

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-531761

(P2007-531761A)

(43) 公表日 平成19年11月8日(2007.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	4 C O 8 5
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-506536 (P2007-506536)
 (86) (22) 出願日 平成17年3月30日 (2005.3.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年12月4日 (2006.12.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/010848
 (87) 国際公開番号 W02005/099776
 (87) 国際公開日 平成17年10月27日 (2005.10.27)
 (31) 優先権主張番号 60/558, 120
 (32) 優先日 平成16年4月1日 (2004.4.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

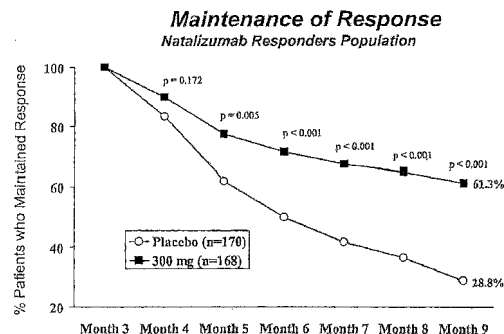
(71) 出願人 399013971
 エラン ファーマシューティカルズ, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, ゲイト
 ウェイ ブールバード 800
 (74) 代理人 100076428
 弁理士 大塚 康徳
 (74) 代理人 100112508
 弁理士 高柳 司郎
 (74) 代理人 100115071
 弁理士 大塚 康弘
 (74) 代理人 100116894
 弁理士 木村 秀二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ステロイド節約剤およびそれを使用する方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的に、必要とする患者に免疫グロブリンのステロイド節約有効量を投与することを含む炎症性腸疾患 (IBD)、喘息、クローン病 (CD)、多発性硬化症 (MS)、慢性関節リウマチ (RA)、移植片対宿主病 (GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症を治療のための薬剤の使用に関する。本発明はまた、一般的に、これらの状態の治療のための併用療法に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、宿主対移植片病、脊椎関節症およびその組合せからなる群から選択される疾患を有する対象におけるステロイド療法に対する必要性を減少および/または排除するために、ステロイド節約剤を使って前記対象を治療するための薬剤を調製するステロイド節約剤の使用方法であって、

ステロイドの節約に有効な量となるだけの前記薬剤を前記対象に投与する工程を含むことを特徴とするステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 2】

前記対象がヒトであることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 3】

前記ステロイド節約剤がモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の免疫学的に活性なフラグメントであることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体がキメラ抗体、ヒト抗体、遺伝子工学的に処理された抗体または二重特異性抗体であることを特徴とする請求項 3 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 5】

前記抗体またはその免疫学的に活性なフラグメントが $\alpha_4\beta_1$ インテグリンに結合していることを特徴とする請求項 4 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 6】

前記抗体またはその免疫学的に活性なフラグメントが $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合していることを特徴とする請求項 4 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 7】

前記抗体がヒト化抗体またはその免疫学的に活性なフラグメントであることを特徴とする請求項 5 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 8】

前記ヒト化抗体がナタリズマブまたはその免疫学的に活性なフラグメントであることを特徴とする請求項 7 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 9】

前記ナタリズマブをそれを必要とする前記対象に非経口的に投与することを特徴とする請求項 8 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 10】

前記薬剤がそれを必要とする前記対象に長期的に投与されることを特徴とする請求項 8 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 11】

前記非経口の投与により、前記対象におけるナタリズマブの有効血中濃度が少なくとも約 1 ng/mL となることを特徴とする請求項 9 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 12】

ナタリズマブの有効血中濃度が前記対象において約 1 ng/mL であることを特徴とする請求項 9 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 13】

前記薬剤を前記対象に長期に投与することを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 14】

前記薬剤の前記長期の投与が少なくとも 1 年間の期間にわたり週 1 回または月 1 回であることを特徴とする請求項 13 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記疾患が炎症性腸疾患であり、前記ステロイド節約剤が₄-免疫グロブリンまたは₄リガンドに対する免疫グロブリンであり、
前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にするのに有効な量の前記薬剤が投与されることを特徴とする請求項1に記載のステロイド節約剤の使用法。

【請求項 16】

前記炎症性腸疾患がクローン病または潰瘍性大腸炎であることを特徴とする請求項15に記載のステロイド節約剤の使用法。

【請求項 17】

前記抗₄免疫グロブリンを約2mg/kg～約8mg/kgの量で前記対象に投与することを特徴とする請求項15に記載のステロイド節約剤の使用法。 10

【請求項 18】

前記対象がステロイドに対して不応性、不耐性または依存性であることを特徴とする請求項15に記載のステロイド節約剤の使用法。

【請求項 19】

前記対象が必要とするステロイドの治療に有効な量は、前記薬剤の投与がない場合に必要とされる量より少ないことを特徴とする請求項18に記載のステロイド節約剤の使用法。

【請求項 20】

前記対象が、 20

- a) 免疫抑制剤による治療に対して無応答性または不耐性である患者、
- b) ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である患者、

または、

c) a) および b) の組合せである患者、であることを特徴とする請求項18に記載のステロイド節約剤の使用法。

【請求項 21】

ステロイドの節約に有効な量の抗₄インテグリン免疫グロブリンまたは₄インテグリンリガンドに対する免疫グロブリンと、

(i) ステロイドでない免疫抑制剤と、(ii) 抗TNF組成物と、(iii) 5-ASA組成物と、(iv) (i) から (iii) の組合せと、からなる群から選択される第2の薬剤と、 30

を含むことを特徴とする炎症性腸疾患の治療のための併用療法。

【請求項 22】

治療上有効な量の第2のステロイド節約剤をさらに含むことを特徴とする請求項21に記載の炎症性腸疾患の治療のための併用療法。

【請求項 23】

前記抗₄免疫グロブリンが、抗₄₇インテグリン抗体であることを特徴とする請求項21に記載の炎症性腸疾患の治療のための併用療法。

【請求項 24】

前記抗₄免疫グロブリンが、ナタリズマブであることを特徴とする請求項21に記載の炎症性腸疾患の治療のための併用療法。 40

【請求項 25】

前記免疫抑制剤が、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートからなる群から選択されることを特徴とする請求項21に記載の炎症性腸疾患の治療のための併用療法。

【請求項 26】

前記抗TNF組成物が、インフリキシマブであることを特徴とする請求項21に記載の炎症性腸疾患の治療のための併用療法。

【請求項 27】

前記5-ASA剤が、スルファサラジン、メサラジンおよびオサラジンからなる群から 50

選択されることを特徴とする請求項 2 1 に記載の炎症性腸疾患の治療のための併用療法。

【請求項 2 8】

前記疾患が、多発性硬化症であり、前記ステロイド節約剤が₄ - 免疫グロブリンまたは₄ リガンドに対する免疫グロブリンであり、前記薬剤が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にする量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 2 9】

前記治療量が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にするものであり、前記対象がステロイドに対して不応性、不耐性または依存性であることを特徴とする請求項 2 8 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

10

【請求項 3 0】

前記対象が必要とするステロイドの治療に有効な量は、前記薬剤の投与がない場合に必要とされる量より少ないことを特徴とする請求項 2 9 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 3 1】

前記対象が、

a) 免疫抑制剤による治療に対して無応答性または不耐性である患者、

b) ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である患者、

あるいは、

c) a) および b) の組合せである患者、であることを特徴とする請求項 2 8 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

20

【請求項 3 2】

ステロイドの節約に有効な量の抗₄ インテグリン免疫グロブリンまたは₄ インテグリンリガンドに対する免疫グロブリンと、

(i) ステロイドでない免疫抑制剤と、(i i) 抗 T N F 組成物と、(i i i) 5 - A S A 組成物と、(i v) (i) から (i i i) の組合せと、からなる群から選択される第 2 の薬剤と、

を含むことを特徴とする多発性硬化症の治療のための併用療法。

【請求項 3 3】

治療上有効な量の第 2 のステロイド節約剤を更に含むことを特徴とする請求項 3 2 に記載の多発性硬化症の治療のための併用療法。

30

【請求項 3 4】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、抗₄ ₁ インテグリン抗体であることを特徴とする請求項 3 2 に記載の多発性硬化症の治療のための併用療法。

【請求項 3 5】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、ナタリズマブであることを特徴とする請求項 3 2 に記載の多発性硬化症の治療のための併用療法。

【請求項 3 6】

前記免疫抑制剤が、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートからなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 2 に記載の多発性硬化症の治療のための併用療法。

40

【請求項 3 7】

前記抗 T N F 組成物が、インフリキシマブであることを特徴とする請求項 3 2 に記載の多発性硬化症の治療のための併用療法。

【請求項 3 8】

前記 5 - A S A 剤が、スルファサラジン、メサラジンおよびオサラジンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 3 2 に記載の多発性硬化症の治療のための併用療法。

【請求項 3 9】

前記疾患が、慢性関節リウマチであり、前記ステロイド節約剤が₄ - 免疫グロブリンまたは₄ リガンドに対する免疫グロブリンであり、前記薬剤が前記対象のステロイド療

50

法を漸減することを可能にするのに十分な量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 40】

前記量が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にするものであり、前記対象がステロイドに対して不応性、不耐性または依存性であることを特徴とする請求項 39 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 41】

前記対象が必要とするステロイドの治療に有効な量が、前記薬剤の投与がない場合に必要とされる量より少ないことを特徴とする請求項 40 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

10

【請求項 42】

前記対象が、

a) 免疫抑制剤による治療に対して無応答性または不耐性である患者、

b) ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である患者、

あるいは、

c) a) および b) の組合せである患者、であることを特徴とする請求項 39 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 43】

ステロイドの節約に有効な量の抗₄ インテグリン免疫グロブリンまたは₄ インテグリンリガンドに対する免疫グロブリンと、

20

(i) ステロイドでない免疫抑制剤と、(ii) 抗 TNF 組成物と、(iii) 5 - A S A 組成物と、(iv) (i) から (iii) の組合せと、からなる群から選択される第 2 の薬剤と、

を含むことを特徴とする慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

【請求項 44】

治療上有効な量の第 2 のステロイド節約剤を更に含むことを特徴とする請求項 43 に記載の慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

【請求項 45】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、抗₄ ₁ インテグリン抗体であることを特徴とする請求項 43 に記載の慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

30

【請求項 46】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、ナタリズマブであることを特徴とする請求項 43 に記載の慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

【請求項 47】

前記免疫抑制剤が、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートからなる群から選択されることを特徴とする請求項 43 に記載の慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

【請求項 48】

前記抗 TNF 組成物がインフリキシマブであることを特徴とする請求項 43 に記載の慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

40

【請求項 49】

前記 5 - A S A 剤が、スルファサラジン、メサラジンおよびオサラジンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 43 に記載の慢性関節リウマチの治療のための併用療法。

【請求項 50】

前記疾患が、宿主対移植片病または移植片対宿主病であり、前記ステロイド節約剤が₄ - 免疫グロブリンまたは₄ リガンドに対する免疫グロブリンであり、前記薬剤が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にする量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 51】

50

前記量が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にするものであり、前記対象がステロイドに対して不応性、不耐性または依存性であることを特徴とする請求項 50 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 52】

前記対象が必要とするステロイドの治療に有効な量が、前記薬剤の投与がない場合に必要とされる量より少ないことを特徴とする請求項 51 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 53】

前記対象が、

a) 免疫抑制剤による治療に対して無応答性または不耐性である患者、

b) ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である患者、

あるいは、

c) a) および b) の組合せである患者、であることを特徴とする請求項 51 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 54】

ステロイドの節約に有効な量の抗₄ インテグリン免疫グロブリンまたは₄ インテグリンリガンドに対する免疫グロブリンと、

(i) ステロイドでない免疫抑制剤と、(ii) 抗 TNF 組成物と、(iii) 5 - A S A 組成物と、(iv) (i) から (iii) の組合せと、からなる群から選択される第 2 の薬剤と、

を含むことを特徴とする宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 55】

治療上有効な量の第 2 のステロイド節約剤を更に含むことを特徴とする請求項 54 に記載の宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 56】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、抗₄ ₁ インテグリン抗体であることを特徴とする請求項 54 に記載の宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 57】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、ナタリズマブであることを特徴とする請求項 54 に記載の宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 58】

前記免疫抑制剤が、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートからなる群から選択されることを特徴とする請求項 54 に記載の宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 59】

前記抗 TNF 組成物が、インフリキシマブであることを特徴とする請求項 54 に記載の宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 60】

前記 5 - A S A 剤が、スルファサラジン、メサラジンおよびオサラジンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 54 に記載の宿主対移植片病または移植片対宿主病の治療のための併用療法。

【請求項 61】

前記疾患が喘息であり、前記ステロイド節約剤が₄ - 免疫グロブリンまたは₄ リガンドに対する免疫グロブリンであり、前記薬剤が対象のステロイド療法を漸減することを可能にする量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 62】

前記量が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にするものであり、前記対象がステロイドに対して不応性、不耐性または依存性であることを特徴とする請求項 61 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

前記対象が必要とするステロイドの治療に有効な量は、前記薬剤の投与がない場合に必要とされる量より少ないことを特徴とする請求項 6 2 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 6 4】

前記対象が、

a) 免疫抑制剤による治療に対して無応答性または不耐性である患者、

b) ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である患者、

あるいは、

c) a) および b) の組合せである患者、であることを特徴とする請求項 6 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。 10

【請求項 6 5】

ステロイドの節約に有効な量の抗₄ インテグリン免疫グロブリンまたは₄ インテグリンリガンドに対する免疫グロブリンと、

(i) ステロイドでない免疫抑制剤と、(i i) 抗 T N F 組成物と、(i i i) 5 - A S A 組成物と、(i v) (i) から (i i i) の組合せと、からなる群から選択される第 2 の薬剤と、

を含むことを特徴とする喘息の治療のための併用療法。

【請求項 6 6】

治療上有効な量の第 2 のステロイド節約剤を更に含むことを特徴とする請求項 6 5 に記載の喘息の治療のための併用療法。 20

【請求項 6 7】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、抗₄ ₁ インテグリン抗体であることを特徴とする請求項 6 5 に記載の喘息の治療のための併用療法。

【請求項 6 8】

前記抗₄ 免疫グロブリンが、ナタリズマブであることを特徴とする請求項 6 5 に記載の喘息の治療のための併用療法。

【請求項 6 9】

前記免疫抑制剤が、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートからなる群から選択されることを特徴とする請求項 6 5 に記載の喘息の治療のための併用療法。 30

【請求項 7 0】

前記抗 T N F 組成物が、インフリキシマブであることを特徴とする請求項 6 5 に記載の喘息の治療のための併用療法。

【請求項 7 1】

前記 5 - A S A 剤が、スルファサラジン、メサラジンおよびオサラジンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 6 5 に記載の喘息の治療のための併用療法。

【請求項 7 2】

前記疾患が、脊椎関節症であり、前記ステロイド節約剤が₄ - 免疫グロブリンまたは₄ リガンドに対する免疫グロブリンであり、前記薬剤が前記対象のステロイド療法を漸減することを可能にする量で投与されることを特徴とする請求項 1 に記載のステロイド節約剤の使用方法。 40

【請求項 7 3】

前記脊椎関節症が、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、ライター症候群、炎症性腸疾患の脊椎炎、未分化脊椎関節症および若年性脊椎関節症からなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 2 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 7 4】

前記対象がステロイドに対して不応性、不耐性または依存性であることを特徴とする請求項 7 3 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 7 5】

前記対象が必要とするステロイドの治療に有効な量は、前記薬剤の投与がない場合に必要とされる量より少ないことを特徴とする請求項 7 4 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

【請求項 7 6】

前記対象が、

- a) 免疫抑制剤による治療に対して無応答性または不耐性である患者、
- b) ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である患者、

あるいは、

c) a) および b) の組合せである患者、であることを特徴とする請求項 7 3 に記載のステロイド節約剤の使用方法。

10

【請求項 7 7】

ステロイドの節約に有効な量の抗 α_4 インテグリン免疫グロブリンまたは α_4 インテグリンリガンドに対する免疫グロブリンと、

(i) ステロイドでない免疫抑制剤と、(i i) 抗 T N F 組成物と、(i i i) 5 - A S A 組成物と、(i v) (i) から (i i i) の組合せと、からなる群から選択される第 2 の薬剤と、

を含むことを特徴とする脊椎関節症の治療のための併用療法。

【請求項 7 8】

治療上有効な量の第 2 のステロイド節約剤を更に含むことを特徴とする請求項 7 7 に記載の脊椎関節症の治療のための併用療法。

20

【請求項 7 9】

前記抗 α_4 免疫グロブリンが、抗 $\alpha_4 \beta_1$ インテグリン抗体であることを特徴とする請求項 7 7 に記載の脊椎関節症の治療のための併用療法。

【請求項 8 0】

前記抗 α_4 免疫グロブリンが、ナタリズマブであることを特徴とする請求項 7 7 に記載の脊椎関節症の治療のための併用療法。

【請求項 8 1】

前記免疫抑制剤が、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートからなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 7 に記載の脊椎関節症の治療のための併用療法。

30

【請求項 8 2】

前記抗 T N F 組成物が、インフリキシマブであることを特徴とする請求項 7 7 に記載の脊椎関節症の治療のための併用療法。

【請求項 8 3】

前記 5 - A S A 剤が、スルファサラジン、メサラジンおよびオサラジンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 7 に記載の脊椎関節症の治療のための併用療法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的に、炎症性腸疾患 (I B D)、喘息、多発性硬化症 (M S)、慢性関節リウマチ (R A)、移植片対宿主病 (G V H D)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の治療用薬剤の調製のためのステロイド節約剤の使用方法に関するものであり、それを必要とする患者にステロイド節約型免疫グロブリンまたは小分子組成物を投与する工程を含む。本発明はまた、一般的に、これらの状態の治療のための併用療法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

炎症は、感染または損傷に対する血管新生化組織の応答であり、血管内皮細胞への白血球の付着および周囲組織へのその浸潤による影響を受ける。正常の炎症では、浸潤白血球は毒性の媒介物を放出して侵入生物を殺し、壊死組織片および死細胞を貪食し、組織修復および免疫応答で役割を果たす。しかしながら、病的な炎症では、浸潤白血球は過剰応答

50

し、重篤または致命的損傷をもたらし得る。例えば、Hickey、Psychoneuroimmunology II (Academic Press 1990)を参照のこと。

【0003】

インテグリンは、細胞接着、免疫細胞の移動および活性化に関する細胞表面糖タンパク質のファミリーである。アルファ-4インテグリンは、好中球を除くすべての循環白血球によって発現され、ベータ-1 (β_1) またはベータ-7 (β_7) インテグリンサブユニットとともにヘテロ二量体受容体を形成する。アルファ-4ベータ-1 ($\alpha_4\beta_1$) およびアルファ-4ベータ-7 ($\alpha_4\beta_7$) は血管内皮を貫通する白血球の移動に役割を果たし (Springerら、Cell 1994、76:301~14頁、Butcherら、Science 1996、272:60~6頁)、実質内の細胞活性化および生存に寄与する (Damleら、J. Immunol. 1993、151:2368~79頁、Koopmanら、J. Immunol. 1994、152:3760~7頁、Leussinkら、Acta Neuropathol. 2002、103:131~136頁)。 $\alpha_4\beta_1$ は、リンパ球、単球、マクロファージ、マスト細胞、好塩基球および好酸球上で主に発現する。

10

【0004】

$\alpha_4\beta_1$ (超遅延抗原 (very late antigen) - 4、VLA-4としても知られている) は、血管細胞接着分子1に結合する (Lobbら、J. Clin. Invest. 1994、94:1722~8頁) が、これは、慢性炎症の多くの部位において血管内皮によって発現される (Bevilacquaら、1993 Annu. Res. Immunol.、11:767~804頁、Postigoら、1993 Res. Immunol.、144:723~35頁)。 $\alpha_4\beta_1$ は、フィブロネクチンおよび他の細胞外マトリックス (ECM) 成分を含む他のリガンドを有する。

20

【0005】

$\alpha_4\beta_7$ 二量体は、粘膜アドレシン細胞接着分子 (MAdCAM-1) と相互作用し、リンパ球の腸へのホーミングを媒介する (Farstadら、1997 Am. J. Pathol.、150:187~99頁、Issekutzら、1991 J. Immunol.、147:4178~84頁)。血管内皮上のMAdCAM-1の発現は、炎症性腸疾患 (IBD) を有する患者の腸管における炎症部位においても増加する (Briskinら、1997 Am. J. Pathol.、151:97~110頁)。

30

【0006】

α_4 インテグリンのような接着分子は、治療薬の有望な標的である。例えば、 α_4 インテグリンがサブユニットであるVLA-4受容体は、脳内皮細胞に存在するリガンドとの相互作用のため、重要な標的である。脳の炎症により生じる疾患および状態は、特に重度の結果を有する。他の例において、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリン二量体は、胃腸管におけるリンパ球ホーミングおよび病的炎症に関与するため、重要な標的である。

【0007】

$\alpha_4\beta_1$ インテグリンは、活性化リンパ球および単球の細胞外表面上に発現され、これらは、多発性硬化症 (MS) に伴う急性炎症性脳病変および血液脳関門 (BBB) の崩壊の病因に関与している (Colesら、1999 Ann. Neurol.、46(3):296~304頁)。 α_4 インテグリンに対する薬剤の抗炎症能が *in vitro* および *in vivo* の両方で試験されている (Yednockら、Nature 1992、356:63~66頁、1998年11月24日発行のBendigらへの米国特許第5840299号および1999年12月14日発行のThorsettらへの米国特許第6001809号を参照)。*in vitro* 実験では、 α_4 インテグリン抗体が脳内皮細胞へのリンパ球の付着を阻害することが示された。多発性硬化症を模倣する人工的に誘発された状態である実験的アレルギー脳脊髄炎 (EAE) を有する動物に対する α_4 インテグリン抗体の効果を試験する実験で、抗 α_4 インテグリン抗体の投与によって動物における脳の炎症と後に続く麻痺が防止されることが示された。まとめると、これらの実

40

50

験によって、抗₄インテグリン抗体は多発性硬化症および他の炎症性疾患および障害の治療のための有望かつ有用な治療薬であることが認められている。

【非特許文献1】Hickey、Psychoneuroimmunology II (Academic Press 1990)

【非特許文献2】Springerら、Cell 1994、76:301~14頁、Butcherら、Science 1996、272:60~6頁

【非特許文献3】Damleら、J. Immunol. 1993、151:2368~79頁

【非特許文献4】Koopmanら、J. Immunol. 1994、152:3760~7頁

【非特許文献5】Leussinkら、Acta Neuropathol. 2002、103:131~136頁

【非特許文献6】Bevilacquaら、1993 Annu. Res. Immunol.、11:767~804頁

【非特許文献7】Postigoら、1993 Res. Immunol.、144:723~35頁

【非特許文献8】Lobbら、J. Clin. Invest. 1994、94:1722~8頁

【非特許文献9】Farstadら、1997 Am. J. Pathol.、150:187~99頁

【非特許文献10】Issekutzら、J. Immunol.、147:4178~84頁

【非特許文献11】Briskinら、1997 Am. J. Pathol.、151:97~110頁

【非特許文献12】Colesら、1999 Ann. Neurol.、43(3):296~304頁

【非特許文献13】Yednockら、Nature 1992、356:63~66頁

【特許文献1】米国特許第5,840,299号

【特許文献2】米国特許第6,001,809号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ステロイドは、炎症状態の治療にしばしば適応されるが、長期間安全に使用することはできない。ステロイドは、免疫系を弱めながら炎症を低減させる。ステロイドを服用している患者は、ステロイドに対して依存性、不耐性または不応性になる可能性がある。ステロイドの例としては、ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン、フルオロメトロン、プレドニゾン、プレドニゾン、メドリゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、リメキソロンおよびトリアムシノロンなどがある。

【0009】

多くの深刻な副作用がステロイドの使用には付きものである。ステロイドの長期の使用は、長期にわたる副作用の危険性が高いため断念される。よくみられる副作用のいくつかとして、免疫抑制、糖尿病、体重増加、あくね、白内障、高血圧、精神病、多毛症、気分変動、胃炎、筋脱力、易挫傷、骨粗鬆症、感染および無菌性壊死のリスクの増加などである。2カ月間以上ステロイドを服用する患者は、骨粗鬆症を予防するために、カルシウムおよびビタミンD補助食品またはビホスホネートなどの他の薬物をしばしば服用しなければならない。小児におけるステロイドの長期の使用は、発育の遅滞および成人で発生する副作用のリスクをもたらす。

【0010】

現在までのところ、例えば、クローン病、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性関節リウマチ(RA)、移植片対宿主病(GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症な

10

20

30

40

50

どの炎症状態を、ステロイドを必要としないで安全かつ有効に治療することを可能にしたり、あるいはステロイドの漸減および/または中止を可能にする療法は発見されていない。統計的に有意な量のステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を低減または排除するためのステロイド節約剤およびこれらの薬剤を用いる方法は、炎症性疾患の治療のために必要であり、探求し続けられている。

【0011】

上記のことに基づいて、ステロイドの使用を必要とする炎症性疾患を効果的に治療または抑制して、患者が長い寿命とより良い生活の質を達成することができるよう、これらの疾患を治療する新規の組成物および方法が必要である。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、一般的に、炎症性腸疾患（IBD）、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の治療用の薬剤の調製のためのステロイド節約剤の使用方法に関するものであり、ステロイドの使用を低減または排除することを可能にする薬剤を投与する工程を含む。

【0013】

本発明の薬剤がステロイド節約型であることが意外にも発見された。ステロイドは、しばしば炎症状態の治療に向くことが示されているが、長期間に安全に使用することはできない。ステロイドは、免疫系を弱める炎症を低減させる。ステロイドを服用している患者は、ステロイドに対して依存性、不耐性または不応性になる可能性がある。

20

【0014】

したがって、本発明の薬剤は、クローン病、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症などの炎症状態の安全かつ有効な治療を、ステロイドの必要を必要としないで可能にするか、あるいはステロイドの漸減および/または中止を可能にする。

【0015】

1つの実施形態において、ステロイド節約剤は、抗体またはその免疫学的に活性なフラグメント、好ましくは抗₄免疫グロブリンであってよい。抗体またはその免疫学的に活性なフラグメントは、好ましくはナタリズマブ（Tysabri（登録商標））またはその免疫学的に活性なフラグメントである。したがって、抗₄免疫グロブリンは、炎症性腸疾患（IBD）、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症からなる群から選択される疾患の治療のために対象に投与することができる。治療上有効な量を投与すると、抗₄免疫グロブリンは、対象のステロイド療法を漸減することを可能にする。したがって、抗₄免疫グロブリンを本発明により対象に投与すると、対象は抗₄免疫グロブリンを投与しない場合に必要な量より少ない治療上有効な量のステロイドを必要とすることが驚くべきことに発見された。

30

【0016】

他の実施形態において、ステロイド節約剤は本明細書に記載されるような小分子であってよい。したがって、該小分子は炎症性腸疾患（IBD）、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症からなる群から選択される疾患の治療のために対象に投与することができる。本明細書に記載されるような小分子は、治療上有効な量を投与すると、対象のステロイド療法を漸減することを可能にする。したがって、本明細書に記載されるような小分子を本発明による対象に投与すると、対象は該化合物を投与しない場合に必要な量より少ない治療上有効な量のステロイドを必要とすることが驚くべきことに発見された。

40

【0017】

本発明はまた、一般的に、これらの状態の治療のための併用療法に関する。したがって、本発明のステロイド節約剤は、他のステロイド節約剤と併用して、ならびに免疫抑制剤

50

(但し、免疫抑制剤はステロイドではない)、抗TNF組成物、5-ASA組成物およびその組合せと併用して、投与することができる。ステロイド節約剤は、本明細書で以下に記載するような小分子であり得る。別法では、ステロイド節約剤は、VLA-4に対する抗体もしくはその免疫学的に活性なフラグメント、またはVLA-4に結合し、それにより同族リガンドに結合することを妨げるポリペプチドであってよい。

【0018】

本発明はさらに、医薬品として許容できる担体および本明細書に開示されるような治療上有効な量のステロイド節約剤を含み、それを必要としている対象に投与したときステロイドの使用を低減または排除することを可能にする医薬品組成物に関する。

【0019】

本発明の組成物は、経口、非経口(例えば、皮下、硬膜下、静脈内、筋肉内、くも膜下腔内、腹腔内、大脳内、動脈内または病変内の投与ルート)、局所、局在型(例えば、外科的適用または外科的坐剤)、腸および肺(例えば、エアゾール剤、吸入剤または散剤)を含む様々な投与ルートにより投与することができる。好ましくは、本発明の組成物は、非経口的に投与される。

【0020】

本発明のこれらおよび他の目的、利点ならびに特徴は、以下により完全に記載されている方法および処方の詳細を読むことによって当業者には明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

本発明の方法および治療剤を説明する前に、本発明は記載される特定の使用および治療剤に限定されず、したがって、もちろん変化し得るものと理解すべきである。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書で用いた用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであって、限定することを意図するものでないことも理解すべきである。

【0022】

数値の範囲が示されている場合、他で明確に記載の無い限り、当該範囲の上限および下限の間の下限の単位の十分の一までの各間の値、ならびに当該指定範囲内の他の指定または間の値は本発明に含まれると理解される。これらのより小さい範囲の上および下限は、指定された範囲における特に除外された限界に属するより小さいものに独立に含まれることがある。指定された範囲が限界の1つまたは両方を含む場合、それらの含まれた限界の両方のいずれかを除外する範囲も本発明に含まれる。引用された範囲内に入るいずれかの値も予想される。

【0023】

特に定義しない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語は、本発明が属する分野の技術者によって一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書で記載されるものと類似または同等な方法および材料も本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法および材料が以下に説明される。本明細書で言及したすべての刊行物は、その刊行物がそれに関連して挙げられている方法および/または材料を開示し説明するために、参照により本明細書に合体される。

【0024】

1. 略語および定義

この詳細な説明に従って、以下の略語および定義が適用される。本明細書で用いられる場合、文脈が明確に別に要求するものでない限り、「a」「an」「the(該)」の単数形は複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「an antibody(抗体)」という表示は複数のそのような抗体を含み、「the dosage(該用量)」は1つまたは複数の用量を含み、当業者に知られているものに相当する等である。

【0025】

本明細書で述べる刊行物は、本出願の出願日前の開示のためにだけ記載する。本明細書におけるいずれも、本明細書のいかなる部分も先行の発明に基づくという理由により上記

10

20

30

40

50

刊行物に先行する資格が本発明にないと認められると解釈すべきでない。さらに、記載した刊行物の日付は、実際の公表日と異なる可能性があり、これは独立に確認する必要がある。

【 0 0 2 6 】

1 . 1 略語

以下の略語を本明細書で用いた。

A C T H 副腎皮質刺激ホルモン

A N A 抗核抗体

a q または a q . 水性

B B B 血液脳関門

C 免疫グロブリンの定常領域

C D クローン病

C D A I クローン病活動度指数

c D N A 相補的デオキシリボ核酸

C D R 相補性決定領域

C D R 1 相補性決定領域 1

C D R 2 相補性決定領域 2

C D R 3 相補性決定領域 3

C N S 中枢神経系

C O X - 2 シクロオキシゲナーゼ - 2

C R P C 反応性タンパク質

C S コケーン症候群

C S F コロニー刺激因子

D M S O ジメチルスルホキシド

D N A デオキシリボ核酸

E A E 実験的自己免疫脳脊髄炎

E B N A 2 エプスタイン - バーウイルス核抗原 2

E C M 細胞外マトリックス

E L A M S 内皮接着分子

E M 電子顕微鏡

F A C S 蛍光活性化細胞解析分取装置

F R フレームワーク領域

F R 1 フレームワーク領域 1

F R 2 フレームワーク領域 2

F R 3 フレームワーク領域 3

G M - C S F 顆粒球単球コロニー刺激因子

G V H D 移植片対宿主病

h または h r 時間

H 免疫グロブリンの重鎖

H A M A ヒト抗マウス抗体

H - E ヘマトキシリン - エオシン

h e x A ヘキサアミニダーゼ A

H I C 疎水性クロマトグラフィー

H I G ヒト免疫グロブリン

H M S N I V 遺伝性運動感覚性ニューロパシー I V (遺伝性多発性神経炎性失調としても知られている)

H ₂ O 水

I C A M - 1 細胞間接着分子 1

I g 免疫グロブリン

I g G 免疫グロブリン G

10

20

30

40

50

I g M	免疫グロブリン M	
I L	インターロイキン	
I L - 1	インターロイキン 1	
I L - 2	インターロイキン 2	
I L - 8	インターロイキン 8	
I B D	炎症性腸疾患	
I B D Q	炎症性腸疾患質問票	
i m m u n o U I	免疫抑制剤に対して無応答性または不耐性の集団	
I T T i n t e n t i o n - t o - t r e a t	(投与を受けたかどうかにかかわらず、無作為化されたすべての対象を含める)	10
L	免疫グロブリンの軽鎖	
L F A - 1	リンパ球機能関連抗原 1 (α ₂ インテグリン、C D 1 1 a / C D 1 8 および β ₂ としても知られている)	
M A b s	モノクローナル抗体	
M a c - 1	α _M β ₂ インテグリン (C D 1 1 b / C D 1 8 としても知られている)	
M A d C A M - 1	粘膜アдресин細胞接着分子	
M A L D I / T O F M S	マトリックス援用レーザー脱着イオン化 / 時間飛行質量分析	
M C P - 1	単球走化性タンパク質 1	
M e O H	メタノール	
M I P - 1	マクロファージ炎症性タンパク質 1	20
M I P - 1	マクロファージ炎症性タンパク質 1	
M L D	異染色性白質ジストロフィ	
M S	多発性硬化症	
N	正常	
N S A I D	非ステロイド性抗炎症薬	
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応	
P E G	ポリエチレングリコール	
P K U	フェニルケトン尿症	
P L P	プロテオリピドタンパク質	
R N A	リボ核酸	30
r t	室温	
R T - P C R	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応	
S A E	重篤な有害事象	
S D S P A G E	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル	
S F - 3 6	生活の質質問票	
S A M I s	選択的接着分子阻害剤	
s a t	または s a t . 飽和	
s c F v	短鎖 F v フラグメント	
ステロイド U I D	ステロイドに対して無応答性、不耐性または依存性の集団	
T G F -	腫瘍増殖因子	40
T L C	または t l c 薄層クロマトグラフィー	
T N F	腫瘍壊死因子	
T N F -	腫瘍壊死因子	
T N F -	腫瘍壊死因子	
V C A M - 1	血管細胞接着分子 1	
V _H	可変領域の重鎖	
V _L	可変領域の軽鎖	
V L A - 4	超遅延抗原 4 (アルファ - 4 ベータ - 1、 α ₄ β ₁ としても知られている)	
【 0 0 2 7 】		
1 . 2	定義	50

20種の天然に存在するアミノ酸の略記は、従来の慣用法に従う (IMMUNOLOG
Y - A SYNTHESIS (2nd ed., E. S. Golub & D. R. Gren
eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass
, 1991))。20種の通常のアミノ酸の立体異性体 (例えば、D - アミノ酸)、
、 - 二置換アミノ酸などの非天然アミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸および他の非
定型的アミノ酸も本発明のポリペプチドの適切な成分であってよい。非定型的アミノ酸の
例としては、4 - ヒドロキシプロリン、 - カルボキシグルタミン酸、 - N, N, N -
トリメチルリシン、 - N - アセチルリシン、O - ホスホセリン、N - アセチルセリン、
N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリシン、 - N - メチ
ルアルギニンならびに他の類似のアミノ酸およびイミノ酸 (例えば、4 - ヒドロキシプロ
リン) などがある。さらに、アミノ酸は、グリコシル化、リン酸化等により修飾してよい
。

10

20

【0028】

本明細書で用いられるポリペプチドの表記法において、標準慣用法および慣例に従って
、左方向はアミノ末端方向であり、右方向はカルボキシ末端方向である。同様に、特に断
らない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左末端は5'末端であり、二本鎖ポリヌクレ
オチド配列の左方向は5'方向と呼ばれる。ナセントRNA転写物の3'付加に対する5
'の方向は、転写方向と呼ばれる。RNAと同じ配列を有し、RNA転写物の5'末端に
対して5'側にあるDNA鎖上の配列領域は、「上流配列」と呼ばれる。RNAと同じ配
列を有し、RNA転写物の3'末端に対して3'側にあるDNA鎖上の配列領域は、「下
流配列」と呼ばれる。

【0029】

「ポリヌクレオチド配列」という句は、5'から3'末端まで読まれるデオキシリボヌ
クレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本または二本鎖ポリマーを指す。これは、自
己複製プラスミド、DNAまたはRNAの感染性ポリマーおよび非機能性DNAまたはR
NAを含む。

【0030】

次の用語は、2つ以上のポリヌクレオチド間の配列関係を説明するために用いられる。
すなわち、「対照標準配列」、「比較ウインドウ」、「配列同一性」、「配列同一性の割
合」および「実質的同一性」。「対照標準配列」は、配列の比較のための基礎として用い
られる定義された配列である。対照標準配列は、例えば、配列一覧に示されている全長c
DNAまたは遺伝子配列のセグメントとしてのより大きい配列のサブセットであってよく
、あるいは完全なDNAまたは遺伝子配列を含んでいてよい。一般的に、対照標準配列は
、長さが少なくとも20ヌクレオチド、しばしば長さが少なくとも25ヌクレオチド、ま
たしばしば長さが少なくとも50ヌクレオチドである。2つのポリヌクレオチドは各々 (1) 2つのポリヌクレオチド間で類似した配列 (すなわち、完全なポリヌクレオチド配列
の一部) を含む可能性があり、(2) 2つのポリヌクレオチド間で互いに異なる配列をさ
らに含む可能性があるので、2つ (またはそれ以上) のポリヌクレオチド間の配列の比較
は、配列類似性の局所領域を特定し、比較するために、2つのポリヌクレオチドの配列を
「比較ウインドウ」にわたり比較することによって一般的に行われる。本明細書で用いら
れる「比較ウインドウ」は、少なくとも20の連続ヌクレオチド位置の概念的セグメント
を指し、あるポリヌクレオチド配列を少なくとも20の連続ヌクレオチドの対照標準配列
と比較することができ、比較ウインドウにおけるポリヌクレオチド配列の一部は、2つの
配列の最適の整列のために、対照標準配列 (付加または欠失を含まない) と比較して20
%以下の付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含んでいてよい。比較ウインドウを整
列するための配列の最適の整列は、Smith & Waterman, Adv. Appl.
Math. 2: 482頁 (1981) の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443頁 (1970) の相同性整列
アルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad.
Sci. (USA) 85: 2444頁 (1988) の類似方法の調査により (各々をすべ

30

40

50

ての目的のためにその全体を参照により援用する)、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis.)のコンピュータによる実行により、または視察により行うことができ、種々の方法により得られる最善な整列(すなわち、比較ウィンドウにわたる最高の割合の配列類似性をもたらす)を選択する。「配列同一性」という用語は、2つのポリヌクレオチド配列が比較ウィンドウにわたり同一である(すなわち、ヌクレオチドごとに)ことを意味する。「配列同一性の割合」は、比較ウィンドウにわたり2つの最適に整列させた配列を比較し、両配列に同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、UまたはI)が存在する位置の数を測定して一致した位置の数を求め、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で割り、結果に100を掛けて、配列同一性の割合を得ることによって計算される。本明細書で用いられる「実質的同一性」という用語は、ポリヌクレオチドが、少なくとも20のヌクレオチド位置の比較ウィンドウにわたり、しばしば少なくとも25~50ヌクレオチドのウィンドウにわたり対照標準配列と比較して少なくとも85%の配列同一性、好ましくは少なくとも90~95%の配列同一性、より通常少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチド配列の特徴を意味し、配列の同一性の割合は、対照標準配列を、比較ウィンドウにわたり対照標準配列の合計20%以下の欠失または付加を含んでいてよいポリヌクレオチド配列と比較することによって計算する。対照標準配列は、より大きい配列のサブセットであってよい。

10

20

【0031】

ポリペプチドに適用される場合、「配列同一性」という用語は、ペプチドが対応する位置に同一アミノ酸を共有することを意味する。「配列類似性」という用語は、ペプチドが対応する位置に同一または類似アミノ酸を有すること(すなわち、同類置換)を意味する。「実質的同一性」という用語は、2つのペプチド配列が、デフォルトギャップ重量を用いてプログラムGAPまたはBESTFITなどにより最適に配列させたとき、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性またはそれ以上(例えば、99%の配列同一性)を共有することを意味する。同一でない残基位置は、同類アミノ酸置換によって異なっていることが好ましい。「実質的同一性」という用語は、2つのペプチド配列が対応する割合の配列類似性を共有することを意味する。

30

【0032】

本明細書で用いられる「実質的に類似」という用語は、機能的に同等のアミノ酸がポリペプチドにおける1つまたは複数のアミノ酸を置換しており、それにより、該ポリペプチドの結合特性に全く影響を及ぼさない、または比較的わずかな影響を及ぼす変化をもたらすような配列の変化を有するポリペプチドを意味する。例えば、配列内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、類似の極性または類似のサイズの他のアミノ酸で置換することができる。

【0033】

「実質的に純粋」という用語は、目的種が存在する優勢な種であり(すなわち、モル基準で、組成物中の他の個別の種より豊富である)、好ましくは実質的に精製された画分が組成物であり、目的種が存在するすべての巨大分子種の少なくとも約50%(モル基準で)を含むことを意味する。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての巨大分子種の約80~90%以上を含む。最も好ましくは、目的種は本質的な同質になるまで精製され(従来の検出方法により汚染種を組成物中に検出することができない)、組成物が単一巨大分子種から本質的になっている。

40

【0034】

アミノ酸置換を同類または非同類と分類する目的のために、アミノ酸を次のように分類した。群1(疎水性側鎖):ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile、群2(中性親水性側鎖):cys、ser、thr、群III(酸性側鎖):asp、g

50

l u、群 I V (塩基性側鎖) : a s u、g l n、h i s、l y s、a r g、群 V (鎖配向に影響を及ぼす残基) : g l y、p r o、および群 V I (芳香族側鎖) : t r p、t y r、p h e。同類置換は、同じクラスのアミノ酸間の置換を伴う。非同類置換は、これらのクラスの 1 つのメンバーと他とを交換することである。

【0035】

免疫グロブリンの成熟重および軽鎖の可変領域のアミノ酸は、それぞれ H x および L x x と表される。ここで、「x」は、K a b a t ら、S E Q U E N C E S O F P R O T E I N S O F I M M U N O L O G I C A L I N T E R E S T (N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h、B e t h e s d a、M d . (1 9 8 7) および (1 9 9 1)) (以後、総称して「K a b a t」と呼ぶ、それらの全体を参照により援用する) のスキームに従ってアミノ酸の位置を表す数である。K a b a t は、各サブクラスに対する抗体の多くのアミノ酸配列を列挙し、当該サブクラスにおける各残基位置において最も一般的に存在するアミノ酸を列挙する。K a b a t は、列挙された配列における各アミノ酸に残基番号を割り当てる方法を使用し、この残基番号を割り当てる方法は、当分野における標準になっている。K a b a t のスキームは、問題の抗体を K a b a t におけるコンセンサス配列の 1 つと整列させることによって、一覧に含まれていない他の抗体に拡大することができる。K a b a t 番号付けシステムを用いることによって、異なる抗体の同等の位置におけるアミノ酸を容易に同定することができる。例えば、ヒト抗体の L 5 0 位置におけるアミノ酸は、マウス抗体のアミノ酸位置 L 5 0 と同等の位置を占める。

10

20

【0036】

「試薬」または「薬剤」は、リガンド受容体に結合する生物学的に活性な分子を示すのに用いる。例えば、V L A - 4 受容体または V C A M - 1 と免疫反応する抗体またはそのフラグメントは、ステロイドに対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を排除することができる。細胞表面受容体に作用して結合することができるペプチドまたはペプチドミメティックもしくは関連化合物も考慮され、当技術分野で知られている方法による合成により調製することができる。本明細書で述べるように、あるいは当業者に明らかなように V L A - 4 受容体と反応する他の試薬も考慮される。

【0037】

「ステロイド節約剤」は、本明細書で用いられる場合、ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を統計的に有意な量で低減または排除する薬剤を指す。好ましくは、そのような薬剤としては、有効な量を投与したとき、ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を低減または排除する、免疫グロブリン (例えば、抗体、抗体フラグメントおよび組換えにより生産した抗体または抗体フラグメント)、ポリペプチド (例えば、インテグリンに対するリガンドタンパク質の可溶形) および小分子などがある。これらの薬剤は、抗₄ インテグリン薬 (好ましくは抗₄₁ または抗₄₇ 拮抗薬) および抗 V C A M - 1 薬であってよい。しかし、本発明に関しては、そのような抗₄ インテグリンおよび抗 V C A M - 1 薬は、有効な量を投与したときステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を低減または排除するもののみを含む。

30

40

【0038】

本明細書で用いられる「抗₄ インテグリン薬」という用語は、₄ サブユニットを含むインテグリンに特異的に結合し、インテグリンの活性を阻害するあらゆる薬剤を指す。

【0039】

「インテグリン拮抗薬」は、₄ サブユニットを含むインテグリンがインテグリンリガンドおよび/または受容体に結合することを阻害するあらゆる薬剤を含む。好ましくは、インテグリン拮抗薬は₄₁ 二量体および/または₄₇ 二量体がその同族リガンドに結合することを阻害する。そのような拮抗薬は、抗インテグリン抗体または抗体同族体を含むタンパク質およびインテグリンに対する可溶形のリガンドタンパク質などの他の分

50

子を含み得る。₄ サブユニットを含むインテグリンに対する可溶性のリガンドタンパク質は、可溶性 V C A M - 1、V C A M - 1 融合タンパク質または二元機能 V C A M - 1 / I g 融合タンパク質を含む。例えば、可溶性のインテグリンリガンドまたはそのフラグメントは、インテグリンに結合し、好ましくは細胞上のインテグリン結合部位に対して競合し、それにより抗インテグリン（例えば、V L A - 4）抗体のような拮抗薬の投与と同様な効果をもたらすために投与することができる。特に、リガンドに結合するが、インテグリン依存性シグナリングを誘発しない可溶性インテグリン突然変異体は、本発明の範囲内に含まれる。

【 0 0 4 0 】

「ナタリズマブ」または「T y s a b r i（登録商標）」は、全体を参照により本明細書に取り込まれる同一所有権者による米国特許第 5 8 4 0 2 9 9 号および第 6 0 3 3 6 6 5 号明細書に記載されているように V L A - 4 に対するヒト化抗体である。他の V L A - 4 特異抗体も本明細書において考慮されている。そのようなステロイド節約型抗体および免疫グロブリンは、米国特許第 6 6 0 2 5 0 3 号および第 6 5 5 1 5 9 3 号明細書、公告済米国特許出願番号第 2 0 0 2 0 1 9 7 2 3 3 号（R e l t o n ら）明細書に記載され、また本明細書でさらに述べる免疫グロブリンを含むが、これらに限定されない。

10

【 0 0 4 1 】

長期投与法の状況において本明細書で用いる「有効性」という用語は、特定の治療法の有効性を指す。有効性は、本発明の薬剤に反応しての疾患の経過の変化に基づいて測定することができる。例えば、M S の治療において、有効性は再発寛解型 M S における再発の頻度により、また M R I のような方法を用いて検出される中枢神経系の新たな病変の存非により測定することができる。

20

【 0 0 4 2 】

長期治療法の状況において本明細書で用いる「成功」という用語は、特定の治療法の有効性を指す。これは、有効性、毒性（例えば、製剤または投与単位の副作用および患者耐性）、患者服薬遵守等のバランスを含む。「成功」とみなされる長期投与法については、最も好ましい患者転帰を得るために患者ケアおよび有効性の種々の側面を均衡させるものでなければならない。

【 0 0 4 3 】

本明細書で用いる「特異的に結合する」という用語は、特異的結合対の 1 つのメンバーがその特異的結合パートナー（例えば、その結合パートナーに対して約 1 0 0 0 倍以上の親和力を有する）以外の分子に対して有意な結合を示さない状況を指す。本発明では、N - [N - (3 - ピリジンスルホニル) - L - 3 , 3 - ジメチル - 4 - チアプロリル] - O - [1 - メチルピペラジン - 4 - イルカルボニル] - L - チロシンイソプロピルエステルのような小化合物は、₄ インテグリンまたは ₄ インテグリンを含む受容体以外のポリペプチドに有意な結合を示さない。例えば、0 . 3 n M を超える結合親和力を有する ₄ インテグリンに結合する本発明の方法で用いられるすべての小化合物は、₄ インテグリンに特異的に結合すると言われる。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書で用いる「免疫反応を誘発する」および「宿主免疫反応を誘発する」という用語は、対象への本発明の薬剤の導入による、対象における ₄ インテグリンを含む受容体に対する免疫反応の発生を指す。対象における免疫反応は、約 1 : 1 0 0 の血清希釈度を用いて血清免疫反応性を測定した場合、無処置対照の反応性の少なくとも 2 倍、より好ましくは無処置対照の反応性の 3 倍、さらにより好ましくは無処置対照の反応性の少なくとも 4 倍である ₄ インテグリン受容体との血清反応性によって特徴付けることができる。

40

【 0 0 4 5 】

「製薬上許容できる担体または賦形剤」という用語は、単に担体として作用することを意図する、すなわちそれ自体生物学的活性を有することを意図しない製剤の一部を形成させるのに用いられる化合物を意味することを意図する。製薬上許容できる担体または賦形剤は、一般的に安全かつ無毒性で、生物学的にも他の点でも望ましくないものでないもの

50

である。本明細書および特許請求の範囲で用いられる製薬上許容できる担体または賦形剤は、1つおよび複数のそのような担体を含む。

【0046】

「治療すること」および「治療」という用語は、一般的に所望の薬理学的および生理学的効果を得ることを意味するように本明細書で用いられる。より具体的には、本明細書に記載される試薬は、ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を低減かつ/または排除するために用いられる。したがって、その効果は、その疾患、症状または状態を防止または部分的に防止するという点から予防的であってよく、かつ/あるいは疾患、状態、症状、または治療される状態または疾患によって疾患に起因する有害な影響の部分的または完全な治癒という点から治療的であってよい。「治療」という用語は、本明細書で用いる場合、哺乳類、特にヒトにおける疾患の治療を含み、(a)疾患の素因があるが、疾患を有すると未だ診断されていない対象における疾患が発生することを予防すること、(b)疾患を抑制すること、すなわち、その発現を抑えること、あるいは(c)疾患を軽減すること、すなわち、疾患および/またはその症状もしくは状態の後退をもたらすことを含む。本発明は、病的炎症に関連する疾患に罹患している患者の治療を対象とする。本発明は、長期間にわたる、かつ/または長期間にわたり生体系に存在する不適切な炎症に対する生理的反応によって引き起こされるような病的炎症、好ましくは、クローン病のような炎症性腸疾患、喘息、MS、RAまたは種々の脊椎関節症に起因する有害な影響を予防、抑制または軽減することに関する。

10

【0047】

「治療上有効な量」とは、哺乳類に投与したとき、ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を統計的に有意な量で低減または排除するのに十分な本明細書に開示する薬剤、試薬または試薬の組合せの量を意味する。

20

【0048】

「ステロイド節約有効量」という用語は、ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要を統計的に有意な量で低減または排除するのに有効な薬剤、試薬または組成物の量を意味する。「ステロイド節約有効量」は、組成または組成物、治療する特定の疾患およびその重症度、治療する哺乳類の年齢、体重等によって異なる。

30

【0049】

「長期投与」とは、ステロイドによる治療に対して無応答性、不耐性または依存性である対象におけるステロイドの必要の低減または排除をもたらす量および周期性での本発明の薬剤、試薬または併用療法の投与を意味する。投与は、好ましくは週2回、週1回、月1回または隔月であるが、毎日であり得る。より好ましくは、治療は週1回または月1回であり、治療する疾患または状態によって6カ月間から数年間または患者の寿命の残りの期間投与する。

【0050】

式Iから式IXの化合物に関するさらなる定義は、本明細書で定義するとおりである。

【0051】

2. 本発明の一般的態様

2.1 疾患および状態

以下の疾患および/または状態は、本発明のステロイド節約剤を用いて治療かつ/または防止することができる。

【0052】

2.1.1 炎症性腸疾患

炎症性腸疾患(IBD)は、腸の炎症を引き起こす疾患に付与された一般名である。炎症性腸疾患は、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む。

【0053】

2.1.1.1 クローン病

50

クローン病は、小腸の炎症を引き起こす。クローン病は、通常、小腸の下部、すなわち、回腸に発生するが、消化管のあらゆる部分を冒し得る。炎症は、罹患した臓器の裏層の深部に達し、疼痛を引き起こし、しばしば腸を空にする。クローン病は、回腸炎または腸炎と呼ばれることもある。クローン病は、男性と女性を同等に罹患させ、一部の家族を罹患させる。クローン病を有する人々の約20%がなんらかの種類のIBDを有する血族を有する。

【0054】

クローン病の疾患の原因は、不明である。1つの理論は、免疫系が腸の持続性炎症を引き起こすことによってウイルスまたは細菌と反応するというものである。クローン病に罹患している患者は、免疫系の異常を有する傾向があるが、これらの異常が疾患の原因または結果であるかどうかは不明である。

10

【0055】

クローン病の最も一般的な症状は、しばしば右下部における腹痛および下痢などである。直腸出血、体重減少および発熱も起こることがある。出血は、重篤かつ持続性で、貧血につながることもある。クローン病を有する小児は、発育遅滞および発育障害に罹患することがある。

【0056】

クローン病の最も一般的な合併症は、腸の閉塞である。閉塞は、クローン病が腫脹および瘢痕組織による腸壁の肥厚をもたらし、腸の通路を狭窄させるために起こる。クローン病は、罹患部位を通り抜けて膀胱、膣または皮膚などの周囲組織に入るトンネルを作るびらんおよび潰瘍も引き起こすことがある。瘻と呼ばれるトンネルは、一般的な合併症であり、しばしば感染された状態になる。時として、瘻は投薬により治療することができるが、手術を必要とすることが多い。

20

【0057】

タンパク質、カロリーおよびビタミンの欠乏のような栄養合併症がクローン病に一般的である。クローン病に伴う他の合併症は、関節炎、皮膚問題、眼もしくは口の炎症、腎臓結石、胆石または肝臓および胆管系の他の疾患などである。

【0058】

クローン病の治療は、疾患の位置および重症度、合併症ならびに以前の治療に対する反応に依存する。治療の目標は、炎症を抑制し、栄養欠乏の矯正ならびに腹痛、下痢および直腸出血のような症状を軽減することである。治療は、薬剤、栄養補給、手術またはこれらの選択肢の組合せを含んでよい。現時点では、治療による治癒はない。一部の患者は、症状がない長期の寛解を有する。しかし、クローン病は通常、人の生涯の種々の時点に再発する。寛解がいつ起こるか、あるいは症状がいつ再発するかを予測することは可能ではない。

30

【0059】

ほとんどの患者が最初に炎症の抑制の助けとなる物質であるメサラミンを含む薬剤の投与を受ける。スルファサラジンも一般的に用いられている。それによる利益を得ない患者、あるいはそれに耐えることができない患者には、Dipentum（登録商標）またはPentasa（登録商標）のような5-ASA剤として一般的に知られている他のメサラミン含有薬を投与してよい。メサラミン製剤の発生し得る副作用は、悪心、嘔吐、胸やけ、下痢および頭痛などである。

40

【0060】

一部の患者に、炎症を抑制するためにブデソニドのようなステロイドが投与される。これらの薬剤は、活動性のクローン病に最も有効であるが、感染に対するより大きい感受性を含む重大な副作用を引き起こすことがある。免疫系を抑制する薬剤もクローン病の治療に用いられている。最も一般的には6-メルカプトプリンおよびアザチオプリンが含まれる。免疫抑制剤は、炎症の一因である免疫反応を妨げることによって作用する。これらの薬剤は、悪心、嘔吐および下痢のような副作用を引き起こし、炎症に対する患者の抵抗性を低下させることがある。

50

【0061】

狭窄、瘻または以前の手術が原因となる小腸における細菌の異常増殖を処置するために抗生物質が用いられている。この一般的な問題に対して、医師はアンピシリン、スルホンアミド、セファロスポリン、テトラサイクリンまたはメトロニダゾールなどの抗生物質を処方する。

【0062】

生物学的製剤もクローン病の治療に用いられている。インフリキシマブ (Remicade (登録商標)) は、標準療法 (すなわち、メサラミン物質、コルチコステロイドおよび免疫抑制剤) に対して反応しない中等度から重度のクローン病の治療および開放排膿性瘻の治療を適応とする。インフリキシマブは、抗腫瘍壊死因子 (TNF) 物質である。TNF は、クローン病に伴う炎症を引き起こすことがある免疫系によって産生されるタンパク質である。

10

【0063】

腸の一部を除去する手術は、クローン病を改善することができるが、治癒させることはできない。除去された部位に隣接する腸の部位に炎症が再発する傾向がある。多くのクローン病患者は、薬物療法に反応しない症状を軽減するため、あるいは腸の閉塞、穿孔、膿瘍または出血のような合併症を矯正するために、手術を必要とする。一部の患者は、結腸切除術により結腸全体の切除を受けなければならない。HARRIS PONS' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE、13th ED.、(1994) McGraw Hill、New York、1403~1405頁、THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE、58th Ed. (2004) Thomson PDR、Montvale、NJ、402頁、1130頁、2707頁、3153~3155頁、3173頁を参照のこと。

20

【0064】

2.1.1.2 潰瘍性大腸炎

潰瘍性大腸炎は、結腸粘膜に生ずる慢性、炎症性および潰瘍性疾患である。潰瘍性大腸炎の原因は、不明である。遺伝的素因が環境、食事または感染性物質に対する無秩序な腸の免疫反応を引き起こすことを示唆する証拠がある。しかし、誘因となる抗原は同定されていない。

【0065】

病理学変化は、粘膜上皮の下のレチクリン線維の変性、上皮毛細管の閉塞ならびに形質細胞、好酸球、リンパ球およびマスト細胞による固定層の進行性浸潤から始まる。陰窩膿瘍、上皮壊死および粘膜潰瘍が最終的に発生する。疾患は、通常直腸S状結腸に始まり、結腸全体に及ぶことがあり、あるいは大腸の大部分を巻き込むことがある。

30

【0066】

症状としては、血性下痢、腹膜炎および深在性毒血症などがある。一部の症例は、実証済み感染 (すなわち、アメーバ症または細菌性赤痢により) の後に発生する。倦怠感、発熱、貧血、食欲不振、体重減少、白血球増加症および低アルブミン血症が存在する可能性がある。出血が最も一般的な局所合併症である。他の重篤な合併症である中毒性大腸炎は、潰瘍形成の拡大が限局性腸閉塞および腹膜炎をもたらすときに起こる。中毒性大腸炎が進行するにつれて、結腸は筋緊張を失い、数時間あるいは数日以内に拡張し始める。

40

【0067】

横行結腸の直径が6cmを超えているとき、中毒性巨大結腸 (または中毒性拡張) が存在し、高熱、白血球増加、腹痛および反跳痛がもたらされる。穿孔、汎発性腹膜炎および敗血症のような危険な合併症を避けるために、治療は初期に行わなければならない。結腸全体が罹患し、疾患がその活動性にかかわらず10年を超えて持続するとき、結腸癌の発生率が増加する。癌の発生率は汎発性潰瘍性結腸炎の場合に最も高いが、そのリスクは、S状結腸の上の潰瘍性結腸炎の程度とともに著しく増加する。

【0068】

他の合併症としては、末梢性関節炎、強直性脊椎炎、仙腸骨炎、前部ぶどう膜炎、結節

50

性紅斑、皮膚合併症ならびに小児における成長および発達の遅滞などがある。肝疾患は、脂肪肝として、あるいはより重篤には自己免疫性肝炎、原発性硬化性胆管炎または硬変として発現する。

【 0 0 6 9 】

潰瘍性大腸炎は、慢性であり、増悪と寛解の繰返しを伴う。広範な潰瘍性大腸炎を有する患者のほぼ三分の一が手術を必要とする。全直腸結腸切除術は治癒力があり、余命および生活の質は正常に復し、結腸癌のリスクはなくなる。

【 0 0 7 0 】

潰瘍性大腸炎の症状は、下痢止め薬および食事の変化に反応することがある。中等度から重度の症状は、1つまたは複数の薬物を必要とする。直腸のみにおける疾患の場合、局所療法が適応となる。結腸全体の炎症の場合、免疫系を抑制するための薬物（アザチオプリン、6-メルカプトプリンまたはシクロスポリン）および炎症を抑制するための薬物（ステロイド）のような全身に作用する薬物が必要である。HARRIS PONS' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE、13th ED.、(1994) McGraw Hill、New York、1403～1405頁、THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE、58th Ed. (2004) Thomson PDR、Montvale、NJ、402頁、1130頁、2707頁、3153～3155頁、3173頁を参照のこと。

10

【 0 0 7 1 】

2 . 1 . 2 移植片対宿主病 (GVHD) および宿主対移植片病

20

移植片対宿主病 (GVHD) は、免疫系が抑制され、輸血または骨髄移植を受けた人を襲う可能性があるまれな障害である。宿主対移植片病は、免疫系の抑制を有し、臓器移植を受けた患者に発生する。これらの状態の症状は、皮疹、結腸炎と類似した腸の問題および肝機能不全などである。

【 0 0 7 2 】

GVHDの場合、免疫抑制レシピエントにおける免疫適格ドナーT細胞は抗原に対して反応する。急性GVHDの症状は、発熱、剥脱性皮膚炎、高ビリルビン血症を伴う肝炎、嘔吐、下痢および腹痛などであり、腸閉塞および体重減少に進行する可能性がある。GVHDは、同種骨髄移植 (BMT) 後の死亡および重症罹病の主要な原因であり続けている。

30

【 0 0 7 3 】

骨髄移植レシピエントの約1/3～1/2が慢性型のGVHDを発現する。皮膚、肝臓および腸は依然として主として罹患する器官であるが、他の部位（すなわち、関節、肺）における併発も認められる。最終的に患者の20～40%がGVHDに伴う合併症により死亡する。

【 0 0 7 4 】

1つの治療方法は、骨髄の再注入の前にロゼティング法または機械的分離を用いて、モノクローナル抗体によりドナー骨髄からT細胞を除去することである。T細胞枯渇は、GVHDの発生率および重症度の低減に非常に有効であった。しかし、生着不全および再発の発生率は増加する。考えられる説明は、移植片対宿主反応で発生したサイトカインが幹細胞増殖と生着に必要な成熟を促進するということである。GVHDを予防または治療するのに用いられる他の薬剤は、メトトレキサート、コルチコステロイドおよび成熟T細胞上に発現する抗原に対するモノクローナル抗体などである。

40

【 0 0 7 5 】

GVHDはまた、例外的な症例における輸血の結果として起こることがある。その理由は、少数のドナーT細胞さえもGVHDの原因となり得るためである。そのような状況としては、子宮内胎児輸血ならびに骨髄移植レシピエント、白血病、リンパ腫、線維芽腫、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫を有する患者のような免疫抑制患者における輸液などがある。THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION (1997)、Merck Research Laboratories、We

50

s t P o i n t、P A、8 3 6 ~ 8 3 7 頁を参照のこと。

【 0 0 7 6 】

2 . 1 . 3 多発性硬化症

多発性硬化症 (M S) は、成人初期に出現し、大部分の症例で重大な能力障害に進行する慢性神経疾患である。米国だけで M S の症例が約 3 5 0 0 0 0 例存在する。外傷を以外では、M S は成人初期から中期までの神経障害の最も一般的な原因である。

【 0 0 7 7 】

M S の原因は未だ確定されていない。M S は、慢性炎症、脱髄および神経膠症 (癥痕化) によって特徴付けられる。脱髄は、軸索伝導に対して陰性または陽性影響をもたらす可能性がある。陽性伝導異常は、軸索伝導遅延、高いが低くない周波数のインパルス列の存在下で起こる可変伝導ブロックまたは完全伝導ブロックなどである。陽性伝導異常は、異所性インパルス発生、自発性または追従性機械的ストレスおよび脱髄軸索間の異常な「クロストーク」などである。

【 0 0 7 8 】

ミエリントタンパク質、すなわちミエリン塩基性タンパク質 (M B P) またはミエリンプロテオリピドタンパク質 (P L P) に対して反応性の T 細胞が、実験的アレルギー性脳脊髄炎における C N S 炎症を媒介することが認められた。患者は C N S 免疫グロブリン (I g) のレベルの上昇を有することも認められた。M S に認められる組織損傷の一部は活性化 T 細胞、マクロファージまたは星状細胞のサイトカイン産物によって媒介されるというさらなる可能性がある。

【 0 0 7 9 】

今日、M S と診断された 8 0 % の患者が疾患の発症後 2 0 年間生存する。M S を管理するための療法として、(1) 急性増悪の治療および疾患の長期抑制に向けての治療を含む疾患経過の変化を目的とした治療、(2) M S の症状の治療、(3) 内科的合併症の予防および治療、ならびに (4) 二次性の個人的および社会的問題の管理などが挙げられる。

【 0 0 8 0 】

M S の発症は、劇的である場合があり、あるいは患者に医学的対応処置を求めさせないほど温和である場合もある。最も一般的な症状は、四肢の 1 つまたは複数の脱力、視神経炎に起因する視力障害、感覚障害、複視および運動失調などである。疾患の経過は、次の 3 つの一般的カテゴリーに層別することができる。(1) 再発性 M S 、(2) 慢性進行性 M S 、および (3) 不活動性 M S 。再発性 M S は、神経機能不全の再発発作によって特徴付けられる。M S 発作は一般的に、数日から数週間にわたって徐々に発生し、その後、完全に回復、部分的に回復または全く回復しない。まれにはある程度の回復が 2 年またはそれ以上の年数持続することがあるが、発作からの回復は一般に症状のピークから数週間から数カ月以内に起こる。

【 0 0 8 1 】

慢性進行性 M S は、安定化または寛解の期間なしに緩徐な進行性悪化をもたらす。患者の 2 0 % では、再発を想起できないが、この型は、再発性 M S の既往歴を有する患者に発現する。急性再発は、進行性経過中にも起こることがある。

【 0 0 8 2 】

第 3 の型は、不活動性 M S である。不活動性 M S は、種々の程度の固定した神経脱落症状によって特徴付けられる。不活動性 M S を有するほとんどの患者は、再発性 M S の既往歴を有する。

【 0 0 8 3 】

疾患の経過は、患者の年齢にも依存する。例えば、好ましい予後因子は、早期発症 (小児期を除く) 、再発性の経過および発症後 5 年目に残存能力障害がほとんどないことなどである。これに対して、不良な予後は、晩年 (すなわち、4 0 歳以上) の発症および進行性の経過に伴うものである。M S を再発する慢性進行性 M S は晩年に始まる傾向があるので、これらの変数は相互依存性がある。慢性進行性 M S による能力障害は、通常、患者の進行性対麻痺または四肢麻痺 (完全麻痺) に起因する。本発明の 1 つの態様において、患

10

20

30

40

50

者が疾患の再発段階にあるときでなく、寛解状態にあるときに、患者を治療することが好ましい。

【 0 0 8 4 】

副腎皮質刺激ホルモンまたは経口コルチコステロイド（例えば、経口プレドニゾンまたは静脈内メチルプレドニゾン）の短期使用は、MSの急性悪化を有する患者を治療するための唯一の特異的治療手段である。

【 0 0 8 5 】

MSのより新しい療法としては、インターフェロン 1 b、インターフェロン 1 aおよびCopaxone（登録商標）（以前はコポリマー 1として知られていた）を患者に投与することが挙げられる。これらの3つの薬剤は、疾患の再発率を有意に低下させることが示された。これらの薬剤は、筋肉内または皮下に自己投与する。

10

【 0 0 8 6 】

2 . 1 . 4 喘息

喘息は、空気を肺に運ぶ気管支、すなわち気道の炎症を伴う呼吸器系の疾患である。気道は、アレルゲンならびに煙、寒冷空気および/または他の環境因子に対して過剰に反応する。気道は狭くなり、呼吸困難になる。アレルゲンが慢性炎症を引き起こすことがある。

【 0 0 8 7 】

喘息は、しばしば小児期または十代に発現し、最も一般的な慢性小児期疾患である。喘息のほとんどの症例は、制御することができる。しかし、重度の症例では、喘息エピソードは致命的であり得る。喘息の症例数は過去30年に着実に増加してきたため、米国および世界の主要な公衆衛生問題のうちの1つとなった。

20

【 0 0 8 8 】

喘息は遺伝、環境および免疫因子によって引き起こされ、これらの因子が複合して喘息エピソードの原因となり得る炎症を引き起こす。一部の患者では、炎症を起こした気道は、煙や寒冷空気のような環境中の物質に対して過剰に反応する。他の患者では、免疫系がアレルゲンに反応して炎症を引き起こす細胞を放出する。

【 0 0 8 9 】

喘息は、種々の時間に、様々な要因により発生する。タバコの煙や大気汚染が発作を引き起こすことがある。さらに、笑いや泣きなどの強い感情の表現が発作の原因となり得る。

30

【 0 0 9 0 】

喘息エピソードの症状は、軽度から重度までの重症度であり得、喘鳴、咳、胸部ひっ迫、急速、浅表性呼吸または呼吸困難、息切れ、運動時に急速に疲労することなどであるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 1 】

治療は、炎症および喘息エピソードを抑制するための薬物の服用ならびに炎症を増大させる物質を回避することを含む。炎症が抑制されない場合、喘息が気管支の永久的変化の原因となり得る。

【 0 0 9 2 】

吸入コルチコステロイド（ブデソニドおよびフルチカゾンなど）、炎症の低減が持続性喘息の一般的療法である。まれな例で、経口コルチコステロイド（プレドニゾンおよびデキサメタゾンなど）を喘息の抑制の助けとするために用いることができる。長時間作用性ベータ2作動薬（サルメテロールおよびホルモテロールなど）も適応とする。速やかな軽減のために投与される薬物は、短時間作用性ベータ2作動薬（アルブテロールおよびテルブタリンなど）および抗コリン薬（イプラトロピウムなど）などである。THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION (1997)、Merck Research Laboratories、West Point、PA、133～137頁を参照のこと。

40

【 0 0 9 3 】

50

2. 1. 5 慢性関節リウマチ

慢性関節リウマチ（RA）は、関節および関節周囲構造の進行性破壊をもたらす末梢関節の炎症によって特徴付けられる慢性症候群である。慢性関節リウマチの原因は、不明である。しかし、遺伝的素因は特定され、白人集団において、クラスII組織適合性遺伝子のHLA-DR1遺伝子座におけるペンタペプチドに局限化する。環境因子も1つの役割を果たす。免疫学的変化は、複数の因子によって開始される。全集団の約1%が罹患しており、女性は男性より2～3倍罹患頻度が高い。発症は、あらゆる年齢に存在し、25～50歳に最も頻繁である。

【0094】

病因において重要であると思われる顕著な免疫学的異常は、滑液細胞および血管炎に認められる免疫複合体などである。形質細胞は、これらの複合体に寄与する抗体を産生する。滑膜組織に浸潤するリンパ球は、催炎症性サイトカインを産生することができる、主としてTヘルパー細胞である。接着分子の増加は、炎症細胞の移動および滑膜組織における停留に寄与する。

【0095】

リウマチ結節は、患者の最大30%における通常皮下の慢性刺激部位に存在する。血管炎は、RAの重症例の皮膚、神経または内臓に認められるが、少数の症例においてのみ臨床的に重要である。

【0096】

発症は、通常潜行性で、関節の罹患は進行性であるが、急性で、複数の関節の同時の炎症が起こることがある。ほぼすべての炎症関節の圧痛および滑膜肥厚が一般的である。最初の症状発現は、あらゆる関節に起こり得る。

【0097】

朝の起立時または長時間の無活動の後に30分未満持続する硬直が一般的である。皮下リウマチ結節は、通常、初期症状発現ではない。内臓結節、脚潰瘍をもたらす血管炎または単神経炎複合、胸水または心膜液、リンパ節腫脹、フェルティ症候群、シェーグレン症候群および上強膜炎が他の症状である。発熱が存在することがある。

【0098】

75%もの患者が疾患の最初の年の保存療法により症候的に改善する。しかし、10%未満の患者は、十分な治療にもかかわらず、最終的に重度の能力障害になる。この疾患は、ほとんどのRA患者の生活に著しい影響を及ぼす。重症疾患の最も活動性の有痛段階中短期のベッドでの完全安静が時折指示される。重症度がより低い症例では、規則的安静を指示すべきである。

【0099】

非ステロイド性抗炎症薬は、重要な症状の軽減をもたらす可能性があり、軽度RAの単一療法として十分であると思われるが、疾患の長期経過を変化させないように思われる。アスピリンのようなサリチル酸塩は、治療に用いることができる。

【0100】

サリチル酸塩または他のNSAIDsが十分に疼痛を軽減または活動性関節炎症を抑制しない場合、通常それらに加えて金化合物を投与する。一部の患者では、金は、臨床的寛解をもたらし、新たな骨びらの形成を減少させる。非経口製剤は、金チオマレイン酸ナトリウムまたは金チオグルコースを含む。上の症状発現のいずれかが出現した場合、金は中止すべきである。軽微な中毒症状発現（例えば、軽度のかゆみ、軽微な発疹）は、金療法を一時的に差し控えることによって消失させることができ、その後、症状が鎮静してから約2週間後に金療法を慎重に再開する。しかし、中毒症状が進行する場合、金を中止し、患者にコルチコステロイドを投与すべきである。軽度金皮膚炎に対しては、局所コルチコステロイドまたは経口プレドニゾン15～20mg/日を分割して投与する。血液学的合併症の場合には、より高い用量が必要となる可能性がある。高度の金反応後に金キレート化薬であるジメルカプロール2.5mg/kg IMを最初の2日間にわたり最大4～6回/日を、その後5～7日間にわたり1日2回投与してよい。

10

20

30

40

50

【0101】

ヒドロキシクロロキンも軽度または中等度に活動性RAの症状を抑制することができる。毒性作用は通常軽度であり、皮膚炎、ミオパシーおよび一般的に可逆性の角膜混濁などである。しかし、非可逆性の網膜変性が報告された。スルファサラジンもRAの治療に用いることができる。

【0102】

経口ペニシラミドは、金と類似した有用性を有し、金が活動性RAを有する患者において無効であるか、または毒性をもたらす場合、一部の症例に用いることができる。中止を必要とする副作用は、金の場合より一般的であり、骨髄抑制、蛋白尿、ネフローゼ、他の重篤な毒性効果（例えば、重症筋無力症、天疱瘡、グッドパスチャー症候群、多発筋炎、狼瘡様症候群）、発疹および腐敗味などである。

10

【0103】

ステロイドは、最も有効な短期抗炎症薬である。しかし、RAに対するそれらの臨床的ベネフィットは時間とともにしばしば減少する。ステロイドは、関節の破壊の進行を予測して妨げることができない。さらに、活動性疾患におけるコルチコステロイドの中止後に重大なリバウンドが発生する。ステロイドの使用に対する禁忌は、消化性潰瘍、高血圧、無処置炎症、糖尿病および緑内障などである。

【0104】

免疫抑制薬は、重症活動性RAの管理にますます使用されている。しかし、肝疾患、肺炎、骨髄抑制など、ならびにアザチオプリンの長期使用後および悪性腫瘍などの重大な副作用が起こり得る。

20

【0105】

関節副子固定は、局所炎症を減少させ、重度の局所症状を軽減することがある。筋肉量を回復させ、正常な関節可動域を確保するための活発な運動は、炎症が鎮静したときには重要であるが、疲れを招くようなものであるべきではない。疾患が活動性であるときに手術を実施してもよい。

【0106】

2.1.6 脊椎関節症

脊椎関節症は、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、ライター症候群および炎症性腸疾患に随伴する関節炎を含む疾患のファミリーである。

30

【0107】

2.1.6.1 強直性脊椎炎

強直性脊椎炎（AS）は、慢性であり、最も多くは脊椎を冒す関節炎の一種である。強直性脊椎炎は、腰部、背部、頸部および股関節部の腫脹および運動制限を伴う疲労、疼痛および硬直を引き起こす。治癒はないが、治療により通常症状を抑制し、状態が悪化することを防ぐことができる。強直性脊椎炎の合併症は、虹彩炎、上体の屈曲に起因する呼吸困難および胸壁の硬化などである。

【0108】

早晩、脊椎の靱帯および関節の持続性炎症が脊椎を互いに融合させ（強直）、頸部および腰部の運動の喪失につながる。脊椎が融合または硬直すると、固定した前方屈曲変形（脊柱後弯）が結果として生じ、著しい能力障害につながる。強直性脊椎炎の炎症は、身体他の部位、最も一般的には他の関節および眼に、時として肺および心臓弁に及ぶことがあり得る。

40

【0109】

強直性脊椎炎は、100人につき1人が罹患する。女性より男性に一般的であり、この状態は通常、十代後期または成人初期に始まる。治療としては、硬直を減少させ、良い姿勢および可動性を維持する助けとなる運動および理学療法、ならびに疼痛および炎症に対するステロイドを含む薬物療法などが挙げられる。

【0110】

2.1.6.2 乾癬性関節炎

50

乾癬性関節炎（P s A）は、乾癬を有する一部の患者において発現する関節の腫脹によって特徴付けられる。乾癬性関節炎は、硬直、有痛性および腫脹関節のような他のタイプの関節炎の症状を示す。無処置乾癬性関節炎は、骨の喪失および関節の変形をもたらすことがある。乾癬性関節炎の疼痛と腫脹は、関節周囲組織の炎症を引き起こす過剰反応性免疫系によって引き起こされる。症状は、突発し、周期的に後退する。対称性関節炎が乾癬性関節炎の最も一般的なタイプであり、全症例の約50%を占めている。症状は身体の両側に発生する。症状は、慢性関節リウマチと類似しており、対称性関節炎は、関節の永続的障害の原因となり得る。乾癬性関節炎の第2の最も一般的なタイプである非対称性関節炎は、より軽度であり、身体の片側のみに症状を引き起こす。

【0111】

10

乾癬性関節炎のさほど一般的でない遠位指節間（DIP）は、指爪および足指爪に近い関節を罹患させる。爪は、しばしば状態によっても罹患する。脊椎炎は、特に頸部および背部の運動を有痛性にすることがある。脊椎炎はまた、脊柱の炎症を引き起こすことがある。離断性関節炎は、しばしば衰弱性であり、乾癬性関節炎の破壊的な型である。これは、しばしば手および足ならびに背部および頸部を罹患させ、永続的変形をもたらすことがある。

【0112】

乾癬性関節炎の症状は、他の種類の関節炎の症状と類似している。それらは、関節の硬直、関節の疼痛または腫脹、眼の刺激および発赤を含む。乾癬の通常の症状は、皮膚の赤色鱗状斑などである。

20

【0113】

一般的な療法は、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）などである。それらは、アスピリンおよびイブプロフェンのような多くの鎮痛大衆薬を含む。しかし、これらの薬物の慢性使用は、危険であり、胃腸の問題の原因となり得る。Cox-2阻害薬は、乾癬性関節炎の治療にしばしば用いられるクラスのNSAIDsである。副作用は、悪心および頭痛などである。

【0114】

免疫抑制剤は、より温和な薬物に反応しない乾癬性関節炎の症例に用いられるより強力な薬剤である。このクラスの薬剤は、免疫系を抑制することによって作用するメトトレキサートのように乾癬の全身療法に用いられている。それらは重篤な副作用も引き起こし、感染のリスクをもたらす。アザルフィジンもしばしば処方される。マラリアの予防に用いられるある種の薬剤は、症状を改善することができ、時として乾癬性関節炎に対しても処方される。

30

【0115】

ステロイドは長期間安全に用いることはできないが、経口ステロイドは激しい関節痛の除去の助けとするためにしばしば指示される。しかし、ステロイドの投与を突然中止した場合にも症状の突発が起こることがあり得る。生物学的製剤も乾癬の治療に用いられる。それらは、乾癬の症状を引き起こす免疫系反応を標的にすることによって作用し、関節が炎症状態になることを予防する。生物学的薬物も感染に対する免疫系の感受性をより高くする。

40

【0116】

2.1.6.3 ライター症候群

反応性関節炎としても知られているライター症候群は、関節に加えて、眼、尿道および皮膚も罹患させる関節炎の1つの型である。

【0117】

ライター症候群は、同時に出現または出現しない身体の種々の器官における多くの症状によって特徴付けられる。この疾患は、急性または慢性で、突然の寛解または再発を伴う。ライター症候群は、20~40歳の主として男性を罹患させる。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）を有する患者は、特にリスクが高い。

【0118】

50

ライター症候群の原因は不明であるが、研究により遺伝的素因と他の因子との組合せによって引き起こされることが示唆される。ライター症候群は、しばしば、トラコーマクラミジア (Chlamydia trachomatis) またはウレアプラスマウレアリティカム (Ureaplasma urealyticum) 感染に後続する。

【0119】

ライター症候群の最初の症状は、尿道または腸の炎症であり、これに関節炎が後続する。関節炎は通常、指、足指、くるぶし、股関節および膝関節が罹患する。他の症状は、有痛性排尿および分泌物を伴う尿道の炎症、口内潰瘍、眼の炎症ならびに膿漏性角皮症 (手掌、足裏、躯幹または頭皮上の鱗状皮膚の斑) などである。

【0120】

ライター症候群に対する特異的療法は存在しない。関節炎症は、通常非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) で治療する。皮疹および眼炎症は、ステロイドで治療することができる。ライター症候群の予後は様々である。一部の患者は、心筋の炎症、脊椎の硬化を伴う炎症、緑内障、進行性盲、足の異常または肺への液体の蓄積を含む合併症を発現する。

10

【0121】

他の脊椎関節症は、炎症性腸疾患の脊椎炎 (IBD SpA)、未分化脊椎関節症 (uSpA)、若年性脊椎関節症 (JSpA) を含むが、これらに限定されない。

【0122】

THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION (1997)、Merck Research Laboratories、West Point、PA、243頁を参照のこと。

20

【0123】

3. 投与

一般的な意味で、本発明の方法は特定の投与法を対象としない。その理由は、投与法は活性薬の形態および活性薬を投与するために開発された製剤に依存するからである。投与法は、経口、非経口 (例えば、皮下、硬膜下、静脈内、筋肉内、くも膜下腔内、腹腔内、大脳内、動脈内または病変内投与経路)、局所、限局 (例えば、外科的適用または外科的坐剤)、腸および肺 (例えば、エアゾール剤、吸入剤または散剤) を含む。好ましくは、投与経路は非経口である。投与経路は、当業者に知られているように、投与する組成物 (例えば、免疫グロブリンは静脈内投与するのに対して小化合物は経口投与する)、標的とする組織 (例えば、脊椎損傷の部位を標的とするために髄腔内投与) 等に基づいている。

30

【0124】

さらに、免疫グロブリンは、クローン病のような炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症 (MS)、慢性関節リウマチ (RA)、移植片対宿主病 (GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症に伴う症状を治療、改善または軽減するために用いられる他の化合物または組成物と併用することができる。さらに、本明細書で開示する化合物は、単独投与または免疫抑制剤、5-ASA および抗TNFsのような他の薬剤と併用投与することができる。併用投与する場合、免疫グロブリンは、これらの他の化合物または組成物と同じ製剤で、あるいは別の製剤で投与することができ、かつ、症状を治療、改善または軽減するために用いられる他の化合物または組成物の前、後または同時に投与することができる。

40

【0125】

5-アミノサリチル酸 (5-ASA) は、クローン病および潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患を治療するために一般的に用いられているクラスの抗炎症薬である。1つの一般的な5-ASAは、Pentasa (登録商標) またはRowasa (登録商標) を含むメサラミンである。オサラジン (Dipentum (登録商標)) のような他の5-ASAは、体内でメサラミンに変換される。スルファサラジン (Azulfidine (登録商標)) も一般的に投与される。5-ASAの副作用は、下血、頭痛、嘔吐および皮疹などである。

50

【0126】

免疫抑制剤は、免疫系を弱めまたは抑制し、ひいては炎症を減弱させる。例としては、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサートおよびミコフェノレートなどがある。これらの薬物は、身体が新たに移植された臓器を拒絶することを予防するため、あるいは他の療法に反応しない炎症性状態に対して最も多く用いられる。これらの薬剤が症状を改善するには数カ月間を必要とし、投薬を中止すると疾患はしばしば再発する。免疫抑制剤の副作用は、悪心、嘔吐、下痢、胃潰瘍、皮疹、倦怠感、肝炎、骨髄抑制、発熱、肺炎およびある種の癌のリスクの増加などである。

【0127】

抗TNF剤も炎症状態の治療を適応とする。抗腫瘍壊死因子(TNF)は、炎症に関連する免疫系によって産生されるタンパク質である。抗TNF剤は、TNFが腸に到達する前にTNFを血流から除去し、それにより、炎症を予防する。インフリキシマブ(Remicade(登録商標))は、標準療法(すなわち、メサラミン物質、コルチコステロイドおよび免疫抑制剤)に対して反応しない中等度から重度のクローン病の治療および開放排膿性瘻の治療を適応とする抗TNF剤である。

10

【0128】

4. 治療の適応

本明細書で開示される組成物、化合物および方法による治療に含まれる炎症性疾患は、炎症性腸疾患(IBD)、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性関節リウマチ(RA)、移植片対宿主病(GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症を含む。治療を考慮されるさらなる疾患または状態は、ステロイドにより伝統的に治療されているものを含む。

20

【0129】

5. 免疫グロブリン

1つの特定の実施形態において、本発明の薬剤は、患者に投与したとき、炎症性腸疾患(IBD)、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性関節リウマチ(RA)、移植片対宿主病(GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の診断および治療に用いることができ、以前にステロイドを服用していた患者にステロイドを漸減させかつ/またはそれらを中止させることができるような、免疫グロブリンである。これらの免疫グロブリンは、 4_1 インテグリンもしくは 4_1 のような 4_1 インテグリンを含む二量体を選択的に結合またはVCAM-1に結合する免疫グロブリンから選択されてよい。好ましくは、免疫グロブリンは 4_1 または 4_7 に結合し、 4_1 または 4_7 活性を阻害する。免疫グロブリンは、好ましくは抗体またはそのフラグメントである。

30

【0130】

「抗体」とは、IgG1(もしくはIgGサブクラス)またはIgMのような完全な免疫グロブリン、あるいはナタリズマブのような抗体由来の阻害剤を含むことを意味する。

【0131】

「抗体同族体」とは、ジスルフィド結合を介して結合した免疫グロブリン軽および重鎖からなる完全な抗体を含むことを意味する。「抗体同族体」という用語は、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖および1つまたは複数の抗原(すなわち、インテグリンまたはインテグリンリガンド)に結合することができるその抗原結合フラグメントから選択される1つまたは複数のポリペプチドを含むタンパク質を含むことも意図する。複数のポリペプチドからなる抗体同族体の成分ポリペプチドは、場合によってジスルフィド結合しているか、あるいは共有結合により架橋してよい。したがって、「抗体同族体」は、免疫グロブリン軽鎖がカッパまたはラムダ型であってよい、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM型(およびそのサブタイプ、例えば、IgG1)の完全な免疫グロブリンを含む。「抗体同族体」はまた、抗原結合特異性を保持している完全な抗体の一部、例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、scFvフラグメント、重および軽鎖単量体または二量体またはその混合物を含む。

40

50

【0132】

本発明の薬剤が抗体である場合、モノクローナル抗体が好ましい抗体である。一般的に異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤と異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一エピトープに対応している。モノクローナル抗体の第2の利点は、それらが、他の免疫グロブリンによって汚染されていない手段により、例えば、ファージディスプレイまたはハイブリドーマからの分離によって合成されることである。本発明は、本発明の薬剤としてポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含むことを意図しているが、モノクローナル抗体は、高度に特異的であるので好ましい。したがって、本発明は主としてモノクローナル抗体に関して検討する。

【0133】

「天然抗体および免疫グロブリン」は、通常2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖とからなる約150000ダルトンのヘテロ4量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンイソ型の重鎖の間で異なっている。各重および軽鎖は、規則的に間隔があいた鎖間ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端における可変領域(V_H)とそれに続く多数の定常領域を有する。各軽鎖は、一端における可変領域(V_L)とその他端における定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定常領域と整列し、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽および重鎖可変領域の間の界面を形成していると考えられている(Clouthier、1985、J. Mol. Biol.、186:651~63頁、Novotnyら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:4592~6頁)。

【0134】

さらに、他の抗体は、当技術分野で利用可能な手法を用いて同定することができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、ファージディスプレイ法を用いて産生させることができる。次いで、 α_4 インテグリンまたは β_4 インテグリンを含む二量体に選択的に結合する抗体フラグメントを分離する。ファージディスプレイにより抗体を生産する好ましい例示的方法は、すべての目的のために全体を参照により本明細書に援用する米国特許第6225447号、第6180336号、第6172197号、第6140471号、第5969108号、第5885793号、第5872215号、第5871907号、第5858657号、第5837242号、第5733743号および第5565332号に開示されている。

【0135】

「変異型」抗体は、本明細書では親抗体配列における1つまたは複数のアミノ酸残基の付加、欠失および/または置換により「親抗体」アミノ酸配列とアミノ酸配列が異なる免疫グロブリン分子を指す。親抗体または免疫グロブリンは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、Primatized(登録商標)抗体またはいずれかの抗体フラグメントであってよい。この好ましい実施形態において、変異型は、親抗体の1つまたは複数の超可変領域における1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。例えば、変異型は、親抗体の1つまたは複数の超可変領域における少なくとも1つ、例えば、約1から約10まで、好ましくは約2から約5までの置換を含む。通常、変異型は、親抗体重または軽鎖可変領域配列と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する。この配列に関する同一性または相同性は、必要な場合、最大の割合の配列同一性を達成するために配列および導入ギャップを整列した後に、親抗体残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基の割合と本明細書において定義する。N末端、C末端または内部拡張、欠失または抗体配列への挿入は、配列同一性または相同性に影響を及ぼすと解釈されるべきではない。変異型は、受容体に結合する能力を保持し、好ましくは親抗体の特性より優れた特性を有する。例えば、変異型は、より強い結合親和力、受容体を活性化する高い能力等を有する。そのような特性を解析するために、変異型のFab型を親抗体のFab型と、または変異型の全長型を親抗体の全長型と比較す

10

20

30

40

50

べきである。本明細書で特に対象とする変異型抗体は、親抗体と比較して少なくとも約 10 倍、好ましくは少なくとも約 20 倍、最も好ましくは少なくとも 50 倍高い生物活性を示すものである。本明細書における「親」抗体は、変異型の調製に用いるアミノ酸配列によってエンコードされるものである。好ましくは、親抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、ヒト抗体定常領域を有する。例えば、親抗体は、ヒト化またはヒト抗体であってよい。「分離」抗体は、同定され、その自然環境の成分から分離かつ/または回収されたものである。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断上または治療上の使用を妨げるような物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性溶質であってよい。好ましい実施形態において、抗体は (1) Lowry 法により測定される抗体の 95 重量%を超える、最も好ましくは 99 重量%を超えるまで、(2) スピニングカップシークエネータを用いて N 末端または内部アミノ酸配列の少なくとも 15 残基を得るのに十分な程度まで、あるいは (3) クーマシーブルーまたは好ましくは銀染色を用いた還元または非還元条件下で SDS-PAGE により均一性になるまで精製する。抗体の自然環境の少なくとも 1 つの成分は存在しないので、分離抗体は組換え細胞内の *in situ* の抗体を含む。しかし、通常、分離抗体は、少なくとも 1 つの精製段階により調製する。

10

【0136】

5.1 モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ法または遺伝子工学的手法を用いて生産することもできる。これらの方法は、多くの特異抗原に対する高レベルのモノクローナル抗体を分泌するハイブリッド細胞系を生産するために広く適用されており、本発明のモノクローナル抗体を生産するために用いることもできる。例えば、腹腔内注射によりマウス (例えば、Balb/c マウス) を抗原性₄ エピトープで免疫化することができる。免疫応答を可能にするのに十分な時間が経過した後に、マウスを屠殺し、脾臓細胞を採取し、当技術分野でよく知られている技術を用いてミエローマ細胞と融合させる。得られた融合細胞、すなわちハイブリドーマを選択培地中で増殖させ、生存細胞を限界希釈条件を用いてそのような培地中で増殖させる。クローニングおよびリクローニングの後に、標的、₄ または₄ インテグリンを含む二量体を選択的に結合する抗体 (例えば、IgG もしくは IgM クラスまたは IgG 1 サブクラスの) を分泌するハイブリドーマを分離することができる。ヒト使用のための特異的な薬剤を製造するために、分離モノクローナルを用いてキメラおよびヒト化抗体を生産することができる。抗ペプチド抗体である抗体も調製することができる。そのような抗ペプチド抗体は、₄ インテグリンのペプチドに対して調製することができよう。

20

30

【0137】

本発明の薬剤に言及するとき「キメラ」という用語は、薬剤が異なる構造を有し、かつ/または異なる起源を有する 2 つ以上のタンパク質の結合 (化学的架橋または共有結合または他の種類) からなることを意味する。したがって、キメラ₄ インテグリン拮抗薬は、₄ インテグリン拮抗薬またはフラグメントである 1 つの部分と₄ ₁ インテグリン拮抗薬でない他の部分を含んでいてよい。

【0138】

「キメラ」タンパク質の種は、それらの個々のペプチド骨格を介して、最も好ましくはそれらのタンパク質をエンコードするポリヌクレオチド分子の遺伝的発現による 2 つ以上のタンパク質またはそのフラグメントの共直線状共有結合を指す「融合」または「融合タンパク質」である。したがって、好ましい融合タンパク質は、抗体に対してオリジナルでない (すなわち、他の免疫グロブリンまたはポリペプチドに由来する) 第 2 の部分に共有結合している抗体またはそのフラグメントを含むキメラタンパク質である。本発明の好ましい融合タンパク質は、抗原結合特異性を保持している完全な抗体の一部、例えば、Fab フラグメント、Fab' フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、scFv フラグメント、重鎖単量体または二量体、軽鎖単量体または二量体、1 つの重鎖と 1 つの軽鎖からなる二量体等を含んでいてよい。

40

【0139】

50

最も好ましい融合タンパク質は、キメラであり、免疫グロブリン軽鎖、重鎖または両方のヒンジおよび定常領域のすべてまたは一部に融合または別の方法で結合した部分を含む。したがって、本発明は、(1)第1の部分、(2)第2のペプチド、例えば、該部分の溶解度または *in vivo* 寿命を増加させるもの、例えば、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーまたはそのフラグメントもしくは一部、例えば、IgGの一部またはフラグメント、例えば、ヒトIgG1重鎖定常領域、例えば、CH₂、CH₃ およびヒンジ領域を含む分子を対象とする。特に、「ステロイド節約/Ig融合」は、本発明の生物学的に活性なステロイド節約部分を含むタンパク質である。薬剤の種は、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部に結合している本発明のステロイド節約型免疫グロブリンを含むタンパク質である「インテグリン/Fc融合」である。好ましいFc融合は、重鎖免疫グロブリンのC末端ドメインを含む抗体のフラグメントに結合した本発明のステロイド節約型免疫グロブリンを含む。

10

【0140】

「融合タンパク質」という用語は、ステロイド節約部分でない第2の部分(「キメラ」分子をもたらす)にモノまたはヘテロ官能分子を介して化学的に結合し、下記のように精製タンパク質から新たに調製されるステロイド節約部分も意味する。したがって、組換えにより結合したに対立するものとしての化学的に結合した融合タンパク質であるキメラ分子の1つの例は、(1)₄インテグリンサブユニット標的部分、例えば、VLA-4を有する細胞上のVLA-4に結合することができるVCAM-1部分、(2)標的部分の溶解度または *in vivo* 寿命を増加させる第2の分子、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)のようなポリアルキレングリコールポリマーを含んでいてよい。₄標的部分は、あらゆる天然に存在する₄リガンドまたはそのフラグメント、例えば、VCAM-1ペプチドまたは同様な同類置換アミノ酸配列であり得る。

20

【0141】

キメラ *primatized* (登録商標) およびヒト化抗体は、非ヒト抗体から生産することができる、それらが生産される元の抗体と同じまたは類似の結合親和力を有することができる。適切な抗原特異性のマウス抗体分子の遺伝子を、例えば、適切な生物活性のヒト抗体分子の遺伝子とともにスプライシングすることによってキメラ抗体を生産するために開発された技術(Morrisonら、1984 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851頁、Neubergerら、1984 *Nature* 312:604頁、Takedaら、1985 *Nature* 314:452頁)を用いることができる。そのような抗体は、本発明の範囲内にある。例えば、マウスモノクローナル抗体の可変(V)領域をエンコードする核酸は、ヒト定常(C)領域、例えば、IgG1またはIgG4をエンコードする核酸に結合させることができる。したがって、得られる抗体は、非ヒト抗体の抗原結合ドメインとヒト抗体のCまたはエフェクタードメインとを通常含む種ハイブリッドである。

30

【0142】

ヒト化抗体は、主としてヒト抗体(アクセプター抗体)からであるが、実質的に非ヒト抗体(ドナー抗体)からの相補性決定領域を有する可変領域を含む抗体である。例えば、Queenら、1989、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029~33頁、WO90/07861ならびに米国特許第6054297号、第5693761号、第5585089号、第5530101号および5224539号を参照のこと。これらの抗体の定常領域または複数の定常領域も一般的にヒト抗体からのものである。ヒト可変領域は、一般的に、所望の非ヒト可変領域結合ドメインと高い相同性を示す配列を有するヒト抗体から選択される。重および軽鎖可変残基は、同じ抗体、または異なるヒト抗体から得ることができる。さらに、配列は、WO92/22653に記載されているようないくつかのヒト抗体のコンセンサスとして選択することができる。

40

【0143】

ヒト可変領域内の特異的アミノ酸は、予測されるコンフォーメーションおよび抗原結合特性に基づいて置換のために選択される。これは、コンピュータモデリングのような技術

50

、可変領域内の特定の位置におけるアミノ酸の挙動および結合特性の予測、ならびに置換の影響の観察を用いて決定することができる。例えば、アミノ酸が非ヒト可変領域とヒト可変領域とで異なる場合、ヒト可変領域は非ヒト可変領域のアミノ酸組成を反映するように改変させることができる。抗₄抗体をヒト化するいくつかの例を本明細書に記載する。

【0144】

「ヒト化抗体同族体」とは、抗原結合に必要とされないヒト免疫グロブリン軽または重鎖のアミノ酸の一部またはすべてが非ヒト哺乳類免疫グロブリン軽または重鎖の対応するアミノ酸に置換された、組換えDNA技術により生産された抗体同族体を意味する。「ヒト抗体同族体」は、免疫グロブリン軽または重鎖（抗原結合に必要とされるか否かにかかわらず）のすべてのアミノ酸がヒト源由来である抗体同族体である。

10

【0145】

特定の実施形態において、本発明の長期投与法に用いられる抗体は、参照により本明細書に援用する米国特許第5840299号に開示されているようなヒト化抗体である。

【0146】

他の実施形態において、ヒト抗体遺伝子を含むトランスジェニックマウスを抗原性₄構造で免疫化することができ、ハイブリドーマ技術を用いて₄に選択的に結合するヒト抗体を得ることができる。

【0147】

キメラ、ヒトおよび/またはヒト化抗体は、ミエローマ細胞またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞における組換え発現、例えば、ヒトハイブリドーマにおける発現（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁（1985））により生産することができる。あるいは、抗体コーディング配列を、動物のゲノムに導入するのに適したベクターに組み込み、それにより、トランスジェニック動物を生産することができる。1つの例は、ウシのようなトランスジェニック動物の乳汁中でのそのような抗体の生産であろう。米国特許第5849992号および第5304489号を参照のこと。適切なトランス遺伝子は、乳腺特異遺伝子、例えば、カゼインまたは₄-ラクトグロブリンからのプロモータ/またはエンハンサを有するトランス遺伝子などである。

20

【0148】

5.2 ヒト化抗体およびPrimatized（登録商標）抗体

本発明の1つの実施形態において、有効な量を投与すると、クローン病のような炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の治療および診断に用いることができる、ステロイドが必要でないようなVLA-4の₄サブユニットに対して特異的なヒト化（およびprimatized（登録商標））免疫グロブリン（または抗体）を提供する。ヒト化およびprimatized（登録商標）抗体は、遺伝子工学技術を用いて修飾された動物（一般的に哺乳類）由来の抗体である。これらの技術は、抗体の最初の抗原特異性を維持しながら、定常領域および/または可変領域フレームワーク配列をヒト配列で置換するために用いられる。ヒト化およびprimatized（登録商標）抗体は、ヒト抗原（例えば、ヒトVCAM-1またはヒトVLA-4）に対する特異性を有するげっ歯類（例えば、マウスおよびハムスター）抗体から一般的に得られる。治療目的のために抗体を投与される予定である動物からの配列を有するようにドナー抗体（抗原を投与された動物からの抗体）を再構築することによって、抗体投与時の動物における宿主反応は減弱するであろう。Fc領域のみまたは相補性決定領域（CDRs）以外のすべてをアクセプタードメインで置換することができる。アクセプターは、再構築抗体を投与される動物（例えば、ヒト、家畜化動物、農業動物等の動物）である。

30

40

【0149】

炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症を治療するために有効な量で

50

患者に投与したとき、V L A - 4 の₄ サブユニットに結合する抗体が好ましい。

【0150】

特異抗原に結合するマウス抗体（またはあらゆる他の動物抗体）の領域はC D R s（すなわち、抗体重鎖に3つ、軽鎖に3つ）であるので、典型的に、マウス抗体のC D R sをヒト抗体の対応する領域上に移植する。遺伝子工学により、マウス重および軽鎖可変（V）領域遺伝子セグメントをクローニングしてC D R DNA配列を決定し、部位特異的突然変異誘発により対応するヒトV領域に転移させることによって、C D R sの移植を実現する。前記工程の最終段階において、所望のイソ型のヒト定常領域遺伝子セグメント（通常、CHではガンマI、CLではカッパ）を付加し、ヒト化重および軽鎖遺伝子を哺乳類細胞中で共発現させて、可溶性ヒト化抗体を生産する。

10

【0151】

これらのC D R sのヒト抗体への転移により、元のマウス抗体の抗原結合特性がこの抗体に付与される。マウス抗体における6つのC D R sがV領域「フレームワーク」領域に構造的にマウントされる。C D R移植が成功する理由は、フレームワーク領域が、マウス抗体とヒト抗体とで、C D R sが相互に交換できるようなC D R sに対する類似した付着点を有する非常に類似した3D構造を有することである。例えば、Jonesら、1986、Nature 321:522~5頁、Riechmannら、1988、Nature 332:323~7頁、Queenら、1989、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029頁およびOrlandiら、1989、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:3833頁に例示されているように、そのような抗体同族体を調製することができる。

20

【0152】

それにもかかわらず、フレームワーク領域内の特定のアミノ酸は、C D R sと相互作用し、全体的な抗原結合親和力に影響を及ぼすと考えられている。ヒトV領域フレームワークを修飾せずに組換えヒト化抗体を生産するためにマウス抗体からC D R sを直接転移させると、しばしば結合親和力が部分的または完全に消失する。いくつかの場合に、結合活性を得るためにアクセプター抗体（例えば、ヒト抗体）のフレームワーク領域における残基を改変させることは重要であると思われる。

【0153】

Queenら、1989（前出）およびWO90/07861（Protein Design Labs）は、マウスMAb（抗Tac）のC D R sをヒト免疫グロブリンフレームワークおよび定常領域と組み合わせることにより、アクセプター抗体のフレームワーク領域に修飾残基を含むヒト化抗体の製剤を調製することを記載した。ヒトV領域フレームワーク残基を修飾しない場合に結合親和力が失われるという問題を解決するための1つの解決策は、2つの重要な段階を含む。最初に、元のマウス抗体のV領域フレームワークとの最適なタンパク質配列相同性を得るために、ヒトVフレームワーク領域をコンピュータ解析により選択する。第2の段階では、マウスC D R sと相互作用する可能性があるフレームワークアミノ酸残基を可視化するために、マウスV領域の3次構造をコンピュータによりモデル化する。これらのマウスアミノ酸残基を相同ヒトフレームワークに重ね合わせる。さらなる詳細については、米国特許第5693762号、第5693761号、第5585089号および第5530101号（Protein Design Labs）を参照のこと。

30

40

【0154】

本発明において有用な特定の₄サブユニット含有インテグリン拮抗薬は、米国特許第5932214号において調製され、記載されているBエピトープ特異性を有するキメラおよびヒト化組換え抗体同族体（MAb HP1/2）（すなわち、完全な免疫グロブリンおよびその一部）などである。キメラ（マウス可変-ヒト定常）およびヒト化抗インテグリン抗体同族体の調製の出発物質は、以前に述べたようなマウスモノクローナル抗インテグリン抗体、市販のモノクローナル抗インテグリン抗体（例えば、HP2/1、Amae International, Inc.、Westbrook, Me）であってよい

50

。他の好ましいヒト化抗VLA-4抗体同族体は、PCT/US95/01219(1995年7月27日)、米国特許第5840299号および第6033665号においてAthena Neurosciences, Inc.により記載されている。第5932214号、第5840299号および第6033665号の内容は、それらの全体を参照により本明細書に援用する。

【0155】

これらのヒト化抗VLA-4抗体は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖を含む。ヒト化軽鎖は、マウス21.6免疫グロブリン軽鎖の対応する相補性決定領域のアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域(CDR I、CDR 2およびCDR 3)、およびマウス21.6免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワークの同等の位置に存在する同じアミノ酸によってアミノ酸の位置が占められている少なくとも1つの位置を除く、ヒトカップ軽鎖可変領域フレームワーク配列の可変領域フレームワークを含む。ヒト化重鎖は、マウス21.6免疫グロブリン重鎖の対応する相補性決定領域のアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域(CDR I、CDR 2およびCDR 3)、およびマウス21.6免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの同等の位置に存在する同じアミノ酸によってアミノ酸の位置が占められている少なくとも1つの位置を除く、ヒト重鎖可変領域フレームワーク配列の可変領域フレームワークを含む。米国特許第5840299号および第6033665号を参照のこと。

【0156】

分離₄ インテグリン拮抗薬のフラグメント(例えば、本明細書で述べる抗体同族体のフラグメント)も組換え法、タンパク質分解消化、または当業者に知られている方法を用いた化学合成により効率的に生産することができる。組換え法では、ポリペプチドの内部または末端フラグメントは、分離ハリネズミポリペプチドをエンコードするDNA配列の1つの末端(末端フラグメントのため)または両末端(内部フラグメントのため)から1つまたは複数のヌクレオチドを除去することによって得ることができる。突然変異誘発DNAの発現がポリペプチドフラグメントを生成させる。特定のエンドヌクレアーゼによる消化によってもフラグメントのアレイをエンコードするDNAsを得ることができる。タンパク質のフラグメントをエンコードするDNAsもランダムシェアリング、制限消化またはその組合せによって得ることができる。タンパク質フラグメントは、完全なタンパク質から直接得ることができる。ペプチドは、プラスミン、トリプシン、キモトリプシンまたはペプシンを含むが、これらに限定されないタンパク質分解酵素によって特異的に切断することができる。これらの酵素の各々が、それが攻撃するペプチド結合の種類に特異的である。トリプシンは、カルボニル基が塩基性アミノ酸、通常アルギニンまたはリシンからのものであるペプチド結合の加水分解を触媒する。ペプシンおよびキモトリプシンは、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニンのような芳香族アミノ酸のペプチド結合の加水分解を触媒する。代替の組の切断タンパク質フラグメントが、タンパク質分解酵素に感受性である部位での切断を妨げることによって得られる。例えば、わずかに塩基性の溶液中でのリシンの α -アミノ酸基とエチルトリフルオロオ酢酸との反応により、隣接ペプチド結合がトリプシンによる加水分解に対してもはや感受性でない保護アミノ酸残基が得られる。タンパク質を修飾して、タンパク質分解酵素に感受性であるペプチド結合を形成させることができる。例えば、 α -ハロエチルアミンによるシステイン残基のアルキル化により、トリプシンにより加水分解されるペプチド結合が得られる(Lindley、1956、Nature 178:647頁)。さらに、特定の残基においてペプチド鎖を切断する化学試薬を用いることができる。例えば、臭化シアンは、メチオニン残基においてペプチドを切断する(Grossら、1961、J. Am. Chem. Soc. 83:1510頁)。したがって、修飾剤、すなわちタンパク質分解酵素および/または種々の組合せによってタンパク質を処理することにより、タンパク質をフラグメントの重複のない所望の長さのフラグメントに、あるいは所望の長さの重複フラグメントに分割することができる。

【0157】

10

20

30

40

50

5.3 ナタリズマブおよび関連ヒト化抗体

本発明は、クローン病のような炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症を診断かつ/または治療するために、VLA-4リガンドに特異的に結合するヒト化免疫グロブリンを単独または組み合わせて使用する方法を提供する。そのような治療の方法および薬剤に使用する1つの好ましい抗体は、その全体を本明細書に援用するElan Pharmaceuticalsに譲渡された米国特許第5840299号に記載されているものを含む。他の態様は、in vivoで評価されたこれらの抗体のフラグメントの使用を考慮するものである。

【0158】

ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖を含む。1つの態様において、ヒト化軽鎖は、マウス21.6免疫グロブリン軽鎖の対応する相補性決定領域のアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域（すなわち、CDRI、CDR2およびCDR3）、およびアミノ酸位置がマウス21.6免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワークの同等の位置に存在する同じアミノ酸によって占められている、位置L45、L49、L58およびL69からなる第1の群から選択される少なくとも1つの位置を除く、ヒトカッパ軽鎖可変領域フレームワーク配列の可変領域フレームワークを含むことができる。

【0159】

ヒト化重鎖は、マウス21.6免疫グロブリン重鎖の対応する相補性決定領域のアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域（すなわち、CDRI、CDR2およびCDR3）、およびアミノ酸位置がマウス21.6免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの同等の位置に存在する同じアミノ酸によって占められている、H27、H28、H29、H30、H44、H71からなる群から選択される少なくとも1つの位置を除く、ヒト重鎖可変領域フレームワーク配列の可変領域フレームワークを含む。免疫グロブリンは、約 10^7 M^{-1} の下限およびマウス21.6免疫グロブリンの親和力の約5倍の上限を有する親和力でVLA-4に特異的に結合する。

【0160】

通常、ヒト化軽および重鎖可変領域フレームワークは、それぞれRE1および21/28'CL可変領域フレームワーク配列からのものである。ヒト化軽鎖可変領域フレームワークがRE1からのものである場合、少なくとも2つのフレームワークアミノ酸が置換されている。1つのアミノ酸は、上記の位置の第1の群からのものである。他のアミノ酸は、位置L104、L105およびL107からなる第3群からのものである。この位置は、RE1以外のヒト免疫グロブリンのカッパ軽鎖の同等な位置に存在する同じアミノ酸によって占められている。

【0161】

一部のヒト化免疫グロブリンは、LaまたはLbと呼ばれる成熟軽鎖可変領域配列、あるいはHa、HbまたはHcと呼ばれる成熟重鎖可変領域配列を有する。好ましいヒト化免疫グロブリンとしては、La軽鎖およびHa、HbまたはHc重鎖を有するものが挙げられる。

【0162】

ヒト化免疫グロブリンは、実質的にヒト免疫グロブリン（アクセプター免疫グロブリンと呼ぶ）からの可変フレームワーク領域および実質的にmumAb21.6と呼ぶマウス免疫グロブリン（ドナー免疫グロブリンと呼ぶ）からの相補性決定領域を有する。存在する場合、定常領域も実質的にヒト免疫グロブリンからのものである。ヒト化抗体は、VLA-4に対する少なくとも 10^7 、 10^8 、 10^9 または 10^{10} M^{-1} の特異的結合親和力を示す。通常、VLA-4に対するヒト化抗体の結合親和力の上限は、mumAb21.6のそれ（約 10^9 M^{-1} ）の3または5倍以内である。結合親和力の下限もしばしばmumAb21.6のその3または5倍以内である。

【0163】

ヒト化抗体は、例えば、マウスMAb21.6モノクローナル抗体を用いて、例示する

10

20

30

40

50

ように生産することができる。ヒト化抗体の生産の出発物質は、muMAb 21.6である。この抗体の分離および特性は、すべての目的のためにその全体を参照により援用するEilan Pharmaceuticals, Inc.に譲渡された米国特許第6033655号に記載されている。簡単に述べると、muMAb 21.6は、VLA-4の₄サブユニットに対して特異的であり、腫瘍壊死因子で刺激したラット脳細胞の組織培養へのヒトリンパ球の結合を阻害することが示された。N末端からC末端まで、軽および重鎖は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4ドメインを含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabab番号付け慣例に従う。

【0164】

次の段階は、供給フレームワーク残基に対するヒト抗体を選択することを含む。ヒト可変領域フレームワーク内へのマウスCDRsの置換は、ヒト可変領域フレームワークがCDRsが起源するマウス可変フレームワークに対して同じまたは類似のコンフォメーションを採用するならば、それらの正しい空間配向の保持をもたらす可能性が高い。これは、フレームワーク領域が、CDRsが由来するマウス可変フレームワークドメインとの高度の配列同一性を示すヒト抗体からのヒト可変領域を得ることによって達成される。重および軽鎖可変フレームワーク領域は、同じまたは異なるヒト抗体配列から得ることができる。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であってよく、あるいはいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であってよい。Kettleboroughら、Protein Engineering 4: 773頁(1991)、Kolbingerら、Protein Engineering 6: 971頁(1993)を参照のこと。

【0165】

適切なヒト抗体配列は、マウス可変領域のアミノ酸配列と既知のヒト抗体の配列とのコンピュータ比較により特定される。比較は重鎖と軽鎖について別個に行うが、原理は各々で同様である。この比較により、mu 21.6軽鎖は、サブタイプカッパ1のヒト軽鎖との最大の配列同一性を示し、mu 21.6重鎖は、前出のKababによって定義されたようなサブタイプのヒト重鎖との最大の配列同一性を示すことが明らかになる。したがって、軽および重ヒトフレームワーク領域は、通常これらのサブタイプのヒト抗体から、あるいはそのようなサブタイプのコンセンサス配列から得られる。muMAb 21.6からの対応する領域との最大の配列同一性を示す好ましい軽および重鎖ヒト可変領域は、それぞれ抗体RE1および21/28'CLからのものである。

【0166】

次いで、コンピュータモデリングを用いてヒト化抗体がその同族抗原に結合する能力をさらに増大させることができる。マウスCDR領域とヒト可変フレームワーク領域との不自然な並置は、特定のアミノ酸残基の置換により是正しない限り、結合親和力の喪失につながる、不自然なコンフォメーション制限をもたらす得る。置換に用いるアミノ酸残基の選択は、コンピュータモデリングにより一部は決定される。免疫グロブリン分子の3次元像を得るためのコンピュータハードウェアおよびソフトウェアは、広く入手可能である。一般的に、分子モデルは、免疫グロブリン鎖またはそのドメインの構造解析から開始して得ることができる。モデル化される鎖を解析した3次元構造の鎖またはドメインとアミノ酸配列の類似性について比較し、最大の配列類似性を示す鎖またはドメインを分子モデルの構造の出発点として選択する。例えば、muMAb 21.6の軽鎖については、フレームワーク領域、CDR1およびCDR2領域のモデリングの出発点は、ヒト軽鎖RE1であった。CDR3領域については、出発点は、異なるヒト抗体HyHEL-5の軽鎖のCDR3領域であった。モデル化される免疫グロブリン鎖またはドメインにおける実際のアミノ酸と出発構造におけるアミノ酸との差異に対処するために、解析済みの出発構造が修正される。次いで、修正済みの構造を複合免疫グロブリンに組み立てられる。最後に、エネルギー最小化と、すべての原子が互いに適切な距離内にあり、結合長さおよび角度が化学的に許容できる限界内であることを確認することにより、モデルが精密にされる。

【0167】

上記のように、本発明のヒト化抗体は、実質的にヒト免疫グロブリンからの可変フレ

10

20

30

40

50

ムワーク領域と μ M A b 2 1 . 6 と呼ぶ実質的にマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域を含む。 μ M A b 2 1 . 6 の相補性決定領域 (C D R s) および適切なヒトアクセプター免疫グロブリンを明確にしたならば、次の段階は、得られたヒト化抗体の特性を最適化するために、もしあるならば、これらのコンポーネントのどの残基を置換すべきかを決定することである。一般的に、マウス残基の導入により抗体がヒトにおける H A M A 反応を誘発するリスクが高くなるため、ヒトアミノ酸残基をマウス残基で置換することは最小限にすべきである。 C D R コンフォーメーションおよび / または抗原への結合に対する想定される影響に基づいて、置換に用いるアミノ酸を選択する。そのような起こり得る影響の検討は、モデリング、特定の位置におけるアミノ酸の特徴の検討、または特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異誘発の影響の経験的観察による。

10

【 0 1 6 8 】

アミノ酸が μ M A b 2 1 . 6 可変フレームワーク領域と同等なヒト可変フレームワーク領域とで異なっているとき、アミノ酸が以下のとおりであることが合理的に予想されるならば、ヒトフレームワークアミノ酸を通常同等なマウスアミノ酸で置換すべきである。

(1) 抗原に直接非共有結合する (例えば、 μ M A b 2 1 . 6 の位置 L 4 9、L 6 9 におけるアミノ酸)

(2) C D R 領域に隣接する、 C h o t h i a ら (前出) によって提案された代替の定義のもとでの C D R 領域の一部である、または C D R 領域と別の仕方で相互作用する (例えば、 C D R 領域の約 3 以内である) (例えば、 μ M A b 2 1 . 6 の位置 L 4 5、L 5 8、H 2 7、H 2 8、H 2 9、H 3 0 および H 7 1 におけるアミノ酸)

20

あるいは

(3) $V_L - V_H$ 界面に関係する (例えば、 μ M A b 2 1 . 6 の位置 H 4 4 におけるアミノ酸)。

【 0 1 6 9 】

置換の他の候補は、その位置のヒト免疫グロブリンでは異常であるアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である (例えば、 μ M A b 2 1 . 6 の位置 L 1 0 4、L 1 0 5 および L 1 0 7 におけるアミノ酸)。これらのアミノ酸は、より典型的なヒト免疫グロブリンの同等の位置のアミノ酸で置換することができる。あるいは、マウス M A b 2 1 . 6 の同等の位置のアミノ酸は、同等の位置のヒト免疫グロブリンに典型的なものである場合、ヒトフレームワーク領域に導入することができる。

30

【 0 1 7 0 】

一般的に、上の基準を満たすすべてまたは大部分のアミノ酸の置換が望ましい。しかし、場合によっては、特定のアミノ酸が上の基準を満たし、代替の変異型免疫グロブリンが産生され、そのうちの 1 つがその特定の置換を受け、そのうちの他のものは受けないかどうかについて若干の不明確さがある。ヒト化抗体は、通常、L 4 5、L 4 9、L 5 8 および L 6 9 位置の少なくとも 1、2 または 3 つ、より通常 4 つにおける対応する μ M A b 2 1 . 6 残基によるヒト軽鎖フレームワーク残基の置換を含む。ヒト化抗体は通常、H 2 7、H 2 8、H 2 9、H 3 0、H 4 4 および H 7 1 位置の少なくとも 1、2、3、4 または 5 つおよび時として 6 つにおけるヒト重鎖フレームワーク残基の置換も含む。場合によって、H 3 6 も置換されていてよい。好ましい実施形態において、ヒト軽鎖アクセプター免疫グロブリンが R E 1 である場合、軽鎖は、L 1 0 4、L 1 0 5 および L 1 0 7 位置の少なくとも 1 または 2 つ、より通常 3 つにおける置換も含む。これらの位置は、より典型的なアミノ酸残基を有するヒト免疫グロブリンの同等の位置からのアミノ酸で置換されている。

40

【 0 1 7 1 】

通常、ヒト化抗体の C D R 領域は、 μ M A b 2 1 . 6 抗体の対応する C D R 領域と実質的に同じであり、より通常、同じである。しかし、場合によっては、C D R 領域における残基の 1 つを交換することが望ましい。 μ M A b 2 1 . 6 の C D R 3 と V C A M - 1 リガンドとの間にアミノ酸類似性が存在する。この知見は、V C A M - 1 にさらに似るように重鎖 C D R 3 領域のデザインを改善することによって、ヒト化抗体の結合親和力が改

50

善されることを示唆している。したがって、CDR3ドメインの1つまたは複数のアミノ酸をVCAM-1結合ドメインのアミノ酸で置換することができる。通常望ましくないが、得られるヒト化免疫グロブリンの結合親和力に認め得るほどの影響を与えずに、CDR残基の1つまたは複数の同類アミノ酸置換を行うことが時として可能である。

【0172】

上記の特定のアミノ酸置換の場合以外は、ヒト化免疫グロブリンのフレームワーク領域は、それらが由来したヒト抗体のフレームワーク領域と通常実質的に同じであり、より通常、同じである。もちろん、フレームワーク領域におけるアミノ酸の多くは、抗体の特異性や親和力にほとんど、または全く寄与していない。したがって、フレームワーク残基の多くの個別の同類置換は、得られるヒト化免疫グロブリンの特異性または親和力の認め得るほどの変化を伴わずに耐えることができる。しかし、一般的に、そのような置換は望ましくない。

10

【0173】

5.3.1 可変領域の生産

ヒト化免疫グロブリンのCDRおよびフレームワークコンポーネントを概念的に選択したならば、そのような免疫グロブリンを生産するための様々な方法が利用可能である。コードの同義性のため、種々の核酸配列が各免疫グロブリンアミノ酸配列をエンコードする。所望の核酸配列は、新規固相DNA合成により、あるいは所望のポリヌクレオチドの以前の調製済み変異型のPCR突然変異誘発により生産することができる。オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発は、標的ポリペプチドDNAの置換、欠失および挿入変異型を調製する好ましい方法である。Adelmanら、DNA2:183頁(1983)を参照のこと。簡単に述べると、所望の突然変異をエンコードするオリゴヌクレオチドを1本鎖DNA鋳型とハイブリッド形成させることによって、標的ポリペプチドDNAを改変する。ハイブリッド形成の後に、DNAポリメラーゼを用いて、オリゴヌクレオチドプライマーを組み込み、標的ポリペプチドDNAにおける選択される改変をエンコードする鋳型の第2の全相補鎖を合成する。

20

【0174】

5.3.2 定常領域の選択

上記のように生産したヒト化抗体の可変セグメントは、典型的に、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にヒト免疫グロブリンのそのの少なくとも一部に結合している。ヒト定常領域DNA配列は、種々のヒト細胞、好ましくは不死化B細胞からよく知られている手順に従って分離することができる(Kabatら、前出およびWO87/02671を参照)(それぞれ全体を参照により本明細書に援用する)。通常、前記抗体は、軽鎖および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、通常CH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域を含む。

30

【0175】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むあらゆるイソ型を含むすべての型の定常領域を有する抗体を含む。ヒト化抗体が細胞毒性活性を示すことが望ましい場合、定常領域は通常、補体固定定常領域であり、クラスは典型的にIgG1である。そのような細胞毒性活性が望ましくない場合、定常領域はIgG2クラスであってよい。ヒト化抗体は、複数のクラスまたはイソ型の配列を含んでいてよい。

40

【0176】

5.3.3 他の抗VLA-4抗体

他の抗VLA-4抗体は、HP1/2、HP2/1、HP2/4、L25およびP4C2を含むが、これらに限定されない。本明細書に述べるように、また当技術分野で知られているように、当業者が容易に認めるように、これらの抗体は、炎症性腸状態を診断かつ/または治療するために有効な量で投与してもよい。

【0177】

しばしば、マウスにおいて産生させたモノクローナル抗体は、マウス抗体を注射された

50

ヒト対象におけるヒト抗マウス抗体（HAMA）免疫反応を避けるために後にヒト化する。これは、CDRの移植または再構築により発生する。したがって、一般的に前記抗体は、21.6抗体について上述したように、CDR移植または再構築によりヒト化される最初のマウスモノクローナル抗体である。

【0178】

特に、前記ヒト化抗体は、VLA-4に対する特異性を有し、炎症性腸状態を診断かつ/または治療する能力を有する。これらの抗体は、可変領域の少なくとも1つまたは複数の相補性決定領域（CDRs）がドナー非ヒト抗VLA-4抗体に由来する源（例えば、典型的にマウス）から得られる。これらの抗体では、ドナー抗体結合特異性を保持するためにアクセプター抗体重および/または軽鎖可変フレームワーク領域の最低限の改変が存在していることも、または存在していないこともある。好ましくは、CDR移植重鎖可変領域の抗原結合領域は、31～35（CDR1）、50～65（CDR2）および95～102（CDR3）位置に対応するCDRsを含む。好ましい実施形態において、重鎖はさらに、フレームワーク位置27～30（Kabat番号付け）における非ヒト残基を含むことができる。重鎖はさらに、フレームワーク位置77～79または66～67および69～71または84～85または38および40または24（Kabat番号付け）における非ヒト残基を含むことができる。好ましくは、CDR移植軽鎖可変領域の抗原結合領域は、24～34（CDR1）、50～56（CDR2）および89～97（CDR3）位置に対応するCDRsを含む。好ましい実施形態において、軽鎖は、フレームワーク位置60および67（Kabat番号付け）における非ヒト残基をさらに含むことができる。これらの残基の呼称は、Kabat番号付け（Kabatら、第5版、4巻、SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST、U.S. Department of Health Human Services、NIH、USA（1991））に従って番号付けされたものである。

10

20

【0179】

マウス抗体HP1/2の合成およびヒト化。HP1/2は、VLA-4に対して産生される他の抗体である。ヒト対象用のこの抗体のヒト化型を調製する方法は、本明細書に記載されており、また、Biogen, Inc.に譲渡され、すべての目的のために全体を参照により援用する米国特許第6602503号にさらに記載されている。ヒト化抗体の配列は次のとおりである。HP1/2_H DNA配列およびその翻訳アミノ酸配列は以下のとおりである。

30

【0180】

【化 1】

5'-gtc aaa ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca	48	
N-Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser		
1 5 10 15		
gtc aag ttg ttc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat	96	
Val Lys Leu Phe Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr		
20 25 30		
atg cac tgg gtg aag cag agg cct caa cag ggc ctg gag tgg att gga	144	
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gln Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
35 40 45		
agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac ccg aag ttc cag	192	10
Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln		
50 55 60		
gtc aag gcc act att aca gcg gac acg tcc tcc aac aca gcc tgg ctg	240	
Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Trp Leu		
65 70 75 80		
cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tac tac tgt gca	288	
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85 90 95		
gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac ttc tgg ggc caa	336	
Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln		
100 105 110		
ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca-3'	360	20
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser-C		
115 120		

【0 1 8 1】

HP 1 / 2 V_H の 2 つの配列とファミリー I I C のコンセンサス配列との比較から、唯一の異常な残基はアミノ酸位置 80 および 121 (すなわち、K a b a t 番号付けで 79、94 および 121) に存在することがわかった。T r y - 80 はサブグループ I I C における非変異体であるが、他の配列決定済みマウス V_H 領域は、いずれも T r p を有さないが、この位置に他の芳香族アミノ酸を有する。ヒトおよびマウス V_H の大多数は K a b a t 位置 94 にアルギニン残基を有する。HP 1 / 2 V_H における A s p - 94 の存在はまれであり、この位置における負に荷電した残基の唯一の報告例が存在する。K a b a t 位置 113 におけるプロリンも異常であるが、遠いため、C D R s のコンフォーメーションにおいて重要であるとは考え難い。C D R 1 を構成するアミノ酸は、他の 3 つの配列決定済みマウス V_H 領域に認められた。しかし、C D R 2 および C D R 3 は、HP 1 / 2 に特有であり、他の報告されたマウス V_H に認められなかった。

【0 1 8 2】

HP 1 / 2 V_K D N A 配列およびその翻訳アミノ酸配列は、次のとおりである。

【0 1 8 3】

【化2】

5'-agt	att	gtg	atg	acc	cag	act	ccc	aaa	ttc	ctg	ctt	gtt	tca	gca	gga	48	
N-Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly		
1				5					10					15			
gac	agg	gtt	acc	ata	acc	tgc	aag	gcc	agt	cag	agt	gtg	act	aat	gat	96	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Asn	Asp		
			20					25					30				
gta	gct	tgg	tac	caa	cag	aag	cca	ggg	cag	tct	cct	aaa	ctg	ctg	ata	144	
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
		35					40					45					
tat	tat	gca	tcc	aat	cgc	tac	act	gga	gtc	cct	gat	cgc	ttc	act	ggc	192	10
Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly		
	50					55				60							
agt	gga	tat	ggg	acg	gat	ttc	act	ttc	acc	atc	agc	act	gtg	cag	gct	240	
Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Ala		
65				70						75					80		
gaa	gac	ctg	gca	gtt	tat	ttc	tgt	cag	cag	gat	tat	agc	tct	ccg	tac	288	
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Ser	Ser	Pro	Tyr		
				85					90					95			
acg	ttc	gga	ggg	ggg	acc	aag	ctg	gag	atc-3'							318	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile-C								
			100					105									

20

【0184】

HP1/2V_Kは、KabatatファミリーVのメンバーであり(Kabatら、第5版、4巻、SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST、U.S. Department of Health Human Services(1991))、異常な残基を有さない。CDR1およびCDR3のアミノ酸は、特有である。CDR2を構成するアミノ酸は、他の1つのマウスV_Kにおいて報告された。

【0185】

CDR移植抗VLA-4抗体の設計。CDR移植抗VLA-4抗体を設計するために、マウスHP1/2のどの残基が軽および重鎖のCDRsを含むかを判定することが必要であった。より少ない可変フレームワーク配列の間の高変異性の3つの領域が軽および重鎖に認められる(WuおよびKabatat、J. Exp. Med. 132:211~250頁(1970)、Kabatatら、(1991))。ほとんどの場合、これらの高変異性領域はCDRに対応するが、超えている可能性がある。マウスHP1/2のCDRsは、他のV_HおよびV_K配列との整列によりKabatatら、(1991)に従って解明された。マウスHP1/2V_HのCDRsは、特定され、ヒト化V_H配列で特定された残基と以下のように対応する。

【0186】

【化3】

CDR1	AA ₃₁ -AA ₃₅	
CDR2	AA ₅₀ -AA ₆₆	
CDR3	AA ₉₉ -AA ₁₁₀	

40

【0187】

これらは、Kabatat番号付けにおけるそれぞれAA₃₁~AA₃₅、AA₅₀~AA₆₅およびAA₉₅~AA₁₀₂に対応する。マウスHP1/2V_KのCDRsは、特定され、ヒト化V_K配列で特定された残基に以下のように対応している。

【0188】

【化 4】

CDR1	AA ₂₄ -AA ₃₄
CDR2	AA ₅₀ -AA ₅₆
CDR3	AA ₈₉ -AA ₉₇

【0189】

これらは、K a b a t 番号付けにおける同じ番号付けアミノ酸に対応している。したがって、V_K の C D R s のみ (V_H は該当せず) が K a b a t C D R 残基に対応していた。H P 1 / 2 (ドナー) C D R s を受け入れるように選択されたヒトフレームワークは、重および軽鎖についてそれぞれ N E W M および R E 1 であった。N E W M および R E 1 配列は、K a b a t ら、(1991) に公表された。

10

【0190】

ヒト化 H P 1 / 2 抗体のヒト化重鎖可変領域の D N A および対応するアミノ酸配列は、以下のとおりである。

【0191】

【化 5】

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt	48
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
1 5 10 15	
gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag tcc ggt gct gaa gtt gtt aaa	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Val Lys	
20 25 30	
cag ggt tcc tcc gtt aaa ctg tcc tgc aaa gct tcc ggt ttc aac atc	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
35 40 45	
aaa gac acc tac atg cac tgg gtt aaa cag cgt ccg ggt cag ggt ctg	192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggt cgt atc gac ccg gct tcc ggt gac acc aaa tac gac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp	
65 70 75 80	
ccg aaa ttc cag gtt aaa gct acc atc acc gct gac gaa tcc acc tcc	288
Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
85 90 95	
acc gct tac ctg gaa ctg tcc tcc ctg cgt tcc gaa gac acc gct gtt	336
Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac tac tgc gct gac ggt atg tgg gtt tcc acc ggt tac gct ctg gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp	
115 120 125	
ttc tgg ggt cag ggt acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'	429
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C	
130 135 140	

20

30

【0192】

ヒト化 H P 1 / 2 抗体のヒト化軽鎖可変領域の D N A および対応するアミノ酸配列は、以下のとおりである。

【0193】

40

【化 6】

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt	48	
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
1 5 10 15		
ggt cac tcc atc gtt atg acc cag tcc ccg gac tcc ctg gct gtt tcc	96	
Val His Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser		
20 25 30		
ctg ggt gaa cgt gtt acc atc aac tgc aaa gct tcc cag tcc gtt acc	144	
Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr		
35 40 45		
aac gac gtt gct tgg tac cag cag aaa ccg ggt cag tcc ccg aaa ctg	192	10
Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu		
50 55 60		
ctg atc tac tac gct tcc aac cgt tac acc ggt gtt ccg gac cgt ttc	240	
Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe		
65 70 75 80		
tcc ggt tcc ggt tac ggt acc gac ttc acc ttc acc atc tcc tcc gtt	288	
Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val		
85 90 95		
cag gct gaa gac gtt gct gtt tac tac tgc cag cag gac tac tcc tcc	336	
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser		
100 105 110		
ccg tac acc ttc ggt ggt ggt acc aaa ctg gag atc taa ggatcctc-3'	383	20
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile-C		
115 120		

【0194】

上のヒト化HP1/2抗体軽および重鎖に加えて、他のアクセプター重および軽鎖領域もドナーHP1/2領域の挿入のために用いることができる。次のすべての構成体は、Ser-75(Kabat番号付け)を含む。STAW構成体はさらに位置77にGln~Thrを、位置78にPhe~Alaを、位置79(Kabat番号付け)にSer~Trpを含む。V_HDNA配列およびその翻訳アミノ酸配列を以下に示す。

【0195】

【化 7】

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt	48	
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly		
1 5 10 15		
gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga	96	
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg		
20 25 30		
cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att	144	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile		
35 40 45		
aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt	192	10
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu		
50 55 60		
gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp		
65 70 75 80		
ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac	288	
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser <u>Ser</u> Asn		
85 90 95		
aca gcc tgg ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc	336	
<u>Thr</u> <u>Ala</u> <u>Trp</u> Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		20
100 105 110		
tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac	384	
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp		
115 120 125		
ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'	429	
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C		
130 135 140		

【0196】

K A I T A S 構成体は、A r g から L y s への（位置 6 6）、V a l から A l a への（位置 6 7）、M e t から I l e への（位置 6 9）、L e u から T h r への（位置 7 0）および V a l から A l a への（位置 7 1）（K a b a t 番号付け）さらなる変化を含む。K A I T A S V_H D N A 配列およびその翻訳アミノ酸配列を以下に示す。

30

【0197】

【化 8】

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt	48	
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly		
1 5 10 15		
gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga	96	
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg		
20 25 30		
cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att	144	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile		
35 40 45		
aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt	192	10
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu		
50 55 60		
gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp		
65 70 75 80		
ccg aag ttc cag gtc aaa gcg aca att acg gca gac acc agc agc aac	288	
Pro Lys Phe Gln Val <u>Lys</u> <u>Ala</u> Thr <u>Ile</u> <u>Thr</u> <u>Ala</u> Asp Thr Ser Ser Asn		
85 90 95		
cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc	336	
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		
100 105 110		
tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac	384	20
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp		
115 120 125		
ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'	429	
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C		
130 135 140		

【0198】

SSE 構成体は、Ala から Ser への（位置 84）、Ala から Glu への（位置 85）（Kabata 番号付け）さらなる変化を含む。SSE V_H DNA 配列およびその翻訳アミノ酸配列を以下に示す。

【0199】

【化 9】

5'-cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga cct agc cag	48	
N-Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln		
1 5 10 15		
acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att aaa gac acc	96	
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr		
20 25 30		
tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt gag tgg att	144	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile		
35 40 45		
gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac ccg aag ttc	192	10
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe		
50 55 60		
cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac cag ttc agc	240	
Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser		
65 70 75 80		
ctg aga ctc agc agc gtg aca tct gag gac acc gcg gtc tat tat tgt	288	
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr <u>Ser</u> <u>Glu</u> Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac ttc tgg ggc	336	
Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly		
100 105 110		
caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'	372	20
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C		
115 120		

【0200】

KRS 構成体は、A r g から L y s への（位置 38）、P r o から A r g への（位置 40）（K a b a t 番号付け）さらなる変化を含む。K R S V_H D N A 配列およびその翻訳アミノ酸配列を以下に示す。

【0201】

【化 1 0】

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt	48	
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly		
1 5 10 15		
gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga	96	
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg		
20 25 30		
cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att	144	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile		
35 40 45		
aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aaa cag cga cct gga cga ggt ctt	192	10
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val <u>Lys</u> Gln <u>Arg</u> Pro Gly Arg Gly Leu		
50 55 60		
gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp		
65 70 75 80		
cag aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac	288	
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn		
85 90 95		
cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc	336	
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		
100 105 110		
tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac	384	20
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp		
115 120 125		
ttc tgg gcc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'	429	
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C		
130 135 140		

【 0 2 0 2】

A S 構成体は、位置 2 4 (K a b a t 番号付け) における V a l から A l a への変化を含む。A S V_H は、以下のとおりである。

【 0 2 0 3】

【化 1 1】

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt	48	
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly		
1 5 10 15		
gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga	96	
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg		
20 25 30		
cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gcg tct ggc ttc aac att	144	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr <u>Ala</u> Ser Gly Phe Asn Ile		
35 40 45		
aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt	192	10
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu		
50 55 60		
gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac	240	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp		
65 70 75 80		
ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac	288	
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn		
85 90 95		
cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc	336	
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		
100 105 110		
tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac	384	20
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp		
115 120 125		
ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'	429	
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C		
130 135 140		

【0 2 0 4】

ヒト化軽鎖は、たとえあるにしても、一般的にほとんど修飾を必要としない。しかし、ヒト化抗 V L A - 4 抗体の調製において、いくつかの経験的変更により、抗体のそのリガンドに対する生物学的活性が改善した。例えば、マウス軽鎖を含む S e r 突然変異を有するヒト化重鎖は、マウス H P 1 / 2 より効力が約 2 . 5 倍低かった。ヒト化軽鎖を含む同じヒト化重鎖は、効力が約 4 倍低かった。 30

【0 2 0 5】

ヒト化 V_K 構成体 (V K 1) は、位置 6 0 における S e r から A s p への置換および位置 6 7 における T r y の代わりに S e r を含む。D N A 配列およびその翻訳アミノ酸配列を以下に示す。

【0 2 0 6】

【化 1 2】

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt	48	
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
1 5 10 15		
gtt cac tcc gac atc cag ctg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc	96	
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
20 25 30		
agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg	144	
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val		
35 40 45		
act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag	192	10
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
50 55 60		
ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca agc aga	240	
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg		
65 70 75 80		
ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc	288	
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser		
85 90 95		
ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc	336	
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser		
100 105 110		
tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-3'		20
386 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C		
115 120 125		

【0 2 0 7】

他の V_K 構成体（すなわち、 $V_K 2$ ）は、修復された元の RE 1 フレームワークの D Q M D Y 配列を有する。DNA およびその翻訳アミノ酸配列を以下に示す。

【0 2 0 8】

【化 1 3】

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt	48	
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		30
1 5 10 15		
gtc cac tcc agc atc gtg atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc	96	
Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
20 25 30		
agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg	144	
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val		
35 40 45		
act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag	192	
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
50 55 60		
ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca gat aga	240	40
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro <u>Asp</u> Arg		
65 70 75 80		
ttc agc ggt agc ggt tat ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc	288	
Phe Ser Gly Ser Gly <u>Tyr</u> Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser		
85 90 95		
ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc	336	
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser		
100 105 110		
tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-3'		
386 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C		
115 120 125		50

【 0 2 0 9 】

第3のV_K構成体は、KV3であり、アミノ末端におけるDQMに
対するSVMおよび他の2つの残基変化を含む。DNAおよびその翻訳アミノ酸配列は、
以下のとおりである。

【 0 2 1 0 】

【 化 1 4 】

```

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt      48
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
   1           5           10           15

gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc      96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
           20           25           30

agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg      144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
           35           40           45

act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag      192
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
           50           55           60

ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca gat aga      240
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
           65           70           75           80

ttc agc ggt agc ggt tat ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc      288
Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
           85           90           95

ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc      336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
           100          105          110

tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-3'
386 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
           115          120          125

```

【 0 2 1 1 】

これらの軽および重鎖配列のそれぞれをどのように調製するのかに関する詳細は、すべ
ての目的のために全体を参照により援用する米国特許第6602503号に記載されてい
る。上の軽および重鎖の種々の組合せは、当技術分野で知られているコンピュータモデリ
ングに基づいて調製することができる。

【 0 2 1 2 】

4 インテグリンを認識し、それに結合するさらなる抗体は、当技術分野で知られてい
る。これらは、GG5/3 (Keszthelyiら、Neurology 47(4):
1053~1059頁(1996))、FW3-218-1 (ATCC No.: HB-
261、ヒツジ 4 インテグリンに対するIgG2b抗体)およびR1-2 (ATCC
No.: HB-227、ドブネズミ(Rattus norvegicus)において発
生したIgG2b抗体)を含むが、これらに限定されない。抗体がマウスまたは他の動物
において発生したかどうかかわりなく、配列の各々を、当技術分野で知られていること
に基づき、またコンピュータモデリングを用いてヒト化されるように遺伝子工学により処
理することができる。次に、抗 4 インテグリンヒト化抗体を、本明細書に開示するin
vivoおよびin vivoアッセイに基づいて、炎症性腸状態を診断かつ/または
治療するそれらの能力について評価することができる。

【 0 2 1 3 】

5.4 抗体フラグメント

VLA-4およびVCAM-1相互作用を阻害するように抗 4 またはVCAM-1に
結合する抗体の抗体フラグメントを、炎症性腸状態を診断かつ/または治療するのに使用
することにも考慮される。抗体フラグメントは、本明細書に開示する組成物に用いること

ができる Fab 、 $F(ab')_2$ 、 $scFv$ および Fv フラグメントを含む。

【0214】

本明細書で用いる「 Fab フラグメント」という用語は、抗体分子の重および軽鎖の一部からなる単一抗原結合領域を含む部分的抗体分子を指す。

【0215】

本明細書で用いる「 $F(ab')_2$ 」という用語は、抗体分子の軽鎖および重鎖の一部からなる両単一抗原結合領域を含む部分的抗体分子を指す。

【0216】

本明細書で用いる「 Fv フラグメント」という用語は、抗原認識および結合に関与する抗体分子の部分を指す。

【0217】

本明細書で用いる「 $scFv$ 」という用語は、単一鎖 Fv ($scFv$) フラグメントを指す。これらの $scFv$ フラグメントは、フレキシブルリンカーにより接続されている抗体重および軽鎖の可変領域のみからなる組換え抗体誘導体である。 $scFv$ 抗体フラグメントは、抗体の V_H および V_L 領域を含み、これらの領域は単一ポリペプチド鎖に存在する。一般的に、 Fv ポリペプチドは、 $scFv$ が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする V_H および V_L 領域間のポリペプチドリリンカーをさらに含む。 $scFv$ のレビューについては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、vol. 113、269～315 頁 (Rosenberg および Moore 編、Springer-Verlag、New York 1994) を参照のこと。

【0218】

抗体フラグメントに二重特異性抗体も含まれる。「二重特異性抗体」という用語は、同じポリペプチド鎖 ($V_H - V_L$) において軽鎖可変領域 (V_L) に連結されている重鎖可変領域 (V_H) を含む、2つの抗原結合部位を有する小抗体フラグメントを指す。短すぎて同じ鎖上の2つの領域間の対の形成ができないリンカーを用いることによって、領域は他の鎖の相補領域と対を形成することを余儀なくされ、2つの抗原結合部位を形成する。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第404097号、WO93/11161 および Holliger ら、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444～8 頁により十分に記述されている。

【0219】

抗体フラグメントは、線状抗体も含む。本願書を通して用いるとき「線状抗体」という表現は、例えば、Zapata ら、1995 Protein Eng. 8(10): 1057～62 頁に記述されている抗体を指す。簡単に述べると、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成するタンデム Fd セグメントの対 ($V_H - C_H1 - V_H - C_H1$) を含む。線状抗体は、二重特異性または単一特異性であり得る。

【0220】

抗体のパイン消化により、各々が単一抗原結合部位および残余「 Fc 」フラグメントを含み、その名称が容易に結晶化するその能力を反映している「 Fab 」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメントが生成する。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋させることができる $F(ab')_2$ フラグメントが生成する。

【0221】

いくつかのマウス抗 $VLA-4$ モノクローナル抗体が以前に記載された。例えば、さらに本明細書で論じ、すべての目的のために全体を参照により本明細書に援用する米国特許第6602503号、第6033665号および第5840299号、Sanchez-Madrid ら、1986、Eur. J. Immunol. 16: 1343～9 頁、Hemler ら、1987、J. Biol. Chem. 262: 11478～85 頁、Pulido ら、1991、J. Biol. Chem. 266: 10241～45 頁、Isssekutz ら、1991、J. Immunol. 147: 109 頁 (TA-2 MAb

10

20

30

40

50

）を参照のこと。V L A - 4 のアルファおよび / またはベータ鎖を認識することができるこれらの抗 V L A - 4 モノクローナル抗体および他の抗 V L A - 4 抗体は、本発明による治療の方法に有用であろう。V C A M - 1 およびフィブロネクチンリガンドへの結合に關与する V L A - 4₄ 鎖エピトープを認識する抗 V L A - 4 抗体（すなわち、リガンド認識に關与する部位において V L A - 4 に結合し、V C A M - 1 およびフィブロネクチン結合を阻害することができる抗体）が好ましい。そのような抗体は、B エピトープ特異抗体（B 1 または B 2）と定義され（P u l i d o ら、1991、前出）、本発明による抗 V L A - 4 抗体でもある。

【0222】

V L A - 4 に対する完全にヒトモノクローナル抗体同族体は、本発明の方法において V L A - 4 リガンドを阻害または被覆する可能性がある他の好ましい結合剤である。これらは、B o e r n e r ら、1991、J . I m m u n o l .、147:86~95 頁により記述されているように *in vitro* 初回免疫ヒト脾細胞を用いてそれらの完全な形で調製することができる。あるいは、それは、P e r s s o n ら、1991、P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A、88:2432~36 頁により、あるいは H u a n g ら、1991、J . I m m u n o l . M e t h .、141:227~236 頁により記述されているようにレパートリークローニングにより調製することができる。米国特許第 5798230 号（1998 年 8 月 25 日、「P r o c e s s f o r t h e p r e p a r a t i o n o f h u m a n m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s a n d t h e i r u s e」）はヒト B 細胞からのヒトモノクローナル抗体の調製を記述している。本発明によれば、ヒト抗体産生 B 細胞を、エプスタイン - バーウイルスまたはエプスタイン - バーウイルス核抗原 2（E B N A 2）を発現するその誘導体に感染させることによって不死化する。不死化に必要である E B N A 2 機能をその後遮断する。これにより抗体産生の増加がもたらされる。別の方法が当技術分野で知られている。

【0223】

ヒト抗体を完全に生産する他の方法については、異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物および不活性化内因性免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物を記述している米国特許第 5789650 号を参照のこと。内因性免疫グロブリン遺伝子は、アンチセンスポリヌクレチドおよび / または内因性免疫グロブリンに対する抗血清により抑制される。異種抗体は、非ヒト動物の当該種の遺伝子に通常認められない免疫グロブリン遺伝子によりエンコードされる。非再配列異種ヒト免疫グロブリン重鎖の配列を含むトランス遺伝子を非ヒト動物に導入し、それによりトランスジェニック免疫グロブリン配列を機能的に再配列し、ヒト免疫グロブリン遺伝子によってエンコードされる種々のイソ型の抗体のレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物を形成させる。そのような異種ヒト抗体は、B 細胞で産生され、その後これを、例えば、ミエローマのような不死化細胞系と融合することにより、あるいはモノクローナル異種完全ヒト抗体同族体を産生することができる細胞系を不死にする他の技術によりそのような B 細胞を操作することにより不死化する。標準ファージ技術を用いてヒト療法として開発することができる高親和力抗体を分離するために、大きい非免疫化ヒトファージディスプレイライブラリーを用いることもできる。

【0224】

真の「キメラ抗体」（すなわち、全定常および全可変領域が異なる源由来である）の調製する初期の方法の後に、抗体を、1 つの種のそれらの相補性決定領域（C D R s）を他の種のそれで置換する（所定の可変領域内での）ことにより改変する新規のアプローチが欧州特許第 0239400 号（W i n t e r ら）に記載された。この方法は、例えば、ヒト重および軽鎖 I g 可変領域ドメインの C D R s をマウス可変領域ドメインの代替 C D R s で置換するために用いることができる。その後これらの改変 I g 可変領域をヒト I g 定常領域と組み合わせて、置換マウス C D R s 以外は組成が完全にヒトである抗体を作ることができる。そのような C D R 置換抗体は、真のキメラ抗体と比較して、かなり少ない非ヒトコンポーネントを含むためヒトにおける免疫反応を誘発する可能性が低いと予想され

10

20

30

40

50

る。CDR「移植」によりモノクローナル抗体をヒト化する方法は、「再構築 (reshaping)」と呼ばれている (Riechmannら、1988、Nature 332: 323~7頁およびVerhoeyenら、1988、Science 239: 1534~6頁)。

【0225】

5.5 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は、細胞内周辺腔内に産生させるか、または媒体中に直接分泌させることができる。抗体を細胞内に産生させる場合、第1段階として、宿主細胞または溶解フラグメントである粒子状デブリを例えば、遠心分離または限外濾過により除去する。Carterら、Bio/Technology 10: 163~7頁 (1992) は大腸菌 (E. coli) の周辺腔に分泌される抗体を分離する方法を記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTAおよびフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSE) の存在下で約30分間にわたって解凍する。細胞デブリは遠心分離により除去することができる。抗体が媒体中に分泌される場合には、そのような発現システムの上清を一般的に最初に市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮する。タンパク質溶解を抑制するためにPMSEのようなプロテアーゼインヒビターを先行する工程のいずれかに含めることができ、外来性汚染物の成長を妨げるために抗生物質を含めることができる。

10

【0226】

細胞から調製する抗体組成物は、好ましくはLPHICの前に少なくとも1つの精製工程にかける。適切な精製工程の例は、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティークロマトグラフィーなどであり、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製法である。アフィニティーリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFcドメインの種およびイソ型に依存する。プロテインAは、ヒト 1、2または4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmarkら、1983 J. Immunol. Meth. 62: 1~13頁)。すべてのマウスイソ型およびヒト 3にはプロテインGが推奨される (Gussら、1986 EMBO J. 5: 1567~75頁)。アフィニティーリガンドが付着するマトリックスはアガロースが最も多いが、他のマトリックスの利用可能である。多孔性制御ガラスあるいはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンのような機械的に安定なマトリックスは、アガロースにより達成することができるとも速い流速と短い処理時間を実現することが可能である。抗体がC_H3領域を含む場合、Bakerbond ABX (商標) 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換カラム上の分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上クロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE (商標) 上クロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂上クロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラムなど)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製のための他の技術も、回収する抗体によって利用可能である。

20

30

【0227】

予備精製工程の後に、問題の工程および汚染物質を含む混合物をLPHICに供する。しばしば、精製すべき抗体組成物は、前の精製工程の緩衝液中に存在する。しかし、LPHIC工程の前に緩衝液を抗体組成物に加えることが必要である可能性がある。多くの緩衝液が利用可能であり、常用実験により選択することができる。精製する抗体およびローディングバッファ中の少なくとも1つの汚染物質を含む混合物のpHは、出発pHによって酸または塩基を用いて約2.5~4.5のpHに調整する。好ましくは、ローディングバッファは低い塩濃度を有する (すなわち、約0.25M塩より低い)。

40

【0228】

混合物をHICカラム上に加える。HICカラムは通常、疎水性リガンド (例えば、アルキルまたはアリアル基) が結合する塩基性マトリックス (例えば、架橋アガロースまた

50

は合成コポリマー材料)を含む。好ましいH I Cカラムは、フェニル基で置換されたアガロース樹脂を含む(例えば、フェニルS E P H A R O S E (商標)カラム)。多くのH I Cカラムは市販されている。例は、低または高置換のフェニルS E P H A R O S E 6 F A S T F L O W (商標)カラム(Pharmacia LKB Biotechnology、AB、スウェーデン)、フェニルS E P H A R O S E (商標)高性能カラム(Pharmacia LKB Biotechnology、AB、スウェーデン)、オクチルS E P H A R O S E (商標)高性能カラム(Pharmacia LKB Biotechnology、AB、スウェーデン)、F R A C T O G E L (商標)E M DプロピルもしくはF R A C T O G E L (商標)E M Dフェニルカラム(E. Merck、ドイツ)、M A C R O - P R E P (商標)メチルもしくはM A C R O - P R E P (商標)t - ブチル保持体(Bio - Rad、カルフォルニア)、W P H I - プロピル(C₃) (商標)カラム(J. T. Baker、ニュージャージー)およびT O Y O P E A R L (商標)エーテル、フェニルもしくはブチルカラム(Tosoh Haas、PA)を含むが、これらに限定されない。

10

【0229】

抗体は、通常ローディングバッファと同じである溶出緩衝液を用いてカラムから溶出させる。溶出緩衝液は、常用実験を用いて選択することができる。溶出緩衝液のpHは、約2.5~4.5であり、低い塩濃度を有する(すなわち、約0.25M塩より低い)。問題の抗体を溶出させるために塩勾配を用いる必要はないことが発見された。所望の生成物は、カラムにさほど結合しないフロースルー画分中に回収される。

20

【0230】

L P H I C工程は、適切に折りたたまれ、ジスルフィド結合した抗体を不必要な不純物(例えば、不適切に結合した軽および重フラグメント)から除去する方法を提供する。特に、該方法は、軽鎖と重鎖がジスルフィド結合により結合していない適切に折りたたまれた抗体フラグメントと本明細書で特徴付けられている不純物を実質的に除去する手段を提供する。

【0231】

精製タンパク質の診断または治療用製剤は、抗体組成物を、例を以下に示す生理的に許容できる担体の形で提供することにより調製することができる。

【0232】

H I Cカラムを再使用できるようにH I Cカラムから不純物(例えば、折りたたまれていない抗体ならびに不適切に結合した軽および重フラグメント)を除去するために、尿素を含む組成物(例えば、6.0M尿素、1% M E S緩衝液pH6.0、4mM硫酸アンモニウム)をカラムに流すことができる。他の方法が当技術分野で知られている。

30

【0233】

5.6 免疫グロブリン製剤

所望の治療効果を有する抗体および免疫グロブリンは、生理的に許容できる担体に混入して対象に投与することができる。抗体は、皮下、硬膜下、静脈内、筋肉内、くも膜下腔、腹腔内、大脳内、動脈内または病変内投与経路を含む非経口投与、局所(例えば、外科的適用または外科的坐剤)および肺(例えば、エアゾール剤、吸入剤または散剤)を含むが、これらに限定されない様々な方法、ならびにさらに下で述べるように投与することができる。

40

【0234】

導入の方法によって、免疫グロブリンは様々な方法で製剤化することができる。製剤中の治療上有効な免疫グロブリンの濃度(すなわち、炎症性腸状態を診断かつ/または治療するのに十分な製剤)は、約1mg/mlから約1g/mlまで変化し得る。好ましくは、免疫グロブリン組成物は、それを必要とする対象に投与するとき、対象において約10ng/mlまたはそれ以上の免疫グロブリンの血中濃度に達する。

【0235】

好ましくは、免疫グロブリンは、滅菌生理食塩溶液のような適切な不活性担体で非経口

50

投与用に製剤化する。例えば、担体溶液中の免疫グロブリンの濃度は、一般的に 1 ~ 100 mg / ml である、投与量は、投与経路によって決定される。好ましい投与経路は、非経口または静脈内投与である。

【0236】

非経口投与の場合、本発明の抗体は、生理的に許容できる希釈剤中物質の溶液または懸濁液の注射剤として投与することができ、界面活性剤および他の製剤を添加した、または添加しない水および油であってよい薬剤担体は、石油、動物、植物または合成由来のもの、例えば、ラッカセイ油、ダイズ油および鉱油である。一般的に、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールは、特に注射液剤用の好ましい液体担体である。本発明の抗体は、有効成分の持続放出を可能にするように製剤化することができるデポ注射剤または植込剤の形で投与することができる。好ましい組成物は、HClで pH 6.0 に調整した 50 mM L - ヒスチジン、150 mM NaCl からなる水性緩衝液で製剤化した 5 mg / mL のモノクローナル抗体を含む。

10

【0237】

本発明の重要な特徴によれば、VLA - 4 を認識し、それに結合する免疫グロブリンは、単独で、あるいはクローン病のような炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症 (MS)、慢性関節リウマチ (RA)、移植片対宿主病 (GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症を治療するために一般的に用いられる他の薬剤と併用して投与することができる。これらの薬剤の投与は、免疫グロブリンの投与の前、同時または後に行うことができる。好ましくは、他の薬剤はステロイドではない。

20

【0238】

抗体または免疫グロブリン、例えば、ナタリズマブの治療上有効な量は、既知の抗体の確立された有効量との比較により、in vivo および in vitro モデルにおいてナタリズマブについて得られたデータを考え合わせて推定することができる。好ましくは、データは、適宜、クローン病のような炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症 (MS)、慢性関節リウマチ (RA)、移植片対宿主病 (GVHD)、宿主対移植片病および脊椎関節症の治療に試験から得られたデータである。当技術分野で知られているように、免疫グロブリンの変性または代謝、全身対局所送達、ならびに免疫グロブリンを投与する対象の年齢、体重、一般健康状態、性、食事、投与時間、薬物相互作用および状態の重症度により、用量の調節が必要である。当業者がそのような調節は行い、常用実験により適切な用量を決定することができる。

30

【0239】

免疫グロブリンの治療用製剤は、所望の程度の純度を有する免疫グロブリンを任意選択の生理的に許容できる担体、賦形剤または安定化剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., A. Osol, Ed, 1980 年およびより最新の版) と混合して、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で保存用に調製する。許容できる免疫グロブリン担体、賦形剤または安定化剤は、用いられる用量および濃度でレシipientに対して無毒性、非治療的かつ/または非免疫原性であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸のような緩衝剤、アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子量 (約 10 残基未満) ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンのようなタンパク質、ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシンのようなアミノ酸、グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む単糖、二糖および他の炭水化物、EDTA のようなキレート化剤、マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール、ナトリウムのような塩形成対イオン、および/またはトウイーン、プルロニクス (Pluronic) もしくはポリエチレングリコール (PEG) のような非イオン性界面活性剤などである。担体分子の特定の例は、グルコサミノグルカン (例えば、ヘパリン硫酸)、ヒアルロン酸、硫酸ケタラン、コンドロイチン 4 硫酸、コンドロイチン 6 硫酸、ヘパラン硫酸およびダルマチン硫酸、パーレカン (perlecan) およびペントポリ硫酸を含むが、これらに限定されない。

40

50

【0240】

免疫グロブリンを含む薬剤組成物は、所望ならば、動物またはヒトへの投与用の薬剤組成物を調合するのに一般的に用いられる賦形剤である製薬上許容できる無毒性担体または希釈剤も含んでいてよい。希釈剤は、配合剤の生物学的活性に影響を及ぼさないように選択する。例は、蒸留水、生理学的リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液およびハンクス液を含むが、これらに限定されない。

【0241】

本発明の薬剤は、植物もしくは他の同様な油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステルまたはプロピレングリコールのような水性または非水性溶媒にそれらを溶解、懸濁または乳化して、注射剤に製剤化することができる。該製剤は、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤および保存剤も含んでいてよい。

10

【0242】

免疫グロブリンはまた、吸入または肺送達により投与するためのエアゾール剤で用いることができる。本発明の薬剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の許容できる加圧噴射剤中に配合することができる。

【0243】

免疫グロブリンはまた、例えば、コアセルベーション法もしくは界面重合により調製したマイクロカプセル（例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリメチルメタクリレートマイクロカプセル）、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中に封じ込めることができる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences（前出）に開示されている。

20

【0244】

in vivo 投与に用いる免疫グロブリンは、無菌性でなければならない。これは、凍結乾燥および再構成の前または後に滅菌濾過膜により容易に実現することができる。免疫グロブリンは、通常、凍結乾燥の形態で、あるいは溶液として保存する。

【0245】

治療用免疫グロブリン組成物は、一般的に滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針または同様な鋭利な器具を挿入できる栓を有する静脈注射液バッグまたはバイアルに入れる。

30

【0246】

徐放性製剤の適切な例は、タンパク質を含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリックスなどであり、マトリックスは成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例は、Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15: 167~277頁（1981）およびLanger、Chem. Tech. 12: 98~105頁（1982）により記述されたようにポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸およびL-グルタミン酸ガンマエチル（Sidmanら、Biopolymers 22: 547~556頁、1983）、非分解性エチレン-酢酸ビニル（Langerら、前出）、LUPRON DEPOT（商標）のような分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（すなわち、乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸リユープロライドからなる注射用マイクロスフェア）およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）などである。

40

【0247】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日間にわたって分子を放出できるが、ある種のヒドロゲルは、より短期間分子を放出する。カプセル封入抗体が体内に長期間にわたって留まっているとき、それらは37℃での水分への曝露の結果として変性または凝集して、生物学的活性の喪失と免疫原性の変化が引き起こされる可能性がある。免疫グロブリンの安定化について、関係するメカニズムに応じて合理

50

的な戦略を考案することができる。例えば、凝集メカニズムがチオ - ジスルフィド交換による分子間 S - S 結合形成であることが発見されたならば、スルフヒドリル残基を修飾し、酢酸溶液から凍結乾燥し、適切な添加剤を用いて水分を調節し、特定のポリマーマトリックス組成物を開発する等によって安定化を達成することができる。

【0248】

徐放性免疫グロブリン組成物は、リポソームにより封じ込められた免疫グロブリンも含む。免疫グロブリンを含むリポソームは、既知の方法により調製する。例えば、Epsteinら、Proc, Natl. Acad. Sci, USA 82: 3688 ~ 92 頁 (1985)、Hwangら、Proc, Natl. Acad. Sci, USA 77: 4030 ~ 4 頁 (1980)、米国特許第 4485045 号、第 4544545 号、第 6139869 号および第 6027726 号を参照のこと。通常、リポソームは小さく (約 200 ~ 約 800 オングストローム)、脂質含量が約 30 モル% コレステロール以上である単層型であり、最適免疫グロブリン療法のために選択する割合を調節する。

10

【0249】

本発明の免疫グロブリンは、有効成分の持続放出を可能にするように処方することができる徐放型、例えば、デポ注射剤、植込剤または浸透圧ポンプで投与することができる。徐放性製剤用の植込剤は、当技術分野でよく知られている。植込剤は、生分解性または非生分解性ポリマーを用いてマイクロスフェア、スラブ等として製剤化される。例えば、乳酸および/またはグリコール酸のポリマーは、宿主による忍容性が良好である侵食性ポリマーを形成する。植込剤は、当該部位における有効成分の局所濃度が身体の残部より高くなるように、タンパク質沈着の部位 (例えば、神経変性障害に伴うアミロイド沈着の形成の部位) に近接して植え込む。

20

【0250】

さらに、炎症性腸状態を診断かつ/または治療する免疫グロブリンは、全または部分抗体 (例えば、単鎖 Fv) をエンコードするポリヌクレオチドを対象に投与することにより提供することができる。ポリヌクレオチドは、対象における免疫グロブリンの治療上有効な量での発現を可能にするために適切な賦形剤に混入して対象に投与する。

【0251】

免疫グロブリンの一般的な 1 日投与量は、本明細書で言及する因子によって約 1 μ g / kg から約 10 mg / kg 以上またはそれ以上までの範囲にある。一般的に、臨床医は所望の効果を達成する用量に達するまで免疫グロブリンを投与する。この治療の経過は、通常のアッセイにより容易にモニターされる。

30

【0252】

「安定な」抗体または抗体フラグメント製剤は、製剤中のタンパク質が保存中にその物理的安定性および/または化学的安定性および/または生物学的安定性を保持しているものである。タンパク質の安定性を測定するための種々の分析技術は、当技術分野で利用可能であり、例えば、Peptide and Protein Drug Delivery、247 ~ 301 頁 (Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. 1991) および A. Jones, Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29 ~ 90 頁 (1993) に総説されている。安定性は、選択した温度で選択した時間測定することができる。好ましくは、製剤は室温 (約 30) もしくは 40 で少なくとも 1 カ月間安定かつ/または約 2 ~ 8 で少なくとも 1 年間、少なくとも約 2 年間安定である。さらに、製剤は、好ましくは製剤の凍結 (例えば、- 70 への) および解凍の後に安定である。

40

【0253】

色および/または透明度の目視検査で、あるいは UV 光散乱またはサイズ排除クロマトグラフィーにより測定したとき、凝集、沈殿および/または変性の徴候を示さない場合、タンパク質は製剤中で「その物理的安定性を保持している」。

【0254】

所定の時点の化学的安定性が、タンパク質が下で定義するようにその生物学的活性を依

50

然として保持しているとみなされるようなものである場合、タンパク質は製剤中で「その化学的安定性を保持している」。化学的安定性は、タンパク質の化学的に変化した形態を検出し、定量化することによって評価することができる。化学的変化は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGEおよび/またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化法/飛行時間質量分析(MALDI/TOF MS)を用いて評価することができるサイズ変化(例えば、クリッピング)を含む可能性がある。他の種類の化学的変化は、例えば、イオン交換クロマトグラフィーにより評価することができる電荷変化(例えば、脱アミド化の結果として起こる)を含む。

【0255】

例えば、抗原結合アッセイにより測定したとき、所定の時点の免疫グロブリンの生物学的活性が、製剤が調製された時点に示された生物学的活性の約10%の範囲内(アッセイの誤差の範囲内)である場合、免疫グロブリンは「その生物学的安定性を保持している」。

10

【0256】

5.7 免疫グロブリン組成物の投与経路

上述の薬剤組成物は、炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性関節リウマチ(RA)、移植片対宿主病(GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の診断、予防および/または治療のために投与することができる。治療適用例において、疾患の疑いのある、または既に罹患している患者に組成物を治療を提供するに十分な量で投与する。これを達成するのに十分な量は、治療上または製薬上有効な量と定義される。

20

【0257】

薬剤組成物は、予防および/または治療のために非経口、局所、静脈内、経口投与するか、または皮下、筋肉内局所投与、あるいはエアゾールまたは経皮などにより投与する。本発明のタンパク質性物質は経口投与(p.o.)の後に腸を通過して残存するが、デポ注射による皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、腹腔内投与、あるいは植込製剤による投与が好ましい。

【0258】

薬剤組成物は、投与方法によって様々な単位剤形で投与することができる。例えば、経口投与に適する単位剤形は、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤およびトローチ剤などである。

30

【0259】

上述の状態の治療用の本発明の組成物の有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態および他の薬剤投与などの多くの因子によって異なる。したがって、安全性および有効性を最適化するために投与量を調節する必要がある。これらの組成物は、他の治療薬と同様な方法、すなわち、生理的に許容できる担体に混入して獣医使用のために哺乳類に、またヒトにおける臨床使用のために投与することができる。一般的に、投与量は約0.0001~100mg/kg、より通常に0.01~0.5mg/kg宿主体重である。

【0260】

好ましい投与法において、抗体は、患者の体重1kg当たり1~5mgの用量で静脈内注入または皮下注射により投与する。投与は2~8週間の間隔で繰り返す。この範囲内では、好ましい投与法は、4週間間隔で体重1kg当たり3mg抗体の投与を繰り返すことである。

40

【0261】

6.0 薬剤の併用

他の薬剤は、炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性関節リウマチ(RA)、移植片対宿主病(GVHD)、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の治療のために現在使用されている。これらおよび他の薬剤も本明細書に開示する化合物および組成物との併用が考慮される。本明細書に開示する化合物および組成物とのカクテルおよび/または組合せで用いる1つまたは複数の薬剤の選択は、疾患の管理に依存する。例えば、本明細書に開示する化合物および組成物は、クローン病をさらに治療し、症状を抑制するため

50

に免疫抑制薬とともに投与することができる。

【0262】

本明細書に開示する化合物および組成物と併用する薬剤の剤形は、対象および用いる薬剤の組合せによって異なる。

【0263】

7.0 長期投与法

本発明の長期投与法は、必要とする患者における病的炎症を抑制するのに十分な受容体飽和を維持するレベルの₄インテグリン剤（例えば、小分子または免疫グロブリン）を供給する。本発明の方法は、2週間ごとに1回または1カ月に1回から2カ月ごとに1回投与することを必要とし、反復投与を少なくとも6カ月間にわたり、より好ましくは1年間またはそれ以上の期間にわたり行う。本発明の方法は、約65%～100%、より好ましくは75%～100%、より好ましくは80～100%の範囲の₄インテグリンを含む二量体（例えば、VLA-4）の患者における受容体飽和レベルを得て、維持することを含む。これらの受容体飽和レベルは、病的炎症の継続的抑制を可能にするためにこれらのレベルに長期に（例えば、6カ月間程度の期間にわたり）維持される。

10

【0264】

特定の実施形態において、治療薬は抗体、好ましくはヒト化またはヒト抗体であり、投与は1カ月に1回である。受容体飽和度をモニターして投与法の有効性を判定し、生理学的マーカーを測定して投与法の成功を確認することができる。確認として、抗体の血清レベルをモニターして、抗体のクリアランスを確認し、治療の有効性に対する半減期の有望な影響を検討することができる。

20

【0265】

他の特定の実施形態において、治療薬は小分子であり、投与は1カ月に1回である。飽和度をモニターして投与法の有効性を判定し、生理学的マーカーを測定して投与法の成功を確認することができる。

【0266】

本発明の薬剤の投与については、用量範囲は、宿主体重に対して約0.0001～100mg/kg、より通常は0.01～5mg/kgである。例えば、用量は1mg/kg体重または10mg/kg体重であってよい。用量および頻度は、本発明の薬剤の半減期によって異なる。用量および投与頻度は、投与が予防的であるか、治療的であるかによって異なる。免疫グロブリン投与については、各投与注射は一般的に2.0～8.0mg/kgの投与である。化合物投与については、各投与注射は一般的に1.0～50.0mg/kgの投与である。本明細書に記載した教示によれば、患者から体液試料を得ることによって有効量をモニターすることができる。このために、一般的に血清または脳脊髄液試料を採取し、インテグリン受容体飽和度を当技術分野でよく知られている方法を用いて測定する。理想的には、試料は最初の投与の前に採取し、その後の試料は毎回の投与の前および/または後に採取し、測定する。

30

【0267】

反復個別投与からなる長期投与に代わるものとして、炎症性腸疾患、喘息、多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ（RA）、移植片対宿主病（GVHD）、宿主対移植片病および種々の脊椎関節症の治療用薬剤は、用量が炎症を抑制するのに十分なレベルの受容体飽和度に維持されるようなものであるならば、徐放性製剤として投与することができる。例えば、放出制御システムは、本発明の範囲内の薬剤を長期に投与するために用いることができる。適切な放出制御剤形の考察は、Leszczek Krowczyński、EXTENDED-RELEASE DOSAGE FORMS、1987（CRC Press、Inc.）に見いだすことができる。

40

【0268】

種々の放出制御技術は、非常に広いスペクトルの薬剤剤形を対象として含む。放出制御技術は、物理的システムおよび化学的システムを含むが、これらに限定されない。物理的システムは、マイクロカプセル化、マクロカプセル化および膜システムのような速度制御

50

膜を含むリザーバシステム、中空繊維、超微細孔セルローストリアセテートならびに多孔性ポリマー物質および発泡体のような速度制御膜を含まないリザーバシステム、無孔性ポリマーまたはエラストマーマトリックス（例えば、非侵食性、侵食性、環境物質移入および分解性）中に物理的に溶解したシステムおよび無孔性ポリマーまたはエラストマーマトリックス（例えば、非侵食性、侵食性、環境物質移入および分解性）中に物理的に分散した物質を含むモノリスシステム、外側制御層と化学的に類似または類似しないリザーバ層を含む積層構造、浸透圧ポンプまたはイオン交換樹脂上への吸着のような他の物理的方法を含むが、これらに限定されない。

【0269】

化学的システムは、ポリマーマトリックスの化学的侵食（例えば、不均一もしくは均一侵食）またはポリマーマトリックスの生物学的侵食（例えば、不均一もしくは均一侵食）を含むが、これらに限定されない。放出制御のシステムのカテゴリーのさらなる考察は、Agis F. Kydonieus、CONTROLLED RELEASE TECHNOLOGIES: METHODS, THEORY AND APPLICATIONS、1980 (CRC Press, Inc.)に見いだすことができる。

10

【0270】

本発明の方法は、病的炎症に伴う、または起因する障害に罹患している患者を治療するため、または特定の障害のリスクがある患者を予防的に治療するために用いることができる。予防的対治療的投与に必要な投与法は、それぞれ異なり、特定の使用および治療する障害についてデザインする必要がある。

20

【0271】

一部の方法において、1つまたはそれ以上の薬剤（例えば、本明細書に開示する異なる結合特異性を有するモノクローナル抗体、モノクローナル抗体および化合物）を同時に投与する。この場合、投与する各薬剤の用量は、指示される範囲内に入る。所望の時間間隔が投与の期間である場合に、薬剤を患者に逐次的に投与する併用療法も発生し得る。受容体飽和度の測定により示されるとき、または疾患経過の他の徴候によって、間隔は不規則にもなり得る。

【0272】

当業者は、用量レベルは特定の薬剤、症状の重症度および副作用に対する対象の感受性の関数として異なることがあることを容易に理解するであろう。一部の特定の薬剤は、他より有効性が高い。所定の薬剤の好ましい用量は、当業者が様々な手段によって容易に決定することができる。好ましい手段は、所定の薬剤の生理学的効力を測定することである。

30

【0273】

予防的適用において、薬剤組成物を、特定の疾患に罹患しやすい、あるいはそのリスクがある患者に疾患のリスクを除去または低減あるいは疾患の発症を遅延させるのに十分な量で長期に投与する。そのような量は、予防的に有効な量と定義される。寛解状態にある多発性硬化症患者では、リスクは、NMR撮像により、あるいは場合によって、患者により観察される前徴により評価することができる。

【0274】

上記の状態の治療のための本発明の組成物の有効な投与法は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態および投与される他の薬剤を含む多くの因子によって異なる。したがって、投与量は、安全性および有効性を最適化するために調節する必要がある。一般的に、投与法の各投与量は、約0.0001～約100mg/kg、通常約0.01～約50、より通常約0.1～約30mg/kg宿主体重である。

40

【0275】

8.0 試験試薬

試薬は、in vitroおよびin vivoで試験することができる。当技術分野で知られているように、試薬が₄サブユニットに結合するかどうかを試験するための多くのin vivoモデルが存在する。試薬が炎症性腸状態ならびに他の炎症状態の診断

50

および/または治療で *in vivo* 活性を有するかどうかの試験は、実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) 動物モデルを用いて行うことができる。EAE は、多発性硬化症と類似性を有する脳神経系の炎症状態である (Patterson, in TEXTBOOK OF IMMUNOPATHOLOGY, eds. Miescher and Mueller-Eberhard, 179~213 頁, Grune and Stratton, N.Y., 1976)。

【0276】

EAE 脳の切片をそれらの白血球付着を支持する能力について、例えば、Stampel および Woodruff, J. Exp. Med. 144: 828~833 頁 (1976) に記載されている *in vitro* 結合アッセイを用いて試験することができる。白血球付着受容体に対する試薬の阻害活性は、*in vitro* 切片アッセイで検討することができる。U937 細胞 (ヒト単核細胞株) の付着は、ヒト VLA-4 抗原に対する抗体によりほぼ完全に阻害された。該抗体は、他の接着分子に対する抗体と比較して有意に大きい阻害作用をもたらした。

10

【0277】

驚くべきことに、 α_4 インテグリン ($\alpha_4\beta_1$ および $\alpha_4\beta_7$) のフィブロネクチン結合活性を選択的に阻害する抗体が EAE 血管への U937 の付着を促進した。これらの結果は、 α_4 インテグリンのフィブロネクチン結合活性は *in vitro* での EAE 血管への U937 接着に直接関与しないことを示唆している。上記の $\alpha_4\beta_1$ 試薬を用いた *in vitro* での結果を考慮すると、EAE の経過に対するこれらの抗体の効果は、麻痺の発症の遅延または麻痺の重症度の低下を測定することにより *in vivo* でも試験することができる。

20

【0278】

炎症性腸状態の診断および/または治療に有効なさらなる試薬は、接着アッセイを用いて特定することができる。例えば、HP2/1 または N-[N-(3-ピリジンスルホニル)-L-3,3-ジメチル-4-チアプロピル]-O-[1-メチルピペラジン-4-イルカルボニル]-L-チロシンイソプロピルエーテルを対照として用いて、他の抗体または試薬を $\alpha_4\beta_1$ インテグリンに対する既知のリガンドに対するリンパ球の結合を阻害するそれらの能力についてスクリーニングすることができる。VLA-4 白血球細胞表面受容体の α_4 サブユニットを標的にすることにより、接着を阻害するいくつかのさらなる試薬を特定することができる。

30

【0279】

本発明の方法および組成物に有用なモノクローナル抗体は、すべての目的のためにその全体を参照により本明細書に援用する米国特許第 6033665 号に述べられている例えば、HP2/1、TY21.6、TY21.12 および L25 などである。これらの抗体は、VLA-4 の鎖と反応し、VCAM-1、フィブロネクチンおよび炎症脳内皮細胞への結合を阻害するが、 α_1 インテグリンファミリーの他のメンバーの活性に影響を及ぼさない。

【0280】

VLA-4/VCAM-1 標的に対して選択的に反応する他の試薬も用いることができる。この試薬はさらに、マトリックス相互作用 (α_1 インテグリンのすべてのメンバーによって媒介される) に影響を及ぼさず、正常な腸免疫 ($\alpha_4\beta_7$ によって媒介される) にも影響を及ぼさない。これおよび他のそのような試薬の製造は、十分に当技術分野の技術の範囲内にある。

40

【0281】

薬剤が $\alpha_4\beta_1$ および/または $\alpha_4\beta_7$ 活性を示すかどうかを検討するためのアッセイは、当業者に知られている。

【0282】

例えば、あるアッセイにおいて、化合物は固体支持体およびそれに加えられた $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合させることができる。試料中の $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ の量は、サン

50

ドイツ E L I S A アッセイの使用のような通常の方法により測定することができる。さらに、本発明の特定の化合物は、 $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンによって媒介される粘膜器官の内皮細胞および上皮細胞への白血球の接着を *in vivo* で阻害し、したがって、 $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンによって媒介される疾患の治療に用いることができる。

【0283】

上で特定された化合物の生物学的活性は、様々なシステムで検定することができる。例えば、化合物を固体表面の固定化することができ、 $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現する細胞の接着を測定することができる。そのような方式を用いて、多数の化合物をスクリーニングすることができる。このアッセイに適する細胞としては、メモリー T 細胞および好酸球のような $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現することが知られているあらゆる白血球などが挙げられる。多くの白血球細胞系を用いることができ、例としては細胞系 P R M I - 8 8 6 6 などがある。

10

【0284】

化合物はまた、 $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンと M A d C A M - 1 との間、または $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンと本発明の化合物もしくは $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する抗体のような $\alpha_4\beta_1$ または $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合することが知られている表示化合物との間の結合を競合的に阻害する能力について試験することができる。これらのアッセイでは、M A d C A M - 1 を固体表面上に固定化することができる。M A d C A M - 1 は、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンへの結合をイムノアッセイで検出できるように、I g

20

【0285】

$\alpha_4\beta_7$ および $\alpha_4\beta_1$ は、V C A M - 1 およびフィブロネクチンに対する接着を媒介することができる。V C A M - 1 およびフィブロネクチンに対する接着を阻害する能力を測定するアッセイについては、国際特許出願公開番号 W O U S 9 8 / 1 5 3 2 4 に記述されているアッセイが特に好ましい。この出願は、その全体を参照により本明細書に合体する。

【0286】

多くのアッセイ方式で標識アッセイコンポーネントを用いている。標識システムは、様々な形であり得る。標識は、当技術分野でよく知られている方法に従ってアッセイの所望のコンポーネントに直接または間接的に結合させることができる。様々な標識を用いることができる。コンポーネントは、いくつかの方法のうちのいずれかによって標識することができる。最も一般的な検出方法は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^{32}P 標識化合物等を用いるオートラジオグラフィーである。非放射性標識としては、標識リガンドの特異的結合対メンバーとしての役割を果たし得る、標識抗体、発蛍光団、化学発光剤、酵素および抗体に結合するリガンドなどがある。標識の選択は、要求される感度、化合物との共役の容易さ、安定性要件および利用可能な器具に依存する。

30

【0287】

炎症反応の治療の有効性を実証するための適切な *in vivo* モデルは、マウス、ラット、モルモットまたは霊長類における E A E (実験的自己免疫脳脊髄炎) ならびに $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに依存する他の炎症モデルなどである。

40

【0288】

所望の生物学的活性を有する化合物は、薬理特性 (例えば、*in vivo* 安定性、生物学的利用能) の改善、または診断適用例において検出される可能性などの所望の特性を得るために、必要に応じて修飾してもよい。例えば、本発明のスルホンアミドに 1 つまたは複数の D - アミノ酸を含めることによって、一般的に *in vivo* 安定性が増大する。安定性は、ペプチダーゼまたはヒト血漿もしくは血清とのインキュベーション中のタンパク質の半減期を測定するなどの様々な方法で試験することができる。多くのそのような

50

タンパク質安定性試験が記載された（例えば、Verhoeffら、Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1990, 15(2): 83~93頁を参照）。

【実施例】

【0289】

以下の実施例は、本発明をどのようにしてなし、使用するかの完全な開示と説明を当業者に提供するように提示するものであり、発明者らがその発明として考えることの範囲を限定することを意図するものでも、また下の実験が実施したすべてまたは唯一の実験であることを示すことを意図するものでもない。用いた数値（例えば、量、温度等）に関して正確さを確保するための努力は払ったが、ある程度の実験誤差および偏りは考慮すべきである。

10

【0290】

[実施例1]

可溶性MadCAM-1FACSアッセイ

このアッセイは、懸濁液中の組換え可溶性MadCAM-1とRPMI-8866細胞との相互作用を測定する。組換え可溶性MadCAM-1（「rsMadCAM-1」）はヒトIgGFcテイルを有する融合タンパク質として発現する（Tidswellら、J. Immunol., (1997) 159(3): 1497~1505頁）。可溶性MadCAM-1を小分子インヒビターの存在下および非存在下でRPMI-8866細胞と混合する。₄ ₇インテグリンの活性を増大させ、それとMadCAM-1構成体との相互作用を促進するために、1mM MnCl₂をアッセイ緩衝液に含める。室温で30分後に、細胞を1mM MnCl₂を含む緩衝液で洗浄し、1mM MnCl₂の存在下でMadCAM-1融合タンパク質のFcテイルに対する蛍光標識抗体に4で30分間曝露させる。細胞を洗浄し、MnCl₂含有緩衝液に再懸濁し、FACS分析により検査する。組換え可溶性VCAM-1とJurkat T細胞系のような₄ ₁を発現する細胞との相互作用を測定するために、同じアッセイを実施することができる。

20

【0291】

[実施例2]

無細胞ELISAアッセイ

このアッセイは、可溶化₄ ₇インテグリンとプラスチック上に固定化したMadCAM-1との相互作用を測定する。RPMI-8866細胞を界面活性剤で溶解して₄ ₇インテグリンを可溶化する。₇インテグリンに対する抗体2G3（Tidswellら、1997 J. Immunol., 159(3): 1497~1505頁）を溶解産物に加える。この抗体は、2つの目的に役立ち、第1は、アッセイで₄ ₇インテグリンを検出できる標識であり、第2は、2G3は₇インテグリンのリガンド占有コンフォーメーションを安定化し、₇インテグリン依存性相互作用を促進する。細胞溶解産物、2G3および試験試薬を、MadCAM-1を被覆したマイクロタイターウエルに加える。混合物を室温で30分間インキュベートする。プレートを洗浄し、1%BSAでブロックし、アッセイウエル上でMadCAM-1に結合した₄ ₇インテグリンに関連する2G3を認識するHRP結合ヤギ抗マウスIgに曝露させる。室温で30分後に、ウエルを洗浄し、HRPの基質に曝露させて、MadCAM-1に結合した₄ ₇インテグリンの量を定量する。

30

40

【0292】

[実施例3]

受容体占有に関するFACSアッセイ

このアッセイは、抗体2G3とRPMI-8866細胞またはリンパ球との相互作用を測定する。抗体は、ラットまたはヒト₇インテグリンのリガンド占有エピトープを認識する。小分子リガンドの濃度を増加させることにより、₇インテグリン上の2G3エピトープが誘導され、細胞表面へのより高いレベルの抗体結合が可能になる。受容体占有に必要なリガンドの濃度は、₄ ₇インテグリンに対するリガンドの親和力に直接関連す

50

る。 α_1 インテグリンのリガンド占有エピトープに対する類似抗体（抗体 15 / 7。Yednockら、(1995) J. Biol. Chem. 270: 28740 ~ 50 頁）を用いる、リガンドと $\alpha_4 \beta_7$ インテグリンとの相互作用を検討するための同様なアッセイが記載された。 α_1 インテグリンアッセイは、 $\alpha_4 \beta_7$ インテグリンでなく、 $\alpha_4 \beta_1$ インテグリンを発現する細胞（Jurkat 細胞のような）に依拠している。両アッセイにおいて、適切な細胞を小分子リガンドの存在下で 2 G 3 または 15 / 7 と混合する。細胞を室温で 30 分間インキュベートし、洗浄して非結合抗体を除去する。細胞を、細胞結合 2 G 3 または 15 / 7 を検出するマウス Ig G に対する蛍光標識抗体に曝露させ、細胞を FACS 分析により検査する。

【0293】

10

[実施例 4]

ex vivo 細胞接着アッセイ

このアッセイは、パイエル板（腸に関連するリンパ様組織）の組織切片中で曝露させた高内皮細静脈へのリンパ球または RPMI - 8866 の接着を測定する。これらの血管は高レベルの MadCAM - 1 を発現する。このアッセイは、Yednockら、JCB (1987) 104: 725 ~ 731 頁により記述された。

【0294】

[実施例 5]

in vitro 移動アッセイ

$\alpha_1 \beta_1$ In 標識または蛍光標識リンパ球のパイエル板への in vivo 移動。このアッセイでは、リンパ球を 1 群の動物から分離し、放射性または蛍光とレーザーで標識する。細胞を第 2 群の動物に静脈内注射する。1 ~ 24 時間後に、種々の組織に関連する放射能カウント数をガンマ線カウンターで測定するか、または組織からリンパ球を分離し、蛍光標識を運ぶ細胞数を測定すること（FACS 分析により測定）により、種々の組織への標識細胞の局在化をモニターすることができる。この種のアッセイは、Rosenら、1989 J. Immunol. 142: 1895 ~ 1902 頁に記載されている。

20

【0295】

[実施例 6]

VLA - 4 に対する候補試薬の結合を測定するための in vitro アッセイ

in vitro アッセイを用いて、候補試薬の $\alpha_4 \beta_1$ インテグリンへの結合を評価した。このアッセイで結合する試薬は、通常のアッセイ（例えば、競合的結合アッセイ）により生物学的試料中の VCAM - 1 のレベルを評価するのに用いることができる。このアッセイは、約 1 nM 程度の低い IC₅₀ 値に対して感度が良い。

30

【0296】

$\alpha_4 \beta_1$ インテグリンの活性は、可溶性 VCAM - 1 と、高レベルの $\alpha_4 \beta_1$ インテグリンを発現するヒト T 細胞である Jurkat 細胞（例えば、American Type Culture Collection Nos. TIB 152、TIB 153 および CRL 8163）との相互作用により測定した。VCAM - 1 は、細胞表面と $\alpha_4 \beta_1$ インテグリン依存的に相互作用する（Yednockら、J. Bio. Chem.、1995、270: 28740 頁）。

40

【0297】

組換え可溶性 VCAM - 1 は、N 末端上の VCAM - 1 の 7 つの細胞外ドメインを含むキメラ融合タンパク質および C 末端上のヒト Ig G 1 重鎖定常領域として発現した。VCAM - 1 融合タンパク質は、Yednock（前出）によって記載された方法により調製し、精製した。

【0298】

Jurkat 細胞は、Yednock（前出）によって記載されたように 10 % ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびグルタミンを添加した RPMI 1640 中で増殖させた。

【0299】

50

Jurkat細胞を1.5 mM $MnCl_2$ および5 $\mu g/mL$ 15/7抗体とともに氷上で30分間インキュベートした。 Mn^{+2} は、受容体を活性化してリガンド結合を促進し、15/7は、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリンの活性化/リガンド占有コンフォメーションを認識し、分子をこのコンフォメーションに固定し、それによりVCAM-1/ $\alpha_4\beta_1$ インテグリン相互作用を安定化する。Yednock(前出)。15/7抗体に類似した抗体が他の研究者ら(Luqueら、1996、J. Biol. Chem.、271:11067頁)によって調製されたので、このアッセイに用いてもよい。

【0300】

次いで、細胞を、標準5ポイント連続希釈を用いた66 $\mu g/mL \sim 0.01 \mu g/mL$ の濃度の候補試薬とともに室温で30分間インキュベートした。次いで、15 μL の溶性組換えVCAM-1融合タンパク質をJurkat細胞に加え、氷上で30分間インキュベートした(Yednock、前出)。

10

【0301】

次いで、細胞を2回洗浄し、PE結合ヤギF(ab')₂抗マウスIgG Fc(Immnotech、Westbrook、ME)に1:200で再懸濁し、氷上、暗所で30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、Yednock(前出)によって記載されたように標準蛍光活性化細胞選別(FACS)分析により分析した。

【0302】

約15 μM 未満のIC50を有する細胞は、 $\alpha_4\beta_1$ に対する結合親和力を有する。

【0303】

20

[実施例7]

$\alpha_4\beta_1$ に対する候補試薬の結合を測定するためのin vitro飽和アッセイ
以下に試薬が、次の実施例で述べる実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)または他のin vivoモデルにおいて活性であるために必要な血漿中濃度を決定するためのin vitroアッセイを述べる。

【0304】

対数増殖Jurkat細胞を洗浄し、20 $\mu g/mL$ の15/7抗体(上の実施例で述べた)を含む正常動物血漿に再懸濁する。

【0305】

Jurkat細胞を2倍に希釈し、標準曲線のための標準12ポイント連続希釈を用いた66 $\mu g/mL \sim 0.01 \mu g/mL$ の種々の濃度の既知の量の候補試薬を含む正常血漿試料、または試薬投与動物の末梢血から得た血漿試料に入れる。

30

【0306】

次いで、細胞を室温で30分間インキュベートし、2%ウシ胎児血清ならびに各々1 mMの塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(アッセイ培地)で2回洗浄して、非結合15/7抗体を除去する。

【0307】

次いで、細胞を、試験する動物種からの5%血清とともにインキュベートすることにより非特異的交差反応性のために吸着させたフィコエリトリン結合ヤギF(ab')₂抗マウスIgG Fc(Immnotech、Westbrook、ME)に1:200で曝露し、暗所で4で30分間インキュベートする。

40

【0308】

細胞をアッセイ培地で2回洗浄し、同じものに再懸濁した。次いで、Yednockら、1995、J. Biol. Chem.、270:28740頁に記載されているように、細胞を標準蛍光活性化細胞選別分析により分析する。

【0309】

次いで、データを蛍光対用量として、例えば、通常の用量-反応表示方式でグラフにする。曲線の上部プラトーを生じさせる用量レベルがin vivoモデルにおいて有効性を得るために必要なレベルである。

【0310】

50

このアッセイは、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリンに最も密接に関連する $\alpha_9\beta_1$ インテグリン (Palmer ら、1993、J. Cell Bio.、123:1289 頁) のような他のインテグリンの結合部位を飽和させるために必要な血漿中濃度を決定するのに用いることもできる。

【0311】

したがって、上記のアッセイは、 $\alpha_9\beta_1$ インテグリンの結合を測定するために、Jurkat 細胞の代わりに $\alpha_9\beta_1$ インテグリンをエンコードする cDNA をトランスフェクトしたヒト結腸癌細胞株 (ATTC 番号 CCL228) (Yokosaki ら、1994、J. Bio. Chem.、269:26691 頁) を用いて実施することができる。対照として、他の α および β_1 サブユニットを発現する SW480 細胞を用いることができる。

10

【0312】

このアッセイを用いて、このアッセイで試験した本発明の試薬について $\alpha_4\beta_1$ および $\alpha_9\beta_1$ の in vivo モデルにおいて有効性を得るのに必要な血漿中濃度が確定された。

【0313】

[実施例 8]

ヒト化 21.6 抗体の構築

ヒト定常領域にマウス 21.6 V_L および V_H 領域の PCR クローン化 cDNA s を結合させて、キメラ軽および重鎖を構築した。特別に設計した PCR プライマーを用いて、マウス cDNA 配列の 5' および 3' 末端を修飾した。リーダー配列の開始をコードする DNA 配列とハイブリッド形成する 5' 末端 PCR プライマー (表 1) を設計して、効率の良い翻訳に必須の DNA 配列を形成させ (Kozak、1987、Mol. Biol. 196:947~950 頁)、発現ベクターにクローニングするための HindIII 制限部位を形成させた。J 領域の末端をコードする DNA 配列とハイブリッド形成する 3' 末端プライマーを設計して、定常領域へのスプライシングに必須の DNA 配列を形成させ、発現ベクターにクローニングするための BamHI 制限部位を形成させた。PCR 増幅の生成物を HindIII および BamHI で消化し、pUC19 ベクターにクローンし、配列決定して PCR 増幅時に過誤が発生しなかったことを確認した。次いで、適応マウス 21.6 可変領域をヒトカッパまたはラムダ - 1 定常領域を含む哺乳類細胞発現ベクターにサブクローンした。

20

30

【0314】

【表 1】

表1

キメラ 21.6 抗体の構築用 PCR プライマー	
A. 軽鎖可変領域	
1. 5'末端 (37-mer) の再構築用プライマー	
5' C AGA <u>AAG CTT</u> GCC GCC ACC ATG AGA CCG TCT ATT CAG 3'	
<i>Hind</i> III Kozak M R P S I Q	
コンセンサス	
配列	
2. 3'末端 (35-mer) の再構築用プライマー	
5' CC GAG <u>GAT CCA</u> CTC ACG TTT GAT TTC CAG CTT GGT 3'	
<i>Bam</i> HI スプライスドナー部位	
B. 重鎖可変領域	
1. 5'末端 (37-mer) の再構築用プライマー	
5' C AGA <u>AAG CTT</u> GCC GCC ACC ATG AAA TGC AGC TGG GTC 3'	
<i>Hind</i> III Kozak M K C S W V	
コンセンサス	
配列	
2. 3'末端 (33-mer) の再構築用プライマー	
5' CC GAG <u>GAT CCA</u> CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC T 3'	
<i>Bam</i> HI スプライスドナー部位	

10

【 0 3 1 5 】

20

マウス 21.6 可変領域の構造のモデリング。マウス 21.6 抗体の V_L および V_H 領域の分子モデルを構築した。モデルは、UNIX (登録商標) オペレーティングシステムのもとで動作し、分子モデリングパッケージ QUANTA (Polygen Corp、USA) を用いた Silicon Graphics IRIS 4D ワークステーションで構築した。マウス 21.6 V_L 領域の FRs の構造は、ヒト Bence-Jones 免疫グロブリン REI の構造解析に基づくものであった (Eppら、1975 Biochemistry 14:4943~4952 頁)。マウス 21.6 V_H 領域の FRs の構造は、マウス抗体 G1oop2 の構造解析に基づくものであった。FRs における同一の残基は保持され、同一でない残基は QUANTA 内の機能を用いて置換した。マウス 21.6 V_L 領域の CDR1 および CDR2 は、それぞれ規定構造群 2 および 1 に属すると同定された (Chothiaら、1978、J. Mol. Biol. 196:901~917 頁)。REI の CDR1 および CDR2 は同じ規定群に属しているので、マウス 21.6 V_L 領域の CDR1 および CDR2 は、REI の CDR1 および CDR2 の構造に基づいてモデル化した。マウス 21.6 V_L 領域の CDR3 は、 V_L 領域の CDR3s の規定構造群いずれにも対応していないように思われた。しかし、データベース検索により、マウス 21.6 V_L 領域の CDR3 はマウス HyHEL-5 V_L 領域と同様であることが明らかになった (Sheriffら、1987、Proc, Natl. Acad. Sci. USA 84:8075~8079 頁)。したがって、マウス 21.6 V_L 領域の CDR3 は、マウス HyHEL-5 V_L 領域における CDR3 の構造に基づいてモデル化した。マウス 21.6 V_H 領域の CDR1 および CDR2 は、それぞれ規定構造群 1 および 2 に属すると同定された。マウス 21.6 V_H 領域の CDR1 は、 V_H 領域の CDR1sb の規定群 1 のメンバーに非常に類似している G1oop2 V_H 領域の CDR1 に基づいてモデル化した。マウス 21.6 V_H 領域の CDR2 は、 V_H 領域の CDR2 の規定群 2 のメンバーでもあるマウス HyHEL-5 (Sheriffら、前出) の CDR2 に基づいてモデル化した。 V_L 領域の CDR3s については、規定構造は存在しない。しかし、マウス 21.6 V_H 領域の CDR3 は、マウス R19.9 V_H 領域における CDR3 に類似しており (Lascombeら、1989、Proc, Natl. Acad. Sci. USA 86:607~611 頁)、マウス R19.9 V_H 領域の CRD3 ループの頂端に存在する余分のセリン残基を除去し、アニールし、ギャップをリファインして、この CDR3 に基づいてモデル化した。好ましくない原子接触を除去し、ファンデルワールスおよび静

30

40

50

電相互作用を最適化するために、Q U A N T Aにおいて実施されたようにC H A R M Mポテンシャルを用いて、モデルを最終的に最も急な降下および複合体勾配エネルギー最小化に供した(B r o o k sら、1983、J . C o m p . C h e m . 4 : 187 ~ 217頁)。

【0316】

再構築ヒト21.6可変領域の設計 - フレームワーク配列のための均一ヒト抗体の選択。F R sがマウス21.6のそれと高い割合の同一性を示したヒト可変領域がアミノ酸配列の比較により特定された。表3および4ではマウス21.6可変領域をすべての既知マウス可変領域と、次にすべての既知ヒト可変領域と比較した。マウス21.6 V_L領域は、K a b a tにより定義されたマウスカッパV_L領域サブグループ1に属することが確認された。個々のマウスカッパV_L領域は、マウス21.6カッパV_L領域と93.4%と高い同一性を有していたことが確認された(38C13V'CLおよびPC613'CL)。マウス21.6 V_L領域は、K a b a tにより定義されたサブグループ1のヒトカッパV_L領域と最も類似していた。個々のヒトカッパV_L領域は、マウス21.6カッパV_L領域と72.4%と高い同一性を有していたことが確認された。最も類似したヒト可変領域の1つであるR E 1のフレームワーク領域(F R s)を再構築ヒト21.6 V_L領域の設計に用いた。マウス21.6 V_H領域は、K a b a tにより定義されたマウスV_H領域サブグループ2cに属することが確認された。個々のマウス重鎖可変領域は、マウス21.6 V_H領域と93.3%と高い同一性を有していたことが確認された(17.2.25'CLおよび87.92.6'CL)。マウス21.6 V_H領域は、K a b a tら、前出により定義されたサブグループ1のヒトV_H領域と最も類似していた。個々のヒトV_H領域は、マウス21.6 V_H領域と64.7%と高い同一性を有していたことが確認された。最も類似したヒト可変領域の1つである21/28'CLのF S sを再構築ヒト21.6 V_H領域の設計に用いた。

【0317】

フレームワーク領域におけるアミノ酸の置換

(A) 軽鎖。再構築ヒト21.6 V_L領域の設計過程の次の段階は、マウス21.6 V_L領域のC D R sをヒトR E 1のF R sに結合させることであった(P a l mら、1975、P h y s i o l . C h e m . 356 : 167 ~ 191頁)。再構築ヒト21.6 V_L領域の最初のバージョン(L a)において、ヒトF R sにおける7つの交換を行った。F R 4の位置104、105および107において、R E 1のアミノ酸を他のヒトカッパ軽鎖のより一般的なヒトJ領域アミノ酸で置換した(R i e c h m e n nら、1988、N a t u r e 332 : 323 ~ 327頁)。

【0318】

F R 2の位置45において、R E 1に通常存在するリシンを、マウス21.6 V_L領域におけるその位置に認められたアルギニンに交換した。この位置のアミノ酸残基は、マウス21.6 V_L領域のC D R 2ループを支持するのに重要であると考えられた。

【0319】

F R 2の位置49において、R E 1に通常存在するチロシンを、マウス21.6 V_L領域のその位置に認められたヒスチジンに交換した。マウス21.6 V_L領域におけるこの位置のヒスチジンは、このモデルにおいて結合部位の中間部に位置することが認められ、抗体抗原結合時におそらく抗原と接触していた可能性がある。

【0320】

F R 3の位置58において、R E 1に通常存在するバリンを、マウス21.6 V_L領域のその位置に認められたイソロイシンに交換した。この位置のアミノ酸残基は、マウス21.6 V_L領域のC D R 2ループを支持するのに重要であると考えられた。

【0321】

F R 3の位置69において、R E 1に通常存在するトレオニンを、マウス21.6 V_L領域のその位置に認められたアルギニンに交換した。マウス21.6 V_L領域におけるこの位置のアルギニンは、このモデルにおいてマウス21.6 V_L領域のC D R 1ループに

隣接して位置することが認められ、抗体抗原結合時におそらく抗原と接触していた可能性がある。

【0322】

再構築ヒト21.6V_L領域の第2のバージョン(Lbと呼ぶ)は、RE1のFR2の位置49における交換を行わなかったことを除いて、上と同じ置換を含むように設計した。

【0323】

(B)重鎖。再構築ヒト21.6V_H領域の設計過程の次の段階は、マウス21.6V_H領域のCDRsを21/28'CLのFRsに結合させることであった(Derssimonianら、1987、J. Immunol. 139: 2496~2501頁)。再構築ヒト21.6V領域の最初のバージョン(Ha)において、ヒトフレームワーク領域における5つの交換を行った。ヒトFRsにおける5つの交換は、位置27、28、29、30および71におけるものであった。

【0324】

FR1の位置27、28、29および30において、ヒト21/28'CLに存在するアミノ酸を、マウス21.6V_H領域のそれらの位置に認められたアミノ酸に交換した。これらの位置はFRI内にある(Kabatら、前出)ように設計されているが、位置26~30は、V_H領域のCDR1ループを形成する構造ループの一部である。したがって、これらの位置のアミノ酸は抗原への結合に直接関与している。実際、位置27~30は、Chothiaら、前出により定義されたようなV_H領域のCDR1の規定構造の一部である。

【0325】

FR3の位置71において、ヒト21/28'CLに存在するアルギニンを、マウス21.6V_H領域のそれらの位置に認められたアラニンに交換した。位置71は、Chothiaら、前出により定義されたようなV_H領域のCDR2の規定構造の一部である。マウス21.6可変領域のモデルから、位置71のアラニンはV_H領域のCDR2ループを支持するのに重要であると思われる。この位置のアラニンをアルギニンに置換することは、CDR2ループの配置を妨害する可能性が非常に高いと思われる。

【0326】

再構築ヒト21.6V_H領域の第2のバージョン(Hb)は、バージョンHaについて上述した5つの交換とFR2における1つの追加の交換を含む。

【0327】

FR2の位置44において、ヒト21/28'CLに存在するアルギニンを、マウス21.6V_H領域のそれらの位置に認められたグリシンに交換した。V_L-V_Hのパッキングに関する公表情報およびマウス21.6可変領域のモデルに基づいて、位置44のアミノ酸残基はV_L-V_Hのパッキングに重要であると思われる。

【0328】

CDR3ループがヒトVCAM-1により類似して見えるようにするために、再構築ヒト21.6V領域バージョンHcを設計した。マウス21.6抗体およびヒトVCAM-1は両者とも、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリンに結合する。抗体のV_H領域のCDR3ループは、6つのCDRループのうちの最も異なるものであり、抗体抗原相互作用における抗体の一般的に最も重要な1成分である(Chothiaら、前出、Hoogenboom & Winter、1992、J. Mol. Biol. 227: 381~388頁、Barbasら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4457~4461頁)。マウス21.6V_H領域のCDR3とヒトVCAM-1のアミノ酸86~94との間、特に、CDR3ループにおけるYGN(チロシン-グリシン-アスパラギン)配列とVCAM-1におけるFGN(すなわち、フェニルアラニン-グリシン-アスパラギン)との間にある程度の配列類似性が確認された。これらの配列は、種々の細胞接着事象において重要なRGD(すなわち、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列に関連していると考えられる(Mainら、1992、Cell 71: 671~678頁)。した

10

20

30

40

50

がって、CDR3の位置98において、マウス21.6V_H領域に存在するチロシンをヒトVCAM-1の配列に認められるフェニルアラニンに交換した。

【0329】

FR2の位置36における可能な置換も考慮した。マウス21.6V_H鎖は、FR2における異常なシステイン残基を含む。FR2におけるこの位置は、関連マウスおよびヒト配列では通常トリプトファンである。システイン残基は抗体のコンフォーメーションにしばしば重要であるが、マウス21.6可変領域のモデルは、このシステイン残基が抗原結合に直接または間接的に関連することを示しておらず、したがって、ヒト21/28'CL V_H領域のFR2に存在するトリプトファンは、ヒト化21.6抗体の3つのバージョンすべてにおいて非置換のままであった。

10

【0330】

再構築ヒト21.6抗体の構築。再構築ヒト21.6V_Lバージョン(r es h 2 1 . 6 L a)の最初のバージョンは、Daughertyら、1991、Nucleic Acids Res. 19: 2471~2476頁により記述されたとおりに本質的にオーバーラップPCRフラグメントから構築した。上記のように適応させ、pUC19に挿入した21.6V_H領域を鋳型として用いた。4対のプライマーAPCR1-vla1、vla2-vla3、vla4-vla5およびvla6-vla7を合成した。隣接した対は、少なくとも21塩基重複している。APCR1プライマーは、pUC19ベクターと相補的である。10mMトリスHCl(pH8.3)、50mM KCl、200μM dNTPsおよび1.5mM MgCl₂を含む50μLのPCR緩衝液中適切なプライマー対(0.2μmol)を10ngの鋳型DNAおよび1単位のAmpliTaq DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer Cetus)と合わせた。各反応は、25サイクル行わせた。94で5分間の最初の融解の後に、反応を94で1分間、55で1分間および72で2分間サイクルさせ、最後に72でさらに10分間インキュベートした。プライマーアニーリングと延長段階との間のランプ時間は、2.5分であった。PCR反応の最初のラウンドの4反応(A、B、CおよびD)の生成物をフェノールで抽出し、エタノールで沈殿させた。

20

【0331】

【表 2 - 1】

表 2

再構築ヒト 21.6 可変領域の構築用の PCR プライマー	
A. 軽鎖可変領域	
1. バージョン「a」の合成用プライマー	
21.6VL _a 1 (39-mer):	
5' GAT GGT GAC TCT ATC TCC TAC AGA TGC AGA CAG TGA GGA 3'	
21.6VL _a 2 (32-mer):	
5' CTG TAG GAG ATA GAG TCA CCA TCA CTT GCA AG 3'	
21.6VL _a 3 (39-mer):	
5' AGG AGC TTT TCC AGG TGT CTG TTG GTA CCA AGC CAT ATA 3'	
21.6VL _a 4 (41-mer):	
5' ACC AAC AGA CAC CTG GAA AAG CTC CTA GGC TGC TCA TAC AT 3'	
21.6VL _a 5 (40-mer):	
5' GCA GGC TGC TGA TGG TGA AAG TAT AAT CTC TCC CAG ACC C 3'	
21.6VL _a 6 (42-mer):	
5' ACT TTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT 3'	
21.6VL _a 7 (59-mer):	
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTG GTG CCT TGA CCG AAC GTC CAC AGA TT 3'	
2. バージョン「b」の合成用プライマー	
21.6VL _b 1 (33-mer): H-49 の Y-49 への交換	
5' GGA AAA GCT CCT AGG CTG CTC ATA TAT TAC ACA 3'	
21.6VL _b 2 (38-mer): StyI 部位を破壊するための ACC-101 の ACA-101 への交換	
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTT GTG CC 3'	

10

20

30

【表 2 - 2】

再構築ヒト 21.6 可変領域の構築用の PCR プライマー	
B. 重鎖可変領域	
1. バージョン「a」の合成用プライマー	
21.6VHa1 (51-mer):	
5' AAC CCA GTG TAT ATA GGT GTC TTT AAT GTT GAA ACC GCT AGC TTT ACA GCT 3'	
21.6VHa2 (67-mer):	
5' AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT G 3'	
21.6VHa3 (26-mer):	
5' GAC CCG GCC CTG GAA CTT CGG GTC AT 3'	
21.6VHa4 (66-mer):	
5' GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC ACC TCT GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAA 3'	
21.6VHa5 (64-mer):	
5' CCA TAG CAT AGA CCC CGT AGT TAC CAT AAT ATC CCT CTC TGG CGC AGT AGT AGA CTG CAG TGT C 3'	
21.6VHa6 (63-mer):	
5' GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA 3'	
2. バージョン「b」の合成用プライマー	
21.6VHb (37-mer): R-44 の G-44 への交換	
5' CCA GGG CCG GGTCAC CAT CAC CAG AGA CAC CTC TGC C 3'	
3. バージョン「c」の合成用プライマー	
21.6VHc (27-mer): Y-98 の F-98 への交換	
5' CAG GCC CCT GGC CAA GGG CTG GAG TGG 3'	
C. 軽および重鎖可変領域	
フランキング pUC19 ベクター DNA APCRI(17-mer、センスプライマー) とハイブリッド形成するプライマー	
5' TAC GCA AAC CGC CTC TC 3'	
APCR4 (18-mer、アンチセンスプライマー)	
5' GAG TGC ACC ATA TGC GGT 3'	

10

20

30

【0332】

PCR 生成物 A と B、および C と D を第 2 ラウンドの PCR 反応で結合させる。PCR 生成物 A と B、および C と D (それぞれ 50 ng) を 50 μL の PCR 反応物 (上記のような) に加え、アニーリング温度を 60 に上昇させたこと以外は、上記のように 20 サイクルにより増幅した。これらの反応の生成物を E および F と呼ぶ。用いた PCR プライマーの対は、それぞれ APCR1 - v1a3 および v1a4 - v1a7 であった。PCR 生成物 E および F をフェノールで抽出し、エタノールで沈殿させ、次いで、末端プライマーとして APCR1 および v1a7 を用いて上記と同様に 2 段階 PCR 反応でそれら自体の相補性により第 3 ラウンドの PCR 反応で結合させる。リーダー配列を含む全再構築ヒト 21.6 VL 領域を表す完全に結合したフラグメントを HindIII および BamHI で消化し、配列決定のために pUC19 にクローンした。正しい配列を有するクローンを resh21.6 VLa と呼ぶ。

40

【0333】

Kammanら、1989、Nucleic Acids Res. 17:5404 頁の方法により再構築ヒト 21.6 VL 領域の最初のバージョン (La) におけるわずかな修正を

50

行うためにPCRプライマーを用いて再構築ヒト21.6VL領域の第2のバージョン(Lb)を構築した。2組のプライマーを合成した。基本的には各PCR反応を上記と同じ条件下で行わせた。最初のPCR反応では、突然変異誘発性プライマー21.6VLb2を用いてStyI部位(Thr-ACC-97~Thr-ACA-97)を破壊してresh21.6VLa2を得た。次いで、2回目のPCRで、突然変異誘発性プライマー21.6VLb1(His-49~Try-49)をpUC-resh21.6VLa2とともに鋳型DNAとして用いた。PCR生成物をStyIおよびBamHIで切断し、pUC-resh21.6VLa2にサブクローンし、同じ制限酵素で切断した。正しい配列を有するクローンをpUC-resh21.6VLbと呼ぶ。

【0334】

10

再構築ヒト21.6VH領域のバージョン「a」は、再構築ヒト21.6VL領域のバージョン「a」の構築について述べたのと同じPCR法を用いて構築した。再構築ヒト425VH領域のバージョン「g」をコードするHindIII-BamHI DNAフラグメント(Kettlboroughら、前出)および再構築ヒトAUK12-20VH領域のバージョン「b」をpUC19ベクターにサブクローンして、それぞれpUC-resh425gおよびpUC-reshAUK12-20bを得た。(AUK12-20のバージョン「b」は、Kettlboroughら、前出により記載されたフラグメントVHa425のPCR突然変異誘発によって得たものであり、以下のアミノ酸配列をエンコードする。

【0335】

20

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSYIHWV
RQAPGQGLEWVG YIDPFNGGTSYNQKFKG KVTMTVDTS
TNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGN-RFAY WGQGTLLV
TVSS

(スペースはFR領域とCDR領域を分別する)

【0336】

プラスミドpUC-resh425gおよびpUC-reshAUK12-20bならびにキメラ21.6重鎖(pUC-chim21.6VH)の構築に用いるために修飾したマウス21.6VH領域を含むpUCベクターを、後のPCR反応における鋳型DNAとして用いた。再構築ヒト21.6VH領域のバージョン「a」の構築のために、PCRプライマーを設計し、合成した。PCR生成物Aは、DNA鋳型としてのpUC-reshAUK12-20bおよびPCRプライマー対としてのAPCR1-vha1を用いて得た。PCR生成物BおよびDは、DNA鋳型としてのpUC-chim21.6VHおよびPCRプライマー対としてのそれぞれvha2-vha3およびvha6-APCR4を用いて得た。最後に、PCR生成物CをDNA鋳型としてのpUC-resh425gおよびPCRプライマー対としてのvla4-vla5を用いて得た。最終PCR生成物を、DNA配列決定のためにHindIII-BamHIフラグメントとしてpUC19にサブクローンした。正しい配列を有するクローンをpUC-resh21.6VHaと呼ぶ。

30

【0337】

40

再構築ヒト21.6VH領域の残りのバージョンは、基本的には再構築ヒト21.6VL領域のバージョン「b」の構築について上述したように構築した。2組のプライマーを合成した。第2(Hb)および第3(Hc)バージョンについては、突然変異誘発性プライマー21.6VHb(Arg-44~Gly-44)および21.6VHc(Tyr-98~Phe-98)をそれぞれpUC-resh21.6VHaを鋳型DNAとしたPCR反応に用いた。PCR生成物VHbおよびVHcを制限酵素で切断し、それぞれMscI-BamHIおよびPstI-BamHIフラグメントとしてpUCベクターpUC-resh21.6VHaにサブクローンして、pUC-resh21.6VHbおよびpUC-resh21.6VHcを得た。

【0338】

50

再構築ヒト21・6V_H領域の最初のバージョン(Ha)は、再構築ヒト21・6V_L領域の最初のバージョン(La)の構築に用いたのと同様な方法で構築した。しかし、この場合、PCRプライマーは、キメラ21・6重鎖、ヒト化425V_H領域バージョン「g」(Kettlboroughら、前出)およびヒト化AUK12-20バージョン「b」V_H領域の発現のために既に適応されたマウス21・6V_H領域である3種の鋳型DNAsとともに用いた。ヒト化21・6V_H領域の第2および第3バージョン(HbおよびHc)は、ヒト化21・6V_H領域の最初のバージョン(Ha)におけるわずかな修正を行うためにPCRプライマーを用いて構築した。

【0339】

【表 3 - 1】

表 3

再構築ヒト 21.6 軽鎖可変領域の設計につながるアミノ酸配列の整列

Kabat	#	FR または CDR	マウス 21.6	マウス カッパ 5	ヒト カッパ 1	ヒト RE1	RH V _L 21.6	コメント
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2		I	I	I	I		
3	3		Q	Q	Q	Q	Q	
4	4		M	M	M	M	M	10
5	5		T	T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	P	
9	9		S	S	S	S	S	
10	10		S	S	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	L	
12	12		S	S	S	S	S	
13	13		A	A	A	A	A	
14	14		S	S	S	S	S	
15	15		L	L	V	V	V	
16	16		G	G	G	G	G	20
17	17		G	D	D	D	D	
18	18		K	R	R	R	R	
19	19		V	V	V	V	V	
20	20		T	T	T	T	T	
21	21		I	I	I	I	I	
22	22		T	T	T	T	T	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	R	R	Q	K	
25	25		T	A	A	A	T*	
26	26		S	S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	Q*	
27A			-	D	S	-	-	30
27B			-	-	L	-	-	
27C			-	-	V	-	-	
27D			-	-	X	-	-	
27E			-	-	X	-	-	
27F			-	-	-	-	-	
28	28		D	D	S	D	D*	
29	29		I	I	I	I	I*	
30	30		N	S	S	I	N*	
31	31		K	N	N	K	K*	
32	32		Y	Y	Y	Y	Y*	
33	33		M	L	L	L	M*	
34	34	CDR1	A	N	A	N	A	40
35	35	FR2	W	W	W	W	W	
36	36		Y	Y	Y	Y	Y	
37	37		Q	Q	Q	Q	Q	
38	38		H	Q	Q	Q	Q	
39	39		K	K	K	T	T	CAMPATH-1H における K
40	40		P	P	P	P	P	
41	41		G	G	G	G	G	

【表 3 - 2】

再構築ヒト 21.6 軽鎖可変領域の設計につながるアミノ酸配列の整理

Kabat	#	FR または CDR	マウス 21.6	マウス カッパ 5	ヒト カッパ 1	ヒト RE1	RH V _L 21.6	コメント	
42	42		K	G	K	K	K		
43	43		R	S	A	A	A	他のバージョンの R を考慮	
44	44		P	P	P	P	P		10
45	45		R	K	K	K	R	L2 ループを支持、 他のバージョンの K を考慮	
46	46		L	L	L	L	L		
47	47		L	L	L	L	L		
48	48		I	I	I	I	I*		
49	49		H	Y	Y	Y	H	結合部位の中間部、 抗原と相互作用する 可能性、他のバージョン の Y を考慮	
50	50	CDR2	Y	Y	A	E	Y*		20
51	51		T	A	A	A	T*		
52	52		S	S	S	S	S*		
53	53		A	R	S	N	A		
54	54		L	L	L	L	L		
55	55		Q	H	E	Q	Q		
56	56	CDR2	P	S	S	A	P		
57	57	FR3	G	G	G	G	G		
58	58		I	V	V	V	I	おそらく L2 を支持、 他のバージョンの V を考慮	
59	59		P	P	P	P	P		
60	60		S	S	S	S	S		
61	61		R	R	R	R	R		30
62	62		F	F	F	F	F		
63	63		S	S	S	S	S		
64	64		G	G	G	G	G*		
65	65		S	S	S	S	S		
66	66		G	G	G	G	G		
67	67		S	S	S	S	S		
68	68		G	G	G	G	G		
69	69		R	T	T	T	R	結合部位の近くの 表面上の L1 に隣接	
70	70		D	D	D	D	D		
71	71		Y	Y	F	Y	Y*	CAMPATH-1H における F	40
72	72		S	S	T	T	T		
73	73		F	L	L	P	F		
74	74		N	T	T	T	T		
75	75		I	I	I	I	I		
76	76		S	S	S	S	S		
77	77		N	N	S	S	S		
78	78		L	L	L	L	L		
79	79		E	E	Q	Q	Q		
80	80		P	Q	P	P	P		
81	81		E	E	E	E	E		

【表 3 - 3】

再構築ヒト 21.6 軽鎖可変領域の設計につながるアミノ酸配列の整理

Kabat	#	FR または CDR	マウス 21.6	マウス カップ 5	ヒト カップ 1	ヒト RE1	RH V _L 21.6	コメント
82	82		D	D	D	D	D	
83	83		I	I	F	I	I	
84	84		A	A	A	A	A	
85	85		T	T	T	T	T	
86	86		Y	Y	Y	Y	Y	
87	87		Y	F	Y	Y	Y	
88	88	FR3	C	C	C	C	C	
89	89	CDR3	L	Q	Q	Q	L	
90	90		Q	Q	Q	Q	Q*	
91	91		Y	G	Y	Y	Y*	
92	92		D	N	N	Q	D*	
93	93		N	T	S	S	N*	
94	94		L	L	L	L	L*	
95	95		-	P	P	P	-	
95A			-	P	E	-	-	
95B			-	-	-	-	-	
95C			-	-	-	-	-	
95D			-	-	-	-	-	
95E			-	-	-	-	-	
95F			-	-	-	-	-	
96	95		W	R	W	Y	W*	
97	96	CDR3	T	T	T	T	T	
98	97	FR4	F	F	F	F	F	
99	98		G	G	G	G	G	
100	99		G	G	Q	Q	Q	
101	100		G	G	G	G	G	
102	101		T	T	T	T	T	
103	102		K	K	K	K	K	
104	103		L	L	V	L	V	CAMPATH-1H と同様
105	104		E	E	E	Q	E	CAMPATH-1H と同様
106	105		I	I	I	I	I	
106A			-	-	-	-	-	
107	106	FR4	K	K	K	T	K	CAMPATH-1H と同様

説明：(Kabat)Kabat ら、前出による番号付け；(#) 分子モデリングに用いた配列番号付け；(マウス 21.6) マウス 21.6 抗体の V_L 領域のアミノ酸配列；(マウスカップ 5) サブグループ 5 のマウスカップ V_L 領域のコンセンサス配列 (Kabat ら、前出)；(ヒトカップ 1) サブグループ 1 のヒト V_L 領域のコンセンサス配列 (Kabat ら、前出)；(ヒト V_L 領域のヒト RED アミノ酸配列 (Palm ら、Physiol.Chem.356:167 ~ 19 頁 (1975))；(RH V_L21.6) 再構築ヒト 21.6V_L 領域のバージョン L1 のアミノ酸配列；(*)CDR ループの規定構造の一部である残基 (Chothia ら、前出)；(下線部) アミノ酸残基が交換されたヒト FRs における残基

【 0 3 4 0 】

【表 4 - 1】

表 4

再構築ヒト 21.6 重鎖可変領域の設計につながるアミノ酸配列の整列

Kabat	#	FR または CDR	マウス 21.6	マウス 2c	ヒト 1	ヒト 21/28'CL	RH V _H 21.6	コメント
1	1	FR1	E	E	Q	Q	Q	
2	2		V	V	V	V	V	
3	3		Q	Q	Q	Q	Q	10
4	4		L	L	L	L	L	
5	5		Q	Q	V	V	V	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	G	
9	9		A	A	A	A	A	
10	10		E	E	E	E	E	
11	11		L	L	V	V	V	
12	12		V	V	K	K	K	
13	13		K	K	K	K	K	
14	14		P	P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	G	
16	16		A	A	A	A	A	20
17	17		S	S	S	S	S	
18	18		V	V	V	V	V	
19	19		K	K	K	K	K	
20	20		L	L	V	V	V	
21	21		S	S	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	C	
23	23		T	T	K	K	K	
24	24		A	A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	G*	
27	27		F	F	Y	Y	F*	H1 規定構造、他の バージョンの Y を考慮 30
28	28		N	N	T	T	N*	H1 規定構造、表面上
29	29		I	I	F	F	I*	H1 規定構造、他の バージョンの F を考慮
30	30	FR1	K	K	T	T	K*	H1 規定構造、表面上
31	31	CDR1	D	D	S	S	D*	
32	32		T	T	Y	Y	T*	40
33	33		Y	Y	A	A	Y	
34	34		I	M	I	M	I*	
35	35		H	H	S	H	H	
35A			—	—	—	—	—	
35B		CDR1	—	—	—	—	—	
36	36	FR2	C	W	W	W	W	埋没残基、C の 明らかな特殊な役割なし
37	37		V	V	V	V	V	
38	38		K	K	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	Q	

【表 4 - 2】

再構築ヒト 21.6 重鎖可変領域の設計につながるアミノ酸配列の整列

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス 21.6	マウス 2c	ヒト 1	ヒト 21/28'CL	RH V _H 21.6	コメント	
40	40		R	R	A	A	A		
41	41		P	P	P	P	P		
42	42		E	E	G	G	G		
43	43		Q	Q	Q	Q	Q		
44	44		G	G	G	R	R	V _L -V _H パッキング、 他のバージョンの G を考慮	10
45	45		L	L	L	L	L		
46	46		E	E	E	E	E		
47	47		W	W	W	W	W		
48	48		I	I	M	M	M		
49	49	FR2	G	G	G	G	G		
50	50	CDR2	R	R	W	W	R		
51	51		I	I	I	I	I		
52	52		D	D	N	N	D		
52A	53		P	P	P	A	P*		
52B			-	-	-	-	-		20
52C			-	-	-	-	-		
53	54		A	A	G	G	A*		
54	55		N	N	N	N	N*		
55	56		G	G	G	G	G*		
56	57		Y	N	D	N	Y		
57	58		T	T	T	T	T		
58	59		K	K	N	K	K		
59	60		Y	Y	Y	Y	Y		
60	61		D	D	A	S	D		
61	62		P	P	Q	Q	P		
62	63		K	K	K	K	K		
63	64		F	F	F	F	F		
64	65		Q	Q	Q	Q	Q		30
65	66	CDR2	G	G	G	G	G		
66	67	FR3	K	K	R	R	R		
67	68		A	A	V	V	V		
68	69		T	T	T	T	T		
69	70		I	I	I	I	I		
70	71		T	T	T	T	T		
71	72		A	A	A	R	A*	H2 規定構造、 H2 を支持	
72	73		D	D	D	D	D		
73	74		T	T	T	T	T		
74	75		S	S	S	S	S		40
75	76		S	S	T	A	A		
76	77		N	N	S	S	S		
77	78		T	T	T	T	T		
78	79		A	A	A	A	A		
79	80		Y	Y	Y	Y	Y		
80	81		L	L	M	M	M		
81	82		Q	Q	E	E	E		
82	83		L	L	L	L	L		
82A	84		S	S	S	S	S		
82B	85		S	S	S	S	S		
82C	86		L	L	L	L	L		

【表 4 - 3】

再構築ヒト 21.6 重鎖可変領域の設計につながるアミノ酸配列の整列

Kabat	#	FR または CDR	マウス 21.6	マウス 2c	ヒト 1	ヒト 21/28'CL	RH V _H 21.6	コメント
83	87		T	T	R	R	R	
84	88		S	S	S	S	S	
85	89		E	E	E	E	E	
86	90		D	D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	T	10
88	92		A	A	A	A	A	
89	93		V	V	V	V	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	Y	
91	95		F	Y	Y	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	C	
93	97		A	A	A	A	A	
94	98	FR3	R	R	R	R		
95	99	CDR3	E	G	A	G	E	
96	100		G	Y	P	G	G	
97	101		Y	Y	G	Y	Y	
98	102		Y	Y	Y	Y	Y	
99	103		G	Y	G	G	G	20
100	104		N	D	S	S	N	
100A	105		Y	S	G	G	Y	
100B	106		G	X	G	S	G	
100C	107		V	V	O	-	V	
100D	108		Y	G	C	-	Y	
100E	109		A	Y	Y	-	A	
100F	110		M	Y	R	M		
100G			-	A	O	-	-	
100H			-	M	D	-	-	
100I			-	-	Y	-	-	
100J			-	-	-	-	-	
100K			-	-	F	-	-	30
101	111		D	D	D	N	D	
102	112	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y	
103	113	FR4	W	W	W	W	W	
104	114		G	G	G	G	G	
105	115		Q	Q	Q	Q	Q	
106	116		G	G	G	G	G	
107	117		T	T	T	T	T	
108	118		S	X	L	L	L	
109	119		V	V	V	V	V	
110	120		T	T	T	T	T	
111	121		V	V	V	V	V	
112	122		S	S	S	S	S	
113	123	FR4	S	S	S	S	S	40

説明：(Kabat)Kabat ら、前出による番号付け；(#) 分子モデリングに用いた配列番号付け；

(マウス 21.6) マウス 21.6 抗体の V_H 領域のアミノ酸配列；(マウス 2c) サブグループ 2c の

マウス V_H 領域のコンセンサス配列 (Kabat ら、前出)；(ヒト 1) サブグループ 1 のヒト V_H 領域の

コンセンサス配列 (Kabat ら、前出)；(ヒト 21/28' CL) ヒト V_H 領域のアミノ酸配列

(Dersimonian ら、J.Immunol.、139:2496 ~ 2501 頁 (1987))；(RH V_H21.6) 再構築ヒト 21.6V_H 領域

のバージョン H1 のアミノ酸配列；(*)CD ループの規定構造の一部である残基 (Chothia ら、前出)；

(下線部) アミノ酸残基が交換されたヒト FRs における残基

[実施例 9]

ナタリズマブ

ナタリズマブは、 $\alpha 4$ インテグリン分子に対する組換えヒト化抗体 (r h A b) であり、 $\alpha 4 \beta 1$ (V L A - 4) および $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンによって媒介される細胞結合を阻害する。ナタリズマブは、白血球、主としてリンパ球上に発現する $\alpha 4 \beta 1$ サブコンポーネントに結合する。 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンへのマウスモノクローナル抗体の結合は、これらの白血球上の $\alpha 4 \beta 1$ と内皮細胞上のその対応する受容体 V C A M - 1 との相互作用を阻害する。これらの細胞接着分子相互作用の阻害は、血管内皮にわたる、そして続く実質組織内へのこれらの白血球の移動を妨げると考えられている。

【 0 3 4 2 】

$\alpha 4 \beta 1$ インテグリンは、ステオポンチンおよびフィブロネクチンのエピトープなどの組織におけるその他のリガンドに結合する。ナタリズマブのさらなるメカニズムは、これらのリガンドを有する $\alpha 4 \beta 1$ 陽性白血球の阻害により、罹患組織における持続性炎症を抑制することなどである。したがって、ナタリズマブは、V C A M - 1 および M a d C A M - 1 との相互作用により炎症組織への免疫細胞のさらなるリクルートメントを阻害することに加えて、罹患部位に存在する既存の炎症活性を抑制するように作用する。

【 0 3 4 3 】

炎症性腸疾患 (I B D) における作用は、I B D 対象の炎症および非炎症腸における炎症の活動性部位の血管細胞接着分子 1 (V C A M - 1) および粘膜アプレシン細胞接着分子 (M a d C A M - 1) の発現を示した。これは、粘膜への白血球のリクルートメントが I B D に特有の炎症反応に寄与することを示唆している。したがって、V C A M - 1 / $\alpha 4 \beta 1$ および M a d C A M - 1 / $\alpha 4 \beta 7$ 相互作用を阻害する薬剤は、白血球の移動の減少と組織の損傷を引き起こすサイトカインおよび他の物質の放出の減少をもたらす可能性がある。炎症腸組織における重要な接着分子の同様な発現パターンを有する 1 つの形の慢性 I B D を経験する霊長類の種であるコットントップタマリン (C T T) における抗 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン抗体の試験で、プラセボと比較して高度に有意な改善が示された。

【 0 3 4 4 】

単回および反復投与毒性試験がマウス、モルモットおよびサルにおいて実施された。すべての毒性試験は、ナタリズマブを用いて実施されたものであり、モルモットにおける急性試験、マウスおよびカニクイザルにおける亜急性試験、ならびに変異原性および組織交差反応性試験を含んでいた。これらの試験は、有意な毒性の臨床または死後証拠を示さなかった。

【 0 3 4 5 】

マウスでは、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンおよび V C A M - 1 が胎盤および心臓の発達に役割を果たすという証拠が存在し、それらが胎児の発達にもより広い役割を果たしている可能性がある。したがって、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンがナタリズマブにより阻害される場合、流産を起こさせる作用または催奇形性リスクがある。予備繁殖毒性試験で、5 匹の妊娠カニクイザルの群に 0 . 0 6 、 0 . 3 または 3 0 m g / k g の用量のナタリズマブを反復静脈内投与した。3 0 m g / k g 群の 5 匹の妊娠雌のうちの 1 匹が、ナタリズマブの 5 回の投与を受けた後に妊娠 3 1 日目に流産した。流産の総発生率がこの動物種における自然流産の発生率の範囲内にあったので、この事象はナタリズマブに関連したものとは考えられなかった。進行中のフォローアップ生殖毒性試験で、1 0 ~ 1 5 匹の妊娠カニクイザルの群に 3 、 1 0 または 3 0 m g / k g の用量で反復静脈内投与した、胚死亡がすべての投与群で同様な率で発生した。すなわち、胚死亡例はそれぞれ対照群で 2 例、3 m g / k g 群で 1 例、1 0 m g / k g 群で 2 例、3 0 m g / k g 群で 2 例であった。予防措置として、妊娠の可能性のある女性、試験中および被験薬の最終注射後少なくとも 3 カ月間は有効な避妊法を用いなければならず、毎回のナタリズマブの投与時の妊娠テストが陰性でなければならない。

【 0 3 4 6 】

霊長類における 6 カ月間の反復投与試験において、盲腸、結腸および / または直腸のリ

10

20

30

40

50

ンパ形質細胞炎症がすべての用量群のナタリズマブ投与動物の約半数に認められ、賦形剤群には認められなかった。炎症は、固有層内のリンパ球および形質細胞の数の増加と時折の陰窩膿瘍によって特徴付けられた。30.0および60.0 mg/kg/週群の動物の結腸および直腸における変化の発生率および大きさのわずかな増加があり、用量反応関係があることが示唆された。しかし、用量反応関係があることが推定されたが、炎症の発生率はナタリズマブの血清濃度と関連していなかった。これらの変化は罹患動物における腸管の基礎感染を反映している可能性があるが、2最高ナタリズマブ用量群の動物における炎症の発生率および程度がわずかに高かったことと、対照群にその存在が欠如していたことを合わせると、ナタリズマブはおそらくこの過程に役割を果たしている可能性があることがわかる。

10

【0347】

クローン病および潰瘍性大腸炎における初期の試験を以下に要約する。1つの試験は、慢性活動性クローン病と診断された男女対象における3 mg/kgのナタリズマブの単回静脈内注入の無作為化二重盲検プラセボ対照安全性、忍容性および有効性試験であった。30例の対象を登録し、18例にはナタリズマブ(3 mg/kg)を、12例にはプラセボを投与した。投与後2週目に、7例のナタリズマブ投与対象(39%)と1例のプラセボ投与対象(8%)が臨床的寛解状態にあった(クローン病活動度指数(CDAI) < 150) (p = 0.1)。さらに、投与後2週目に、プラセボ投与対象(33%)と比較して少数のナタリズマブ投与対象(11%)が救助療法を必要とした。平均CDAIスコアは、平均ベースラインCDAIスコアと比較して、ナタリズマブ群においてのみ投与後2および4週目に有意に低下した。これらの効果は、投与後4週目を超えて持続せず、4週目の時点で認められたナタリズマブの低い血清濃度と相関している。

20

【0348】

ナタリズマブの3 mg/kgの用量の単回静脈内投与は、CDを有する対象において安全かつ忍容性が良好であった。いずれの対象も有害事象の発生が理由で試験を中止しなかった。6例の対象が1件の重篤な有害事象を報告したが、すべての対象がナタリズマブ投与群に属していた。これらの事象のいずれも致命的でなかった。6件の有害事象のうちの5件は、対象のクローン病の再発または悪化の徴候であり、他の重篤な有害事象は貧血の徴候であった。最も頻繁に報告された有害事象(頭痛、クローン病および腹痛)の発生率にはナタリズマブ群とプラセボ群との間の有意な差はなかった。

30

【0349】

第2の初期の試験は、活動性潰瘍性大腸炎を有する男女対象における3 mg/kgのナタリズマブの単回静脈内注入の安全性、忍容性および有効性試験であった。10例の対象を募集し、ナタリズマブ(3 mg/kg)を投与した。投与後2および4週目に、5例の対象(50%)が、Powell-Tuck活動度指数(PTAI)スコアが5と定義された良好な臨床的反応を示し、平均PTAIスコアが0週目の9.7から投与後1、2および4週目のそれぞれ6.9、5.7および4.9に低下した。平均PTAIスコアは、12週間の試験期間にわたり抑制されたままであった。対象の70%は0週目から4週目まで救助薬投与を受けなかった。

40

【0350】

この試験における最も頻繁に報告された有害事象は、潰瘍性大腸炎の悪化、頭痛、嘔吐、嗜眠および咽頭痛であった。この試験で報告された30件の有害事象のうち、3件のみが被験薬に関連するとみなされた。頭痛、潰瘍性大腸炎の悪化および嗜眠のそれぞれ1件の発生があった。重度と特徴付けられた2件の事象が存在し、両事象は、投与に関連するとみなされなかった潰瘍性大腸炎の悪化の報告であった。3例の対象が重篤な有害事象を報告した。これらの事象のいずれも致命的でなかった。これらの事象は、キャンピロバクター腸炎、対象の試験中止をもたらさなかった潰瘍性大腸炎の悪化、ならびに硬直、発熱、頭痛および嘔吐のエピソードであった。

【0351】

他の初期の試験は、中等度から重度の活動性クローン病を有する対象におけるプラセボ

50

、3または6 mg / kg のナタリズマブの1または2回静脈内注入の二重盲検プラセボ対照並行群多施設有効性、安全性および忍容性試験であった。合計248例の対象が無作為化され、そのうちの244例が少なくとも1回の被験薬の投与を受けた。68例の対象が3 mg / kg の単回注入に、66例が4週間間隔での3 mg / kg の2回の注入に、51例が4週間間隔での6 mg / kg の2回の注入に、63例がプラセボ投与に無作為化された。ナタリズマブは、4、6、8および12週目に3実薬投与群の少なくとも1つにおいて寛解（CDAI < 150）を誘発する点でプラセボより優れていた。46%の最高の寛解率が3 mg / kg の2回の注入を受けた群で6週目に認められ、41～43%の寛解率がこの群および6 mg / kg の2回の注入を受けた群で8および12週目に認められた。ナタリズマブは、2、4、6、8および12週目に3実薬投与群の少なくとも1つにおいて反応（CDAIの70ポイント以上または100ポイント以上の低下）を誘発する点でプラセボより優れていた。73%（70ポイント以上の低下）および56%（100ポイント以上の低下）の最高反応率が3 mg / kg の2回の注入を受けた群で6週目に認められた。炎症性腸疾患質問票により評価した生活の質の統計的に有意な改善およびC反応性タンパク質の減少も達成された。

10

20

30

40

50

【0352】

ナタリズマブの投与は、活動性CDを有する対象において安全かつ忍容性が良好であった。各投与群の同様な例数の対象が有害事象のため試験を中止した。すなわち、プラセボ、1回3.0 mg / kg、2回3 mg / kg および2回6 mg / kg 注入投与群でそれぞれ2、1、2および3例の対象が中止した。合計32例の対象が試験の主段階において重篤な有害事象を報告した（プラセボ、1回3.0 mg / kg、2回3 mg / kg および2回6 mg / kg 注入投与群でそれぞれ9、8、8および7例の対象）。これらの事象のいずれも致命的でなく、いずれも被験薬に関連すると評価されなかった。これらの事象の大部分は、合併症またはCDの症状の治療を容認するものであった。少なくとも2つのナタリズマブ投与群でより大きい頻度で報告された疾患に関連しない事象は、胸痛、発熱、かぜ症状、めまいおよび結膜炎などであった。

【0353】

クローン病の治療におけるナタリズマブの使用

CDを有する大多数の対象が、最初に5-ASA製剤（スルファサラジン、メサラジン、オルサラジン）、経口ステロイド（例えば、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ブデソニド）を含む入手可能な薬剤に反応する。より最近、重症難治性CDおよび難治性瘻孔形成性疾患の治療用の腫瘍壊死因子に対する薬剤（抗TNF抗体、インフリキシマブ）が開発された。しかし、一部の患者は衰弱性疾患を有し続けており、疾患が現行の療法により十分にコントロールされない対象の治療の改善の必要がある。

【0354】

IBDを有する対象におけるMadCAM-1およびVCAM-1のアップレギュレーションの証拠、およびMadCAM-1 / 4 7相互作用が腸へのリンパ球のホーミングを媒介するという証拠がある。IBDにおける抗4インテグリン抗体の有望な役割は、コットントップタマリンにおける試験の所見により最初に、またより最近、臨床試験におけるナタリズマブの結果により裏付けられた。

【0355】

下に詳細に述べる2つのさらなる試験は、初期の結果を確認するために計画されたものであり、中等度から重度の活動性CD対象（CDAI 220、450）の集団における反応および/または寛解を誘発するようにデザインされている。反応し、その後、中等度の活動性疾患（CDAIスコア < 220 および 70 の低下）を有していた最初の試験の対象を、ナタリズマブの反復投与が反応および/または寛解を維持することができるかどうかを検討するためにデザインされた、その後の試験に登録した。CDが慢性であることを考慮すると、新たな薬剤を、長期間にわたり疾患の活動性を低減または除去する能力について評価することは明らかに重要である。さらに、達成されたならば、改善を維持するアプローチも現在の診療の目的を反映している。

【0356】

有効性の評価のための主要なツールは、クローン病活動度指数 (CDAI) である。CDAI は、1979 年に全米共同クローン病研究 (US National Cooperative Crohn's Study) (NCCDS) のために開発され、既知の CD 臨床スコアの最善のものである。これは、新規の療法の臨床試験に広く用いられており、臨床試験のエンドポイントとして一般的に受け入れられている。＜150 の CDAI スコアは寛解として一般的に受け入れられており、150～＜220 のスコアは中等度の活動度の疾患とみなされ、一方、220～＜450 のスコアは高度の活動度の疾患とみなされている。

【0357】

したがって、反応の喪失は 220 の CDAI スコアと定義され、寛解の喪失は 150 の CDAI スコアと定義される。これらの定義は、救助インターベンションの使用と合わせて、この試験における反応および寛解の解析の維持に用いた。

【0358】

この試験のさらなるエンドポイントは、炎症性腸疾患質問票、IBD 集団用の開発された生活の質ツール、ならびに生活の質のより一般的な評価を可能にし、一部の規制当局により支持されている SF-3612 などである。経口ステロイドの投与を受ける対象のサブグループにおける併用経口ステロイドを中止させる能力としての C 反応性タンパク質のような炎症マーカーの変化も評価した。

【0359】

臨床的評価に選択したナタリズマブの初期の用量は、モルモット実験的アレルギー性脳炎 (EAE) モデルにおける非臨床試験に基づくものであった。これらの試験で、3 mg / kg の用量のナタリズマブは EAE の徴候および症状の発現の有意な遅延および逆転をもたらし、より低用量のナタリズマブは有効でなかったことが示された。3 mg / kg の単回投与は約 3 週間までの 4 インテグリン受容体遮断を伴うナタリズマブの血清濃度をもたらし、6 mg / kg 投与では約 6 週間であった。

【0360】

ナタリズマブは、すべての臨床試験において体重について調整した用量を投与することによって評価した。健康志願者ならびに MS および IBD を有する対象における完了した試験の単回投与薬物動態データは、ナタリズマブの 3 mg / kg の注入が 3～4 週間にわたり十分な程度の受容体飽和および細胞接着の阻害を伴うレベルである 2.5～3.0 μg / mL のナタリズマブの血清濃度を維持することを示した。6 mg / kg ナタリズマブというより高用量の単回注入は、わずかに高く、より長期間 (約 6 週間) 持続した 4 インテグリン飽和レベルをもたらした。

【0361】

これらの第 II 相試験で認められた薬力学的効果および治療反応は、ナタリズマブの用量および血清中ナタリズマブ濃度に関連していることがみとめられた。これらの所見とナタリズマブのクリアランスが主として体重に依存するという知識に基づいて、固定用量の投与が体重により調節する投与の代わりになり得るかどうかを判断するために、300 mg の固定用量によってもたらされる曝露の範囲を検討した。

【0362】

薬物動態モデリングと AUC が総用量に比例するという仮定により、300 mg の固定用量は、第 II 相試験に用いた 3 mg / kg および 6 mg / kg の用量で認められた曝露と重複するナタリズマブ曝露をもたらすことが示された。したがって、3 mg / kg の用量は CD および MS 適応に有効であり、6 mg / kg 用量は用量限定的毒性の証拠をもたらさず、3 mg / kg 用量と比べて 6 mg / kg 用量のさらなる利益はなかったため、300 mg の固定用量は第 III 相試験のための適切な選択である。

【0363】

クローン病 (CD) 患者における臨床的反応および寛解の維持におけるチサブリ (Tysabri) (ナタリズマブ、300 mg 1 カ月 1 回) の有効性、安全性および忍容性の

10

20

30

40

50

二重盲検プラセボ対照試験を実施した。目的は、C Dを有する対象における臨床的反応を維持するナタリズマブの能力をプラセボと比較すること、C Dを有する対象における臨床的寛解を維持するナタリズマブの能力をプラセボと比較すること、炎症性腸疾患質問票（IBDQ）により測定される生活の質に対するナタリズマブの影響をプラセボと比較すること、および対象が経口ステロイドの使用を中止することを可能にするナタリズマブの能力をプラセボと比較することであった。

【0364】

試験デザイン

最初の試験において10週目に治療に反応し、その反応を12週目まで維持し（ベースラインCDAIの70ポイント以上の低下と定義）、疾患が中等度に活動性である（< 220のCDAIスコアと定義）以前に活動性のクローン病（C D）（中等度から重度の活動性と定義、CDAI 220、< 450）を有していた対象の第III相国際多施設無作為化二重盲検プラセボ対照並行群試験を実施した。

10

【0365】

この群内に、最初の試験の10週目に寛解（< 150のCDAIスコアと定義）を達成した亜集団が存在した。10週目から12週目まで反応を維持しなかった対象は、第2の試験に適格でなく、最初の試験の安全性フォローアップ相に参加し続けた。C Dのための併用薬の投与を受けた対象は、登録を許可し、最初の試験への参加中に安定に維持した当該用量を提供した。固定アルゴリズムに従って節約した経口ステロイドを除いて、C D用のすべての併用薬は、12カ月間の治療相（15カ月目まで）の期間中に安定のままであった。本願書の提出時に、9カ月のデータのみが入手可能であった。

20

【0366】

ナタリズマブは、月1回300mgを12回注入投与した。プラセボは、月1回で12回注入投与した。対象はその疾患状態（寛解対寛解なし、すなわち、CDAI < 150または150）、経口ステロイドの併用および免疫抑制剤の併用に従って層別化した。

【0367】

無作為化後、対象はその初回注入を受けた。その後、対象は、評価および注入のために月1回（1カ月を4週間と定義する）診療所に戻った。C D用の新規薬剤の導入またはC D用の既存の併用薬の用量の変更（固定アルゴリズムに従った経口ステロイドの使用中止を除く）は、救助インターベンションのために必要と考えられない限り、許可した。救助が行われたならば、そのような対象は治療失敗とみなした。

30

【0368】

対象は、この試験で12回までの注入を受け、最終注入後1カ月目（すなわち、15カ月目）に最終治療相評価のために戻る予定である。

【0369】

約380例の対象が治療に対して反応し、最初の試験の10週目に中等度の活動性の疾患（CDAIスコアの70ポイントの低下、< 220のCDAIスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義）を有し、12週目/3カ月目まで維持したと予想された。285例の対象が第2の試験に登録されると予想され、2つの試験の間の適格対象の脱落率は25%と仮定した。これらのうち、200例の対象が寛解（< 150のCDAIスコアと定義）を達成したと予想された。

40

【0370】

無作為化し、投与した285例の対象（投与群当たり142例、比1:1）のサンプルサイズは、ナタリズマブに対する65%の反応率およびプラセボに対する44%の反応率を仮定し、10%の脱落率を考慮したとき、反応率の維持（< 220のCDAIスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義）についてのナタリズマブ投与群とプラセボ群との間の差を検出する5%の有意水準での90%の検出力を与えられた。

【0371】

したがって、無作為化し、投与した寛解状態にある200例の対象のサブグループは、ナタリズマブに対する55%の反応率およびプラセボに対する30%の反応率を仮定し、

50

10 %の脱落率を考慮したとき、反応率の維持 (< 150 の C D A I スコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義) についてのナタリズマブ投与群とプラセボ群との間の差を検出する 5 %の有意水準での 90 %の検出力を与えられた。

【0372】

併用経口ステロイドを服用している対象がステロイドの漸減を開始することを可能にするために、最初の試験の 10 週目に適格な対象を同意させ、第 2 の試験に登録された。12 週目 / 3 カ月目に適格性基準を満たし続けていた、すなわち、対象の次の月 1 回の注入に間に合った対象を再無作為化し、12 カ月間まで (すなわち、15 カ月目まで) 継続される予定の治療相に参加した。対象は、男性または女性で、18 歳以上であった。

【0373】

薬剤の用量および製剤

静脈内ナタリズマブを 300 mg の用量で投与した。ナタリズマブは、20 mg / mL の濃度で 5 mL バイアル入りで供給された。すべての注入液は、0.9 % 食塩水の入った 100 mL バッグ中で調製した。ナタリズマブバイアルは、リン酸で pH 6.0 に調整した 10 mM リン酸緩衝液、140 mM NaCl および 0.02 % ポリソルベート 80 中 20 mg / mL のナタリズマブを含んでいた。

【0374】

対照群のために、プラセボが対応した 5 mL バイアル入りで供給され、リン酸で pH 6.0 に調整した 10 mM リン酸緩衝液、140 mM NaCl および 0.02 % ポリソルベート 80 からなっていた。

【0375】

投与経路

ナタリズマブまたはプラセボを 2 mL / 分の流量で約 60 分間にわたって静脈内注入により投与した。すべての対象を各注入の開始後 2 時間観察した。

【0376】

手順

手順は、身体的検査、バイタルサイン、体重、C D A L、I B D Q、S F - 36、対象包括的評価、血液学、生化学、C 反応性タンパク質 (C R P)、抗核抗体 (A N A)、血清中ナタリズマブ濃度、抗ナタリズマブ抗体および妊娠テストの評価のための血液試料、尿検査および妊娠テスト用尿試料、有害事象、併用薬および救助インターベンションの評価などであった。

【0377】

主要、副次的および第 3 次的エンドポイント

主要エンドポイント

主要エンドポイントは、12 週目に反応した状態の対象の反応の喪失 (C D A I スコア 220 または救助インターベンションの使用と定義) までの時間であった。

【0378】

副次的エンドポイント

1. 付随主要エンドポイント: 12 週目に寛解した状態 (< 150 の C D A I スコアと定義) の対象の寛解の喪失 (C D A I スコア 150 または救助インターベンションの使用と定義) までの時間

2. 12 カ月後 (すなわち、15 カ月目) に寛解した状態のまま (< 150 の C D A I スコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義) であった 12 週目に寛解した状態 (< 150 の C D A I スコアと定義) の対象の割合 (%)

3. 9 カ月目の C D 301 におけるベースラインからの I B D Q の平均変化

4. 9 カ月目に経口ステロイドを服用していない例数 (%)。9 カ月目に寛解した状態 (< 150 の C D A I スコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義) にあり、経口ステロイドを服用していない対象の例数 (%)

【0379】

第 3 次的エンドポイント

10

20

30

40

50

1. 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14および15カ月目に中等度の活動性の疾患＜220のCDAIスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義）を有する対象の例数（％）

2. 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14および15カ月目に寛解状態にある（＜150のCDAIスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義）対象の例数（％）

3. 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14および15カ月目に＜200のCDAIスコアを有し、かつ救助インターベンションを使用しない対象の例数（％）

4. 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14および15カ月目の平均CDAIスコア 10

5. 3、6、12および15カ月目のCD301におけるベースラインからのIBD Qの平均変化

6. 3、6、9、12および15カ月目のCD301におけるベースラインからのSF36の平均変化

7. 3、6、9、12および15カ月目のCD301におけるベースラインからの対象包括的評価の平均変化

8. 3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14および15カ月目に経口ステロイドを服用していない対象の例数（％）

9. 3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14および15カ月目に寛解した状態（＜150のCDAIスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義）にあり、経口ステロイドを服用していない対象の例数（％） 20

10. 救助インターベンション（外科的インターベンションを含む）を最初に使用するまでの時間

11. 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14および15カ月目に救助インターベンション（外科的インターベンションを含む）を必要とする対象の例数（％）

12. 3、6、9、12および15カ月目のCD301におけるベースラインからのC反応性タンパク質の平均変化（CD301におけるベースラインでのCRPの上昇を有していた対象における） 30

13. 3、6、9、12および15カ月目のCD301におけるスクリーニングからの血清アルブミンの平均変化

【0380】

統計的考察

有効性解析は、*intention-to-treat* 集団に基づくものとした。*per protocol* 集団について主要なエンドポイントの解析を繰り返した。カテゴリデータは、計数および百分率として表した。連続データは、要約統計量として表した。行ったすべての比較は、両側とし、有意水準を5%とした。

【0381】

主たる解析は、層別化に用いた因子ならびに地理上の位置および他のあらかじめ指定された共変量について調整した。主要な有効性エンドポイントが5%の水準で統計的に有意であった場合、付随主要エンドポイントである寛解の喪失までの時間のみを解析した。 40

【0382】

第1および第2の試験を合わせて400患者年のデータが得られ、すべての対象が最小限3カ月間のデータを有するとき（すなわち、12週目までの最初の試験を最小限として完了したか、または第2の試験で12週目/3カ月目を完了した）、管理解析を行うものとする。

【0383】

被験薬

被験薬は、20mg/mLナタリズマブまたはプラセボの栓付きの透明な個別5mLバ 50

バイアル入りで供給された（ナタリズマブまたはプラセボ）。バイアルは、遮光するために3バイアルずつ箱に包装されていた。各箱は、固有の6桁の箱番号が表示され、1回の注入用の十分な被験薬を含むものとする。

【0384】

ナタリズマブバイアルは、リン酸でpH 6.0に調整した10 mMリン酸緩衝液、140 mM NaClおよび0.02%ポリソルベート80中20 mg/mLのナタリズマブを含んでいた。プラセボは、リン酸でpH 6.0に調整した10 mMリン酸緩衝液、140 mM NaClおよび0.02%ポリソルベート80を含む対応する5 mLバイアル入りで供給された。

【0385】

被験薬の用量

ナタリズマブに無作為化された対象は、静脈内注入により月1回（すなわち、4週間ごとに）300 mgの投与を最大12回受けた。

【0386】

被験薬の準備

加える被験薬と等量である15 mLの生理食塩水を0.9%食塩水の100 mLバッグから抜き取り、捨てた。次いで、合計15 mLの被験薬を3つのバイアルから18または19ゲージ針により50 mL注射器に吸引し、20～23ゲージ針により、薬剤ポートダイヤフラムを通して生理食塩水バッグ中に緩やかに加えた。希釈は、無菌的方法を用いて行った。

【0387】

被験薬の投与

被験薬の投与は、静脈内注入により4週間ごとに行った。各注入は、約60分間を必要とした。注入は、約2 mL/分の流量で行った。被験薬の100 mLバッグが空になったならば、同じ速度で注入ラインをフラッシュするために、生理食塩水の50 mLバッグと交換した。

【0388】

経口ステロイドの漸減

経口ステロイドの投与を受けていたすべての対象は、第2の試験への参加直後に次のアルゴリズムを用いた漸減を受けることが要求された。>10 mgのプレドニゾロンに相当する用量の投与を受けていた対象は、10 mgの用量に達するまで、7日ごとに5 mgの割合でその漸減を開始する。10 mgのプレドニゾロンに相当する用量の投与を受けていた対象は、対象が完全に使用を中止するまで、7日ごとに2.5 mgの割合で漸減した。ブデソニドを服用していた対象は、3週間ごとに3 mgの割合で漸減した。

【0389】

身体的検査

完全な身体的検査を6カ月目、9カ月目、12カ月目および15カ月目に、また15カ月目の前に試験を中止した対象における早期中止来院の一部として実施し、また実施する予定である。体重は、CD AISコアの評価の一部としてすべての来院時に記録した。バイタルサインは、すべての来院時に記録した。注入液を投与した来院時には、注入直前（0分）と注入の終了時にバイタルサインを記録した。

【0390】

生活の質の評価

対象包括的評価、炎症性腸疾患質問票（IBDQ）および健康調査からなる生活の質の評価は、3カ月目、6カ月目、9カ月目、12カ月目および15カ月目来院時、ならびに早期中止来院の一部として対象が完了した。対象は、来院の開始時（すなわち、他の評価または注入の前）に最初に対象包括的評価を完了し、評価を完了しなかった。対象包括的評価は、対象が被験薬の最初の投与を受ける直前の気分と比較した気分の包括的な印象を評価した視覚アナログスケールである。

【0391】

10

20

30

40

50

ナタリズマブの濃度

ナタリズマブの濃度の測定のための血液試料を3カ月目、6カ月目、9カ月目、12ヶ月および15カ月目に採取した。注入液を投与した来院時には、注入直前(0分)に試料を採取した。さらに、6カ月目および12カ月目のみに、注入を終了してから少なくとも1時間目に第2の試料を採取した。

【0392】

統計手法

ナタリズマブがCDを有する対象における軽度の活動性の疾患(<220のCD A Iスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義)および寛解(<150のCD A Iスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義)を維持する能力を評価した。問題の主たる比較は、治療群間の反応の喪失までの時間であった(反応の喪失をCD A Iスコア220または救助インターベンションの使用と定義するとき)。付随逐次解析は、12週目に寛解状態(CD A I < 150)にあった対象のサブグループにおける治療群間の寛解の喪失(CD A Iスコア150または救助インターベンションの使用と定義)までの時間に対する治療の効果について行った。

10

【0393】

約380例の対象が投与に反応し、12週目/3カ月目まで維持される最初の試験の10週目に軽度の活動性の疾患(CD A Iスコアの70ポイントの低下、<220のCD A Iスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義)を有すると予想された。2つの試験の間の適格対象の脱落率を25%と仮定して、そのうちの285例は第2の試験に登録すると予想された。これらのうち、200例の対象は寛解(<150のCD A Iスコアと定義)を達成したと予想された。

20

【0394】

無作為化し、投与した285例の対象(投与群当たり142例、比1:1)のサンプルサイズは、ナタリズマブに対する65%の反応率およびプラセボに対する44%の反応率を仮定し、10%の脱落率を考慮したとき、反応率の維持(<220のCD A Iスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義)についてのナタリズマブ投与群とプラセボ群との間の差を検出する5%の有意水準での90%の検出力を与えられた。

【0395】

したがって、無作為化し、投与した寛解状態にある200例の対象のサブグループは、ナタリズマブに対する55%の反応率およびプラセボに対する30%の反応率を仮定し、10%の脱落率を考慮したとき、寛解の維持(<150のCD A Iスコアかつ救助インターベンションを使用せずと定義)についてのナタリズマブ投与群とプラセボ群との間の差を検出する5%の有意水準での90%の検出力を与えられた。

30

【0396】

有効性解析

すべての有効性解析および要約は、intention-to-treat集団に基づくものであった。主要な有効性パラメータの確認解析は、per protocol集団を用いて行った。感度分析は、最初の試験でナタリズマブの投与を受けるように無作為化された最初の試験のレスポnderからなるintention-to-treat集団のサブセットを用いて主要および副次的エンドポイントに関して行った。

40

【0397】

結果

第2の試験で、9カ月目にステロイドを服用していなかった対象(最初の試験ベースラインにおいてステロイドを服用していた対象のうちの)は、以下の結果を示した。

【0398】

【表 5】

表 5

	プラセボ N=760	ナタリズマブ	p 値
ステロイドを服用せず*	19 (25%)	37 (55%)	< 0.001
寛解かつ ステロイドを服用せず*	17 (22%)	31 (46%)	0.009

【0399】

10

両群における最も一般的な副作用は、頭痛、悪心および腹痛であった。重篤な有害事象（SAE）については、8%対7%がプラセボ対ナタリズマブであった。

【0400】

図1にクローン病試験において患者に投与したときのナタリズマブに対する反応のグラフを示す。試験に参加してから3カ月目のナタリズマブレスポンダー集団のうち、61.3%の患者が9ヵ月後に反応を維持していたが、プラセボ群では28.8%のみが反応を維持していた。

【0401】

図2にクローン病試験において患者に投与したときナタリズマブに反応した寛解のレベルのグラフを示す。試験に参加してから3カ月目のナタリズマブ寛解集団のうち、43.8%の患者が9ヵ月後に反応を維持していたが、プラセボ群では25.8%のみが反応を維持していた。

20

【0402】

図3に様々な集団、すなわち、intention-to-treat集団（ITT）、C反応性タンパク質上昇集団（CRP）、免疫抑制剤に対して無応答性または不耐性の集団（immunoUI）およびステロイドに無応答性、不耐性または依存性の集団（steroidUID）におけるクローン病試験において患者に投与したときナタリズマブに反応した寛解のレベルのグラフを示す。これらのカテゴリーは、患者のこれらの薬剤の以前の使用歴に基づいていた。

【0403】

30

有効性の要約

問題の集団において、最初の試験でプラセボと比較してナタリズマブで寛解および反応率の臨床的に意味のある差が認められた。第2の試験（最初の試験のレスポンダーの二重盲検中止試験）で、最初の試験において認められた誘導効果が確認されている。有望な維持データが第2の試験における6ヵ月後に認められた。第2の試験では、ナタリズマブは対象がステロイドを漸減させるに成功することを可能にした。

【0404】

【表 6】

表 6 クローン病活動度指数 (CDAI)

変数	重み係数
以前の 7 日の各々における下痢便の総回数	× 2
以前の 7 日の各々における腹痛 なし=0 軽度=1 中等度=2 重度=3	× 5
以前の 7 日の各々における一般的安寧 良好=0 常態以下=1 不良=2 非常に不良=3 極度に不良=4	× 7

10

20

【0 4 0 5】

他のすべての指数は、医師が外来で以下のように評価する。

【0 4 0 6】

【表 7】

表 7

以前の 7 日間の臨床徴候 関節炎または関節痛=1 皮膚または口腔病変=1 虹彩炎またはぶどう膜炎=1 肛門直腸病変=1 他の瘻 週内の 38°C以上の発熱	× 20	10
口モチルまたは他の下痢止め なし=0、あり=1	× 30	
腹部腫瘍 なし=0 疑わしい=2 明確=5	× 10	
以下のヘマトクリット値未満と定義される貧血 男性-47% 女性-42%	× 6	20
標準体重-実際の体重 × 100 標準体重*	× 1	
クローン病活動度指数 (CDAI) 総和	=	

* 提供される標準体重および体重表から得る

【 0 4 0 7 】

30

実施例 1 0

この実験は、クローン病における臨床的反応および寛解の維持におけるナタリズマブの有効性、安全性および忍容性の二重盲検プラセボ対照試験であった。

【 0 4 0 8 】

4 インテグリンに対するヒト化モノクローナル Ig G 4 抗体であるナタリズマブを、第 I I I 相反応 / 寛解誘導試験でナタリズマブ投与対象において達成された臨床的反応および寛解を維持する 6 カ月療法の能力を検討するために無作為化対照試験で評価した。

【 0 4 0 9 】

方法

最初の試験でナタリズマブの 3 回の注入を受けた後に反応（ベースラインクローン病活動度指数 (CDAI) の 70 ポイントの低下と定義）および / または寛解 (CDAI < 150) を達成し、CDAI スコア < 200 を有していたクローン病 (CD) を有していた 339 例の対象を、さらなる 12 回の月 1 回の注入のためにナタリズマブ (300 mg) (n = 168) またはプラセボ (n = 171) に 1 : 1 の比率で再無作為化した。主要なエンドポイントは、第 2 の試験におけるさらなる連続 6 カ月間にわたるすべての時点で最初の試験での反応を喪失しなかった対象の割合であった。反応の喪失は、CDAI 220 および第 2 の試験のベースライン CDAI からの 70 ポイントの増加または救助インターベンションの使用と定義した。寛解の維持も評価した。

40

【 0 4 1 0 】

結果

50

6 カ月目に、ナタリズマブ投与対象（ITT 集団）の 61%（103 / 168）が臨床的反応に関する基準を満たしていたのに対して、プラセボ投与を受けるように再無作為化された対象の 29%（49 / 170）が満たしていた（ $p < 0.001$ ）。ナタリズマブ投与群における 44%（57 / 130）が臨床的寛解を維持していたのに対して、プラセボ群では 26%（31 / 120）であった（ $p = 0.003$ ）。さらに、第 2 の試験でナタリズマブに再無作為化された、最初の試験でステロイドを服用したナタリズマブ投与対象の 55%（37 / 67）がステロイドを中止したのに対して、プラセボに再無作為化された 25%（19 / 76）が中止した（ $p < 0.001$ ）。治療群間で重篤および非重篤有害事象の発生率の注目すべき差は認められなかった。

【0411】

10

第 2 の試験で、ナタリズマブは、最初の試験でのナタリズマブレスポンダーにおける 6 カ月間にわたるすべての連続する時点に反応および寛解を持続させるその能力の点でプラセボと比べて有意な優位性を示した。6 カ月間にわたるナタリズマブの月 1 回の投与は、忍容性が良好であり、対象がステロイドを中止することに成功することを可能にした。

【0412】

上の刊行物、特許および特許出願のすべては、個々の刊行物、特許および特許出願がすべての目的のためにその全体を参照により援用すると明確かつ個別に示された場合と同じ程度にそれらの全体を参照により本明細書に援用する。本願書は、すべての目的のためにその全体を参照により本明細書に援用する 2004 年 4 月 1 日に提出された米国仮出願番号 60 / 558120 の恩典を主張する。

20

【図面の簡単な説明】

【0413】

【図 1】クローン病試験において患者に投与したときのナタリズマブに対する反応を示すグラフである（実施例 2 を参照）。

【図 2】クローン病試験において患者に投与したときのナタリズマブに対する反応の寛解のレベルを示すグラフである（実施例 2 を参照）。

【図 3】intention-to-treat 集団（ITT）、C 反応性タンパク質上昇集団（CRP）、免疫抑制剤に対して無応答性または不耐性の集団（免疫 UI）およびステロイドに対して無応答性、不耐性または依存性の集団（ステロイド UID）などの種々の集団におけるクローン病試験において患者に投与したときのナタリズマブに対する反応の寛解のレベルを示すグラフである（実施例 2 を参照）。これらの分類は、これらの薬剤についての患者の以前の使用歴に基づくものであった。

30

【 図 1 】

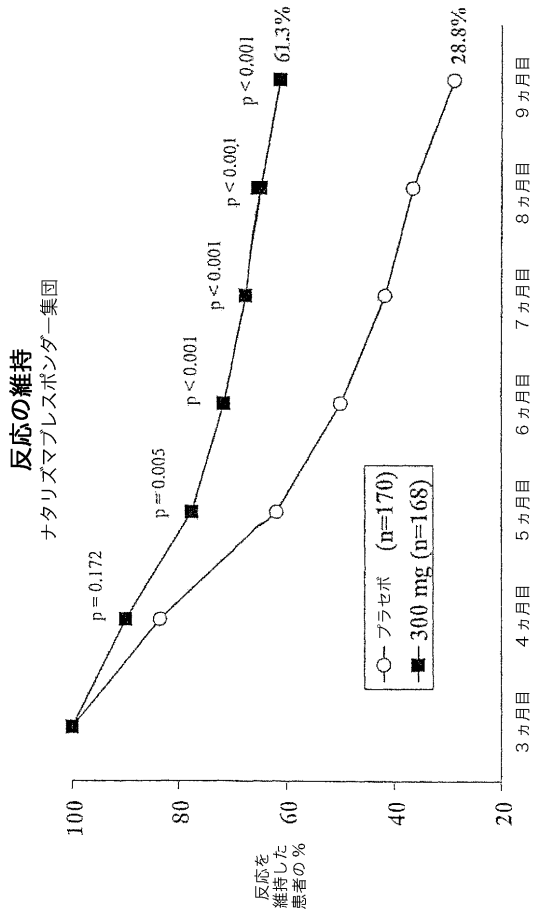


Fig.1

【 図 2 】

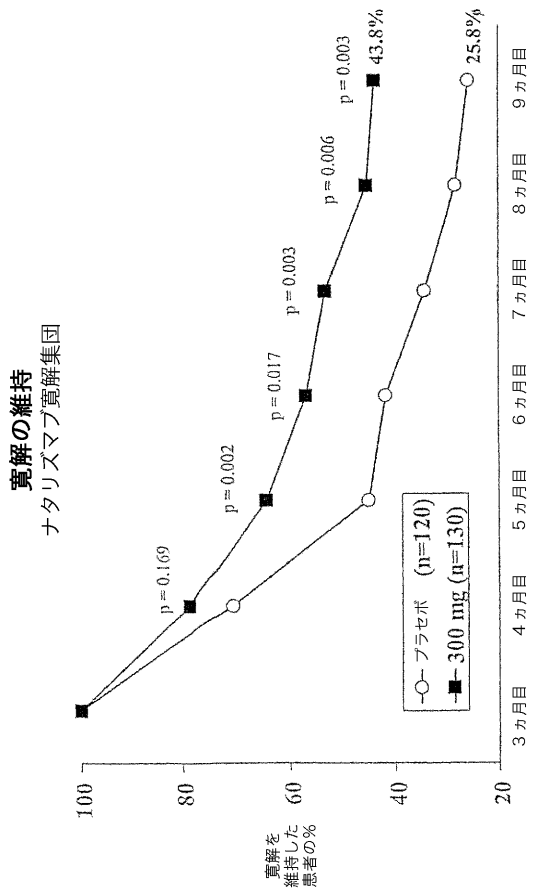


Fig.2

【 図 3 】

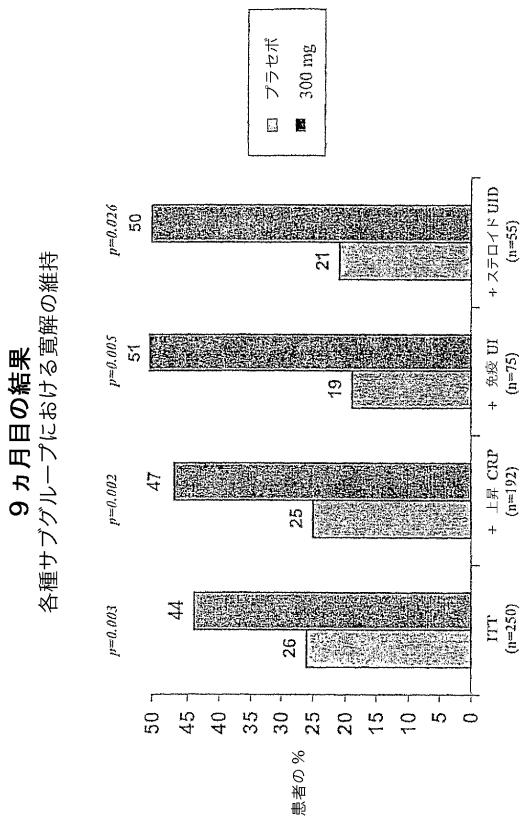


Fig.3

【配列表】

2007531761000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/010848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/395 A61K31/505 A61K31/52 A61K31/635 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/009169 A1 (TAYLOR JULIE ET AL) 15 January 2004 (2004-01-15) the whole document	1-83
X	WO 03/072040 A (ELAN PHARMACEUTICALS, INC; TAYLOR, JULIE; YEDNOCK, TED, A) 4 September 2003 (2003-09-04) the whole document ----- -/-	1-83
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 November 2005		Date of mailing of the international search report 27/03/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Greif, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2005/010848

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SORBERA L A ET AL: "Natalizumab. Treatment of IBD, treatment of multiple sclerosis: AN100226, Antegren TM " DRUGS OF THE FUTURE, vol. 25, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 917-921, XP002352328 ISSN: 0377-8282	1-20, 28-31, 72-76
Y	the whole document	21-27, 32-38, 43-49, 54-60, 65-71, 77-83
X	NEPOM G T: "Therapy of autoimmune diseases: clinical trials and new biologics" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, vol. 14, no. 6, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 812-815, XP004390323 ISSN: 0952-7915	1-24,27, 32-35, 37, 39-46, 48, 54-57, 59, 65-68, 70, 72-80,82
	the whole document	
P,X	FOX R J ET AL: "New directions in MS therapeutics: vehicles of hope" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 25, no. 12, December 2004 (2004-12), pages 632-636, XP004628797 ISSN: 1471-4906 table 1	1-14, 21-28, 43-49, 54-60, 65-71, 77-83
X	ULBRICH H ET AL: "Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 24, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 640-647, XP004476617 ISSN: 0165-6147	1-20, 28-31, 39-42, 50-53, 61-64, 72-76
Y	the whole document	21-27, 32-38, 43-49, 54-60, 65-71, 77-83
X	WO 02/070007 A (MEDIMMUNE, INC) 12 September 2002 (2002-09-12) the whole document	1-4,13, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/010848

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004009169	A1	15-01-2004	NONE
WO 03072040	A	04-09-2003	AU 2003213231 A1 09-09-2003
			BR 0307975 A 11-01-2005
			CA 2477178 A1 04-09-2003
			CN 1646163 A 27-07-2005
			EP 1485127 A2 15-12-2004
			JP 2005526045 T 02-09-2005
WO 02070007	A	12-09-2002	CA 2439852 A1 12-09-2002
			CN 1507354 A 23-06-2004
			EP 1372720 A1 02-01-2004
			HU 0303340 A2 29-12-2003
			JP 2004536786 T 09-12-2004
			MX PA03007878 A 08-07-2004
			NO 20033862 A 31-10-2003
			NZ 528076 A 30-09-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
	C 0 7 K 16/00	Z N A
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74) 代理人 100130409
弁理士 下山 治

(74) 代理人 100074583
弁理士 屋代 順治郎

(72) 発明者 リバーバーグ, アイヴァン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 7 0 5 , バークレイ , ヒルクレスト ロード 8 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11
HA01
4C084 AA17 NA14 ZA02 ZA59 ZA66 ZA89 ZA96 ZB05 ZB08 ZC41
4C085 AA14 AA16 AA33 BB31 CC22 CC23 DD62 DD63 EE01 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 FA74