(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3675819号
(P3675819)
(45)発行日　平成17年7月27日(2005.7.27)　(24)登録日　平成17年5月13日(2005.5.13)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12P 21/08	C12P 21/08
A61K 39/395	A61K 39/395
A61P 29/00	A61P 29/00
A61P 37/06	A61P 37/06
C07K 16/28	C07K 16/28

請求項の数 8　(全 16 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-510807
(86)(22)出願日　平成6年9月2日(1994.9.2)
(65)公表番号　特表平9-504169
(43)公表日　平成9年4月28日(1997.4.28)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/009984
(87)国際公開番号　WO1995/009653
(87)国際公開日　平成7年4月13日(1995.4.13)
審査請求日　平成13年8月27日(2001.8.27)
(31)優先権主張番号　08/130,541
(32)優先日　平成5年10月1日(1993.10.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　HB 11459

(73)特許権者
イミュネックス・コーポレーション
アメリカ合衆国ワシントン州９８１０１，
シアトル，ユニバーシティ・ストリート
５１
(74)代理人
弁理士　社本　一夫
(74)代理人
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人
弁理士　栗田　忠彦
(74)代理人
弁理士　小林　泰

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ４０に対する抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ネズミハイブリドーマｈｕＣＤ４０ｍ２（ＡＴＣＣ　ＨＢ　１１４５９）によって産生されるモノクローナル抗体。
【請求項２】
ネズミハイブリドーマｈｕＣＤ４０ｍ２（ＡＴＣＣ　ＨＢ　１１４５９）によって産生されるモノクローナル抗体と同一のＣＤ４０結合特性を有するモノクローナル抗体。
【請求項３】
ヒト化されている、請求項１又は２に記載のモノクローナル抗体。
【請求項４】
請求項３のモノクローナル抗体の一本鎖Ｆｖフラグメント、および請求項３のモノクローナル抗体の二価Ｆｖフラグメントとから成る群から選択される、ＣＤ４０結合タンパク質。
【請求項５】
ＣＤ４０を検出するための組成物であって、請求項１～３のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む前記組成物。
【請求項６】
Ｂ細胞のＣＤ４０リガンド誘導増殖を阻害するための組成物であって、請求項１～３のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含む前記組成物。
【請求項７】

ＣＤ４０を検出するための組成物であって、請求項４に記載のＣＤ４０結合タンパク質を含む前記組成物。
【請求項８】
Ｂ細胞のＣＤ４０リガンド誘導増殖を阻害するための組成物であって、請求項４に記載のＣＤ４０結合タンパク質を含む前記組成物。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は一般に抗体に関し、さらに詳しくは、ＣＤ４０に対する抗体に関する。
発明の背景
ＣＤ４０はＢ細胞、樹枝状細胞、ある種の癌細胞系及びヒト胸腺上皮細胞上に発現する５０ｋＤａ表面抗原である。ＣＤ４０はＢリンパ球の増殖及び分化に重要な役割を果たすことが知られる。アミノ酸配列の類似性に基づいて、ＣＤ４０はタンパク質のＴＮＦ受容体ファミリーの要素として同定されており、このファミリーは神経成長因子の低アフィニティ受容体、両形式のＴＮＦ受容体、ＣＤ２７、ＯＸ４０及びＨｏｄｇｋｉｎリンパ腫マーカーＣＤ３０のような分子を含む。ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）のヒト形とネズミ形の両方が最近クローン化され、主として活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞上に発現するＩＩ型内在性(integral)膜タンパク質であると実証された。ＣＤ４０Ｌはヒトとネズミ種の両方からのＢ細胞に強い刺激シグナルを与える；しかし、他の種類の細胞上のＣＤ４０Ｌの発現及びＣＤ４０Ｌの効果については殆ど知られていない。
ＣＤ４０表面抗原に対するモノクローナル抗体がヒトＢ細胞に対する種々な生物学的活性を仲介することも判明している。例えば、ＣＤ４０ｍＡｂはホモ型及びヘテロ型付着を誘導し（Ｂａｒｒｅｔｔ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４６：１７２２，１９９１；Ｇｏｒｄｏｎ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：１４２５，１９８８）、細胞サイズを増加させる（Ｇｏｒｄｏｎ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：１４２５，１９８８；Ｖａｌｌｅ等，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９：１４６３，１９８９）。ＣＤ４０は抗ＩｇＭ、ＣＤ２０ｍＡｂ又はホルボールエステル単独によって（ＣｌａｒｋとＬｅｄｂｅｔｔｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：４４９４，１９８６；Ｇｏｒｄｏｎ等，ＬＥＵＣＯＣＹＴＥ ＴＹＰＩＮＧ ＩＩＩ．Ａ．Ｊ．ＭｃＭｉｃｈａｅｌ編集，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ．Ｏｘｆｏｒｄ，４２６頁；Ｐａｕｌｉｅ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４２：５９０，１９８９）、又はＩＬ－４と共に（Ｖａｌｌｅ等，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９：１４６３，１９８９；Ｇｏｒｄｏｎ等，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７：１５３５，１９８７）活性化されたＢ細胞の増殖を誘導し、ＩｇＥ（Ｊａｂａｒａ等，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７２：８，１９９１、Ｇａｓｃａｎ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：８，１９９１）、ＩｇＧ及びＩｇＭ（Ｇａｓｃａｎ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：８，１９９１）をＩＬ－４刺激Ｔ細胞欠損培養から生成する。さらに、ＣＤ４０ｍＡｂはＢ細胞からのＩＬ－４仲介溶解性ＣＤ２３／$F_{c\varepsilon}$ＲＩＩ放出を強化し（ＧｏｒｄｏｎとＧｕｙ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ８：３３９，１９８７；Ｃａｉｒｎｓ等，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８：３４９，１９８８）、ＩＬ－６のＢ細胞産生を促進する（ＣｌａｒｋとＳｈｕ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５：１４００，１９９０）と報告されている。最近、$CD_{w}32$＋付着細胞の存在下で、ヒトＢ細胞ラインがＩＬ－４及びＣＤ４０ｍＡｂによって一次(primary)Ｂ細胞集団から形成されている（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：７０，１９９１）。さらに、胚中心のリンパ芽球(centrocyte)が、ＣＤ４０及び／又はＡｇの受容体によって活性化される場合には、アポプトシス(apoptosis)を受けるのを防止することができる（Ｌｉｕ等，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：９２９，１９８９）。上記刊行物の各々はＢ細胞の生物学的活性を刺激するＣＤ４０ｍＡｂを開示する。
しかし、ＣＤ４０リガンドへのＣＤ４０の結合を阻止するモノクローナル抗体はまだ開示されていない。このような阻止抗体は、例えば、ＣＤ４０の役割をさらに解明するための研究用途に及びＣＤ４０仲介生物学的活性の阻害を必要とする治療用途にも有用であると考えられる。ＣＤ４０リガンド阻止ｍＡｂは例えばＣＤ４０関連疾患の診断のための臨床

用途にも有用であると考えられる。さらに、例えば組換え的に産生したＣＤ４０の精製のような、種々な研究用途に、又はＣＤ４０の存在を検出する分析に抗体を使用することができる。

本発明はこのような抗体を提供し、さらに他の関連利益を提供する。

発明の概要

本発明は、特異的にヒトＣＤ４０分子に結合し、ＣＤ４０リガンドへのＣＤ４０分子の結合を阻止するモノクローン抗体を提供する。モノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体とから成る群から選択することができる。同様に、ＣＤ４０はネズミＣＤ４０とヒトＣＤ４０から成る群から選択してもよい。上記のようなＣＤ４０に対するモノクローナル抗体と生理学的に許容されるキャリヤー又は希釈剤とを含む治療用組成物も提供する。

本発明はまた、例えば抗体フラグメント又は、抗体から誘導される少なくとも１つのドメインを含む融合タンパク質である、哺乳動物ＣＤ４０に特異的に結合する結合タンパク質をも提供する。哺乳動物ＣＤ４０に特異的に結合する結合タンパク質と、生理学的に許容されるキャリヤー又は希釈剤とを含む治療用組成物も提供する。

本発明はまた、（ａ）標識される、上記のようなモノクローナル抗体と共に細胞をインキュベートし、そして（ｂ）結合した抗体を検出する工程とを含む、細胞上のＣＤ４０の検出方法をも含む。本発明はまた、（ａ）溶解性ＣＤ４０を含むと疑われる血清を、上記のようなモノクローナル抗体が付着した固体サポートと共に、結合が生ずるために充分な条件下及び時間、インキューベートし、（ｂ）該固体サポートをＣＤ４０に特異的な第２標識モノクローナル抗体と共に、結合が生ずるために充分な条件下及び時間、インキューベートし、そして（ｃ）結合した標識抗体の存在を検出する工程とを含む、血清中の溶解性ＣＤ４０の検出方法をも提供する。

上記その他の態様は下記詳細な説明と、添付図面とを参照するときに明らかになると思われる。

【図面の簡単な説明】

図１は、ＣＤ４０ｍＡｂＭ２とＭ３による、ヒトＣＤ４０Ｌに結合する溶解性ヒトＣＤ４０の阻害を示す。

図２は、ＣＤ４０ｍＡｂＭ２とＭ３による、ネズミＣＤ４０Ｌに結合する溶解性ヒトＣＤ４０の阻害を示す。

図３は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γの存在下でのＣＤ４０Ｌ（ＣＶ－１／ＥＢＮＡ細胞の表面に発現）と単球のＴＮＦ－α産生との間の用量依存性関係を示すグラフである。

図４は、単球のＣＤ４０Ｌ誘導ＴＮＦ－α産生がＣＤ４０Ｆｃ又はＣＤ４０ｍＡｂＭ２によって阻害されることを示すグラフである。

図５は、抗ＩｇＭとトリマーＣＤ４０リガンドとによって刺激された末梢血液Ｂ細胞を用いた増殖分析の結果を示す。

図６は、トリマーＣＤ４０リガンド単独によって刺激された末梢血液Ｂ細胞を用いた増殖分析の結果を示す。

図７は、ＩＬ－４とトリマーＣＤ４０リガンドとによって刺激された末梢血液Ｂ細胞を用いた増殖分析の結果を示す。

発明の詳細な説明

精製ＣＤ４０を用いて、モノクローナル抗体と、組換え体ＤＮＡ方法を用いて特に構成されることができる他の結合タンパク質とを形成することができる。これらの結合タンパク質は特異的結合性モノクローナル抗体をコードする遺伝子からの可変領域を組み込む。本発明に関連して、モノクローナル抗体と結合タンパク質とは、それらが$10^{7}M^{-1}$以上のK_aで結合するならば、特異的結合性であると定義される。本発明の好ましい態様では、モノクローナル抗体はＣＤ４０のＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）への結合をも阻止する。モノクローナル抗体又は結合タンパク質のアフィニティは当業者によって容易に判定されると考えられる（Ｄｏｗｅｒ等，“マウス脾臓細胞上のＭＨＣクラスＩ抗原とモノクロ

ーナル抗体との相互作用。Ｉ．結合の機構の分析”，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３２：７５１，１９８４を参照のこと）。簡単に言えば、放射能標識抗体又は結合タンパク質の増加する量がＣＤ４０に暴露される。抗体の１／２が最大に結合する抗体濃度の逆数を算出することによって、抗体のアフィニティを算出することができる（Ｄｏｗｅｒ等，上記文献を参照のこと）。当業者に明らかであるように、ＣＤ４０、全ＣＤ４０又はＣＤ４０の一部を含む細胞に対して抗体が産生される。溶解性ＣＤ４０．Ｆｃ分子を用いてＣＤ４０に対して発生させた抗体が特に好ましい。さらに、本発明に関連して、モノクローナル抗体は、当業者によって容易に製造可能である、Ｆ（ａｂ’）$_2$とＦａｂフラグメントとを含む。

ポリクローナル抗体は例えばウマ、ウシ、種々な家禽、ウサギ、マウス又はラットのような、多様な温血動物から当業者によって容易に産生されることができる。簡単に言えば、ＣＤ４０を用いて、動物を腹腔内、筋肉内、眼内又は皮下注入によって免疫化することができる。ＣＤ４０の免疫原性を例えばＦｒｅｕｎｄ完全若しくは不完全アジュバントのようなアジュバントの使用によって増強することができる。幾つかの追加免疫化後に、血清の小サンプルを回収し、特に、例えばＥＬＩＳＡ、ＡＢＣ若しくは改良ＡＢＣアッセイを含む幾つかの方法のいずれかによって、又はドットブロットアッセイによって、ＣＤ４０に対する反応性を試験した。特に好ましいポリクローナル抗血清はバックグラウンドよりも少なくとも３倍大きいシグナルをこれらのアッセイの１種で与える。動物の抗体価がＣＤ４０へのその反応性に関してプラトーに達したならば、週１回の採血(bleeding)によって又は動物からの放血によって多量のポリクローナル抗体を容易に得ることができる。

モノクローナル抗体も慣習的な方法を用いて、容易に産生されることができる（米国特許第ＲＥ３２，０１１号、第４，９０２，６１４号、第４，５４３，４３９号及び第４，４１１，９９３号（これらは本明細書に取り込まれる）；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ：Ａ Ｎｅｗ Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｅｓ，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｋｅｎｎｅｔｔ，ＭｃＫｅａｒｎ，及びＢｅｃｈｔｏｌ（編集），１９８０，及びＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＨａｒｌｏｗとＬａｎｅ（編集），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８８（これも本明細書に援用される）を参照のこと）。簡単に言うと、１実施態様では、例えばラット又はマウスのような対象動物にＣＤ４０に対して免疫反応を誘発させるために適した形状のＣＤ４０を注入する。特に、ＣＤ４０を発現する細胞、例えばワクチニアウイルスのような、ＣＤ４０を発現するウイルス、例えばＣＤ４０．Ｆｃのような、溶解性形のＣＤ４０、又はＣＤ４０配列に基づくペプチドのような、種々な形状のＣＤ４０による免疫化によって、これを達成することができる。さらに、例えば溶解性受容体若しくはペプチドを他のタンパク質（例えば、オバルブミン若しくはキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ））に結合させることによる、又は例えばＦｒｅｕｎｄ完全若しくは不完全アジュバントのようなアジュバントの使用によるような、多くの方法が生ずる免疫反応を増強するために当該技術分野において知られている。初期免疫化は腹腔内、筋肉内、眼内又は皮下経路によることができる。

初期免疫化後の１週間～３週間に、動物を他の追加免疫によって再免疫化する。次に、動物を試験採血し、例えばＥＬＩＳＡ、ドットブロット、ＡＢＣ又は改良ＡＢＣアッセイのようなアッセイを用いて、血清をＣＤ４０に対する免疫反応性に関して試験した。追加免疫化は、動物がＣＤ４０に対するその反応性においてプラトーに達するまで、実施することができる。次に、動物に溶解性ＣＤ４０の最終追加免疫(final booster)を与えて、３～４日後に殺した。この時点で、例えば脾臓及びリンパ節のような、多数のＢ細胞を含む器官を回収して、この器官をメッシュスクリーンに通すことによって、又は細胞を含む、脾臓若しくはリンパ節の膜を破壊することによって粉砕して、単細胞懸濁液にする。１実施態様では、続いて、低張性溶液の添加によって赤血球を溶解し、その後直ちに、等張性に戻す。

他の実施態様では、インビトロ免疫化方法の使用によって、モノクローナル抗体の製造に

適した細胞が得られる。簡単に言うと、動物を殺し、脾臓とリンパ節との細胞を上記のように摘出する。単細胞懸濁液を調製し、上記のような免疫反応を誘発するために適した、ＣＤ４０の１形式を含む培養物(culture)中に該細胞を入れる。次いで、リンパ球を回収し、下記のように融合する(fused)。

インビトロ免疫化の使用によって又は上記のような免疫化動物から得られる細胞は、例えばＥｐｓｔｅｉｎバーウイルス（ＥＢＶ）のようなウイルスによるトランスフェクションによって不死化される(immortalized)（ＧｌａｓｋｙとＲｅａｄｉｎｇ，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ ８（４）：３７７～３８９，１９８９を参照のこと）。或いは、好ましい実施態様では、モノクローナル抗体を分泌する“ハイブリドーマ”を形成するために、回収した脾臓及び／又はリンパ節の細胞懸濁液を適当な骨髄腫細胞と融合させる。適当な骨髄腫細胞ラインは特に抗体の構成又は発現に欠陥があり、免疫化動物からの細胞とさらに相乗作用を有する。多くのこのような骨髄腫細胞ラインは当該技術分野において周知であり、例えばＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（メリーランド州，ロックビル）のようなソースから入手可能である（Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ ＆ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，第６版，ＡＴＣＣ，１９８８を参照のこと）。代表的な骨髄腫細胞ラインは、ヒトに関しては、ＵＣ７２９－６（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ８０６１）、ＭＣ／ＣＡＲ－Ｚ２（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ８１４７）及びＳＫＯ－００７（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ８０３３）；マウスに関しては、ＳＰ２／０－ＡＧ１４（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１５８１）及びＰ３Ｘ６３Ａｇ８（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＴＩＢ９）；ラットに関しては、Ｙ３－Ａｇ１．２．３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１６３１）及びＹＢ２／０（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１６６２）を含む。特に好ましい融合細胞ラインはＮＳ－１（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＴＩＢ １８）及びＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ１５８０）を含み、これらはマウス、ラット又はヒト細胞ラインとの融合に利用できる。骨髄腫細胞ラインと免疫化動物からの細胞との融合は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＨａｒｌｏｗとＬａｎｅ（編集），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８８を参照）又は電気融合（ＺｉｍｍｅｒｍａｎとＶｉｅｎｋｅｎ，Ｊ．Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｂｉｏｌ．６７：１６５～１８２，１９８２を参照）の使用を含む、種々な方法によって達成することができる。

融合後に、細胞を適当な培地、例えばＲＰＭＩ １６４０又はＤＭＥＭ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏの改良イーグル培地）（ＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，カンサス州，レネキサ）のような、適当な培地を含む培養プレートに入れることができる。この培地は例えばウシ胎児血清（ＦＢＳ、Ｈｙｃｌｏｎｅ（ユタ州，ローガン）から又はＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから）、免疫化に用いた種と同じ種の動物幼仔から採取した胸腺細胞、又は培地を凝固させるための寒天のような付加的成分を含むこともできる。さらに、培地は融合した脾臓細胞と骨髄腫細胞の成長を選択的に可能にする試薬も含むべきである。ＨＡＴ（ハイポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン）（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．ミズリー州，セントルイス）の使用が特に好ましい。約７日後に、ＣＤ４０を認識する抗体の存在を検出するために、得られる融合細胞又はハイブリドーマをスクリーニングすることができる。数回のクローナル希釈と再アッセイ後に、ＣＤ４０に結合するハイブリドーマ産生抗体を単離することができる。

モノクローナル抗体を構成するために他の方法を用いることもできる（Ｗｉｌｌｉａｍ Ｄ．Ｈｕｓｅ等，“ファージラムダにおける免疫グロブリンレパートリーの大きい複合ライブラリーの産生”，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５～１２８１，１９８９年１２月；Ｌ．Ｓａｓｔｒｙ等，“モノクローナル触媒抗体の産生のための大腸菌における免疫レパートリーのクローニング：Ｈ鎖可変領域特異的ｃＤＮＡライブラリーの構成”，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５７２８～５７３２，１９８９年８月；Ｍｉｃｈｅｌｌｅ Ａｌｔｉｎｇ－Ｍｅｅｓ等，“モノクローナル抗体発現ライブラリー：ハイブリドーマへの迅速な代替え策”，Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３：１～９，１９９０年１月も参照のこと；これらの参考文献

はＳｔｒａｔａｃｙｔｅ（カリフォルニア州，ラジョラ）から入手可能な商業的系を説明し、この系は組換え方法による抗体の産生を可能にする）。簡単に言うと、ｍＲＮＡがＢ細胞集団から単離され、ｋＩｍｍｕｎｏＺａｐ（Ｈ）ベクター及びｋＩｍｍｕｎｏＺａｐ（Ｌ）ベクターにおけるＨ鎖及びＬ鎖免疫グロブリンｃＤＮＡ発現ライブラリーの形成に用いられる。これらのベクターは個々にスクーリニングされるか、又は同時発現して、Ｆａｂフラグメント又は抗体を形成する（Ｈｕｓｅ等，上記文献；Ｓａｓｔｒｙ等，上記文献をも参照のこと）。陽性プラーク(positive plaque)は続いて、非溶解性(non-lytic)プラスミドに転化し、これは大腸菌からのモノクローナル抗体フラグメントの高レベル発現を可能にする。

同様に、組換えＤＮＡ方法を用いて、ＣＤ４０のＣＤ４０Ｌへの結合を阻止する特異的結合抗体をコードする遺伝子の可変領域を組み入れるように、結合タンパク質を構成することもできる。本明細書に記載する開示を与えるならば、これらのタンパク質の構成は当業者によって容易に達成することができる（Ｊａｍｅｓ　Ｗ．Ｌａｒｒｉｃｋ等，“混合ポリマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応：単ハイブリドーマ細胞からのヒトモノクローナル抗体可変領域遺伝子のクローニング”，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，７：９３４～９３８，１９８９年９月；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ等，“療法としてのヒト抗体の再成形”，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３～３２７，１９８８年；Ｒｏｂｅｒｔｓ等，“タンパク質工学による、その抗原に対して強化されたアフィニティと特異性とを有する抗体の産生”Ｎａｔｕｒｅ，３２８：７３１～７３４，１９８７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ等，“ヒト抗体の再成形：抗リゾチーム活性のグラフティング”，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４～１５３６，１９８８年；Ｃｈａｕｄｈａｒｙ等，“シュードモナス　エキソトキシンに融合した２抗体可変領域から成る組換え体イムノトキシン”，Ｎａｔｕｒｅ，３３９：３９４～３９７，１９８９年を参照）。簡単に言うと、特異的結合性及び阻止性モノクローナル抗体を産生する細胞からの抗原結合部位又はＣＤ４０結合ドメインを増幅し、ヒト抗体を産生する細胞のゲノム中に直接挿入する（Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ等，上記文献；Ｒｅｉｃｈｍａｎｎ等，上記文献を参照のこと）。この方法は、特異的結合性ネズミ又はラットモノクローナル抗体の抗原結合部位のヒト抗体中への転移を可能にする。このような抗体は、ラットまたはマウスの抗体ほど抗原性がないのでヒトの治療に使用するのに好ましい。或いは、抗原結合部位（可変領域）を他の完全に異なるタンパク質へ結合又は挿入して（Ｃｈａｕｄｈａｒｙ等，上記文献を参照）、抗体の抗原結合部位と、完全に異なるタンパク質の機能活性(functional activity)とを有する新規なタンパク質を得ることができる。当業者が認識するように、抗体の抗原結合部位又はＣＤ４０結合ドメインは抗体の可変領域に発見することができる。さらに、哺乳動物ＣＤ４０に特異的に結合する、抗体のより小さい部分又は可変領域をコードするＤＮＡ配列も本発明に関連して用いることができる。これらの部分は、例えばＥＬＩＳＡ、ＡＢＣ又はドットブロットアッセイを含めた、当該技術分野で知られたアッセイを用いて、ＣＤ４０への結合特異性に関して容易に試験することができる。

好ましい実施態様では、興味の対象となるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからの可変領域をコードする遺伝子を可変領域のプライマーを用いて増幅する。これらのプライマーは当業者によって合成するか、又は商業的に入手可能なソースから購入することができる。Ｓｔｒａｔａｃｙｔｅ（カリフォルニア州，ラジョラ）は、特に、V_{Ha}、V_{Hb}、V_{Hc}、V_{Hd}、V_{Hl}、V_L及びC_L領域のプライマーを含む、マウス及びヒト可変領域のプライマーを販売する。これらのプライマーを用いて、Ｈ鎖又はＬ鎖可変領域を増幅し、次にこれらを例えばＩｍｍｕｎｏＺＡＰ*Ｈ又はＩｍｍｕｎｏＺＡＰ*Ｌ（Ｓｔｒａｔａｃｙｔｅ）のようなベクターにそれぞれ挿入することができる。これらのベクターを次に発現のために大腸菌に導入することができる。これらの方法を用いて、V_HドメインとV_Lドメインとの融合を含む一本鎖タンパク質の多量を産生することができる（Ｂｉｒｄ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４２：４２３～４２６，１９８８を参照）。

他の実施態様では、結合タンパク質を発現ベクター内で他のタンパク質（例えば、トキシン）に融合させる。したがって、結合タンパク質によって結合される細胞をトキシンの組

み入れによって殺すことができる（Ｃｈａｕｄｈａｒｙ等）。或いは、結合タンパク質をＣＤ４０Ｌアンタゴニスト（すなわち、ＣＤ４０を結合するが、生物学的活性を生じないタンパク質）に融合して、ＣＤ４０を発現する細胞の周囲に大きい局部濃度のアンタガニストを発生させることができる。このアンタゴニストを結合することができる細胞のみが影響され、恐らく治療目的に必要な用量を減ずると考えられる。

適当な抗体又は結合タンパク質が得られたならば、当業者に周知の多くの方法によってこれらを単離又は精製することができる（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＨａｒｌｏｗとＬａｎｅ（編集），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８８を参照）。適当な方法には、ペプチド若しくはタンパク質アフィニティカラム、ＨＰＬＣ若しくはＲＰ－ＨＰＬＣ、プロティンＡ若しくはプロティンＧカラム上での精製、又はこれらの方法の任意の組合せがある。

本発明の抗体と結合タンパク質は多くの用途を有する。例えば、フローサイトメトリーに用いて、ＣＤ４０含有細胞を選別したり又はＣＤ４０含有細胞を組織化学的に染色したりすることができる。簡単に言うと、細胞上のＣＤ４０を検出するために、哺乳動物ＣＤ４０に特異的に結合する標識モノクローナル抗体と共にインキュベートしてから、結合抗体の存在を検出する。これらの工程は非結合抗体を除去するための洗浄のような付加的工程と共に達成することもできる。本発明の範囲内での使用に適した標識は当該技術分野において周知であり、特に、フルオレセイン イソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリシン（ＰＥ）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）及びコロイド状金を含む。フローサイトメトリーに用いるために、“抗体へのフルオレセイン イソチオシアネートの結合．Ｉ．結合条件に関する実験”，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１８：８６５～８７３，１９７０におけるＫｅｌｔｋａｍｐの方法によって精製抗体に結合することができるＦＩＴＣが特に好ましい（Ｋｅｌｔｋａｍｐ，“抗体へのフルオレセイン イソチオシアネートの結合．ＩＩ．再現可能な方法”，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１８：８７５～８８１，１９７０；及びＧｏｄｉｎｇ，“抗体とフルオロクロムとの結合：標準方法の改良”，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１３：２１５～２２６，１９７０も参照のこと）。組織化学的染色に関しては、ＨＲＰが好ましく、これは“ペルオキシダーゼ標識抗体：新規な結合方法”，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．２２：１０８４～１０９１，１９７４におけるＮａｋａｎｅとＫａｗａｏｉの方法によって精製抗体に結合することができる（ＴｉｊｓｓｅｎとＫｕｒｓｔａｋ，“エンザイムイムノアッセイのためのペルオキシダーゼと活性ペルオキシダーゼ抗体複合体の非常に効果的かつ簡単な製造方法”，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３６：４５１～４５７，１９８４をも参照）。

精製した抗体又は結合タンパク質はインビボでのＣＤ４０へのＣＤ４０Ｌの結合を阻止するため、又はＣＤ４０含有細胞のインビボ中和のために治療的に用いることもできる。好ましい実施態様では、上記のように、例えば、特異的ネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位をヒトモノクローナル抗体に転移することによって、免疫学的検出を免れるように、抗体を修飾する。ＣＤ４０に対する抗体又は結合タンパク質と、生理学的に許容されるキャリヤー若しくは希釈剤とを含む治療組成物の使用が特に好ましい。適当なキャリヤー若しくは希釈剤は、特に、中性緩衝化した生理食塩水又は非特異性アルブミンと生理食塩水との混合物を含む。さらに、治療組成物は例えば緩衝剤、炭水化物（例えば、グルコース、スクロース又はデキストロースを含む）、キレート化剤（例えば、ＥＤＴＡ）又は種々な保存剤のような、他の賦形剤又は安定剤を含むことができる。適当な用量は臨床試験で決定することができるが、投与量と投与頻度とは治療すべき適応症の性質と重症度、所望の反応及び患者の状態のような要素に依存する。

抗体を用いて、患者に投与した循環溶解性ＣＤ４０の存在を監視することも、又は患者におけるＣＤ４０のインビボレベルを測定することもできる。好ましい実施態様では、二重決定基(double determinant)又はサンドイッチアッセイを用いて、ＣＤ４０を検出する。簡単に言うと、溶解性ＣＤ４０を含むと疑われる血清を、上記のような、付着したモノクローナル抗体を有する固体サポートと共に結合が生ずるために充分な条件下及び時間、イ

ンキュベートする。多くの固体サポートが当該技術分野において周知であり、これらには、特に、ＥＬＩＳＡプレート（Ｌｉｎｂｒｏ，ヴァージニア州，マクレーン）、ニトロセルロース（Ｍｉｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐ．マサチュッセツ州，ベッドフォード）、ビーズ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ，ペンシルバニア州，ウァーリントン）、及びマグネチックビーズ（Ｒｏｂｂｉｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，カリフォルニア州，マウンテンビュー）がある。さらに、モノクローナル抗体は当該技術分野において周知の方法を用いて固体サポートに容易に付着可能である（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，ＨａｒｌｏｗとＬａｎｅ（編集），Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，１９８８を参照）。次に、哺乳動物ＣＤ４０に特異的な第２標識モノクローナル抗体と共に、結合が生ずるために充分な条件下及び時間、インキュベートし、その後、結合した標識抗体を検出する。

特に好ましい実施態様では、モノクローナル抗体を例えば９６孔プレートのような固体サポート上に塗布する。続いて、このプレートを例えばウシ血清アルブミンのようなタンパク質又は脱脂ドライミルクによって約３０分間ブロックする。患者からの血清をリン酸塩緩衝化生理食塩水で希釈して、孔中で結合が生ずるために充分な条件下及び時間（一般に、約３０分間）インキュベートする。続いて、プレートを洗浄し、異なるＣＤ４０エピトープに特異的な標識第２モノクローナル抗体を孔に加え、上記のようにインキュベートする。異なるＣＤ４０の抗体はクロスーブロッキングアッセイの使用によって決定することができる。次に、孔を第２標識抗体の存在に関して試験する。第２標識抗体の存在は患者血清中のＣＤ４０の存在を実証する。当業者によって理解されるように、上記アッセイに用いるモノクローナル抗体を、ＣＤ４０に特異的であるポリクローナル抗体又は結合タンパク質に置換することができる。

説明のために、但し限定のためではなく、下記実施例を提供する。

実施例

実施例１

ＣＤ４０に対するモノクローナル抗体の製造

ヒトＣＤ４０に結合し、ＣＤ４０リガンドに対するＣＤ４０の結合を阻止するモノクローナル抗体を以下のように産生させた。ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ分子（ＨｕＣＤ４０．Ｆｃと呼ばれる）に融合したＣＤ４０の細胞外ドメインから成るヒトＣＤ４０免疫原を、実質的にＦａｎｓｌｏｗ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４９：６５５，１９９２が述べているように製造した。

ＢＡＬＢ／ｃマウスにｈｕＣＤ４０．Ｆｃ（１０μｇ）を腹腔内と皮下の両方で注入し、完全Ｆｒｅｕｎｄアジュバンドによって乳化した。１３～１９日後に、マウスにｈｕＣＤ４０．Ｆｃ（１０μｇ）（不完全Ｆｒｅｕｎｄアジュバンドによって乳化）を皮下注射した。６日後にレトロ－オービタル(retro-orbital)放血によって回収した。血清サンプルをドットブロット、抗体捕獲プレートアッセイ及びＦＡＣＳ分析(analysis)（膜結合ｈｕＣＤ４０又は溶解性Ｆｌａｇ　ＨｕＣＤ４０のいずれかを用いる）によって試験した。ＦｌａｇＨｕＣＤ４０は非常に抗原性であるＮ末端“フラグ（断片）”ペプチドＡｓｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ｌｙｓ（Ｈｏｐｐ等，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，６：１２０４，１９８８）を有し、特異的モノクローナル抗体によって可逆的結合したエピトープを形成し、発現組換えタンパク質の迅速なアッセイと容易な精製とを可能にする。この配列はまた、Ａｓｐ－Ｌｙｓ対の直後の残基においてウシ粘膜エンテロキナーゼによって特異的に開裂する。血清サンプルはドットブロットアッセイ（フラグｈｕＣＤ４０　２５μｇ／ドットを用いる）において＞１：２１００の抗体価と、抗体捕獲フォーマットＥＬＩＳＡアッセイ（１５０ｎｇ／ｍｌのビオチン標識フラグｈｕＣＤ４０を用いる）において約１：１６００の抗体価と、抗体捕獲プレートアッセイ（３０００ｃｐｍ／μｌのI^{125}標識フラグｈｕＣＤ４０を用いる）において＞１：１６００の抗体価とを有した。細胞の表面上にｈｕＣＤ４０を発現する細胞を用いて血清を１：４００希釈度でのＦＡＣＳアッセイにおいても試験して、正常のマウス血清より４倍大きい平均蛍光シフトを示すことを発見した。

マウスを約８週間試験して、ｈｕＣＤ４０．Ｆｃ（７μｇ）によって皮下免疫化した（不完全Ｆｒｅｕｎｄアジュバントによって乳化）。４．５週間後に、マウス１匹にｈｕＣＤ４０．Ｆｃ（２μｇ）をアジュバントなしに静脈内投与した。３日後にこのマウスを殺した。次に、脾臓細胞を回収し、ネズミ骨髄腫細胞ライン（Ａｇ８．６５３）に融合させた。この融合物を非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するために、９６孔プレートのＨＡＴ（ハイポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン）選択性培地中で培養した。

ハイブリドーマ細胞上清を２種アッセイによってスクリーニングした。両アッセイをヤギ抗マウス抗体（１０μｇ／ｍｌ）を塗布した９６孔プレートで実施した。簡単に言うと、ｈｕＣＤ４０．Ｆｃ反応性に関する陽性スクリーニングを次のように実施した。被覆し、ブロックしたプレートを洗浄し、第１抗体（ハイブリドーマ細胞上清）を加え、インキュベートした。プレートを再び洗浄し、ストレプトアビジンＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体）を加え、インキュベートした。最終工程として、プレートを洗浄し、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルーベンジジン）ペルオキシダーゼ基質を加えた。発色させ、色をＥＬＩＳＡプレートリーダーを用いて読み取った。

Ｆｃ反応性に関する陰性スクリーニングは次のように実施した。被覆し、ブロックしたプレートを洗浄し、第１抗体（ハイブリドーマ細胞上清）を加え、インキュベートした。プレートを再び洗浄し、ｈｕＩｇＧ１ＨＲＰ（西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体）を加え、インキュベートした。最終工程として、プレートを洗浄し、ＴＭＢペルオキシダーゼ基質を加えた。発色させ、色をＥＬＩＳＡプレートリーダーを用いて読み取った。

第２スクリーニングとして、細胞表面にｈｕＣＤ４０リガンドを発現する細胞に対するビオチン標識ｈｕＣＤ４０．Ｆｃの結合を阻止するハイブリドーマ上清の能力に関して、ハイブリドーマ上清をＦＡＣＳ分析を用いて、第１（陽性）スクリーニングと同じアッセイフォーマットにおいてビオチン標識フラグｈｕＣＤ４０に比べて試験した。

上記方法を用いて、ＣＤ４０を結合し、ＣＤ４０ＬへのＣＤ４０の結合を阻止する２種類のハイブリドーマクローンを単離した。これらの２種類のクローンはｈｕＣＤ４０ｍ２（Ｍ２）及びｈｕＣＤ４０ｍ３（Ｍ３）として呼ばれる。上記操作によって産生されたハイブリドーマクローンｍｕＣＤ４０ｍ２はＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，１２３０１　パークローン　ドライブ，ロックビル，ＭＤ２０８５２，アメリカ合衆国（受け入れ番号ＨＢ１４５９）にブタペスト条約の条件下で１９９３年１０月６日に寄託されている。

ＨｙｂｒｉｄｏｍａクローンはＣＤ４０との反応性に関して、例えばＥｎｇｖａｌｌ等によって，Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，８：８７１，１９７１及び米国特許第４，７０３，００４号に開示された方法を適用して、ＥＬＩＳＡによってスクリーニングすることができる。陽性クローンを次に同系ＢＡＬＢ／ｃマウスの腹腔内に注入し、高濃度（＞１ｍｇ／ｍｌ）の抗ＣＤ４０モノクローナル抗体を含む腹水を生じさせる。得られるモノクローナル抗体を硫酸アンモニウム沈降と、その後のゲル排除クロマトグラフィー及び／又は黄色ブドウ球菌のプロテインＡに対する抗体結合に基づくアフィニティクロマトグラフィーによって精製することができる。

実施例２

ＣＤ４０Ｌに対するＣＤ４０結合の阻害

ＣＤ４０ｍＡｂ　Ｍ２及びＭ３は、下記のように、ｈｕＣＤ４０Ｌに対するｈｕＣＤ４０．Ｆｃの結合を阻害することが判明した。精製ヒト末梢血Ｔ細胞をＰＭＡとイオノマイシンとによって１８時間刺激して、ヒトＣＤ４０Ｌ発現を誘導した。次に、Ｔ細胞に陰性対照タンパク質としてのヒトＩＬ－４Ｒ．Ｆｃ（５μｇ／ｍｌ）又はｈｕＣＤ４０．Ｆｃ（５μｇ／ｍｌ）を結合させ、結合阻害を不適切なｍｓＩｇＧ（２０μｇ／ｍｌ）、ＣＤ４０ｍＡｂ　Ｍ２（２０μｇ／ｍｌ）又はＣＤ４０ｍＡｂ　Ｍ３（２０μｇ／ｍｌ）によって実施した。結合ＣＤ４０．Ｆｃはフローサイトメトリー分析によって、抗ヒトＦｃＡｂ－ビオチンとストレプトアビジンフィコエリスリンとを用いて検出した。図１に示すように、これらの濃度において、ＣＤ４０Ｍ２とＭ３の両方は、不適切なｍｓＩｇＧに比べて＞

９０％、ＣＤ４０．Ｆｃ結合を阻害した。
ＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ２とＭ３はｍｕＣＤ４０へのｈｕＣＤ４０．Ｆｃ結合を阻害することが次のように実証された。ｍｕＣＤ４０Ｌを本質的に発現するＥＬ４０．９細胞を、対照タンパク質又は最適未満濃度のｈｕＣＤ４０．Ｆｃビオチン（２．５μｇ／ｍｌ）と結合させ、結合阻害を不適切なｍｓＩｇＧ（５０μｇ／ｍｌ）、対照ｍｓＩｇＧ１ｍＡｂＧ２８．５（５０μｇ／ｍｌ）（ワシントン大学Ｄｒ．Ｅｄｗａｒｄ Ａ．Ｃｌｅｒｋによって提供）、ＣＤ４０ｍＡｂＭ２（１２．５μｇ／ｍｌ）又はＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ３（１２．５μｇ／ｍｌ）によって実施した。結合ビオチン標識ＣＤ４０．Ｆｃはフローサイトメトリー分析によって、ストレプトアビジン－フィコエリスリンを用いて検出した。図２に示すように、これらの濃度において、ＣＤ４０ｍＡｂＭ２とＭ３の両方は、不適切なｍｓＩｇＧ又はｍｓＩｇＧ１ｍＡｂＧ２８．５に比べて＞９５％、ＣＤ４０．Ｆｃ結合を阻害した。

実施例３

ＣＤ４０ｍＡｂを用いるＣＤ４０の生物学的活性の阻害

この実施例は、ＣＤ４０ｍＡｂがＣＤ４０Ｌ仲介ＴＮＦ－α産生を阻害することによってＣＤ４０生物学的活性を阻止することを示す。Ａｌｄｅｒｓｏｎ等，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：９２３，１９９１が述べているような向流傾瀉(elutriation)によって正常ドナーＰＢＭＣから単球を最初に精製することによって、単球培養物を確立した。これはギムザ染色細胞遠心分離(cytocentrifuge)標本(preparation)の顕微鏡検査によって少なくとも９５％純度であった。１０％低エンドトキシンＦＢＳと、５０Ｕ／ｍｌペニシリンと、５０ｍｇ／μｌストレプトマイシンと、5×10^{-5}Ｍ２－メルカプトエタノールとを含むＲＰＭＩ１６４０培地において、細胞を培養した。

下記試薬を用意した。ＣＤ４０Ｌを発現するＣＶ－１／ＥＢＮＡ細胞をＡｒｍｉｔａｇｅ等，Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄ．）３５７：８０，１９９２及びＳｐｒｉｇｇｓ等，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１５４３，１９９２が述べているように、トランスフェクションの２日後にパラホルムアルデヒドによって固定した。組換え体ＩＬ－３、ＩＬ－４及びＧＭ－ＣＳＦをＡｎｄｅｒｓｏｎ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４９：１２５２，１９９２が述べているように、精製した、これらは9×10^{4}、1×10^{4}及び5×10^{4}Ｕ／μｇの比活性を有した。用いたＣＤ４０分子は、実施例１に上述したように構成し、精製したヒトＩｇＧ１のＦｃ領域に結合したＣＤ４０の細胞外ドメインから成る溶解性ＣＤ４０融合タンパク質であった。

単球培養物を２４孔プレート（Ｃｏｓｔａｒ，マサチュッセツ州，ケンブリッジ）において、一時的にＣＤ４０Ｌを発現する、増加する数のＣＶ－１／ＥＢＮＡ細胞によって単独で又はＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３又はＩＦＮ－γ（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下で確立した。ＴＮＦ－αレベルを２４時間目にＥＬＩＳＡによって検出した。図３はＣＤ４０Ｌ誘導とＴＮＦ－α産生との間の用量依存性関係を示す。ＧＭ－ＣＳＦ，ＩＬ－３又はＩＦＮ－γの存在下では、ＣＤ４０Ｌを発現する10^{3}程度の少ないＣＶ－１／ＥＢＮＡ細胞がＴＮＦ－α産生を誘導するために充分であったが、さらに多数のこれらの細胞でさえ単独では有意なＴＮＦ－α産生を誘導することができなかった。

ＣＤ４０．Ｆｃ又はＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ２は両方ともＣＤ４０Ｌ誘導ＴＮＦ－α産生を阻害することができること判明した。単球はＧＭ－ＣＳＦの存在下でＣＤ４０Ｌによって刺激された。ＣＤ４０．ＦｃとＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ２を１０μｇ／ｍｌの最終濃度で用いた。培地のみ、ＧＭ－ＣＳＦのみ、ＣＤ４０Ｌのみ、ＣＤ４０．Ｆｃのみ又はＣＤ４０抗体のみによる対照培養ではＴＮＦ－αが検出不能であった。図４は、ＣＤ４０．Ｆｃ又はＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ２の不存在下では、ＴＮＦ－α産生がＧＭ－ＣＳＦの存在下でＣＤ４０Ｌによって刺激されることを示す。これに反して、ＣＤ４０．ＦｃとＣＤ４０ブロッキングｍＡｂ Ｍ２の両方はＧＭ－ＣＳＦの存在下でＣＤ４０Ｌによって誘導されるＴＮＦ－α産生を阻害した。イソタイプ対照ｍＡｂとヒトＩｇＧ１とはこのアッセイにおいてＴＮＦ－α産生を阻害することができなかった（データ示さず）。これらのデータは、ＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ２が特異的にヒトＣＤ４０分子に結合し、ＣＤ４０リガンドへのＣＤ４０分

子の結合を阻止できることを実証する。これらのデータはさらに、ＣＤ４０ｍＡｂ Ｍ２が、他のサイトカイン(cytokine)と共に用いる場合に、ＴＮＦ－α仲介炎症(inflammation)の阻止に有用であることをさらに示唆する。

実施例４

抗体の産生と精製

ＢＡＬＢ／ｃマウスをプライスタン(pristane)（２，４，６，１０－テトラメチルペンタデカン，Ａｌｄｒｉｃｈ，ウィスコンシン州，ミルウォーキー）（０．５ｍｌ）によって最初に感作した(primed)。２週間後に、ＰＢＳ中の$1x10^6$マウスハイブリドーマをマウスの腹腔内に注入した。約２～５週間後に、腹水(ascites fluid)をマウスから採取し、遠心分離して、細胞と粒状物質とを除去した。

腹水（５ｍｌ）をプロテインＡセファロースの３ｍｌカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，ニュージャージー州，ピスカタウェイ）に、０．１Ｍ硫酸アンモニウム（ｐＨ９）によって１：４に希釈して塗布した。カラムをカラム容量の１０～２０倍の硫酸アンモニウム（ｐＨ９）によって洗浄した。次に、精製した抗体を０．０５Ｍクエン酸（ｐＨ３．０）によって溶離し、１Ｍ　ＮａＯＨによって中和した。

実施例５

ＣＤ４０リガンド誘導Ｂ細胞増殖に対するモノクローナル抗体の効果

ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を正常な被験者(volunteer)からＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標）（Ｓｉｇｍａ，ミズリー州，セントルイス）上での密度勾配遠心分離によって単離した。２－アミノエチルイソチオウロニウムブロミド処理ＳＲＢＣ（ヒツジ赤血球）によるロゼット形成と、さらにＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標）上での密度勾配遠心分離とによってＴ細胞を除去することによって、Ｔ細胞欠損標本（E^-）を得た。１０％CO_2雰囲気下、３７℃において、１０％熱不活化ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を添加したＲＰＭＩ培地中のE^-標本によってＢ細胞増殖アッセイを実施した。$1x10^5$ E^-細胞／孔を平底９６孔マイクロタイタープレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）内で、溶解性トリマーＣＤ４０リガンド単独（実質的にＰＣＴ／ＵＳ９２／０８９９０に記載のとおりの、溶解性トリマーＣＤ４０Ｌをコードする発現ベクターによって形質転換された、１：４０希釈上清細胞）、溶解性トリマーＣＤ４０リガンドと固定された抗ＩｇＭ（５μｇ／ｍｌ；ＢｉｏＲａｄ，ヴァージニア州，リッチモンド）又は溶解性トリマーＣＤ４０リガンドとインターロイキン－４（５ｎｇ／ｍｌ）の存在下で３日間、培養した。さらに、モノクローナル抗体Ｍ２（本明細書で開示）、Ｇ２８－５（Ｌｅｄｂｅｔｔｅｒ等，米国特許第５，２４７，０６９号に記載）、ＥＡ５とＢＥ１（両方とも、Ｄｏｅｒｋｅｎ等，Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ｔｙｐｉｎｇ ＩＶ，１９８０に記載）、他の抗ＣＤ４０抗体、Ｓ２Ｃ６、又は対照ネズミＩｇＧを滴定して(titrated in)、Ｂ細胞増殖に対する種々な抗体の効果を観察した。細胞にトリチウム化チミジン（２５Ｃｉ／ｎｍｏｌｅ，Ａｍｅｒｓｈａｍ，イリノイ州，アーリントンハイト）の１μＣｉ／孔を適用して(pulsed)、最終８時間培養した。細胞を自動化細胞回収器によってガラス繊維ディスク上に回収して、組み込まれたｃｐｍを液体シンチレーション分光法によって測定した。結果を図５～７に示す。モノクローナル抗体Ｍ２はＢ細胞のＣＤ４０リガンド誘導増殖を阻害したが、抗体Ｇ２８－５と他の抗ＣＤ４０モノクローナル抗体（Ｓ２Ｃ６）とは増殖に効果を及ぼさなかった。抗体ＥＡ５とＢＥ１とは実際に増殖を強化した。同様な実験は、モノクローナル抗体Ｍ３がモノクローナル抗体Ｍ２と同じ形式で作用することを実証した。

上記から、説明のために本発明の特定の実施態様をを本明細書で説明したが、本発明の要旨及び範囲から逸脱せずに、種々な変更を実施することができる。したがって、本発明は請求の範囲による以外は限定されない。

【図１Ａ】

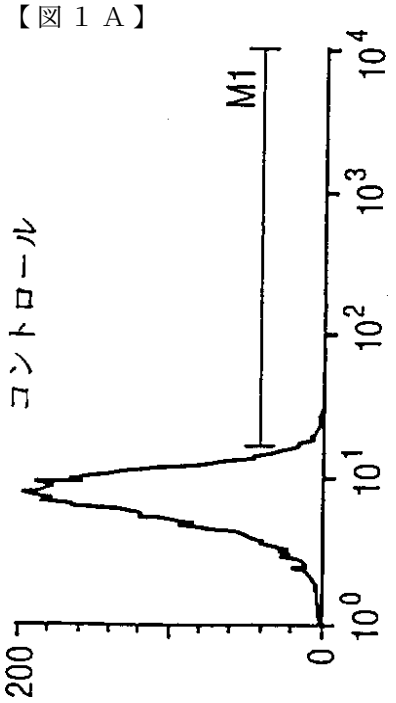


Figure 1A

【図１Ｂ】

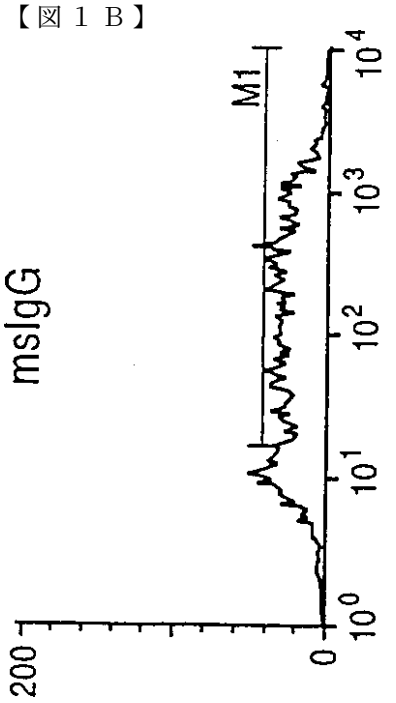


Figure 1B

【図１Ｃ】

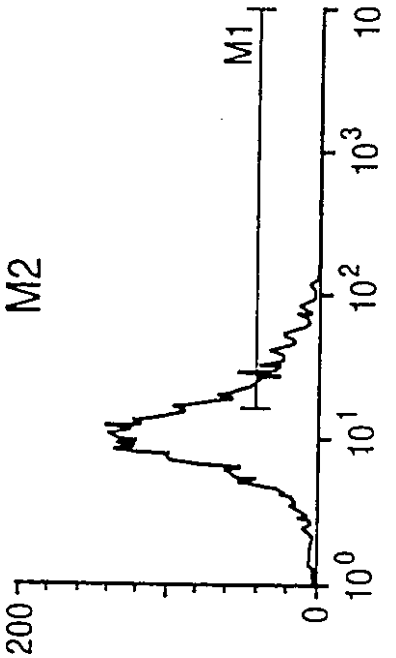


Figure 1C

【図１Ｄ】

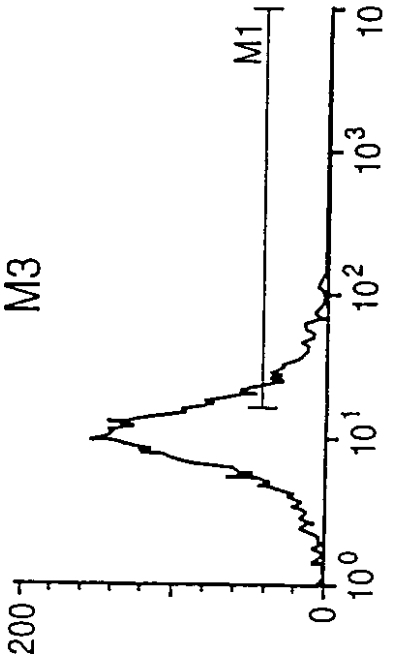


Figure 1D

【図２Ａ】

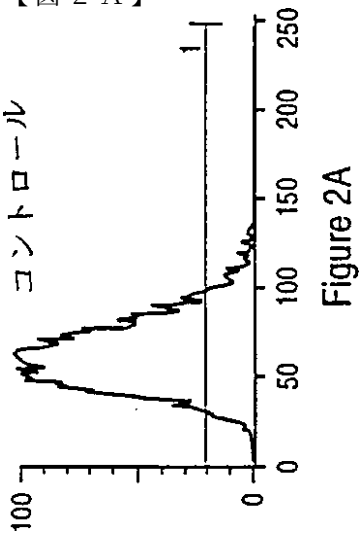


Figure 2A

【図２Ｂ】

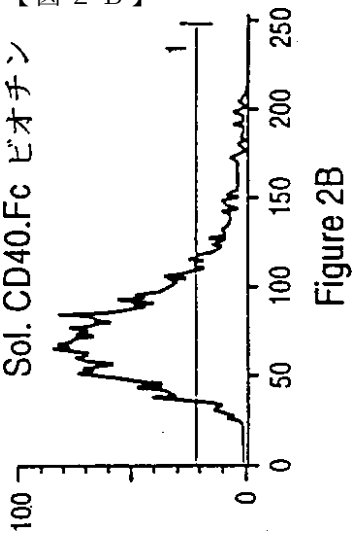


Figure 2B

【図２Ｃ】

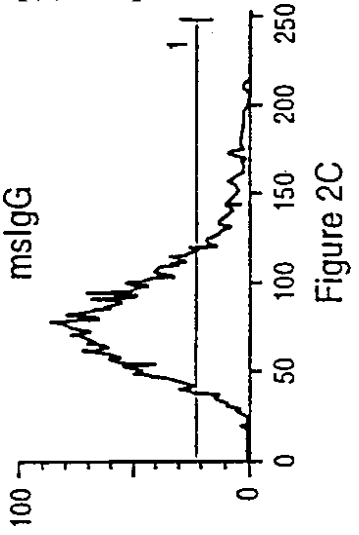


Figure 2C

【図２Ｄ】

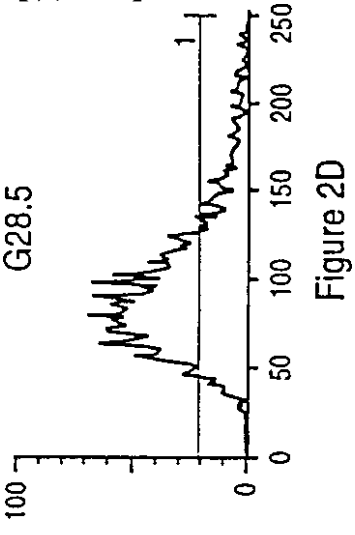
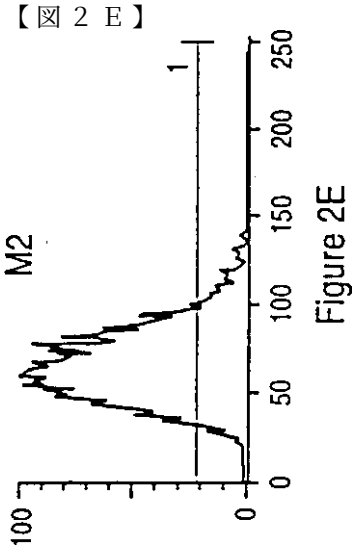
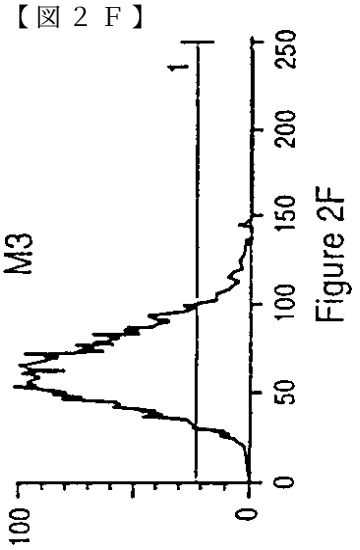


Figure 2D

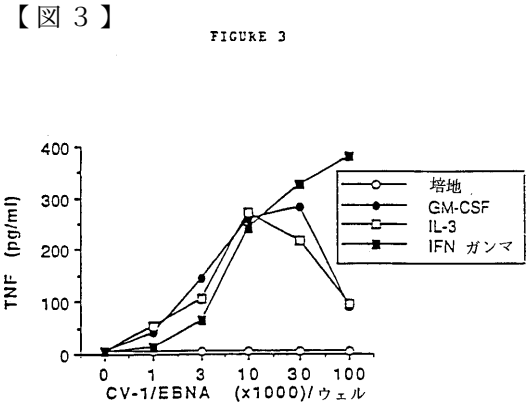
【図２Ｅ】



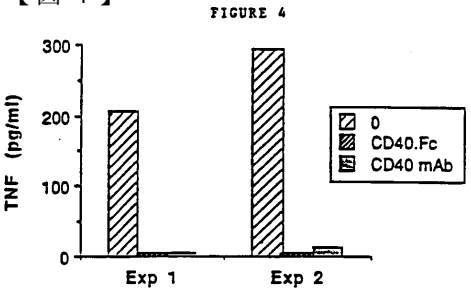
【図２Ｆ】



【図３】



【図４】



【図５】

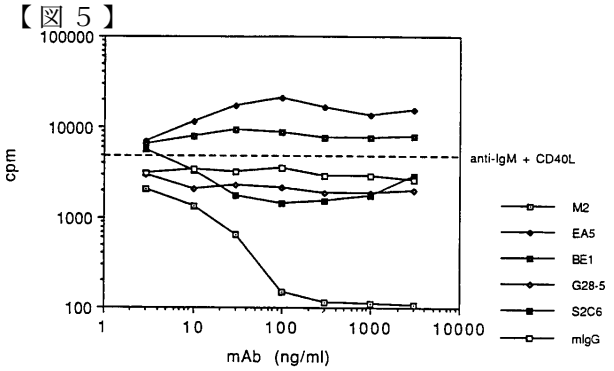


Figure 5

【図６】

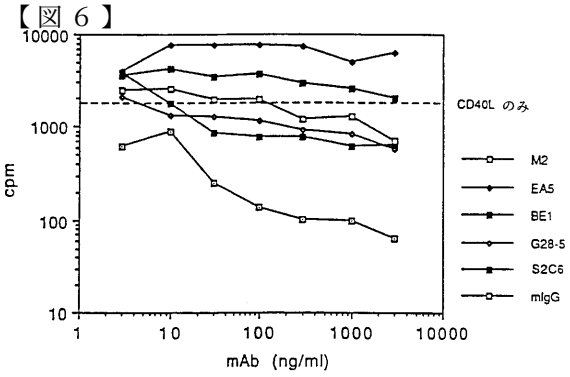


Figure 6

【図７】

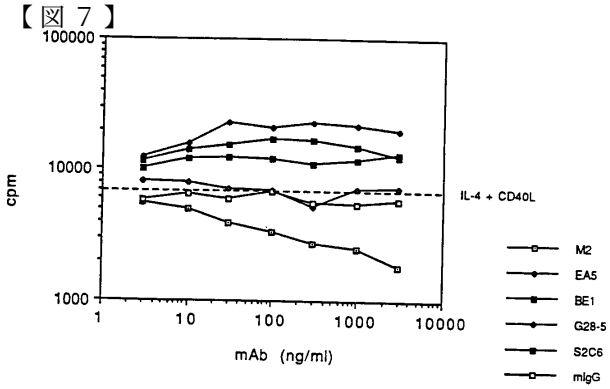


Figure 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	
// Ｃ１２Ｎ　5/10	Ｃ１２Ｎ　5/00	Ｂ
Ｃ１２Ｎ　15/02	Ｃ１２Ｎ　15/00	Ｃ
(Ｃ１２Ｐ　21/08	Ｃ１２Ｐ　21/08	
Ｃ１２Ｒ　1:91　)	Ｃ１２Ｒ　1:91	

(74)代理人
弁理士　村上　清
(72)発明者　ファンズロウ，ウィリアム・シー，ザ・サード
アメリカ合衆国ワシントン州９８０２３，フェデラル・ウェイ，サウス・ウエスト・スリーハンドレッドアンドトゥエンティセブンス・プレース　２１８
(72)発明者　ザッポーネ・ジョディー
アメリカ合衆国ワシントン州９８０３７，リンウッド，ワンハンドレッドアンドセブンティシクスス・ストリート・サウス・ウエスト　４４２６，ナンバー　ジェイ－２
(72)発明者　アルダーソン，マーク
アメリカ合衆国ワシントン州９８１１０，ベインブリッジ・アイランド，グロウ・アベニュー・ノース・ウエスト　１１１６
(72)発明者　アーミテージ，リチャード・ジェイ
アメリカ合衆国ワシントン州９８１１０，ベインブリッジ・アイランド，イーグル・ハーバー・ドライブ　５１３３

審査官　斎藤　真由美

(56)参考文献　国際公開第９１／００９１１５（WO，Ａ１）
特表平０３－５０１５６０（ＪＰ，Ａ）
特表平０４－５０３４５０（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 90
C12P 21/00 - 21/08
C12N 1/00 - 9/99
C07K 1/00 - 19/00
PubMed,MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
EUROPAT(QUESTEL)