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

特許第4108572号
(P4108572)

(45)発行日　平成20年6月25日(2008.6.25)　(24)登録日　平成20年4月11日(2008.4.11)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61P 1/00	(2006.01)	A61K	39/395	N
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	1/00	
		A61P	29/00	

請求項の数 19　(全 14 頁)

(21)出願番号	特願2003-303345 (P2003-303345)
(22)出願日	平成15年8月27日 (2003.8.27)
(62)分割の表示	特願平5-514148の分割
原出願日	平成5年2月2日 (1993.2.2)
(65)公開番号	特開2004-2472 (P2004-2472A)
(43)公開日	平成16年1月8日 (2004.1.8)
審査請求日	平成15年8月27日 (2003.8.27)
審判番号	不服2007-9964 (P2007-9964/J1)
審判請求日	平成19年4月6日 (2007.4.6)
(31)優先権主張番号	835,139
(32)優先日	平成4年2月12日 (1992.2.12)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(73)特許権者　592221528
バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセッツ　０２１４２、ケンブリッジ、ケンブリッジ　センター　１４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】炎症性胃腸病の処置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

炎症性腸病に罹患した哺乳動物を処置するための医薬組成物であって、Ｖｅｒｙ　Ｌａｔｅ　Ａｎｔｉｇｅｎ－４（ＶＬＡ－４）インテグリンのα４サブユニットのＢ１エピトープに結合する抗体を含有する、医薬組成物。

【請求項２】

静脈内投与されるように処方される、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記抗－ＶＬＡ－４抗体が、ＨＰ１／２およびＨＰ２／１よりなる群から選択される、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項４】

前記抗－ＶＬＡ－４抗体が、ＨＰ１／２である、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項５】

炎症性腸病罹患者の体重に対し０．０５～５．０ｍｇ／ｋｇの抗体を与えるような投与量にて投与するように処方されている、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項６】

炎症性腸病罹患者の体重に対し０．５～２．０ｍｇ／ｋｇの抗体を与えるような投与量にて投与するように処方されている、請求項５に記載の医薬組成物。

【請求項７】

前記哺乳動物において１０～１５μｇ／ｍｌの抗体の血漿レベルを与えるのに有効な量に

て投与するように処方されている、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項８】
前記哺乳動物がヒトである、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項９】
前記哺乳動物が潰瘍性大腸炎の罹患者である、請求項８に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記哺乳動物がクローン病の罹患者である、請求項８に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
炎症性腸病の急性再発に際し投与するように処方される、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
炎症性腸病に罹患した哺乳動物を処置するための医薬組成物であって、哺乳動物を救助するのに有効な量の、Ｖｅｒｙ　Ｌａｔｅ　Ａｎｔｉｇｅｎ－４（ＶＬＡ－４）インテグリンのα４　サブユニットのＢ１エピトープに結合しうる抗体、組換抗体、キメラ抗体またはこれらの任意の組合せ物を含む、医薬組成物。
【請求項１３】
複数の抗－ＶＬＡ－４モノクローナル抗体をさらに含む、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記抗－ＶＬＡ－４の他に抗－ＥＬＡＭ－１抗体、抗－ＩＣＡＭ－１抗体、抗－ＶＣＡＭ－１抗体、抗－ＣＤＸ抗体、抗－ＬＦＡ－１抗体、抗－ＣＤ１８抗体またはこの種の抗体の組合せ物を含む、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記抗－ＶＬＡ－４抗体が、ＨＰ１／２である、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
炎症性腸病罹患者の体重に対し０．０５～５．０ｍｇ／ｋｇの抗体を投与するように処方される、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
炎症性腸病罹患者の体重に対し０．５～２．０ｍｇ／ｋｇの抗体を投与するように処方される、請求項１６に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
哺乳動物において１０～１５μｇ／ｍｌの抗体の血漿レベルを与えるのに有効な量にて投与するように処方されている、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
炎症性腸病における炎症性腸病組織の急性炎症を有意に低減するのに有効な医薬組成物であって、医薬上許容しうるキャリヤ中のＶＬＡ－４のα４サブユニットのＢ１エピトープを認識するモノクローナル抗体からなる、医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は炎症性腸病（ＩＢＤ）の処置に関するものである。より詳細には本発明は、ＩＢＤの処置に際しインテグリンＶＬＡ－４（ｖｅｒｙ　ｌａｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ－４）を認識する抗体の使用に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
炎症性腸病（すなわちＩＢＤ）は潰瘍性大腸炎およびクローン氏病（Ｃｒｏｈｎ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）（回腸炎）を包含する総合的な名称であり、これらは胃腸管の慢性炎症障害である。潰瘍性大腸炎は大腸（結腸）および直腸に限られ、腸壁部の内表層のみに関係する。クローン氏病は胃腸管の任意の部分（すなわち口、食道、胃、小腸、大腸、直腸および肛門）に影響を与え、腸壁部の全層に関与する。これら両病気は腹痛、並びに痙攣、下痢、直腸出血および発熱を特徴とする。これら病気の徴候は一般に進行性であって、

罹患者は典型的には寛解期の後に重大な再発を受ける。

【０００３】

ＩＢＤは米国だけでも２００万人が推定される。ＩＢＤは致命的な病気でないと考えられるが、長期間にわたる病気は生長に影響を及ぼす重大な栄養障害をもたらし或いは膿瘍または腸瘢痕組織を形成して感染もしくは腸障害を引き起こす。

【０００４】

ＩＢＤは療法がなく、正確なＩＢＤの原因はまだ知られていない。慣用のＩＢＤ処置は抗炎症剤、免疫抑制剤および外科手術を含む。生物活性の５－アミノ－サリチル酸（５－ＡＳＡ）成分を含有するサルファサラジンおよび関連薬剤が、軽度のＩＢＤ徴候を抑制すると共に寛解傾向を維持すべく使用される。しばしば、重度の炎症は強力なコルチコステロイドおよびしばしばＡＣＴＨにより或いはたとえば６－メルカプトプリンおよびアザチオプリンのような免疫抑制剤で処置される。重度の慢性ＩＢＤに最も一般的な外科処置は腸切除および最終的に結腸切除術であるが、潰瘍性大腸炎についてのみ完全な療法である。

【０００５】

ＩＢＤにつき一般的に処方される薬物については嘔気、眩暈、血液化学変化（貧血および白血球減少症を含む）、皮膚発疹および薬物依存症を含め重大な副作用が伴う。さらに外科処置は、しばしば患者の日常生活を顕著に変化させるような急激な手法である。したがって、有効であって副作用が少なく、ＩＢＤ患者の人体および生活面を大して侵害しないようなＩＢＤの処置が極めて必要になる。

【０００６】

ＩＢＤの原因およびより効果的な処置に関する探求は、多くの研究者を発病および正常な組織につき細胞レベルで研究するに至らしめた。これは腸内ムチンの正常な含有量の変化に関する観察（ポドルスキー、非特許文献１）をもたらし、さらに結腸糖蛋白が発病組織にのみ生ずるという観察（ポドルスキーおよびフールニエール、非特許文献２および非特許文献３）をもたらした。研究者等は、ＩＢＤ組織にて細胞付着分子ＩＣＡＭ－１が高レベルで発現されることを観察した（マリチア等、非特許文献４）。この分子は全ゆる白血球における白血球表面リガンド、すなわちＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８複合体）および大食細胞におけるＭａｃ－１（ＣＤ１１ｂ／ＣＤ１８）に対する付着を介し、炎症部位への白血球補充を媒介すると思われる（たとえばスプリンガー、非特許文献５参照）。ＩＢＤの再発はしばしば腸粘膜化組織における好中球およびリンパ球の濃度増大を伴うので、内皮細胞リセプタ（たとえばＩＣＡＭ－１）とその白血球リガンド（たとえばＬＦＡ－１、Ｍａｃ－１）との間の相互作用を阻止することがＩＢＤの処置として提案されている。

【０００７】

他の細胞付着分子、すなわちＶＣＡＭ－１（ｖａｓｃｕｌａｒ　ｃｅｌｌ　ａｄｈｅｓｉｏｎ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ－１）は炎症した内皮で発現され、好中球以外の全白血球の表面で発現されるα$_4$　β$_1$　インテグリン、すなわちＶＬＡ－４を認識することが示されている（特許文献１、非特許文献５、およびウェラー等、非特許文献６参照）。さらにＶＣＡＭ－１は、パイヤース斑小胞樹状細胞（Ｐｅｙｅｒ’ｓ　ｐａｔｃｈ　ｆｏｌｌｉｃｕｌａｒ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌ）を含め非炎症細胞で構成的に発現されることも判明している（フリードマン等、非特許文献７；ライス等、非特許文献８）。さらに、細胞付着現象を媒介する他、ＶＣＡＭ－１はさらにＴ細胞活性化においてＶＬＡ－４を介し重大な役割を演ずることも最近決定された（バークリー等、非特許文献９；ダムレおよびアルフォ、非特許文献１０；バン・セベンター等、非特許文献１１）。したがって、ＶＣＡＭ－１が免疫反応の調整剤として或いはインビボにおける付着の媒体として役割を演ずるかどうか検討すべく、ＶＣＡＭ－１のさらなる検討が行われている。

【０００８】

驚くことに今回、抗－ＶＬＡ－４抗体を投与すればＩＢＤの霊長動物モデルにて急性炎症を顕著に減少させることが突き止められた。抗－ＶＬＡ－４抗体（ＨＰ１／２）で処置

された人間における潰瘍性大腸炎に匹敵する自然の腸炎症に罹患した綿毛シシザルは、生検腸組織の炎症において顕著な減少を示した。

【特許文献１】国際特許公開第９２／００７５１号
【非特許文献１】D. Podolsky, "Colonic Glycoproteins in Ulcerative Colitis: Potential Meaning in Heterogeneity," Inflammatory Bowel Diseases: Basic Research and Clinical Implications, Falk Symposium, Titisee, Germany, June 7－9, 1987 (Kluwer Academic Publishers;Boston 1987) pp. 449－56.
【非特許文献２】D. Podolsky and D. Fournier, "Alterations in Mucosal Content of Colonic Glycoconjugates in Inflammatory Bowel Disease Defined by Monoclonal Antibodies," Gastroenterology, 95, pp. 379－87 (1988).
【非特許文献３】D. Podolsky and D. Fournier, "Emergence of Antigenic Glycoprotein Structures in Ulcerative Colitis Detected Through Monoclonal antibodies," Gastroenterology, 95, pp. 371－8 (1988).
【非特許文献４】G. Malizia et al., "Expression of Leukocyte Adhesion Molecules by Mucosal Mononuclear Phagocytes in Inflammatory Bowel Disease," Gastroenterology, 100, pp. 150－9 (1991).
【非特許文献５】T. Springer, "Adhesion Receptors of the Immune System," Nature, 346, pp. 425. 34 (August 1990).
【非特許文献６】P. Weller et al., "Human Eosinophil Adherance to Vascular Endothelium Mediated by Binding to Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, pp. 7430－7433 (1991).
【非特許文献７】A. Freedman et al., "Adhesion of Human B Cells to Germinal Centers in Vitro Involves VLA－4 and INCAM－110," science, 249, pp. 1030－33 (1990).
【非特許文献８】G. E. Rice et al., "Vascular and Nonvascular Expression of INCAM－110," Amer, J. Pathology, 138(2), pp. 385－93 (1991).
【非特許文献９】L. Burkly, at al., "Signaling by Vascular Cell Adhesion Molecule－1 (VCAM－1) Through VLA－4 Promotes CD3－dependent T Cell Proliferation," Eur. J. Immunol., 21, pp. 2871－75 (1991).
【非特許文献１０】N. Damle and A. Aruffo, "Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Induces T－cell Antigen Receptor－dependent Activation

of CD4+ T Lymphocytes," Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 88, pp.6403−7 (1991).
【非特許文献11】G. van Seventer et al., "Analysis of T Cell Stimulation by Superantigen Plus Major Histocompatibility Complex Class II Molecules or by CD3 Monoclonal Antibody: Costimulation by Purified Adhesion Ligands VCAM−1, ICAM−1, but Not ELAM−1," J. Exp. Medicine, 174, pp. 901−13 (1991).
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【0009】
したがって本発明はＩＢＤの新規な処置法を提供し、さらにＩＢＤの処置に有用な新規な医薬組成物を提供する。特に本発明は、ＩＢＤ罹患者に対したとえば抗体ＨＰ１／２のような抗−ＶＬＡ−４抗体を投与する工程からなる方法を提供する。さらにＩＢＤの処置にて、抗−ＶＬＡ−４抗体の作用に類似する同様な抗体、抗体断片、可溶性蛋白質および小分子の使用も考えられる。
【課題を解決するための手段】
【0010】
本発明の方法はＶＬＡ−４（すなわち大抵の種類の白血球で発現されて消化管における内皮および他の組織への白血球付着に関与する表面分子）を認識する抗体、ポリペプチドまたは他の分子を投与することからなっている。
【発明を実施するための最良の形態】
【0011】
モノクローナル抗体を産生する技術は周知されている。要するに、不死細胞ライン（典型的には骨髄腫細胞）を所定の抗原（たとえばＶＬＡ−４）を発現する全細胞で免疫化された哺乳動物からのリンパ球（典型的には脾細胞）に融合させ、得られたハイブリドーマ細胞の培養上澄液を抗原に対する抗体につきスクリーニングする（一般にコーラーおよびミルスタイン、Kohler and Milstein, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," Nature, 256, pp.495−7 (1975)）。
【0012】
免疫処理は標準法を用いて行うことができる。単位投与量および免疫処方は免疫処理する哺乳動物の種類、その免疫状態、哺乳動物の体重などに依存する。典型的には免疫処理された哺乳動物を出血させ、各血液試料からの血清を適するスクリーニング分析により特定抗体につき分析する。たとえば、抗−ＶＬＡ−４抗体はＶＬＡ−４−発現性細胞からの^{125}Ｉ−標識細胞溶解物の免疫沈澱によって同定することができる（サンチェズ・マドリード等、F. Sanchez−Madrid et al., "VLA−3: A novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization," Eur. J, Immunol., 16, pp.1343−9 (1986). およびヘムラー等、M. E. Hemler et al., "Characterization of the Cell Surface Heterodimer VLA−4 and Related Peptides," J. Biol. Chem., 262(24), pp.11478−85 (1987). 参照）。抗−ＶＬＡ−４抗体はさらにフロー・サイトメトリーにより、たとえばＶＬＡ−４を認識すると思わ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して同定することも

できる（エリス等、M. Elices et al., "VCAM-1 on Activated Endothelium Interacts with the Leukocyte Integrin VLA-4 at a Ste Distinct from the VLA-4/Fibronectin Binding Site," Cell, 60, pp. 577-84 (1990). 参照）。ハイブリドーマ細胞の産生に使用されるリンパ球は典型的には、血清が抗－ＶＬＡ－４抗体の存在につき上記スクリーニング分析により陽性と既に試験されている免疫処理された哺乳動物から分離される。

【００１３】

典型的には、不死細胞系統（たとえば骨髄腫細胞系統）は同じ哺乳動物種からリンパ球として得られる。好適な不死細胞系統はマウス骨髄腫細胞系統であってヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含有する培地（「ＨＡＴ培地」）に対し感受性である。ＨＡＴ－感受性マウス骨髄腫細胞は、たとえば１５００分子量ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ１５００」）を用いてマウス脾細胞に融合させることができる。融合から得られたハイブリドーマ細胞を、次いで未融合および非産生的に融合した骨髄腫細胞を死滅させるＨＡＴ培地を用いて選択する（未融合の脾細胞は形質転換されないので数日間後に死滅する）。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澄液のスクリーニングにより検出する。たとえば抗－ＶＬＡ－４抗体を産生するよう作成したハイブリドーマは、ハイブリドーマ培養上澄液をたとえばトランスフェクトされたＫ－５６２細胞のような組換α_4 －サブユニット－発現性細胞系統に結合する能力を持った分泌抗体について試験しスクリーニングすることができる（上記エリス等の文献参照）。

【００１４】

抗－ＶＬＡ－４抗体を産生させるには、この種のスクリーニング分析にて陽性と試験されたハイブリドーマ細胞を、これらハイブリドーマ細胞がモノクローナル抗体を培地中に分泌する条件下および充分な時間にて栄養培地で培養する。ハイブリドーマ細胞に適する組織培養技術および培地は周知されている。細胞を除いたハイブリドーマ培養上澄液を集め、必要に応じ抗－ＶＬＡ－４抗体をさらに周知の方法で精製することができる。

【００１５】

或いは所望の抗体は、ハイブリドーマ細胞を２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（プリステイン（ＰＲＩＳＴＡＮＥ）；シグマ・ケミカル・カンパニー社、セントルイス、ＭＯ）で処理されたマウスの腹腔内に注射して産生することもできる。ハイブリドーマ細胞は腹腔内で増殖して抗体を分泌し、腹液として蓄積する。この抗体を、腹腔から注射器により腹液を抜取ることにより回収することができる。

【００１６】

従来、数種の抗－ＶＬＡ－４モノクローナル抗体が記載されている（たとえば上記サンチェズ・マドリード等、ヘムラー等の文献、もしくはプリド等、R. Pulido et al., "Functional Evidence for Three Distinct and Independently Inhibitable Adhesion Activities Mediated by the Human Integrin VLA-4," J. Biol. Chem., 266(16), pp. 10241-5 (1991). 参照）。ここでの実験については、ＨＰ１／２と称する抗－ＶＬＡ－４モノクローナル抗体（バイオジェン・インコーポレーション社、ケンブリッジ、ＭＡから入手）を使用した。抗－ＶＬＡ－４抗体ＨＰ１／２の重鎖および軽鎖の可変領域をクローン化し、配列決定し、さらにヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の定常領域と組合せて発現させた。この種のキメラＨＰ１／２抗体は特異性および能力においてネズミＨＰ１／２抗体と類似し、本発明による処置方法に有用である。同様に、人体適応化した組換抗－ＶＬＡ－４抗体もこれら方法に有用である。ＨＰ１／２ V_H ＤＮＡ配列およびその翻訳アミノ酸配列をそれぞれＳＥＱ ＩＤＮＯ：１およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２に示す。ＨＰ１／２ V_K ＤＮＡ配列およびその翻訳アミノ酸配列をそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４に示す。

【００１７】
たとえばＨＰ１／２のようなモノクローナル抗体およびＶＬＡ－４のα鎖を認識しうる他の抗－ＶＬＡ－４抗体（たとえばＭａｂ　ＨＰ２／１、ＨＰ２／４、Ｌ２５、Ｐ４Ｃ２）が本発明に有用である。抗体はＶＬＡ－α_4　鎖のＢ１もしくはＢ２エピトープを認識することが最も好ましい（上記プリド等の文献参照）。特定の科学理論に拘束されるものでないが、本発明の方法により使用される抗－ＶＬＡ－４抗体は少なくとも初期にわたり消化管の炎症部分へのＶＬＡ－４－発現性白血球の移動を特異的に阻止することができる。或いは、ＩＢＤ組織に既に補充された白血球による炎症媒体およびサイトカインの放出を何らかのＶＣＡＭ－１－媒介信号導入（たとえば従来観察されているＴ－細胞同時活性化）を妨げる抗－ＶＬＡ－４抗体により阻止することができる（たとえば上記非特許文献９）。モノクローナル抗体ＨＰ１／２は、ＶＣＡＭ－１－発現性細胞に対する白血球付着を阻止し、ＶＬＡ－４－媒介のＴ－細胞活性化を促進しないことが示されている。

【００１８】
本発明の方法は、炎症性腸病に罹患している哺乳動物に抗－ＶＬＡ－４抗体からなる組成物を投与することを特徴とする。後記実施例は綿毛シシザルで観察された結果を示す。綿毛シシザル（ＣＴＴ）とＩＢＤヒトとで観察された自然の慢性広汎性大腸炎の間には生理学的および組織化学的な類似性が示されている（たとえばポドルスキー等、Ｄ．Ｐｏｄｏｌｓｋｙ，ｅｔ　ａｌ．，”Ｃｏｌｏｎｉｃ　Ｍｕｃｉｎ　Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｐｒｉｍａｔｅｓ　Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ　Ａｌｔｅｒａｔｉｏｎｓ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｗｉｔｈ　Ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ　Ｃｏｌｉｔｉｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｃｏｔｔｏｎ－ｔｏｐ　Ｔａｍａｒｉｎ，”　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ，　８８，　ｐｐ．２０－５　（１９８５）；ポドルスキー等、Ｄ．Ｐｏｄｏｌｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，”Ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ　Ｃｏｌｉｔｉｓ　Ｉｎ　Ｃｏｔｔｏｎ－Ｔｏｐ　Ｔａｍａｒｉｎｓ：　Ｈｉｓｔｏｌｏｇｉｃ，　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｆｅａｔｕｒｅｓ　ｏｆ　ａｎ　Ａｎｉｍａｌ　Ｍｏｄａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｎｉｃ　Ｃｏｌｉｔｉｓ，”　Ｄｉｇｅｓｔｉｖｅ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　ａｎｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　３０（４），　Ａｂｓｔｒａｃｔ，　ｐ．３９６　（１９８５）．参照）。従来の研究は、ヒトＩＢＤの処置で使用される治療化合物に対してＣＴＴは同等な反応を示している（たとえばマダラ等、Ｊ．Ｍａｄａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，”Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ　Ｃｏｌｉｔｉｓ　ｉｎ　Ｃｏｔｔｏｎ－Ｔｏｐ　Ｔａｍａｒｉｎ　（Ｓａｑｕｉｎｕｓ　ｏｅｄｉｐｕｓ）　ａｎｄ　Ｉｔｓ　Ｒｅｓｐｏｎｓｅ　ｔｏ　Ｓｕｌｆａｓａｌａｚｉｎｅ，”　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ，　８８，　ｐｐ．１３－１９　（１９８５）参照）。したがって、ここに示した結果は、ＩＢＤに罹患した人間を含む全ゆる哺乳動物に適切でありかつ適用することができ、本発明の方法がこれに有用である。

【００１９】
本発明にしたがって投与される抗－ＶＬＡ－４抗体は、慢性ＩＢＤ罹患者に予防的に投与して病気の寛解傾向をもたらし或いは維持しうるが、好ましくは本発明の方法は病気の急性再発を処置すべく使用される。

【００２０】
抗－ＶＬＡ－４抗体は、抗－ＶＬＡ－４抗体と医薬上許容しうるキャリヤとからなる組成物として投与することができる。好ましくは、組成物は静脈内注射に適する形態である。潰瘍性大腸炎またはクローン氏病の急性再発については０．０５～５．０ｍｇ／患者１ｋｇ／１日（好ましくは０．５～２．０ｍｇ／患者１ｋｇ／１日）の投与量で使用されるが、それより多量もしくは少量の投与も患者の年齢、感受性、耐性および他の特性、再発の急性程度、病気の履歴および過程、用いる抗体の血漿レベルおよび半減期、並びにその認識部位に対する親和性、さらに担当医により日常的に考えられる他の同様な因子を考慮して指示することができる。活発な病気からの寛解傾向に維持するには０．０５～５．０ｍｇ／患者１ｋｇ／１日（好ましくは０．５～２．０ｍｇ／患者１ｋｇ／１日）を使用し得るが、それより多量もしくは少量の投与も患者の年齢、感受性、耐性および他の特性、

再発のパターン、病気の履歴および経過、用いる抗体の血漿レベルおよび半減期、並びにその認識部位に対する親和性、並びに他の同様な担当医により日常的に考えられる因子を考慮して指示し、或いは用いることができる。たとえば投与量を調整して、抗体の特定血漿レベルをたとえばネズミ抗体につき５～３０μｇ／ｍｌ、より好ましくは１０～１５μｇ／ｍｌの範囲にすると共に、このレベルをたとえば所定期間（たとえば１週間）にわたり或いは臨床結果が得られるまで（たとえば再発が静まるまで）維持することができる。より緩徐に消費されると思われるキメラ抗体および人体適応抗体では、有効血漿レベルを維持するには、より低い投与量でよい。さらにＶＬＡ－４に対し高い親和性を有する抗体もしくは断片は、より低い親和性の抗体もしくは抗体断片よりも回数を少なく或いは投与量を少なくして投与する必要がある。

【００２１】

適する医薬キャリヤはたとえば無菌塩水、生理緩衝溶液などを包含する。医薬組成物はさらに、活性成分の放出を調節するよう或いは患者人体におけるその存在を長期化させるよう処方することもできる。多くの適する薬剤供給系はこの目的につき公知であり、たとえばハイドロゲル、ヒドロキシメチルセルロース、マイクロカプセル、リポソーム、マイクロエマルジョン、微小球などを包含する。燐酸塩緩衝塩水（ＰＢＳ）が注射用組成物につき好適なキャリヤである。

【００２２】

さらに本発明の目的には、ＶＬＡ－４のα_4 サブユニットに結合しうる抗体を用いねばならない。モノクローナル抗体を使用することが好ましい。

【００２３】

天然産の抗体の他に、ＶＬＡ－４に結合しうる適する組換抗体も代替として使用することができる。この種の組換抗体は、組換ＤＮＡ技術によりたとえば宿主細胞を所望抗体の軽鎖および重鎖免疫グロブリン鎖をコードするＤＮＡを含有した適する発現ベクターで形質転換して産生された抗体、並びに抗－ＶＬＡ－４抗体の重鎖および／または軽鎖のヒンジ領域および定常領域の１部または全部が異なる種の免疫グロブリン軽鎖もしくは重鎖の対応領域で置換されている組換キメラ抗体を包含する（すなわち、投与抗体に対する免疫反応を最小化させるため、処置されるＩＢＤ罹患者と同じ種が好ましい）（たとえばジョーンズ等、P. Jones et al., "Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody with Those From a Mouse," Nature, 321, pp. 522-25 (1986)．、ワード等、E. Ward et al., "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From Escherichia coli," Nature, 341, pp. 544-6 (1989)および米国特許第４，８１６，３９７号（ボス等）参照、これら全てを参考のためここに引用する）。ここで特に考えられる組換抗体はＣＤＲ－グラフト抗体もしくは「人体適応」抗体を包含し、ここでたとえばネズミ抗体の超可変領域はたとえばヒト抗体の骨格領域にグラフトされる（たとえばリーチマン等、L. Riechmann et al., "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature, 332, pp. 323-7 (1988)．；マン・サング・コ等、Man Sun Co et al., "Humanized Antibodies for Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88`, PP 2869-73 (1990)．；ブラウン・ジュニア、P. Brown, Jr. et al., "Anti-Tac-H, a Humanized Antibody to the Interleukin 2 Receptor, Prolongs Primate Cardiac Allograft Survival," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, pp. 2663-7 (1990)．参照）。

【００２４】
さらに抗－ＶＬＡ－４抗体のＶＬＡ－４－結合性断片、たとえばＦａｂ、Ｆａｂ′、Ｆ（ａｂ′）$_2$、およびＦ（ｖ）断片；重鎖モノマーもしくはダイマー；軽鎖モノマーもしくはダイマー；並びに１個の重鎖と１個の軽鎖とよりなるダイマーもここで考えられる。この種の抗体断片は、化学法によりたとえば完全抗体をたとえばヘプシンもしくはパパインのようなプロテアーゼで切断して、或いは組換ＤＮＡ技術によりたとえば端を切り取った重鎖および／または軽鎖遺伝子で形質転換された宿主細胞を用いて産生させることができる。重鎖および軽鎖モノマーは同様に、完全抗体をたとえばジチオスレイトールもしくはβ－メルカプトエタノールのような還元剤で処理して、或いは所望の重鎖もしくは軽鎖またはその両者のいずれかをコードするＤＮＡにより形質転換された宿主細胞を用いて産生させることができる。

【００２５】
ハイブリドーマ技術に対する代案として、所望の抗－ＶＬＡ－４特異性を有する抗体断片をファージクローニング法によって分離することもできる（たとえばクラックソン等、Ｔ．Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，”Ｍａｋｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｕｓｉｎｇ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ，” Ｎａｔｕｒｅ，３５２，ｐｐ．６２４－２８（１９９１）参照）。

【００２６】
さらに上記の検討から明らかなように、ＶＬＡ－４／ＶＣＡＭ－１相互作用を抑制し或いはＶＣＡＭ－１－媒介信号導入を抑制するのに充分な特異性を以てＶＬＡ－４に結合する他のポリペプチドおよび分子も、抗－ＶＬＡ－４抗体と同様にＩＢＤの処置に有効である。たとえば可溶型のＶＣＡＭ－１（たとえばオスボーン等、Ｌ．Ｏｓｂｏｒｎ ｅｔ ａｌ．，”Ｄｉｒｅｃｔ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｃｌｏｎｉｎｇ ｏｆ Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １，ａ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ－ｉｎｄｕｃｅｄ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｔｈａｔ Ｂｉｎｄｓ ｔｏ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ，” Ｃｅｌｌ，５９，ｐｐ．１２０３－１１（１９８９）．参照）またはその断片をＶＬＡ－４結合部位に競合するよう投与することにより、抗－ＶＬＡ－４抗体の投与と同様な効果をもたらすこともできる。ＶＬＡ－４リガンドの結合領域に類似すると共にＶＬＡ－４のリセプタ領域に適合する小分子も用いることができる（デブリン等、Ｊ．Ｄｅｖｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，”Ｒａｎｄｏｍ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ：Ａ Ｓｏｕｒｃｅ ｏｆ Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，” Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９，ｐｐ．４００－４０６（１９９０）．、スコットおよびスミス、Ｊ．Ｓｃｏｔｔ ａｎｄ Ｇ．Ｓｍｉｔｈ，”Ｓｅａｒｃｈｉｎｇ ｆｏｒ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｌｉｇａｎｄｓ ｗｉｔｈ ａｎ Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｌｉｂｒａｒｙ，” Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９，ｐｐ．３８６－９０（１９９０）．、並びに米国特許第４，８３３，０９２号（ゲイセン）参照、これら全てを参考のためここに引用する）。処置患者におけるＩＢＤ組織の炎症を効果的に減少させるこの種のＶＬＡ－４－結合性ポリペプチドもしくは分子の使用がＩＢＤの処置につき代案方法として考えられる。

【００２７】
さらに、抗－ＶＬＡ－４抗体をＩＢＤに対し治療効果を有する他の抗体と組合せて使用しうることも考えられる。たとえば、ここに報告した有利な効果が内皮に対する白血球補充の抑制に基づく範囲で、抗－ＶＬＡ－４抗体を白血球抗原と内皮細胞リセプタ分子との間の付着を阻害する他の抗体と組合せることが有利である。たとえば本発明により抗－ＶＬＡ－４抗体を使用する他に、抗－ＥＬＡＭ－１抗体、抗－ＶＣＡＭ－１抗体、抗－ＩＣＡＭ－１抗体、抗－ＣＤＸ抗体、抗－ＣＤ１８抗体および／または抗－ＬＦＡ－１抗体の使用も有利である。

【００２８】
適するビヒクルにて処方する場合、ここで考えられる医薬組成物はたとえば経口、食道内もしくは鼻腔内、さらに皮下、筋肉内、静脈内、動脈内もしくは非経口のような任意適

する手段により投与することができる。通常の静脈内（ｉ．ｖ．）または非経口投与が再発症状を処置するのに好適であり、調時放出ビヒクルにおける経口投与が寛解傾向を維持するのに好適である。

【００２９】

本発明による方法の結果としてのＩＢＤ患者の改善は、当業界における実務者に知られた多くの方法で評価することができる。たとえばトルーロープ・ウイッツの基準（Ｔｒｕｅｌｏｖｅ－Ｗｉｔｔｓ ｃｒｉｔｅｒｉａ）（たとえばリヒチガー等、Ｓ．Ｌｉｃｈｔｉｇｅｒ ａｎｄ Ｄ．Ｐｒｅｓｅｎｔ，”Ｐｒｅｌｉｍｉｎａｒｙ Ｒｅｐｏｒｔ：Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎ ｉｎ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｓｅｖｅｒｅ Ａｃｔｉｖｅ Ｕｌｃｅｒａｔｉｖｅ Ｃｏｌｉｔｉｓ，” Ｌａｎｃｅｔ，３３６，ｐｐ．１６－１９（１９９０）．参照）のような観察される徴候の改善を用いることができ、或いは結腸組織の試料を生検して組織学的に特性化することもできる（たとえば上記マダラ等の文献参照）。

【００３０】

以下、限定はしないが実施例により本発明の方法および組成物につきさらに説明する。

【実施例】

【００３１】

実施例１

結腸におけるＶＣＡＭ－１発現

白血球付着に関与する内皮細胞表面蛋白質の発現に活性ＩＢＤが関係するかどうかを決定するため実験を行なった。ＩＢＤ罹患者の結腸組織におけるＶＣＡＭ－１の発現を正常もしくは無関係の結腸組織を対照に評価した。ヒト結腸鏡生検組織試料を患者の同意により得、ＯＣＴコンパウンド（ティシューテク社）に装着すると共にイソペンタン／液体窒素で急速凍結することにより凍結切片として作製した。ヒト結腸試料を正常結腸、活性の潰瘍性大腸炎結腸（ＵＣ－活性）、不活性の潰瘍性大腸炎結腸（ＵＣ－不活性）、無関係の潰瘍性大腸炎結腸（ＵＣ－無関係）、活性クローン氏病結腸（ＣＤ－活性）および無関係のクローン氏病結腸（ＣＤ－無関係）から得た。

【００３２】

凍結切片（～４μ）をゼラチン被覆されたスライド（１％ゼラチン、６０℃で１～２分間加熱、風乾、室温にて１％ホルムアルデヒド、風乾）に載せ、３０分間にわたり風乾し、アセトンで４℃にて１０分間固定し、ＰＢＳで３回洗浄し、次いでメタノール中で０．３％H_2O_2により処理した（３０分間、室温）。次いでスライドをＰＢＳで３０分間洗浄し、希釈正常ヒト血清（１：１００）と共にインキュベートし、さらにジョーン・ハーラン博士から供与された抗－ＶＣＡＭ－１抗体４Ｂ９（１：１００）と共に室温にて６０分間インキュベートした。対照スライドを抗－牛血清アルブミン（抗－ＢＳＡ）抗体（シグマ・ケミカル・カンパニー社、セントルイス、ＭＯ）と共にインキュベートした。次いで試料をＰＢＳで１０分間洗浄し、第２のビオチニル化されたウサギ抗－マウス免疫グロブリン（ダコ・コーポレーション社、サンタ・バーバラ、ＣＡ）と共に室温にて６０分間インキュベートし、次いでアビジン結合のペルオキシダーゼ（ベクタステイン（ＶＥＣＴＡＳＴＡＩＮ）、ベクター・ラブス社、バーリンガム、ＣＡ）を用いて可視化させた。

【００３３】

これら試験の結果を次表１に示す。

【表１】

ヒト組織における内皮細胞染色

	ＶＣＡＭ－１　発現	
組織（ｎ）	ｎ	（％）
正常（１１）	６	（５４．４）
ＵＣ活性（２３）	１４	（６０．９）
ＵＣ不活性（８）	５	（６２．５）
ＵＣ無関係（１０）	４	（４０．０）
ＣＤ活性（９）	５	（５５．５）
ＣＤ無関係（１２）	７	（５８．３）

これらデータは、たとえば上記非特許文献７や８により報告されたようなＶＣＡＭ－１がＩＢＤに関与する結腸組織と正常な結腸組織との両者にて発現されるという観察を確認する。ＣＤ組織およびＵＣ組織の両者にて、ＶＣＡＭ－１は免疫細胞化学により試料の約６０％で観察された。

【００３４】

実施例２

ＣＴＴ白血球の抗－ＶＬＡ－４抗体認識

ＣＴＴ白血球におけるエピトープを認識するかどうかを確認するため、抗－ＶＬＡ－４モノクローナル抗体（ＨＰ１／２、バイオジェン・インコーポレーション社、ケンブリッジＭＡから入手）を試験した。

【００３５】

ＣＴＴからの血液試料（３ｍｌ）をヘパリン処理すると共にＣＴＴ末梢血液単核白血球（ＰＢＬ）をヒトＰＢＬを分離する製造業者の指示に従いフィコール・ハイパック濃度勾配（Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ　ｇｒａｄｉｅｎｔ）（ファルマシア社）により分離した。ＣＴＴ　ＰＢＬを、ベクトン・ジケンソンＦＡＣＳ技術（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ　ＦＡＣＳｔａｒ）および標準技術を用いＦＡＣＳ分析によってネズミ抗－ヒトＶＬＡ－４モノクローナル抗体ＨＰ１／２およびＨＰ２／１に対し結合する能力につき検査した（たとえばロブ等、Ｒ．　Ｌｏｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，”Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎｄ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　Ｓｏｌｕｂｌｅ　Ｆｏｒｍ　ｏｆ　Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ－Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　Ａｄｈｅｓｉｏｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌｅ　ｌ，”　Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　１４７（１），ｐｐ．１２４－２９　（１９９１）．参照）。両モノクローナル抗体はＣＴＴ　ＰＢＬに結合し、このことはヒトおよびＣＴＴの両ＶＬＡ－４がこれら２種の抗体により認識される同様なエピトープを有することを示す。

【００３６】

さらにＣＴＴ　ＰＢＬは固定化された組換可溶性ヒトＶＣＡＭ－１（バイオジェン・インコーポレーション社）で被覆されたマイクロタイター板に付着することも観察され、この結合はＨＰ１／２およびＨＰ２／１により阻止された。これらの結果は、ＣＴＴ　ＰＢＬがＶＬＡ－４に依存してＶＣＡＭ－１に結合することを示し、さらにＨＰ１／２およびＨＰ２／１がＣＴＴ　ＶＬＡ－４とヒトＶＣＡＭ－１との相互作用を阻止することを示す（ロブ等、Ｒ．　Ｌｏｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，”Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎｄ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　Ｓｏｌｕｂｌｅ　Ｆｏｒｍ　ｏｆ　Ｖａｓｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　Ａｄｈｅｓｉｏｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌｅ　１，

”　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　Ｒｅｓ．　Ｃｏｍｍｕｎ．，　１７８（３），　ｐｐ．１４９８－１５０４　（１９９１）．参照）。

【００３７】

実施例３

綿毛シシザルの試験

抗－ＶＬＡ－４抗体、ＨＰ１／２（ＩｇＧ１）の無菌塩水における保存溶液およびプラシーボ対照（塩水のみ）を自然の大腸炎の徴候（すなわち下痢など；上記マダラ等の文献参照）を示す１０匹の綿毛シシザル（ＣＴＴ）に投与すべく作製した。５匹のＣＴＴにＨＰ１／２を接種すると共に、残り５匹にはプラシーボを静脈内注射により接種した。毎日１ｍｇ　ＨＰ１／２（すなわちＣＴＴの体重約５００ｇに対し約２ｍｇ／ｋｇ／１日）を８日間で（試験の０日、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日目）、ＣＴＴにＨＰ１／２を注射した。各動物から結腸組織試料を１日おきに（試験の０日、２日、４日、６日、８日および１０日目）生検した。

【００３８】

生検から得られたデータを用いて各動物につき急性炎症指数を決定し、これは大腸炎の経過の半定量的分析を示す（上記マダラ等の文献参照）。試験開始前（０日目）および試験の終了（１０日目）における炎症指数を下表２に示す（「処理ＣＴＴ」は抗体ＨＰ１／２を接種し；「比較ＣＴＴ」はプラシーボを接種した）。

【表２】

	０日目	１０日目
処理ＣＴＴ	ＡＩＩ*	ＡＩＩ
１	２	０
２	１	０
３	１	０
４	２	０
５	２	１
平均	１．６	０．２
対照ＣＴＴ		
Ｃ１	２	０
Ｃ２	２	１
Ｃ３	１	１
Ｃ４	２	２
Ｃ５	２	２
平均	１．８	１．２

註＊ＡＩＩ＝急性炎症指数

これらの結果は、抗－ＶＬＡ－４抗体による処理が急性炎症指数における有意（ｐ＜０．０１）の減少を与えたことを示す。

【００３９】

実施例４

実施例３に記載した試験を１４匹のＣＴＴを用い、７匹にＨＰ１／２を接種し、７匹にプラシーボを接種して繰り返した。０日目から１０日目に至る急性炎症指数の変化を表３に示す。

【表３】

	０日目	１０日目
処理ＣＴＴ	ＡＩＩ	ＡＩＩ
６	２	０
７	２	０
８	２	０
９	２	０
１０	２	０
１１	２	１
１２	２	２
平均	２．０	０．４３
対照ＣＴＴ		
Ｃ６	２	２
Ｃ７	２	２
Ｃ８	１	１
Ｃ９	２	１
Ｃ１０	２	１
Ｃ１１	２	０
Ｃ１２	１	０
平均	１．７１	１．００

この結果は、ＨＰ１／２を接種したＣＴＴにおける急性炎症の有意の減少を示す。

【００４０】

以上、限定を意味することなく本発明の方法を実施例につき説明したが、この説明は単に例示の目的に過ぎず、本発明の思想および範囲を逸脱することなく多くの改変をなしうることが当業者には了解されよう。たとえば用いる実際の投与量、用いる抗体、抗体断片もしくは同族体の種類、投与方式、正確な組成、処置の投与時間および投与法、並びに他の多くの特徴は全て上記説明の範囲内で変化させることができ、したがってこれら改変は全て本発明の範囲内であることから了解されよう。

【配列表】

0004108572000001.xml

フロントページの続き

(72)発明者 ロイ アール. ロブ
アメリカ合衆国 ０２０９０ マサチューセッツ州 ウエストウッド ロアリング ストリート
６２

合議体
審判長 星野 紹英
審判官 穴吹 智子
審判官 谷口 博

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K39/395