

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5670318号
(P5670318)

(45) 発行日 平成27年2月18日(2015.2.18)

(24) 登録日 平成26年12月26日(2014.12.26)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/24 (2006.01) C O 7 K 16/24
C 1 2 N 1/15 (2006.01) C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21

請求項の数 13 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-511656 (P2011-511656)	(73) 特許権者	510312617
(86) (22) 出願日	平成21年6月1日(2009.6.1)		エックスバイオテック、インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2011-524740 (P2011-524740A)		X B I O T E C H, I N C.
(43) 公表日	平成23年9月8日(2011.9.8)		カナダ ブリティッシュコロンビア州 ヴイ6イー 2イー9, バンクーバー, スイート 300, ウェストヘイスティングス
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/003355		ストリート 1055
(87) 国際公開番号	W02009/148575	(74) 代理人	100096024
(87) 国際公開日	平成21年12月10日(2009.12.10)		弁理士 柏原 三枝子
審査請求日	平成24年5月31日(2012.5.31)	(74) 代理人	100125520
(31) 優先権主張番号	61/057, 586		弁理士 高橋 剛一
(32) 優先日	平成20年5月30日(2008.5.30)	(74) 代理人	100155310
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 柴田 雅仁
(31) 優先権主張番号	61/178, 350		
(32) 優先日	平成21年5月14日(2009.5.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン1 α 抗体及び有用な方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

軽鎖に共有結合した重鎖を含み、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合することを特徴とする精製されたヒトIgG1モノクローナル抗体であって、前記重鎖が配列番号9のアミノ酸配列のうち位置19ないし471のアミノ酸配列：

C Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C T A S G F T F S M F G V H W
V R Q A P G K G L E W V A A V S Y D G S N K Y Y A E S V K G R F T I S R D N S K
N I L F L Q M D S L R L E D T A V Y Y C A R G R P K V V I P A P L A H W G Q G T
L V T F S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S
S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A
P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L
P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y
K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A
L H N H Y T Q K S L S L S P G K ;

を含み、前記軽鎖が配列番号11のアミノ酸配列のうち位置23ないし236のアミノ酸配列：

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q

10

20

Q K P G K A P K L L I Y E A S N L E T G V P S R F S G S G S G S D F T L T I S S
L Q P E D F A T Y Y C Q Q T S S F L L S F G G G T K V E H K R T V A A P S V F I
F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
H Q G L S S P V T K S F N R G E C ;

を含むことを特徴とする精製されたヒト I g G 1 モノクローナル抗体。

【請求項 2】

インターロイキン 1 に特異的に結合するヒト I g G 1 モノクローナル抗体の重鎖をコードする第 1 核酸と、ヒトインターロイキン 1 に特異的に結合するヒト I g G 1 モノクローナル抗体の軽鎖をコードする第 2 核酸とを含み、前記第 1 核酸が配列番号 9 のアミノ酸配列のうち位置 1 9 ないし 4 7 1 のアミノ酸配列：

C Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C T A S G F T F S M F G V H W
V R Q A P G K G L E W V A A V S Y D G S N K Y Y A E S V K G R F T I S R D N S K
N I L F L Q M D S L R L E D T A V Y Y C A R G R P K V V I P A P L A H W G Q G T
L V T F S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S
S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A
P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L
P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y
K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A
L H N H Y T Q K S L S L S P G K ;

をコードし、前記第 2 核酸が配列番号 1 1 のアミノ酸配列のうち位置 2 3 ないし 2 3 6 のアミノ酸配列：

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q
Q K P G K A P K L L I Y E A S N L E T G V P S R F S G S G S G S D F T L T I S S
L Q P E D F A T Y Y C Q Q T S S F L L S F G G G T K V E H K R T V A A P S V F I
F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
H Q G L S S P V T K S F N R G E C ;

をコードすることを特徴とする単離された核酸のセット。

【請求項 3】

前記第 1 核酸が配列番号 9 のアミノ酸配列をコードし、前記第 2 核酸が配列番号 1 1 のアミノ酸配列をコードすることを特徴とする請求項 2 に記載の単離された核酸のセット。

【請求項 4】

第 1 核酸が配列番号 1 0 のヌクレオチド配列を含み、第 2 核酸が配列番号 1 2 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の単離された核酸のセット。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の単離された核酸のセットを含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の単離された核酸のセットを含む発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の単離された核酸のセットを含む発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の単離された核酸のセットを含む単離された宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 3 に記載の単離された核酸のセットを含む単離された宿主細胞において、前記宿主細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする単離された宿主細胞。

【請求項 1 0】

10

20

30

40

50

請求項 4 に記載の単離された核酸のセットを含む単離された宿主細胞において、前記宿主細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする単離された宿主細胞。

【請求項 1 1】

宿主細胞において請求項 2 に記載の単離された核酸のセットを発現することによって産生される、ヒトインターロイキン 1 に特異的に結合する精製されたヒト I g G 1 モノクローナル抗体。

【請求項 1 2】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の精製されたヒト I g G 1 モノクローナル抗体。

【請求項 1 3】

前記哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の精製されたヒト I g G 1 モノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は、それぞれ、2008年5月30日、2008年12月10日及び2009年5月14日に提出された米国仮特許出願第61/057,586号、第61/121,391号、及び第61/178,350号の優先権を主張する。

〔連邦政府がスポンサーとなった研究に関する陳述〕

適用なし

【0002】

〔技術分野〕

本発明は、広くは、免疫学、炎症、癌、血管障害及び医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、インターロイキン 1 (I L - 1) に特異的に結合する抗体 (A b) 、及び、そのような抗体を用いることによって I L - 1 の発現異常に関連した疾病を治療、予防又は検出する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

インターロイキン 1 は、炎症、免疫反応、腫瘍転移及び造血を含む多くの様々な機能において役割を果たす炎症性サイトカインである。インターロイキン 1 に対する I g G 自己抗体は、一般的な人口母集団において自然に生じており、アテローム性動脈硬化などの疾病において有益であると考えられる。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、i) ヒトインターロイキン 1 に対して非常に高い結合親和性を示す抗原結合可変領域、並びに、(i i) C 1 q 結合を通じた補体系の活性化及びいくつかの異なる F c 受容体への結合のいずれにおいても有効な定常領域を含む完全なヒトモノクローナル抗体 (m A b) の開発に基づいている。ここに記載されているヒトインターロイキン 1 特異的モノクローナル抗体は、ヒトインターロイキン 1 に対して特異的な可変領域を有するヒト I g G 4 モノクローナル抗体の定常領域を、ヒト I g G 1 モノクローナル抗体の定常領域で置換することによって作成された。

【0005】

従って、本発明は、軽鎖に共有結合で結合した重鎖を含むモノクローナル抗体である、ヒトインターロイキン 1 に特異的に結合する精製されたヒト I g G 1 モノクローナル抗体を特徴とする。重鎖は、配列番号：9のアミノ酸配列を含んでもよく、軽鎖は、配列番号：11のアミノ酸配列を含んでもよい。

【0006】

インターロイキン 1 に特異的に結合するヒト I g G 1 モノクローナル抗体の重鎖をコードする第 1 核酸、及び、ヒトインターロイキン 1 に特異的に結合するヒト I g G 1 モ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体の軽鎖をコードする第2核酸を含む単離された核酸のセットも本発明の範囲内である。第1核酸は、配列番号：9のアミノ酸配列をコードすることができ、第2核酸は、配列番号：11のアミノ酸配列をコードすることができる。第1核酸は、配列番号：10のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、第2核酸は、配列番号：12のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

【0007】

別の一態様において、本発明は、配列番号：9又は配列番号：11のアミノ酸配列をコードする核酸を含む発現ベクターを特徴とする。

【0008】

本発明の他の特徴は、インターロイキン1 に特異的に結合するヒトIgG1モノクローナル抗体の重鎖をコードする第1核酸、及び、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合するヒトIgG1モノクローナル抗体の軽鎖をコードする第2核酸を含む単離された核酸のセットを含む、単離された宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳動物細胞）である。重鎖は、配列番号：9のアミノ酸配列を含んでいてもよく、軽鎖は、配列番号：11のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0009】

本発明は、ヒトインターロイキン1 を発現する細胞を死滅させる方法をさらに特徴とする。この方法は、細胞を、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する精製されたヒトIgG1モノクローナル抗体に接触させるステップを含んでいてもよい。

【0010】

基底膜マトリクスを経たヒト細胞の移動を阻害する方法も本発明に含まれる。この方法は、基底膜マトリクス及びヒト細胞を含む混合物に、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する精製されたモノクローナル抗体を加えるステップを含んでいてもよい。

【0011】

ヒト内皮細胞の表面におけるインターロイキン1 によって誘導されるICAM-1及び/又はE-セレクトリン発現の増加を阻害する方法も本発明に含まれる。この方法は、内皮細胞及びインターロイキン1 を含む混合物に、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する精製されたモノクローナル抗体を加えるステップを含んでいてもよい。

【0012】

本発明は、以前に以下のステップ：最初に対象から末梢血単核細胞の第1サンプルを得るステップと；その第1サンプルを、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する精製されたモノクローナル抗体に接触させるステップと；及び、モノクローナル抗体に結合する第1サンプル中の細胞のパーセントを決定するステップとに供したヒト対象の炎症を追跡する方法をさらに含む。この方法は、以下のステップ：（a）2回目に対象から末梢血単核細胞の第2サンプルを得るステップと；（b）前記第2サンプルを、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する精製されたモノクローナル抗体に接触させるステップと；（c）モノクローナル抗体に結合する第2サンプル中の細胞のパーセントを決定するステップと；及び、（d）モノクローナル抗体に結合する第1サンプル中の細胞のパーセントを、モノクローナル抗体に結合する第2サンプル中の細胞のパーセントと比較するステップと、を具えていてもよい。

【0013】

前記方法において、精製されたモノクローナル抗体は、軽鎖に共有結合で結合した重鎖を含むヒトIgG1モノクローナル抗体であってもよい。例えば、重鎖は、配列番号：9のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号：11のアミノ酸配列を含む。

【0014】

本発明に含まれるその他の方法は、以下のステップ：（a）ヒト対象から得た生体サンプルを、分子量に従って分子を分離するフィルターを用いて、インターロイキン1 と複合化された完全なIgGを含む第1画分と、100Kda未満の分子を含む第2画分とに濃縮するステップと；及び、（b）第1画分中のインターロイキン1 の量を定量するステップと、を特徴とする。

【0015】

しかし、本発明に含まれるその他の方法は、以下のステップ：(a) ヒト対象から得た血漿のサンプルを、分子量に従って分子を分離するフィルターを用いて、インターロイキン1 と複合化された完全なIgGを含む第1画分と、100Kda未満の分子を含む第2画分とに濃縮するステップと；(b) 第1画分中のIgGが、基質上に固定化された抗ヒトIgG抗体に特異的に結合することを許容する条件下において、固定化された抗ヒトIgG抗体を含む基質に前記第1画分を加えるステップと；(c) 前記基質を洗浄して、固定化された抗ヒトIgG抗体に特異的に結合しない第1画分中の成分を除去するステップと；(d) ステップ(c)において洗浄した基質を、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する抗体が基質に結合したあらゆるヒトインターロイキン1 に特異的に結合することを許容する条件下において、ヒトインターロイキン1 に特異的に結合する抗体に接触させるステップと；(e) 前記基質を洗浄して、基質に結合しないヒトインターロイキン1 に特異的に結合しているあらゆる抗体を除去するステップと；及び、(f) ステップ(e)の後に基質に結合したままのヒトインターロイキン1 に特異的に結合する抗体量を定量するステップとを特徴とする。

10

【0016】

別段の定めがない限り、ここで用いられているすべての技術的用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有している。一般的に理解される生物学的用語の定義は、Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991、及び、Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994において見つけることができる。

20

【0017】

「特異的に結合する」という用語は、ここで用いられているように、ポリペプチド(抗体を含む)又はレセプタに言及する場合、タンパクの異種混合集団及びその他の生物製剤中におけるタンパク又はポリペプチド又はレセプタの存在の決定要因である結合反応を意味する。従って、指定された条件(例えば、抗体の場合における免疫測定条件)において、特定のリガンド又は抗体が、特定のその「ターゲット」に結合し、サンプル中に存在するその他のタンパク又は生体中においてそのリガンド若しくは抗体が接触する可能性があるその他のタンパクに有意な量で結合しない。通常、第2分子に「特異的に結合する」第1分子は、第2分子に対して約 10^5 リットル/モル超(例えば、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 及び 10^{12} 以上)の平衡親和定数を有する。

30

【0018】

「精製された」は、抗体などのタンパク分子に言及する場合、そのような分子に自然に付随する成分から分離されていることを意味する。典型的には、抗体又はタンパクが、非抗体タンパク又は前記抗体又は前記タンパクに自然に付随するその他の天然有機分子を含まずに、重量によって、少なくとも約10%(例えば、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.9%及び100%)であれば、精製されたものである。例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、HPLC解析といったあらゆる適切な方法によって純度を測定することができる。化学的に合成されたタンパク又は天然に存在する細胞型以外の細胞型において生産されたその他の組み換えタンパクは、「精製された」ものである。

40

【0019】

本発明の実施又は試験においては、ここに記載されているものに類似又は同等の方法及び材料を用いることができるが、適切な方法及び材料を以下に記載する。ここで言及されているすべての刊行物は、言及することによってその全体が組み込まれている。紛争の場合には、定義を含む本明細書が規定するであろう。さらに、以下に論じる特定の実施形態は例示的なものに過ぎず、限定するようには意図されていない。

50

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、(i)インターロイキン1 に対する非常に高い結合親和性を示す抗原結合可変領域、並びに、(ii)C1q結合を通じた補体系の活性化及びいくつかの異なるFc受容体への結合のいずれにおいても有効な定常領域を含む完全なヒトモノクローナル抗体に関する組成物及び方法を包含する。以下に記載されている好ましい実施形態は、これらの組成物及び方法の適用を説明する。それにかかわらず、これらの実施形態の説明から以下に提供する説明に基づいて本発明のその他の態様を作成及び/又は実行することができる。

【0021】

従来の免疫学的手法及び分子生物学的手法を含む方法は、本明細書に記載されている。免疫学的手法(例えば、抗原抗体複合体の検出及び位置限定のための分析、免疫沈降、イムノプロットングなど)は、当業界において一般的に知られており、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., ed., John Wiley & Sons, New Yorkなどの方法論の論文に記載されている。分子生物学的手法は、分子クローニング: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001、及び、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New Yorkなどの方法論の論文に詳細に記載されている。抗体手法は、Handbook of Therapeutic Abs, Dubel, S., ed., Wiley-VCH, 2007に記載されている。細胞培養技術は、当業界において一般的に知られており、A Manual of Basic Technique, 4th edition, by R Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2000、及び、and General Techniques of Cell Culture, by Maureen A Harrison and Ian F Rae, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994などの動物細胞培養の方法論の論文に詳細に記載されている。タンパク精製の方法は、Methods in Enzymology, Vol. 182, Deutscher M P, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1990といったタンパク精製のガイドにおいて論じられている。

【0022】

一態様においては、本発明は、(i)ヒトインターロイキン1 に対する非常に高い結合親和性を示す抗原結合可変領域、並びに、(ii)C1q結合を通じた補体系の活性化及びいくつかの異なるFc受容体への結合のいずれにおいても有効な定常領域を含む完全なヒトモノクローナル抗体を特徴とする。ヒト抗体はIgG1であることが好ましい。抗体のKaは、好ましくは少なくとも $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上(例えば、 $9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、 $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 又は $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ よりも多い)である。

【0023】

ヒトインターロイキン1 に対して特異的な免疫グロブリンを発現するBリンパ球がヒトにおいて自然に生じるので、モノクローナル抗体を高める現在の好ましい方法は、まず対象からそのようなBリンパ球を単離し、次いで、培養において連続的に複製できるように不死化させることである。ヒトインターロイキン1 に対して特異的な免疫グロブリンを発現する天然のBリンパ球の大部分を欠損している対象を、1以上のヒトインターロイキン1 抗原を用いて免疫化させてそのようなBリンパ球の数を増加させてもよい。ヒト

モノクローナル抗体は、ヒト抗体分泌細胞（例えば、ヒト血漿細胞）を不死化することによって調製される。例えば、米国特許第4,634,664号を参照されたい。

【0024】

1つの例示的方法においては、1以上（例えば、5、10、25、50、100又は1000以上）のヒト対象（例えば、以前にヒトインターロイキン1 ワクチンを接種されていない対象）を、血液中のそのようなヒトインターロイキン1 特異的抗体の存在について検査する。その後、所望の抗体を発現する対象を、Bリンパ球ドナーとして用いることができる。あり得る1つの方法においては、ヒトインターロイキン1 特異的抗体を発現するBリンパ球を有するヒトドナーから末梢血を得る。その後、そのようなBリンパ球を、例えば、細胞分類（例えば、蛍光活性化細胞選別「FACS」；又は磁気ビーズ細胞選別）によって血液サンプルから分離することによって、ヒトインターロイキン1 特異的免疫グロブリンを発現するBリンパ球を選択する。その後、ウイルス形質転換（例えば、EBVを用いて）によって、又は、公知技術によってヒト骨髓腫などの他の永久増殖細胞に融合させることによって、これらの細胞を不死化することができる。その後、限界希釈（例えば、ヒトインターロイキン1 に対して特異的な免疫グロブリンに対してポジティブなマイクロタイタープレート中のウェル内の細胞を選択して二次培養し、所望のクローン系を分離することができるまでプロセスを繰り返すこと）によって、ヒトインターロイキン1 に対して特異的な免疫グロブリンを発現するこの集団内のBリンパ球を分離することができる。例えば、Goding, Monoclonal Abs: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986を参照されたい。ヒトインターロイキン1 に対して少なくともナノモル又はピコモルの結合親和性を有する免疫グロブリンを発現するクローン細胞株が好ましい。これらのクローン細胞株によって分泌されるモノクローナル抗体を、脱塩、サイズ排除、イオン交換分離及び親和性クロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培地又は体液（例えば腹水）から精製することができる。

【0025】

不死化されたBリンパ球をインビトロ培養に用いてモノクローナル抗体を直接的に生産してもよいが、いくつかの場合においては、異種起源の発現系を用いてモノクローナル抗体を生産することが望ましいこともある。例えば、米国特許出願第11/754,899号に記載されている方法を参照されたい。例えば、ヒトインターロイキン1 に対して特異的なモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローンし、異種起源の宿主細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞及び大腸菌細胞）中の発現用の発現ベクター（例えば、プラスミドベースの発現ベクター）に導入してもよい。免疫グロブリンは、重鎖（H）及び軽鎖（L）をH₂L₂配置で含んでいるので、それぞれをコードする遺伝子を別々に分離して、異なるベクターにおいて発現させてもよい。

【0026】

一般的にはあまり好ましくないキメラモノクローナル抗体に由来した異なる部分（例えば、異なる動物種（例えば、ヒト免疫グロブリンの定常領域に結合したマウス免疫グロブリンの可変領域）を有する抗原結合分子である「ヒト化」モノクローナル抗体）を本発明において用いてもよい。当業界において知られている方法、E.G., Morrison et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81:6851, 1984; Neuberger et al., Nature, 312:604, 1984; Takeda et al., Nature, 314:452, 1984によってそのようなキメラ抗体を調製することができる。同様に、当業界で知られている方法によって抗体をヒト化することができる。例えば、所望の結合特異性を有するモノクローナルの抗体を、米国特許第5,693,762号、第5,530,101号又は第5,585,089号に記載されているように商業的にヒト化することができる。

【0027】

ここに記載されているモノクローナル抗体を、VH及びVLドメインシャフリング(Marks et al. Bio/Technology 10:779-783, 1992)によって生成することも可能である。

10

20

30

40

50

2)、超可変領域のランダムな突然変異誘発(HVR)、及び/又は、骨格残基(Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 91:3809-3813, 1994; Schier et al. Gene 169:147-155, 1995; Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9, 1995; 及び、Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896, 1992)などの公知の方法によって、結合特異性を高める又は他の方法で変更するために親和性成熟してもよい。抗体のアミノ酸配列変異は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な変異を導入することによって作成していてもよい。さらに、モノクローナル抗体をコードする核酸配列への修飾を、ある発現系におけるモノクローナル抗体の生産を高めるように(例えばモノクローナル抗体のアミノ酸配列を変化させることなく)変更してもよい(例えば、イントロン除去及び/又は規定の発現系に対するコドン最適化)。ここに記載されているモノクローナル抗体は、その他のタンパク(例えば、他のモノクローナル抗体)又は非タンパク分子への接合によっても修飾することができる。例えば、モノクローナル抗体を、ポリエチレングリコール又はカーボンナノチューブなどの水溶性ポリマーに結合させてもよい(例えば、Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005を参照されたい)。米国特許出願第11/754,899号を参照されたい。

【0028】

最小限の副作用で対象に投与することができる高い力価のヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体を確かなものにするために、本発明のモノクローナル抗体組成物は、(あらゆる添加剤を除いて)少なくとも0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、95、96、97、98、99又は99.9重量%純粋であることが好ましい。本発明のモノクローナル抗体組成物は、1種類のモノクローナル抗体(すなわち、単一のクローンBリンパ球株から作られるもの)のみを含んでいてもよいし、又は、2種類以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10種類以上)の異なるモノクローナル抗体の混合物を含んでいてもよい。ヒトインターロイキン1 モノクローナル抗体に加えて、本発明の抗体組成物は、ヒトインターロイキン1 以外の抗原に特異的に結合するその他のモノクローナル抗体を含んでいてもよい。

【0029】

ヒトインターロイキン1 モノクローナル抗体を、細胞毒素又は検出可能なラベルなどの他の分子に結合させて、機能を変化又は強化してもよい。ヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体を1つ以上の細胞毒素に結合させて、インターロイキン1 を発現する細胞をより効果的に死滅させてもよい。本発明で使用する細胞毒素は、ヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体に結合させることができるあらゆる細胞毒性薬(例えば、細胞と接触した後にその細胞を殺すことができる分子)であってもよい。細胞毒素の例は、限定されるものではないが、放射性核種(例えば、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{201}Tl 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{67}Cu 、 ^{213}Bi 及び ^{211}At)、結合した放射性核種及び化学療法剤を含む。さらに、細胞毒素の例は、限定されるものではないが、代謝拮抗物質(例えば、5-フルオロウラシル(5-FU)、メトトレザト(MTX)、フルダラビンなど)、抗微小管薬剤(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、タキサン(パクリタキセル及びドセタセルなど)など)、アルキル化薬(例えば、シクロホスファミド、メルファラン、ビスクロロエチルニトロソ尿素(BCNU)など)、白金薬剤(例えば、シスプラチン(cDDPとも呼ばれる)、カルボプラチン、オキサリプラチン、JM-216、CI-973など)、アントラサイクリン(例えば、ドキソルピシン、ダウノルピシンなど)、抗生物質(例えば、マイトマイシンC)、トポイソメラーゼ阻害剤(例えばエトポシド、テニポシド及びカンプトテシン)、又は、(リシン、ジフテリア毒素(DT)、シュードモナス菌体外毒素(PE)A、PE40、アブリン、サボリン、アメリカヤマゴボウウィル

スタンパク、臭化エチジウム、グルココルチコイド、炭疽毒素などの)その他の細胞毒性薬を含む。例えば、米国特許第5,932,188号を参照されたい。

【0030】

検出可能なラベルにヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体を結合させることもできる。本発明において有用な検出可能なラベルは、ビオチン又はストレプトアビジン、磁気ビーズ、蛍光染料(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパクなど)、放射標識(例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 又は ^{72}As)、放射性イメージングのための金属などの放射線不透過性物質、磁気共鳴画像のための常磁性薬剤、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、E L I S Aにおいて一般的に用いられるその他のもの)、コロイド金若しくは有色ガラスなどの比色定量ラベル、又は、プラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズを含む。そのようなラベルを検出する手段は当業者に周知である。従って、例えば、写真フィルム又はシンチレーション計数器を用いて放射標識を検出してもよい。蛍光マーカーを用いてもよく、放射された光束を光検出器を用いて検出することによって、蛍光マーカーを検出することができる。酵素ラベルは、一般的には、酵素に基質を提供し、基質に対する酵素の作用によって生じた反応生成物を検出することによって検出される。比色定量ラベルは、単純に有色ラベルを視覚化することによって検出される。

【0031】

本発明は、ヒトインターロイキン1 に対して特異的なヒトモノクローナル抗体をコードする完全な核酸分子を包含する。同じ核酸分子がヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の両方をコードしてもよいが、重鎖をコードする1つの核酸と、軽鎖をコードするもう1つの核酸との2つの異なる核酸分子を用いてもよい。ヒトインターロイキン1 に対して特異的な3つのI g G 1モノクローナル抗体のアミノ酸配列を与える。配列番号1、3、5、7、9及び11を参照されたい。また、これらのアミノ酸配列をコードする例示的核酸分子を記載する。配列番号2、4、6、8、10及び12を参照されたい。2つの記載されているI g G 1モノクローナル抗体又は本発明に含まれるその他のモノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードするその他のあらゆる適切な核酸を用いてもよい。

【0032】

モノクローナル抗体の生産のために、本発明の核酸分子は、そのような核酸分子が作用可能な状態で転写制御配列及び翻訳制御配列などの発現制御配列に連結される方向で発現ベクター中に組み込まれていてもよい。発現ベクターの例は、プラスミドに由来するベクター、並びに、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及びレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクターを含む。軽鎖及び重鎖をコードする核酸分子は、単一のベクターに組み込まれていてもよいし、又は、異なるベクターに組み込まれていてもよい。本発明のベクターは、プロモータ及び/若しくはエンハンサなどの調節配列(米国特許第5,168,062号、米国特許第4,510,245号及び米国特許第4,968,615号を参照されたい)、選択マーカ、又は、親和性タグ(精製を容易にするためのもの)若しくは検出可能なラベルをコードする配列を含んでいてもよい。

【0033】

モノクローナル抗体の生産のために、本発明のベクターを、例えば、バクテリアなどの原核細胞、又は、好ましくは哺乳動物、植物又は酵母などの真核細胞といった適切な宿主細胞中に導入することができる。宿主細胞中に異種起源のポリヌクレオチドを導入する方法の例は、ウイルスベクターの使用、エレクトロポレーション、リボソーム中へのポリヌクレオチドのカプセル化、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、アグロバクテリウム媒介性トランスフォーメーション、遺伝子銃トランスフォーメーション、及び、核内へのDNAの直接的マイクロインジェクションを含む。現在のところ、哺乳動物細胞株は、

ベクターからのモノクローナル抗体の発現に好ましい。哺乳動物宿主細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、DG44CHO細胞株）、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、293フリースタイル細胞及びNIH-3T3細胞を含む。本発明のモノクローナル抗体は、トランスジェニック動物又はトランスジェニック植物において発現されてもよい。例えば、米国特許第5,827,690号；第5,756,687号；第5,750,172号；第5,741,957号；第6,046,037号；及び第5,959,177号を参照されたい。

【0034】

本発明は、細胞をヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体と接触させてその細胞に結合したモノクローナル抗体を検出することによって、サンプル中のヒトインターロイキン1 を発現する細胞を検出する方法を提供する。本発明は、細胞をヒトインターロイキン1 特異的モノクローナル抗体と接触させることによってヒトインターロイキン1 を発現する細胞を死滅させる方法をも提供する。そのような死滅は、補体媒介性障害、抗体依存的細胞媒介性細胞傷害、又は、細胞毒素の抗体媒介性送達によって達成することができる。ここに記載されている抗体は、その他の方法にも有用であることが示されている。例えば、MABp1は、インターロイキン1 によって誘導される内皮細胞におけるICAM1及びE-セレクトイン発現を減少させている。MABp1は、生体サンプル中のインターロイキン1 の検出及び定量的ための免疫測定に用いられることが示されている。

【0035】

実施例1 - 抗ヒトインターロイキン1 IgG1及び鎖のクローニング

可変領域重鎖（V-HC）及び可変領域軽鎖（V-LC）の配列は、米国特許第5,959,085号で提供されているアミノ酸配列情報を用いて合成される遺伝子であった。ATG開始コドンの上流にHindIII/ClaI部位を導入し、3'末端にNheI部位を導入して、V-HCをPCR増幅させた。ヒト生殖細胞IgG1定常領域（エキソン及びイントロンを含む）を、最初の2個のアミノ酸Ala-Serをコードする5'トリプレットをNheI部位に組み換えて、3'末端にBamHI部位を導入して、PCR増幅させた。ヒト生殖細胞IgG1定常領域アミノ酸配列は、K171Q及びV261L交換を除いて、Swiss-ProtエントリーP01857に対応していた。V-HC配列と定常IgG1-HC配列とをNheI部位を用いて結合し、HindIII及びBamHI部位を用いてpCDNA3中にクローンした。

【0036】

>ヒトインターロイキン1 - IgG1-HC

```
MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CTASGFTTFSMFGVHWVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYA
ESVKGRFTISRDN SKNIFLQMDSLRLED TAVYYCARGRP
KVVIPAPLAHWGQGT LVTFS SASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSLVVTVPS SSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCTPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAQTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IALEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 1)
```

【0037】

>ヒトインターロイキン1 - IgG1-HC

```
atggaggttcgggctgagttggggtgttccctgggtggctctgctc
```

t g c g g g c g t g c a g t g c c a g g t g c a g c t g g t g g a g a g t g g
 g g g t g g c g t g g t g c a g c c t g g c c g g t c t c t g c g c c t g t c t
 t g c a c t g c c t c c g g t t t t a c c t t t t c t a t g t t t g g t g t g c
 a c t g g g t g c g c c a g g c t c c c g g c a a g g g a c t g g a a t g g g t
 g g c c g c c g t g a g t t a c g a c g g g t c c a a c a a a t a t t a c g c t
 g a g a g c g t g a a a g g c a g a t t c a c c a t c a g c a g a g a t a a t t
 c c a a g a a t a t t c t g t t c c t g c a g a t g g a c a g t c t g a g a c t
 g g a g g a c a c t g c t g t g t a c t a c t g c g c t c g t g g a c g c c c t
 a a g g t g g t c a t c c c c g c c c c c t g g c a c a t t g g g g c c a g g
 g a a c t c t g g t g a c c t t t t c t a g c g c t a g c a c c a a g g g c c c
 a t c g g t c t t c c c c c t g g c a c c c t c c t c c a a g a g c a c c t c t
 g g g g c a c a g c g g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t
 t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t
 g a c c a g c g g c g t c c a c a c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c
 t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g t a g t g a c c g t g c c c t
 c c a g c a g c t t g g g c a c c c a g a c c t a c a t c t g c a a c g t g a a
 t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g t g g a c a a g a a a g t t g a g
 c c c a a a t c t t g t g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c
 c a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t
 c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c
 c c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g
 a c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a
 g g t g c a t a a t g c c c a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c
 a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c
 a c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t
 c t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c
 t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a
 c c c t g c c c c c a t c c c g g g a t g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t
 c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c
 a t c g c c c t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a
 a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c
 c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g
 t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g
 a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c t t
 a a g t c c g g g a a a a t a a (配列番号 : 2)

【 0 0 3 8 】

A T G 開始コドンの上流に H i n d I I I / C l a I 部位を導入し、3' 末端に B s i
 W I 部位を導入して、V - L C を P C R 増幅させた。付加された A r g 及び第 1 アミノ酸
 T h r をコードする 5' B s i W I 部位を導入し、3' 末端に B a m H I 部位を導入して
 、ヒト定常カップ L C 配列を P C R 増幅させた。ヒト定数カップ L C アミノ酸配列は、S
 w i s s - P r o t エントリー P 0 1 8 3 4 に対応していた。B s i W I 部位を用いて V
 - H C 配列と定常カップ L C 配列とを結合し、H i n d I I I 及び B a m H I 部位を用い
 て p c D N A 3 中にクローンした。

【 0 0 3 9 】

> ヒトインターロイキン 1 - K - L C

M D M R V P A Q L L G L L L L W F P G S R C D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R
 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y E A S N L E T G V
 P S R F S G S G S G S D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T S S F L L S F
 G G G T K V E H R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F
 Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L

T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C [配列番号 : 3]

【 0 0 4 0 】

> ヒトインターロイキン 1 - K - L C

a t g g a c a t g c g c g t g c c c g c c c a g c t g c t g g g g c t g c t g c
t g c t g t g g t t c c c t g g a t c t a g g t g c g a c a t t c a g a t g a c
c c a g t c c c c c a g c t c a g t g t c a g c c t c c g t g g g c g a c a g a
g t g a c a a t c a c c t g c c g c g c c t c t c a g g g a a t c t c t a g t t
g g c t g g c c t g g t a c c a g c a g a a g c c t g g a a a g g c c c c c a a
g c t g c t g a t c t a t g a a g c c t c c a a c c t g g a g a c c g g c g t g
c c c t c t c g c t t c a g c g g c t c a g g c t c a g g c a g t g a t t t t a
c t c t g a c c a t c a g c t c c c t g c a g c c a g a g g a t t t c g c t a c
t t a c t a c t g c c a g c a g a c c t c t t c c t t c c t g c t g t c c t t c
g g g g g a g g c a c a a a g g t g g a g c a c c g t a c g g t g g c t g c a c
c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a t c t g a t g a g c a g t t g a a
a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t g c c t g c t g a a t a a c t t c
t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g
c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a
g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a g c c t c a g c a g c a c c c t g
a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a a c a c a a a g t c t a c g
c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c c t g a g t t c a c c g g t g a c
a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t g t t a g [配列番号 : 4]

【 0 0 4 1 】

実施例 2 - N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 - I g G 1 及び 鎖の生成

N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 / I g G 1 重鎖をコードする完全な配列を
遺伝子合成した。V - H C 配列は、米国特許第 5 , 9 5 9 , 0 8 5 号に記載されているア
ミノ酸配列に対応していた。ヒト定常 I g G 1 - H C 配列は、S w i s s - P r o t エン
トリー P 0 1 8 5 7 に対応していた。このヌクレオチド配列は、C H O 細胞における発現
に最適化されたコドンであった。K o z a c 配列 (g c c a c c) を開始 A T G の上流に
加えた。

【 0 0 4 2 】

> N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 - I g G 1 - H C

M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S
C T A S G F T F S M F G V H W V R Q A P G K G L E W V A A V S Y D G S N K Y Y A
E S V K G R F T I S R D N S K N I L F L Q M D S L R L E D T A V Y Y C A R G R P
K V V I P A P L A H W G Q G T L V T F S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S
G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T
P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K [配列番号 : 5]

【 0 0 4 3 】

> N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 - I g G 1 - H C

g c c a c c a t g g a g t t t g g t c t g t c c t g g g t g t t c t t g g t g g
c t c t g c t g a g g g g g t g c a g t g c c a g g t c c a g c t g g t g g a
g t c t g g t g g g g a g t g g t g c a g c c t g g g a g a t c t c t g c g g
c t g t c t t g c a c t g c c t c t g g t t t c a c t t t c t c t a t g t t t g

g t g t g c a t t g g g t c a g g c a a g c a c c a g g c a a a g g a c t c g a
 g t g g g t c g c a g c t g t g a g c t a t g a c g g g t c t a a c a a a t a t
 t a c g c t g a g t c t g t c a a g g g t a g g t t t a c c a t c a g c c g g g
 a t a a t t c c a a a a t a t c c t g t t c c t g c a a a t g g a c t c t c t
 g a g g c t g g a a g a t a c t g c a g t c t a c t a t t g t g c a a g g g g g
 a g g c c a a a g g t g g t g a t c c c c g c t c c c c t c g c t c a c t g g g
 g a c a g g g a a c c c t g g t g a c t t t c a g c t c t g c t a g c a c c a a
 g g g c c c t a g c g t g t t c c c a t t g g c t c c t t c c t c c a a a t c t
 a c t t c t g g a g g c a c c g c c g c c c t g g g a t g t c t c g t g a a a g
 a t t a t t t t c c t g a g c c c g t c a c c g t g a g c t g g a a c a g c g g
 c g c c c t g a c t a g c g g c g t g c a c a c c t t t c c c g c a g t g c t g
 c a a t c t a g c g g g c t g t a c t c c c t g a g c t c t g t c g t g a c c g
 t g c c c t c c a g c a g c c t c g g a a c t c a g a c c t a c a t c t g c a a
 t g t c a a t c a t a a a c c c t c t a a t a c c a a a g t c g a t a a g a a g
 g t c g a a c c t a a a t c t t g c g a t a a a a c c c a t a c c t g c c c c c
 c t t g c c c a g c a c c c g a a c t g c t g g g c g g t c c c t c t g t g t t
 t c t g t t c c c c c c a a a c c c a a a g a t a c c c t g a t g a t c t c t
 a g g a c c c c c g a g g t c a c t t g t g t c g t g g t g g a t g t g t c c c
 a c g a a g a t c c a g a a g t c a a a t t c a a c t g g t a t g t g g a c g g
 g g t c g a a g t g c a c a a c g c a a a g a c c a a g c c t a g g g a g g a a
 c a g t a t a a t a g c a c a t a t a g g g t g g t c a g c g t c c t g a c c g
 t c c t g c a t c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a a g a a t a t a a g t g
 t a a a g t g t c c a a c a a g g c c c t g c c a g c c c c a a t c g a a a a g
 a c a a t c t c t a a a g c c a a g g g g c a a c c c c g g g a a c c t c a g g
 t c t a t a c a c t g c c a c c c t c t c g g g a t g a a c t g a c c a a g a a
 t c a g g t g a g c c t g a c a t g t c t t g t g a a g g g t t t t t a t c c c
 t c c g a c a t t g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g a c a a c c a g
 a a a a t a a c t a c a a a a c c a c a c c c c c t g t g c t g g a c t c c g a
 t g g t t c c t t c t t c c t c t a c t c t a a g c t g a c a g t g g a t a a g
 t c t a g g t g g c a g c a g g g g a a t g t g t t c t c c t g c t c t g t g a
 t g c a c g a g g c a c t g c a c a a t c a t t a t a c a c a a a a g t c t c t
 g t c t c t g t c t c c a g g a a a g t a a [配列番号 : 6]

【 0 0 4 4 】

NATHMAB - ヒトインターロイキン 1 / 軽鎖をコードする完全な配列を遺伝子
 合成した。V - L C 配列は、米国特許第 5 , 9 5 9 , 0 8 5 号に記載されているアミノ酸
 配列に対応していた。ヒト定常カッパ L C 配列は、S w i s s - P r o t エントリー P 0
 1 8 3 4 に対応していた。このヌクレオチド配列は、C H O 細胞の発現に最適化されたコ
 ドンであった。K o z a c 配列 (g c c a c c) を A T G の上流に加えた。

【 0 0 4 5 】

> NATHMAB - ヒトインターロイキン 1 - K - L C
 MDMRVPAQLLGLLLWFP GSRCDIQMTQSPSSVSASVGD R
 VTITCRASQG ISSLAWYQQKPKGKAPKLLIYEASNLE TGV
 PSRFSGSGSGSDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQTSSSFLLSF
 GGGTKVEHTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC [配列番号 :
 7]

【 0 0 4 6 】

> NATHMAB - ヒトインターロイキン 1 - K - L C
 g c c a c c a t g g a c a t g c g c g t t c c t g c c c a g c t c c t c g g a c

t g c t g c t g c t t t g g t t c c c a g g c t c c c g g t g t g a t a t t c a
g a t g a c a c a g t c t c c c t c c t c c g t a t c t g c a t c c g t g g g c
g a c a g g g t c a c a a t c a c t t g t a g g g c c a g c c a g g g g a t c t
c t a g t t g g c t c g c a t g g t a c c a a c a a a g c c a g g t a a g g c
t c c g a a a c t g c t c a t t t a c g a a g c t a g t a a c c t c g a a a c a
g g c g t g c c a a g c c g g t t t a g c g g c t c c g g t t c c g g t t c t g
a c t t c a c c c t c a c t a t t t c c t c c c t g c a a c c t g a g g a t t t
t g c c a c a t a t t a c t g t c a g c a a a c t t c t t c t t t t c t g c t c
t c c t t t g g t g g g g a a c t a a g g t g g a g c a c a c a g t g g c c g
c c c c c a g c g t c t t t a t c t t c c c c c a a g c g a t g a a c a g c t
g a a g t c a g g g a c c g c c a g c g t g g t c t g c c t g c t c a a t a a t
t t t t a c c c t c g c g a g g c t a a g g t c c a a t g g a a a g t g g a t a
a c g c c c t c c a g a g c g g t a a c t c t c a g g a g t c t g t c a c a g a
g c a a g a c a g c a a g g a t a g c a c c t a t t c c c t c t c c a g c a c c
c t g a c a c t g t c t a a g g c c g a c t a c g a g a a a c a c a a a g t g t
a c g c t t g t g a g g t g a c t c a c c a g g g a c t g a g t a g c c c t g t
g a c a a a a t c t t t c a a t a g g g g a g a a t g c t g a [配列番号： 8]

【 0 0 4 7 】

実施例 3 - N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 (I g G 1 / k サブタイプ) の発
現

N A T H M A B - インターロイキン 1 を一時的トランスフェクション方法を用いて発
現させ、精製した。細胞培養上澄み又は G タンパク質親和性精製された抗体を、以下に記
載されているさらなる分析に供した。ヒト胎児腎臓 (H E K) 2 9 3 T 細胞を、 1 0 % F
C S を含む D M E M 中で培養し、製造社のプロトコルに従って j e t P E I 試剤 (P o l
y p l u s) を用いて一時的にトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 4 時間
前に 1 0 c m のディッシュ上に細胞を撒き (1 0 c m のディッシュ当たり 3×10^6 細
胞)、トランスフェクション時に約 5 0 % の密度に達するようにした。ディッシュ当たり
5 μ g の p c D N A 3 - 抗ヒトインターロイキン 1 - I g G 1 - H c 及び 2 倍モル過剰
量の p c D N A 3 - 抗ヒトインターロイキン 1 - K a p p a をトランスフェクションに
用いた。回収後に、媒体を、 2 % F C S を含む D M E M (1 ディッシュ当たり 1 0 m l)
に変更し、 5 ~ 6 日間抗体を回収した。上澄みを回収し、ろ過し、p H 7 . 5 ~ 8 に調整
して、さらなる使用まで 4 で保存した。

【 0 0 4 8 】

上澄み (2 5 0 m l) の一部を、回転ホイール上で 4 において G タンパクセファロー
ス (G E H e a l t h c a r e) と共に 3 時間インキュベートした。その後、G タンパ
クセファロースを重力流カラムにロードし、P B S で洗浄した。1 0 0 m M のグリシン /
1 5 0 m M の N a C l を含む 1 0 0 μ l の T r i s (p H 8) を用い、その後の 1 0 % グ
リセロールを含む P B S による透析によって、1 m l の画分中に抗体を溶出させた。B C
A タンパク検出キット (P i e r c e) を用いて各画分の総タンパク濃度を測定した。S
D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって重鎖及び軽鎖の正確なサイズ並びに組み立
てられた天然抗体の正確なサイズを確認した。

【 0 0 4 9 】

N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 精製抗体及び生成 H E K 2 9 3 T 細胞のト
リトン X - 1 0 0 細胞溶解物を含む上澄みを用いて、 125 I - インターロイキン 1 を
用いた放射免疫定量法 (R I A) における抗原結合について試験を行った。タンパク G へ
の吸着によって結合を定量した。すべてのサンプルは、溶出液中において最も高い活性で
 125 I - ヒトインターロイキン 1 に結合した。0 . 0 1 2 % 濃度 (R I A において最
大半量の活性) の精製された N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 の 125 I - ヒ
トインターロイキン 1 に対する結合を、親和係数の測定に用いた。これらの条件下にお
ける N A T H M A B - ヒトインターロイキン 1 の K a は、 $3 . 0 3 \times 10^{-10}$ M \cdot $^{-1}$ で

あった。逆算によって、精製された溶出液中の活性抗ヒトインターロイキン1 - I g Gの濃度が推定的に約30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることが明らかになった。

【0050】

マウス又はヒトインターロイキン1 で処理を行うと高いレベルのインターロイキン2を生成するマウスEL4 - 6 . 1 亜系統を用いた生物的分析において、NATHMAB - ヒトインターロイキン1 の中和活性を試験した (Zubler et al., J. Immunol. 134: 3662 - 3668, 1985)。示されている濃度のNATHMAB - ヒトインターロイキン1 (溶出液)を、96ウェル培養プレート(平底)内において、最終体積が100 μl /ウェルの様々な濃度の組み換えのヒトインターロイキン1 (eBioscience)と共に37 で30分間インキュベートした。各ポイント

10

を培地(DMEM、5% FCS)中において3回反復して実行した。0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のイオノマイシンを含む培地中のEL4 - 6 . 1細胞(5×10^5 細胞/ ml)の懸濁液100 μl を各ウェルに加えた。5% CO₂ インキュベータ内において37 で24時間のインキュベートした後に、細胞が含まれていない上澄みを回収し、市販のELISA (R&D Systems)を用いて、インターロイキン2濃度について分析した。その結果は、NATHMAB - インターロイキン1 が、ヒトインターロイキン1 で誘導されたEL - 4細胞によるインターロイキン2の分泌を有効に中和することができることを示した。

【0051】

膜結合ヒトインターロイキン1 の中和について試験を行うために、上記されている同じEL - 4細胞ベースの分析を以下のように変更して用いた。様々な濃度のNATHMAB - ヒトインターロイキン1 (溶出液)を、様々な数のヒト活性化単球と共にインキュベートした。単球を調製するために、フィコール・バック遠心分離機を用いて、軟膜からPBMCを分離した。RPMI中において単球を37 で1.5時間にわたってプラスチックディッシュ上に付着させた。付着していないリンパ球を洗い流してほぼ純粋な単球培地を作った。Gln、Pyr及び10% FCSを含むRPMI中において、単球を、LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と共に、5% CO₂ 炭酸インキュベータ内において37 で24時間培養した。細胞を、PBS / 2 mMのEDTAを用いて分離し、慎重にプレートからこすり落とし、ファルコンチューブ内に移した。細胞を、PBSで2回洗浄し、PBS / 1% PFA中に再懸濁し、20 において10分間固定した。細胞を、グリシンバッファ (150 mMのグリシン、75 mMのNaCl、pH 7.4)で洗浄し、次いで培養液で洗浄し、数をカウントした。その結果は、NATHMAB - ヒトインターロイキン1 が、膜結合ヒトインターロイキン1 で誘導されたEL - 4細胞によるインターロイキン2分泌を有効に中和することを示した。上述されているものと類似の試験において、マウスインターロイキン1 の中和についてNATHMAB - ヒトインターロイキン1 を試験した。示されている量のNATHMAB - ヒトインターロイキン1 上澄みを、組み換えヒト(h)又はマウス(m)インターロイキン1 (eBioscience)と共にインキュベートした。抗体を含む上澄みは、ヒトインターロイキン1 を中和したが、マウスインターロイキン1 を中和しなかった。

20

30

【0052】

実施例4 - 抗体による癌細胞の死滅

標準的フィコールバック調製によって軟膜から分離されたヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、RPMI - 1640 CM又は組み換えヒトインターロイキン2 (30ナノグラム/ ml 、eBioscience)を含むRPMI - 1640 - CMのいずれかにおいて、37 及び5% CO₂ 中で一晩培養し、作動細胞(E)として用いた。THP1細胞をターゲット(T)として用いた。96ウェルプレートにおいて各ポイントを3回反復して分析を実行した。1 $\times 10^4$ 個のターゲットを様々な濃度のMABp1と共に15分間インキュベートした後に、1 $\times 10^4$ 個のターゲットに25:1及び50:1のET比で作動細胞を加え、さらに4時間培養した。75 μl の分析体積を、新しい96ウェルプレートに移し、LDH細胞毒性検出キット(Roche)を用いて製造社のプロトコルに従っ

40

50

て細胞毒性を分析した。

% 特異的細胞溶解 = (平均試験放出 - 抗体を含まない平均自然放出) × 100 / (ターゲットからの平均最大放出 - ターゲットからの平均自然放出)

A . 処理していない P B M C を作動細胞として用いた。

B . 組み換えヒトインターロイキン 2 で処理した P B M C を作動細胞として用いた。

いずれの場合においても、M A B p 1 の濃度 (1 . 25 ~ 20 μ g / m l) を増加させることは、両方の E T 比においてターゲット細胞殺傷の増大 (約 90 % まで) をもたらした。

【 0053 】

実施例 5 - ヒト抗ヒトインターロイキン 1 特異的モノクローナル抗体配列

10

ヒトインターロイキン 1 (M A B p 1) に対して特異的なもう 1 つのヒト抗 - ヒトインターロイキン 1 I g G 1 / 軽鎖をコードする完全な配列を合成して上記のように発現させた。重鎖及び軽鎖をコードする核酸中に、開始 A T G の上流に K o z a c 配列 (g c c a c c) を加えた。

【 0054 】

重鎖

M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S
C T A S G F T F S M F G V H W V R Q A P G K G L E W V A A V S Y D G S N K Y Y A
E S V K G R F T I S R D N S K N I L F L Q M D S L R L E D T A V Y Y C A R G R P
K V V I P A P L A H W G Q G T L V T F S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S
G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T
P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K [配列番号 : 9]

20

g c c a c c a t g g a g t t t g g t c t g t c c t g g g t g t t c t t g g t g g
c t c t g c t g a g g g g g t g c a g t g c c a g g t c c a g c t g g t g g a
g t c t g g t g g g g a g t g g t g c a g c c t g g g a g a t c t c t g c g g
c t g t c t t g c a c t g c c t c t g g t t t c a c t t t c t c t a t g t t t g
g t g t g c a t t g g g t c a g g c a a g c a c c a g g c a a a g g a c t c g a
g t g g g t c g c a g c t g t g a g c t a t g a c g g g t c t a a c a a a t a t
t a c g c t g a g t c t g t c a a g g g t a g g t t t a c c a t c a g c c g g g
a t a a t t c c a a a a a t a t c c t g t t c c t g c a a a t g g a c t c t c t
g a g g c t g g a a g a t a c t g c a g t c t a c t a t t g t g c a a g g g g g
a g g c c a a a g g t g g t g a t c c c c g c t c c c c t c g c t c a c t g g g
g a c a g g g a a c c c t g g t g a c t t t c a g c t c t g c t a g c a c c a a
g g g c c c t a g c g t g t t c c c a t t g g c t c c t t c c t c c a a a t c t
a c t t c t g g a g g c a c c g c c g c c c t g g g a t g t c t c g t g a a a g
a t t a t t t t c c t g a g c c c g t c a c c g t g a g c t g g a a c a g c g g
c g c c c t g a c t a g c g g c g t g c a c a c c t t t c c c g c a g t g c t g
c a a t c t a g c g g g c t g t a c t c c c t g a g c t c t g t c g t g a c c g
t g c c c t c c a g c a g c c t c g g a a c t c a g a c c t a c a t c t g c a a
t g t c a a t c a t a a a c c c t c t a a t a c c a a a g t c g a t a a g a g g
g t c g a a c c t a a a t c t t g c g a t a a a a c c c a t a c c t g c c c c c
c t t g c c c a g c a c c c g a a c t g c t g g g c g g t c c c t c t g t g t t
t c t g t t c c c c c c a a a c c c a a a g a t a c c c t g a t g a t c t c t

30

40

50

a g g a c c c c g a g g t c a c t t g t g t c g t g g t g g a t g t g t c c c
 a c g a a g a t c c a g a a g t c a a a t t c a a c t g g t a t g t g g a c g g
 g g t c g a a g t g c a c a a c g c a a a g a c c a a g c c t a g g g a g g a a
 c a g t a t a a t a g c a c a t a t a g g g t g g t c a g c g t c c t g a c c g
 t c c t g c a t c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a a g a a t a t a a g t g
 t a a a g t g t c c a a c a a g g c c c t g c c a g c c c c a a t c g a a a a g
 a c a a t c t c t a a a g c c a a g g g g c a a c c c c g g g a a c c t c a g g
 t c t a t a c a c t g c c a c c c t c t c g g g a g g a a a t g a c c a a g a a
 t c a g g t g a g c c t g a c a t g t c t t g t g a a g g g t t t t t a t c c c
 t c c g a c a t t g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g a c a a c c a g
 a a a a t a a c t a c a a a a c c a c a c c c c c t g t g c t g g a c t c c g a
 t g g t t c c t t c t t c c t c t a c t c t a a g c t g a c a g t g g a t a a g
 t c t a g g t g g c a g c a g g g g a a t g t g t t c t c c t g c t c t g t g a
 t g c a c g a g g c a c t g c a c a a t c a t t a t a c a c a a a a g t c t c t
 g t c t c t g t c t c c a g g a a a g t a a [配列番号 : 10]

10

【 0 0 5 5 】

軽鎖

M D M R V P A Q L L G L L L L W F P G S R C D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R
 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y E A S N L E T G V
 P S R F S G S G S G S D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T S S F L L S F
 G G G T K V E H K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C [配列番
 号 : 11]

20

g c c a c c a t g g a c a t g c g c g t t c c t g c c c a g c t c c t c g g a c
 t g c t g c t g c t t t g g t t c c c a g g c t c c c g g t g t g a t a t t c a
 g a t g a c a c a g t c t c c c t c c t c c g t a t c t g c a t c c g t g g g c
 g a c a g g g t c a c a a t c a c t t g t a g g g c c a g c c a g g g g a t c t
 c t a g t t g g c t c g c a t g g t a c c a a c a a a a g c c a g g t a a g g c
 t c c g a a a c t g c t c a t t t a c g a a g c t a g t a a c c t c g a a a c a
 g g c g t g c c a a g c c g g t t t a g c g g c t c c g g t t c c g g t t c t g
 a c t t c a c c c t c a c t a t t t c c t c c c t g c a a c c t g a g g a t t t
 t g c c a c a t a t t a c t g t c a g c a a a c t t c t t c t t t t c t g c t c
 t c c t t t g g t g g a g g a a c t a a g g t g g a g c a c a a g c g g a c a g
 t t g c t g c t c c t a g c g t c t t t a t c t t c c c t c c a a g c g a t g a
 a c a g c t g a a g t c a g g g a c c g c c a g c g t g g t c t g c c t g c t c
 a a t a a t t t t t a c c c t c g c g a g g c t a a g g t c c a a t g g a a a g
 t g g a t a a c g c c c t c c a g a g c g g t a a c t c t c a g g a g t c t g t
 c a c a g a g c a a g a c a g c a a g g a t a g c a c c t a t t c c c t c t c c
 a g c a c c c t g a c a c t g t c t a a g g c c g a c t a c g a g a a a c a c a
 a a g t g t a c g c t t g t g a g g t g a c t c a c c a g g g a c t g a g t a g
 c c c t g t g a c a a a a t c t t t c a a t a g g g g a g a a t g c t g a [配列
 番号 : 12]

30

40

【 0 0 5 6 】

実施例 6 - M A B p 1 結合親和性

B I A c o r e 2 0 0 0 装置 (G E H e a l t h S c i e n c e s) による表面プ
 ラズモン共鳴 (S P R) を用いて、精製 M A B p 1 の結合親和性を決定した。ヒト抗体捕
 捉キット及びアミンカップリングキット (G E H e a l t h S c i e n c e s) を用
 いて、マウスモノクローナル抗ヒト I g G (F c) 抗体を、C M 5 センサチップのフロー

50

セル上に共有結合で固定化した。典型的には8000 - 14000 RUの固定化レベルが達成されるであろう。マウス抗ヒトIgG (Fc) 捕捉抗体の固定化の後に、HBS - EP 泳動バッファ (GE Health Sciences) を用いた3回のスタートアップサイクル及びMABp1を用いた2回のスタートアップサイクルを実行して、CM5表面を安定化し、共有結合しないあらゆる抗体を除去した。分析のために、MABp1抗体を、HBS - EP 泳動バッファ中で1 µg / mlの最終濃度に希釈し、CM5 センサチップの1個のフローセル上に700 RUまで固定化した。担体を含まないヒトIL - 1 A サイトカイン (e Bioscience、#34 - 8019) を、HBS - EP 泳動バッファ中によって、100 nMから0.05 nMの試験範囲にひと続きに希釈した。流速は30 µl / 分であった。各サイトカイン希釈物の溶出データを15分間記録した。各サイクル後に、3 MのMgCl₂の単独注射を30 µl / 分の流速で25秒間行って、CM5表面を再生した。BiaEvaluationソフトウェア及びLangmuir結合モデルを用いてデータを一致させた。MABp1に対するK_Dは、2.0 × 10⁻¹⁰ M未満であることがわかった。

【0057】

実施例7 - MABp1は基底膜マトリクス腫瘍細胞侵入を阻害する

マトリゲル (BD)、基底膜マトリクスを4 において一晩解凍し、血清を含まない冷却された細胞培養液で希釈した (5 mg / ml ~ 1 mg / ml)。100 µlの希釈されたマトリゲルを、24ウェルのトランスウェル (Costar) の上部室に入れ、ゲル化のために37 度で少なくとも4 ~ 5時間培養した。腫瘍細胞 (MDA - MB - 231及びTHP - 1) を、トリプシン / EDTAによって組織培養フラスコから回収し、培養液で洗浄し、1% FBSを含む媒体中に1 × 10⁶ 細胞 / mlの濃度で再懸濁した。ゲル化したマトリゲルを暖めた無血清培養液で穏やかに洗浄し、各ウェルに100 µlの細胞懸濁液を加えた。トランスウェルの下部室を600 µlの培養液で満たし、そのプレートを37 度で12 ~ 24時間インキュベートした。マトリゲルに侵入しなかった細胞を各トランスウェル上から綿球で穏やかにこすり落とした。次いで、トランスウェルを24ウェルプレートから取り除き、侵入した細胞を70%エタノール又はメタノールで固定した後に、トランスウェルをクリスタルバイオレットで染色した。侵入した細胞を光学顕微鏡下でカウントした。マトリゲルに侵入する細胞の割合は、MABp1の存在下において有意に阻害された。

【0058】

実施例8 - MABp1は内皮細胞におけるICAM1発現の増加をブロックする

低血清増殖サプリメント (Invitrogen) が加えられたM - 200溶媒1 mL中のヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) (BD Biosciences社) を、1ウェル当たり5 × 10⁵ 個で24ウェルプレートに撒いた。細胞を3 ~ 4時間定着させた。溶媒を吸引し、1ウェル当たり1 mLのフレッシュなM - 200を加えた。MABp1を4.26 µg / mlで細胞に直接的に加え、室温で15分間共培養し、次いで、組み換えヒトIL - 1 (組み換えヒトインターロイキン1、e Bioscience) を40 pg / mlの最終濃度で加えた。ポジティブコントロールウェルにはIL - 1のみを加えた。IL - 1 非存在下又はMABp1非存在下のHUVEC細胞をネガティブコントロールとした。37 度及び5% CO₂での17 ~ 20時間のインキュベーションの後に、細胞を、Cell Stripper試剤 (Cellgro Mediatech) を用いた20分間の非酵素的処理によってプレートから離し、次いで、標準的流動細胞計測法プロトコルを用いてCD54 (ICAM - 1) 発現について直ちに分析した。染色バッファは、2%の熱不活性化されたウシ胎児血清が加えられたダルベッコPBSで構成されていた。PE結合マウス抗ヒトCD54 (ICAM - 1) モノクローナル抗体 (e Bioscience、クローンHA58) 又はPE結合マウスIgG1kアイソタイプコントロール (e Bioscience、#12 - 4714) を製造社の説明書に従って用いて、100マイクロリットルの染色体積で、暗闇において室温で20分間HUVEC細胞を染色した。続いて、染色バッファ中における2回の洗浄を行い、次に、FACSCalibur

フローサイトメーター (BD Biosciences) でサンプルを得た。いくつかの独立した試験 ($n = 5$) において、HUVEC細胞表面の組み換えヒトインターロイキン1によって誘導されるICAM-1接着分子のアップレギュレーションは、MABp1によって促進されていないHUVEC細胞によって示されたベースラインレベルまで中和された。

【0059】

実施例9 - MABp1は内皮細胞におけるe-セレクトイン発現の増大をブロックする

ICAM-1誘導に対するその効果と同様に、HUVEC細胞に対するCD62E (E-セレクトイン) の誘導のMABp1によって媒介される中和も観察された。HUVEC細胞が、可溶性組み換えヒトインターロイキン1によってではなく、DG44CHO細胞 (GPI-IL1A細胞) の表面にグリコシル-ホスファチジルイノシトールによって固定された膜性IL-1aによって促進される場合、この効果が最も顕著であった。この試験において、6ウェルプレート中のHUVEC細胞のコンフルエント培養液を、単独で、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のMABp1の存在下で、又は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のD5アイソタイプコントロール抗体の存在下で、M-200媒体中の 5×10^6 個のGPI-IL1A DG44細胞と共に一晩共培養した。17~20時間後に、HUVEC単層を、ダルベッコPBSで広く洗浄し、次に、CellStripper試剤 (Cellgro Mediatech) を用いた20分間の非酵素的処理によって離し、次いで、標準的流動細胞計測法プロトコルを用いてCD62E (E-セレクトイン) 発現について直ちに分析した。染色バッファは、2%熱不活性化ウシ胎児血清が加えられたダルベッコPBSで構成されていた。PE結合マウス抗ヒトCD62Eモノクローナル抗体 (eBioscience、クローンP2H3) 又はPE結合マウスIgG1kアイソタイプコントロール (eBioscience、クローンP3) を製造社の説明書に従って用いて、100マイクロリットルの染色体積で、暗闇において室温で20分間HUVEC細胞を染色した。続いて、染色バッファ中で2回の洗濯を行い、次に、FACSCaliburフローサイトメーター (BD Biosciences) でサンプルを得た。膜性GPI-IL-1aによって誘導されるHUVEC細胞表面においてアップレギュレートされるE-セレクトイン発現は、MABp1によって、促進されていないHUVEC細胞によって示されるベースラインレベルまで中和された。

【0060】

実施例10 - MABp1効力 (組み換えヒトインターロイキン1Aの中和) に関するMRC-5生物試験

ATCCコレクション (CCL-171) から胎児ヒト肺繊維芽細胞に由来するMRC-5細胞株を得た。MRC-5細胞からのIL-1Aによって誘導されるIL-6の放出を測定することによって、MABp1のIL-1中和能力を分析した。MRC-5細胞を、100マイクロリットルのDMEM完全培地中に1ウェル当たり 5×10^3 で96ウェルプレートに撒いた。加湿した5%CO₂ インキュベータ内において37℃で細胞を一晩培養した。続いて、コンフルエントのMRC-5細胞を、単独で又は増大させた濃度のMABp1の存在下で、 $20 \text{ pg}/\text{ml}$ の組み換えヒトIL-1A (組み換えヒトインターロイキン1A、eBioscience) と共にさらに24時間培養した。ネガティブコントロール細胞は、組み換えヒトインターロイキン1Aによって刺激されなかった。24時間後に上澄みを回収し、eBioscienceのIL-6 ELISAキットを用いてIL-6放出について分析した。IC₅₀、又は、最大のIL-6放出の50%を阻害するのに必要なMABp1の濃度は、 $0.001 \sim 0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内であった。

【0061】

実施例11 - MABp1はIL-1a+細胞を識別する

100マイクロリットルのナトリウムヘパリン抗凝結全血をポリスチレンFACSチューブに等分した。サンプルを、2mlの熱不活性化ウシ胎児血清を加えた1mgのヒトIgG (精製されたプロテインA) と共に室温において15分間インキュベートすることによって、Fc受容体をブロックした。その後、サンプル：アレクサ-488でラベルされ

10

20

30

40

50

た1mgのMABp1、FITCでラベルされた1mgのモノクローナル抗膜ヒトIL1A抗体(FAB200F、R&D Systems)、又は、1mgのマウスアイソタイプコントロール(IC002F、R&D Systems)のいずれかに一次抗体を加えた。一次抗体を、暗闇の室温において30分間サンプルと共にインキュベートした。その後、サンプル赤血球を室温において15分間溶解させ(BD Biosciences PharmLysate溶液)、300×gで5分間遠心分離して吸引した。サンプルペレットを、2%熱不活性化胎児血清を含む1mlのハンクス液(HBSS)で3回洗浄した。サンプルを0.3mlのHBSS+2%FBS中に再懸濁し、データをFACSCaliburフローサイトメーターで得て、CellQuestソフトウェアを用いて分析した。MABp1を用いたヒトPBMCのフローサイトメトリ分析は、PBMCの0.2%のみがインターロイキン1に対してポジティブであることを示した。

10

【0062】

実施例12 - 感染及び炎症を検出及び追跡するためのMABp1

MABp1を用いたヒトPBMCの(実施例11のような)フローサイトメトリ分析は、IL-1⁺に対してポジティブなPBMCのパーセントが、通常のコントロールと比較して、無症状感染を有する対象において3.6倍に増加したことを示した。同様に、炎症を起こした親知らずを有する対象において、IL-1⁺に対してポジティブなPBMCのパーセントが増加した。IL-1⁺PBMCの数における実質的減少は、親知らずの除去の14日後から45日後までみられた。

【0063】

20

実施例13 - インターロイキン1の検知及び/又は定量のための免疫分析

ヒト対象の血漿中には一般に非常に低いレベルのIL-1が存在する。多くの場合においてこれらのレベルは従来の免疫分析の検出閾を外れているので、改善された感度を有するELISAが開発された。このELISAにおいては、抗体がサンプル中のインターロイキン1に結合することを許容する条件下で、試験される生体サンプル(例えばヒト血漿)に外因性の抗インターロイキン1抗体(例えばMABp1)を加えることができる。ヒト血漿サンプル中のインターロイキン1のほとんどすべてが内因性抗インターロイキン1抗体に既に結合して存在することがわかっているため、多くの場合においては後のステップを省略することができる。その後、ヒトインターロイキン1抗体複合体を含むサンプルを、約100kDaの分子量遮断装置を有するフィルター(Amicon遠心装置)に適用することによって、サンプル中の分子量遮断未満の分子からヒトインターロイキン1抗体複合体を分離した。ある試験においてはこれによって濃度が50倍になった。その後、処理されたサンプル(及びその希釈物)を、抗ヒトIgG捕捉抗体(2µg/mlのマウス抗ヒトIgG、Fc特異的、Southern Biotech 製品コード#9042-01)でコーティングされたマイクロタイタープレートのウェル中に加えた。サンプル中のヒトインターロイキン1抗体複合体に結合するための時間を与えた後に、ウェルを洗浄して結合しない成分を除去した。その後、ラベルされた抗ヒトインターロイキン1二次抗体(0.2µg/mlのビオチン結合モノクローナルマウス抗ヒトIL-1A抗体、クローンCRM6、eBioscienceカタログ#13-7017)をそのウェルに加えた。ウェル中のインターロイキン1に結合するための時間を与えた後に、プレートを洗浄し、試験したサンプル中のインターロイキン1の濃度の指標として、各ウェル中のラベルされた抗ヒトインターロイキン1の量を定量した。

30

40

【0064】

その他の実施形態

本発明はその詳細な説明と共に記載されているが、前記説明は例示的なものであり、本発明の範囲を限定するように意図されておらず、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によって定められることは理解されるであろう。その他の態様、長所及び変更は、添付の特許請求の範囲に含まれる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	1 0 2
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 61/121,391

(32)優先日 平成20年12月10日(2008.12.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 シマール, ジョン

アメリカ合衆国 テキサス州 7 8 7 4 4 , オースティン, スイート 1 0 0 , イーストリバーサ
イドドライブ 8 2 0 1 , ビルディング # 4

審査官 森井 文緒

(56)参考文献 米国特許第 0 5 9 5 9 0 8 5 (U S , A)

Nature Biotechnology , 2 0 0 7 年 , Vol.25, No.12 , p.1369-1372

Trends in Immunology (2008) Vol.29, No.2, pp.91-97

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2012) Vol.109, No.31, pp.12272-12273

Arthritis & Rheumatism (2011) Vol.63 (Suppl. 10), p.2552

J. Clin. Invest. (1996) Vol.98, No.10, pp.2235-2243

Expert Opin. Biol.Ther. (2007) Vol.7, No.9, pp.1401-1413

J. Biol. Chem. (2007) Vol.282, No.18, pp.13917-13927

J. Biol. Chem. (1994) Vol.269, No.17, pp.13048-13055

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 0 9

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d