TCA ACG GGA TAT 315
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr
                96                 101                 106

GCT CTG GAC TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 360
Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
               111                 116                 121
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 120 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```
Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 2                  6                  11                  16

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
                   21                  26                  31

Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
                   36                  41                  46

Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
                   51                  56                  61

Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser
                   66                  71                  76

Asn Thr Ala Trp Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr
                   81                  86                  91

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr
                   96                 101                 106

Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                  111                 116                 121
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 318 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1-318
(D) OTHER INFORMATION: /product= "HP1/2 light chain variable region"

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG172 insert: HP1/2 light chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

```
AGT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCC AAA TTC CTG CTT GTT TCA GCA  45
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala
  1               5                  10                  15

GGA GAC AGG GTT ACC ATA ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTG ACT  90
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr
                20                  25                  30

AAT GAT GTA GCT TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCT AAA 135
Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
                35                  40                  45

CTG CTG ATA TAT TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT 180
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
                50                  55                  60

CGC TTC ACT GGC AGT GGA TAT GGG ACG GAT TTC ACT TTC ACC ATC 225
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
                65                  70                  75

AGC ACT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG 270
Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
                80                  85                  90

GAT TAT AGC TCT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAG 315
Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
                95                 100                 105

ATC
Ile                                                         318
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 106 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

```
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala
  1               5                  10                  15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr
                20                  25                  30

Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
                35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
```

```
                50                  55                  60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
            65                  70                  75

Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
            80                  85                  90

Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
            95                 100                 105

Ile
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 429 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1-57

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 58-429

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1-429

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG195 insert: AS heavy chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

```
ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCA CCA  45
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro
            -15                 -10                 -5

GGT GCC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT  90
Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
              1                   5                  10
```

```
GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GCG TCT GGC 135
Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly
            15                  20                  25

TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT 180
Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro
            30                  35                  40

GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AGT GGC 225
Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly
            45                  50                  55

GAT ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GTC AGA GTG ACA ATG CTG 270
Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu
            60                  65                  70

GTA GAC ACC AGC AGC AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG 315
Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val
            75                  80                  85

ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA GAC GGA ATG TGG 360
Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp
            90                  95                  100

GTA TCA ACG GGA TAT GCT CTG GAC TTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG 405
Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
           105                 110                 115

GTC ACC GTC TCC TCA GGT GAG TCC                         429
Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
           120
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 143 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro
               -15                 -10                 -5

Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
                 1                   5                  10

Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly
```

15 20 25

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro
30 35 40

Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly
45 50 55

Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu
60 65 70

Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val
75 80 85

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp
90 95 100

Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
105 110 115

Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser
120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 386 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1-57

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 58-386

(ix) EATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1-386

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION: 1
(D) OTHER INFORMATION: /note= "pBAG198 insert: VK2 (SVMDY) light chain variable region"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

```
ATG GGT TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTC CTG GTT GCT ACC GCT ACC  45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
               -15                 -10                 -5

GGT GTC CAC TCC AGC ATC GTG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG  90
Gly Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
             1                   5                  10

AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT 135
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
            15                  20                  25

CAG AGT GTG ACT AAT GAT GTA GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT 180

Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
            30                  35                  40

AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAT GCA TCC AAT CGC TAC ACT 225
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
            45                  50                  55

GGT GTG CCA GAT AGA TTC AGC GGT AGC GGT TAT GGT ACC GAC TTC 270
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe
            60                  65                  70

ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC 315
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
            75                  80                  85

TAC TGC CAG CAG GAT TAT AGC TCT CCG TAC ACG TTC GGC CAA GGG 360
Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
            90                  95                 100

ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT AAG TG                          386
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
           105
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 128 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
               -15                 -10                 -5
```

```
Gly Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1               5                  10

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
            15                  20                  25

Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
        30                  35                  40

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
    45                  50                  55

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe
60                  65                  70

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
75                  80                  85


Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
            90                  95                  100

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys
        105
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1348 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: VCAM-1 gene segment
(B) LOCATION: 1-219
(D) OTHER INFORMATION: This portion of the sequence corresponds, in part, to Exons I, II and III nucleotide sequence of the VCAM-1 gene of Cybulsky et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88:7861 (1991).

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: Hinge region
(B) LOCATION: 220-229
(D) OTHER INFORMATION: This portion of the sequence corresponds, in part, to Fig. 12A in PCT/US92/0250 and represents the hinge region of Human IgG1 heavy chain constant region.

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: Heavy chain constant region 2
(B) LOCATION: 230-338
(D) OTHER INFORMATION: This portion of the sequence corresponds, in part, to Fig. 12A in PCT/US92/02050 and represents the heavy chain constant region 2 of Human IgG1 heavy chain constant region.

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: heavy chain constant region 3
(B) LOCATION: 339-446
(D) OTHER INFORMATION: This portion of the sequence corresponds, in part, to Fig. 12A in PCT/US92/02050 and represents the heavy chain constant region 3 of Human IgG1 heavy chain constant region.

```
ATG CCT GGG AAG ATG GTC GTG ATC CTT GGA GCC TCA AAT ATA CTT   45
Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu
                5                  10                  15

TGG ATA ATG TTT GCA GCT TCT CAA GCT TTT AAA ATC GAG ACC ACC   90
Trp Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Phe Lys Ile Glu Thr Thr
            20                  25                  30

CCA GAA TCT AGA TAT CTT GCT CAG ATT GGT GAC TCC GTC TCA TTG  135
Pro Glu Ser Arg Tyr Leu Ala Gln Ile Gly Asp Ser Val Ser Leu
        35                  40                  45

ACT TGC AGC ACC ACA GGC TGT GAG TCC CCA TTT TTC TCT TGG AGA  180
Thr Cys Ser Thr Thr Gly Cys Glu Ser Pro Phe Phe Ser Trp Arg
    50                  55                  60

ACC CAG ATA GAT AGT CCA CTG AAT GGG AAG GTG ACG AAT GAG GGG  225
Thr Gln Ile Asp Ser Pro Leu Asn Gly Lys Val Thr Asn Glu Glv
65                  70                  75

ACC ACA TCT ACG CTG ACA ATG AAT CCT GTT AGT TTT GGG AAC GAA  270
Thr Thr Ser Thr Leu Thr Met Asn Pro Val Ser Phe Gly Asn Glu
                80                  85                  90

CAC TCT TAC CTG TGC ACA GCA ACT TGT GAA TCT AGG AAA TTG GAA  315
His Ser Tyr Leu Cys Thr Ala Thr Cys Glu Ser Arg Lys Leu Glu
            95                  100                 105

AAA GGA ATC CAG GTG GAG ATC TAC TCT TTT CCT AAG GAT CCA GAG  360
Lys Gly Ile Gln Val Glu Ile Tyr Ser Phe Pro Lys Asp Pro Glu
        110                 115                 120

ATT CAT TTG AGT GGC CCT CTG GAG GCT GGG AAG CCG ATC ACA GTC  405
Ile His Leu Ser Gly Pro Leu Glu Ala Gly Lys Pro Ile Thr Val
```

```
                    125                 130                 135

AAG TGT TCA GTT GCT GAT GTA TAC CCA TTT GAC AGG CTG GAG ATA  450
Lys Cys Ser Val Ala Asp Val Tyr Pro Phe Asp Arg Leu Glu Ile
                140                 145                 150

GAC TTA CTG AAA GGA GAT CAT CTC ATG AAG AGT CAG GAA TTT CTG  495
Asp Leu Leu Lys Gly Asp His Leu Met Lys Ser Gln Glu Phe Leu
                155                 160                 165

GAG GAT GCA GAC AGG AAG TCC CTG GAA ACC AAG AGT TTG GAA GTA  540
Glu Asp Ala Asp Arg Lys Ser Leu Glu Thr Lys Ser Leu Glu Val
                170                 175                 180

ACC TTT ACT CCT GTC ATT GAG GAT ATT GGA AAA GTT CTT GTT TGC  585
Thr Phe Thr Pro Val Ile Glu Asp Ile Gly Lys Val Leu Val Cys
                185                 190                 195

CGA GCT AAA TTA CAC ATT GAT GAA ATG GAT TCT GTG CCC ACA GTA  630
Arg Ala Lys Leu His Ile Asp Glu Met Asp Ser Val Pro Thr Val
                200                 205                 210

AGG CAG GCT GTA AAA GAA TTG CAA GTC GAC AAA ACT CAC ACA TGC  675
Arg Gln Ala Val Lys Glu Leu Gln Val Asp Lys Thr His Thr Cys
                215                 220                 225

CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC  720
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
                230                 235                 240

CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC  765
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT  810
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                260                 265                 270

GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT  855
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                275                 280                 285

GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG  900
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                290                 295                 300

GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC  945
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                305                 310                 315

AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC  990
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
```

```
                320                 325                 330

ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA 1035
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Dys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                335                 340                 345

CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC 1080
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
                350                 355                 360

CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC 1125
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                365                 370                 375

ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC 1170
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                380                 385                 390

AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC 1215
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                395                 400                 405

TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC 1260
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                410                 415                 420

GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC 1305
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                425                 430                 435

ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GTG CGG     1348
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                440                 445
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
- (A) NAME/KEY:
- (B) LOCATION:
- (D) OTHER INFORMATION: This corresponds to Kinase Primer 370-31.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

TCGTC GAC AAA ACT CAC ACA TGC C 24
Asp Lys Thr His Thr Cys
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY:
(B) LOCATION:
(D) OTHER INFORMATION: This corresponds to Kinase Primer 370-32.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

GTAAATGAGT GCGGCGGCCG CCAA 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 115 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY:
(B) LOCATION:
(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

GCGGCCGCGG TCCAACCACC AATCTCAAAG CTTGGTACCC GGGAATTCAG 50

ATCTGCAGCA TGCTCGAGCT CTAGATATCG ATTCCATGGA TCCTCACATC 100

CCAATCCGCG GCCGC 115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 39 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY:
(B) LOCATION:
(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

GA GCT CGA GGC GGC CGC ACC ATG CCT GGG AAG ATG GTC GTG 41
Met Pro Gly Lys Met Val Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY:
(B) LOCATION:
(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

AA GTC GAC TTG CAA TTC TTT TAC 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 14 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

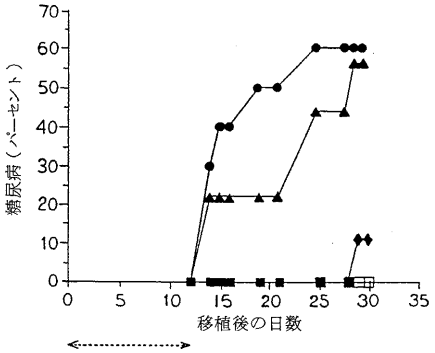
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY:
(B) LOCATION:
(D) OTHER INFORMATION:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

TCGACGCGGC CGCG 14

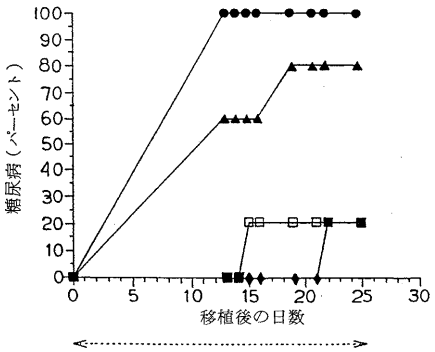
【図１】

FIG.1



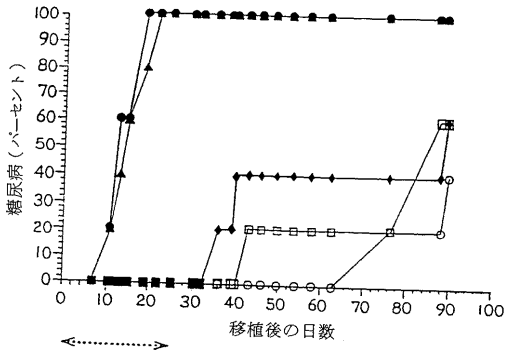
【図２】

FIG.2



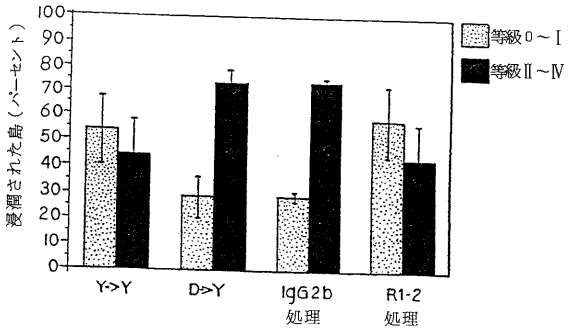
【図３】

FIG.3



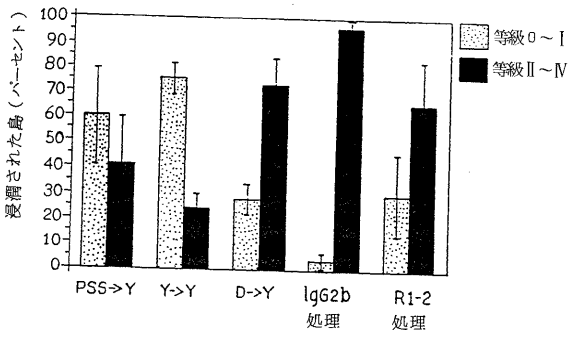
【図４】

FIG.4



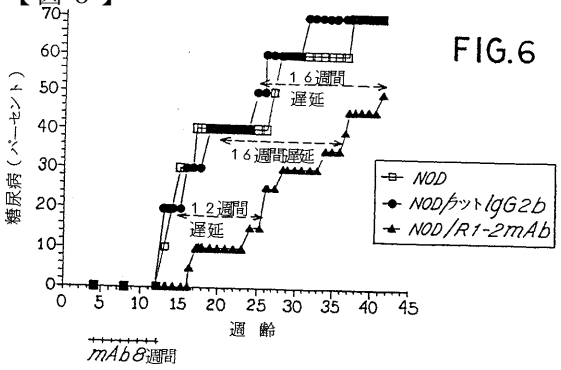
【図５】

FIG.5



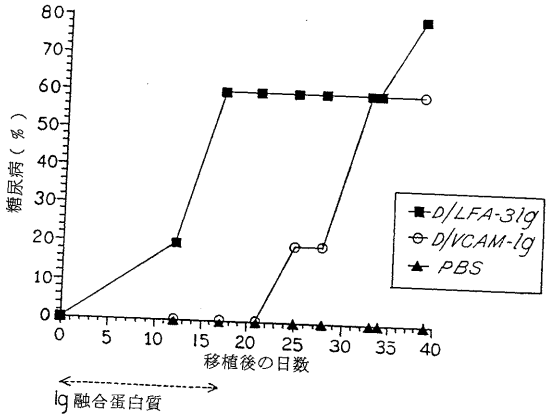
【図６】

FIG.6



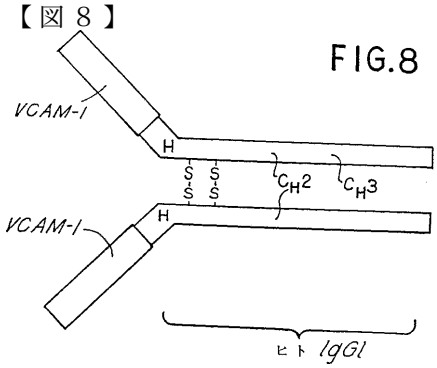
【図７】

FIG.7



【図８】

FIG.8



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI
(C12P 21/08	C12P 21/08
C12R 1:91)	C12P 21/08
	C12R 1:91

(56)参考文献 J.Biol. Chem., 1991, Vol.266, No.16, pp.10241-10245

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], DB名)
A61K 37/00 - 39/44
BIOSIS(DIALOG)