

(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 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/24	(2006.01) C 07 K 16/24
C 12 N 1/15	(2006.01) C 12 N 1/15
C 12 N 1/19	(2006.01) C 12 N 1/19
C 12 N 1/21	(2006.01) C 12 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)
(86) (22) 出願日	平成21年6月1日(2009.6.1)
(65) 公表番号	特表2011-524740 (P2011-524740A)
(43) 公表日	平成23年9月8日(2011.9.8)
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/003355
(87) 國際公開番号	W02009/148575
(87) 國際公開日	平成21年12月10日(2009.12.10)
審査請求日	平成24年5月31日(2012.5.31)
(31) 優先権主張番号	61/057,586
(32) 優先日	平成20年5月30日(2008.5.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(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)

(73) 特許権者	510312617 エックスバイオテク、インコーポレイテッド X BIOTECH, INC. カナダ ブリティッシュコロンビア州 ヴィ ^イ 6イー 2イー9, バンクーバー, スイート 300, ウエストヘイスティングスストリート 1055
(74) 代理人	100096024 弁理士 柏原 三枝子
(74) 代理人	100125520 弁理士 高橋 剛一
(74) 代理人	100155310 弁理士 柴田 雅仁

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つて、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 IgG1 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 IgG1 モノクローナル抗体の重鎖をコードする第 1 核酸と、ヒトイントロイキン 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 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 ;

をコードし、前記第 2 核酸が配列番号 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
 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 11 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 10 のヌクレオチド配列を含み、第 2 核酸が配列番号 12 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 10】

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 Ig 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 Ig 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 Ig 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 (IL-1) に特異的に結合する抗体 (Ab)、及び、そのような抗体を用いることによって IL-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 Ig 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あり、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、(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 (mAb) 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 Ig G 4 モノクローナル抗体の定常領域を、ヒト Ig 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 Ig 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。

【0006】

インターロイキン 1 に特異的に結合するヒト Ig 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 Ig 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、ヒトイントーロイキン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。

10

【0009】

本発明は、ヒトイントーロイキン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、ヒトイントーロイキン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。

20

【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、ヒトイントーロイキン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-セレクチ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、ヒトイントーロイキン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、ヒトイントーロイキン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、ヒトイントーロイキン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。

30

【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。

40

【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。

50

【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。

【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。

【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。

【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隨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。

【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。

【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、イムノプロッティングなど）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) ヒトイントロイキン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】

ヒトイントロイキン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不死化させることである。ヒトイントロイキン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以上のヒトイントロイキン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

10

20

30

40

50

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髄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、Godding, 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。10

【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。30

【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來した異なる部分（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。40

【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, 1995)によ

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くてもよい。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つ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てもよい。本発明で使用される細胞毒素は、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)であつてもよい。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、³⁵S、¹⁴C、³²P、¹²⁵I、¹³¹I、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、²⁰¹Tl、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁷Cu、²¹³Bi及び²¹¹At)、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、ビンプラスチン、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、ドキソルビシン、ダウノルビシンなど)、抗生素質(例えば、マイトイシンC)、トボ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(PeA、Pe40、アブリン、サポリン、アメリカヤマゴボウウィル

10

20

30

40

50

スタンパク、臭化工チジウム、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、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、¹¹¹In、⁹⁷Ru、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga又は⁷²As)、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、アルカリフェオヌファターゼ、ELISA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IgG1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IgG1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、アデノ隨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、プロモータ及びノ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、リポ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、

10

20

30

40

50

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】

10

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、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-セレクチ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の検出及び定量のための免疫測定に用いられることが示されている。

20

【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tron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。

30

【0036】

>ヒトインターロイキン1 - IgG1 - HC
 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 Q 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 L 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：1)

40

【0037】

>ヒトインターロイキン1 - IgG1 - HC
 a t g g a g t t c g g g c t g a g t t g g g t g t t c c t g g t g g c t c t g c

50

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

【0038】

A T G 開始コドンの上流に H i n d I I I / C l a 1 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、ヒト定常カッパL C配列をP C R 増幅させた。ヒト定数カッパ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 配列と定常カッパ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。

【0039】

>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 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]

【0040】

>ヒトインターロイキン1 - K - LC

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 a g g g a a t c t c 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 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 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 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 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]

【0041】

実施例2 - NATHMAB - ヒトインターロイキン1 - IgG1及び鎖の生成

NATHMAB - ヒトインターロイキン1 / IgG1重鎖をコードする完全な配列を遺伝子合成した。V - HC配列は、米国特許第5,959,085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IgG1 - HC配列は、Swiss-ProtエンタリーP01857に対応していた。このヌクレオチド配列は、CHO細胞における発現に最適化されたコドンであった。Kozac配列(gccacc)を開始ATGの上流に加えた。

30

【0042】

>NATHMAB - ヒトインターロイキン1 - IgG1 - HC

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]

40

【0043】

>NATHMAB - ヒトインターロイキン1 - IgG1 - HC

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

50

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 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
 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 g t a a [配列番号：6]
【0044】

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-LC配列は、米国特許第5,959,085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LC配列は、Swiss-ProtエントリーP01834に対応していた。このヌクレオチド配列は、CHO細胞の発現に最適化されたコードンであった。Kozac配列(gccacc)をATGの上流に加えた。

【0045】

>NATHMAB - ヒトインターロイキン1 - K - LC
 M D M R V P A Q L L G 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 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：
 7]
【0046】

>NATHMAB - ヒトインターロイキン1 - K - LC
 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 50

t g c t g c t g c 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 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 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 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 c c t c c c t g c a a c c t g a g g a 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 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 a t c t t 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 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 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 c a a t a g g g g a g a t g c t g a [配列番号：8]
 【0047】

実施例3 - NATHMAB - ヒトインターロイキン1（IgG1/kサブタイプ）の発現

10

NATHMAB - 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（HEK）293T細胞を、10%FCSを含むD MEM中で培養し、製造社のプロトコルに従ってjetPEI試剤（Polyplus）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24時間前に10cmのディッシュ上に細胞を撒き（10cmのディッシュ当たりに 3×10^6 細胞）、トランスフェクション時に約50%の密度に達するようにした。ディッシュ当たり5μgのpcDNA3 - 抗ヒトインターロイキン1 - IgG1 - Hc及び2倍モル過剰量のpcDNA3 - 抗ヒトインターロイキン1 - Kappaをトランスフェクションに用いた。回収後に、媒体を、2%FCSを含むD MEM（1ディッシュ当たり10ml）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、pH7.5~8に調整して、さらなる使用まで4度保存した。

20

【0048】

上澄み（250ml）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（GE Health care）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、PBSで洗浄した。100mMのグリシン/150mMのNaClを含む100μlのTris（pH8）を用い、その後の10%グリセロールを含むPBSによる透析によって、1mlの画分中に抗体を溶出させた。BCAタンパク検出キット（Pierce）を用いて各画分の総タンパク濃度を測定した。SDS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。

30

【0049】

NATHMAB - ヒトインターロイキン1 精製抗体及び生成HEK293T細胞のトリトンX-100細胞溶解物を含む上澄みを用いて、¹²⁵I - インターロイキン1を用いた放射免疫定量法（RIA）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¹²⁵I - ヒトインターロイキン1に結合した。0.012%濃度（RIAにおいて最大半量の活性）の精製されたNATHMAB - ヒトインターロイキン1の¹²⁵I - 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NATHMAB - ヒトインターロイキン1のKaは、 $3.03 \times 10^{10} M^{-1}$ で

40

50

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 - IgGの濃度が推定的に約30 μg / 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度30分間インキュベートした。各ポイントを培地(DMEM、5%FCS)中において3回反復して実行した。0.2 μg / mlのイオノマイシンを含む培地中のEL4-6.1細胞(5 × 10⁵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度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・パ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度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 μg / ml)と共に、5%CO₂炭酸インキュベータ内において37度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。

【0052】

実施例4 - 抗体による癌細胞の死滅

標準的フィコールパ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度及び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 × 10⁴個のターゲットを様々な濃度のMAB p1と共に15分間インキュベートした後に、1 × 10⁴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つ

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PBMC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PBMCを作動細胞として用いた。

いずれの場合においても、MABp1の濃度(1.25~20 μg/ml)を増加させることは、両方のET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 (MABp1)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 IgG1/ 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ATGの上流にKozac配列(gccacc)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 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 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 g a g t g g t g c a g c c t 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 c t c t a t g 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 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 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 c c t g a g 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 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 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 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 50

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 a g t g
 t a a a g t g t c c a a c a a a g g 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 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 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 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 g t a a [配列番号 : 10]
【0055】

軽鎖

M D M R V P A Q L L G 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]
【0056】

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 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 c a
 g a t g a c a c a g t c t c 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 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 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 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 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 g 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 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 c a a t a g g g g a g a a t g c t g a [配列番号 : 12]
【0057】

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) による表面プロテラズモン共鳴 (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 Ig G (F c) 抗体を、C M 5 センサチップのフロー

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-E 10 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-E EP 泳動バッファ中で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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-1A サイトカイン (eBioscience, #34-8019) を、HBS-E 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 $30 \mu\text{l}/\text{分}$ 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 $30 \mu\text{l}/\text{分}$ の流速で 25 秒間行って、CM5 表面を再生した。Biasevaluation 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、 $2.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ 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 ($5 \text{ mg}/\text{ml}$ ~ $1 \text{ mg}/\text{ml}$)。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 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 1×10^6 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 $100 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を加えた。トランスウェルの下部室を $600 \mu\text{l}$ の培養液で満たし、そのプレートを 37 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 5×10^5 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 $4.26 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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、eBioscience) を $40 \text{ pg}/\text{ml}$ 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 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、Cellstripper 試剤 (Cellgro MediTech) 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 (eBioscience、クローン HA58) 又は PE 結合マウス IgG1 k アイソタイプコントロール (eBioscience、#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、FACS Calibur 50

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、H U V E C 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 I C A M - 1 接着分子のアップレギュレーションは、M A B p 1 によって促進されていない H U V E C 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 - M A B p 1 は内皮細胞における e - セレクチン発現の増大をブロックする

I C A M - 1 誘導に対するその効果と同様に、H U V E C 細胞に対する C D 6 2 E (E - セレクチン) の誘導の M A B p 1 によって媒介される中和も観察された。H U V E C 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、D G 4 4 C H O 細胞 (G P I - I L 1 A 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 I L - 1 a 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 H U V E C 細胞のコンフルエント培養液を、単独で、10 μ g / m l の M A B p 1 の存在下で、又は、10 μ g / m l の D 5 アイソタイプコントロール抗体の存在下で、M - 2 0 0 媒体中の 5×10^6 個の G P I - I L 1 A D G 4 4 細胞と共に一晩共培養した。17 ~ 20 時間後に、H U V E C 単層を、ダルベッコ P B S で広く洗浄し、次に、C e l l S t r i p p e r 試剤 (C e l l g r o M e d i a t e c h) 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 C D 6 2 E (E - セレクチン) 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 P B S で構成されていた。P E 結合マウス抗ヒト C D 6 2 E モノクローナル抗体 (e B i o s c i e n c e、クローン P 2 H 3) 又は P E 結合マウス I g G 1 K アイソタイプコントロール (e B i o c i e n c e、クローン P 3) 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 H U V E C 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、F A C S C a l i b r u r フローサイトメーター (B D Biosciences) でサンプルを得た。膜性 G P I - I L - 1 a によって誘導される H U V E C 細胞表面においてアップレギュレートされる E - セレクチン発現は、M A B p 1 によって、促進されていない H U V E C 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 - M A B p 1 効力 (組み換えヒトインターロイキン 1 A の中和) に関する M R C - 5 生物試験

A T C C コレクション (C C L - 1 7 1) から胎児ヒト肺纖維芽細胞に由来する M R C - 5 細胞株を得た。M R C - 5 細胞からの I L - 1 A によって誘導される I L - 6 の放出を測定することによって、M A B p 1 の I L - 1 中和能力を分析した。M R C - 5 細胞を、100 マイクロリットルの D M E M 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 % C O₂ インキュベータ内において 37 °C で細胞を一晩培養した。続いて、コンフルエントの M R C - 5 細胞を、単独で又は増大させた濃度の M A B p 1 の存在下で、20 μ g / m l の組み換えヒト I L - 1 A (組み換えヒトインターロイキン 1 A、e B i o s c i e n c e) 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 1 A によって刺激されなかった。24 時間後に上澄みを回収し、e B i o s c i e n c e の I L - 6 E L I S A キットを用いて I L - 6 放出について分析した。I C₅₀、又は、最大の I L - 6 放出の 50 % を阻害するのに必要な M A B p 1 の濃度は、0.001 ~ 0.01 μ g / m L の範囲内であった。

【0061】

実施例 11 - M A B p 1 は I L - 1 a + 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 F A C S チューブに等分した。サンプルを、2 m l の熱不活性化ウシ胎児血清を加えた 1 mg のヒト I g G (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、F c 受容体をブロックした。その後、サンプル：アレクサ - 4 8 8 でラベルされ

10

20

30

40

50

た 1 mg の M A B p 1 、 F I T C でラベルされた 1 mg のモノクローナル抗膜ヒト I L 1 A 抗体 (F A B 2 0 0 F 、 R & D S y s t e m s) 、又は、 1 mg のマウスアイソタイプコントロール (I C 0 0 2 F 、 R & D S y s t e m s) 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 (B D B i o s c i e n c e s P h a r m L y s e 溶液) 、 3 0 0 × 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 1 ml のハンクス液 (H B S S) で 3 回洗浄した。サンプルを 0.3 ml の H B S S + 2 % F B S 中に再懸濁し、データを F A C S C a l i b u r フローサイトメーターで得て、 C e l l Q u e s t ソフトウェアを用いて分析した。 M A B p 1 を用いたヒト P B M C のフローサイトメトリー分析は、 P B M C 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。

【 0 0 6 2 】

実施例 1 2 - 感染及び炎症を検出及び追跡するための M A B p 1

M A B p 1 を用いたヒト P B M C の（実施例 1 1 のような）フローサイトメトリー分析は、 I L - 1⁺ に対してポジティブな P B M C 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、 I L - 1⁺ に対してポジティブな P B M C のパーセントが増加した。 I L - 1⁺ P B M C 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。

【 0 0 6 3 】

実施例 1 3 - 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 I L - 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的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 E L I S A が開発された。この E L I S A 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 M A B p 1 ）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ので、多くの場合において後のステップを省略することができる。その後、ヒトイントロイキン 1 抗体複合体を含むサンプルを、約 1 0 0 k D a の分子量遮断装置を有するフィルター（ A m i c o n 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トロイキン 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 I g G 捕捉抗体（ 2 μ g / m l のマウス抗ヒト I g G 、 F c 特異的、 S ou t h e r n B i o t e c h 製品コード # 9 0 4 2 - 0 1 ）でコーティングされたマイクロタイプレートのウェル中に加えた。サンプル中のヒトイントロイキン 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トロイキン 1 二次抗体（ 0.2 μ g / m l のビオチン結合モノクローナルマウス抗ヒト I L - 1 A 抗体、クローン C R M 6 、 e B i o s c i e n c e カタログ # 1 3 - 7 0 1 7 ）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トロイキン 1 の量を定量した。

【 0 0 6 4 】

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。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 78744,オースティン,スイート 100,イーストリバーサ
イドドライブ 8201,ビルディング #4

審査官 森井 文緒

(56)参考文献 米国特許第05959085(US,A)

Nature Biotechnology, 2007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., DB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