

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4939397号
(P4939397)

(45) 発行日 平成24年5月23日(2012.5.23)

(24) 登録日 平成24年3月2日(2012.3.2)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 19/00	(2006.01) C07K 19/00
C07K 16/28	(2006.01) C07K 16/28
C07K 16/42	(2006.01) C07K 16/42
A61K 39/395	(2006.01) A61K 39/395 D
A61P 1/04	(2006.01) A61K 39/395 N

請求項の数 14 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-505735 (P2007-505735)
(86) (22) 出願日	平成17年3月30日 (2005.3.30)
(65) 公表番号	特表2007-537157 (P2007-537157A)
(43) 公表日	平成19年12月20日 (2007.12.20)
(86) 國際出願番号	PCT/IL2005/000358
(87) 國際公開番号	W02005/095460
(87) 國際公開日	平成17年10月13日 (2005.10.13)
審査請求日	平成20年2月7日 (2008.2.7)
(31) 優先権主張番号	60/557,377
(32) 優先日	平成16年3月30日 (2004.3.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者 505251831
イッサム リサーチ ディベロップメント
カンパニー オブ ザ ヘブリュ ユニ
バーシティ オブ エルサレム
イスラエル エルサレム 91390 ピ
ー. オー. ボックス 39135 ギバ
ト ラム エドモンド ジェイ サフラ
キバパス ハイ テク パーク
(73) 特許権者 508074055
ディメス-ディパルティメント ド メデ
ィチナ スペリメンターレーウニベルシタ
テリィ ストゥディ ディ ジェノバ
イタリア 16132 ジェノバ ピア
レオン パティスタ アルベルティ 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アレルギー性反応に関する細胞を標的化するための二重特異性抗体、ならびにその組成物および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のものを含む、二重特異性抗体：

- (i) 阻害性受容体 IR p 60 に特異的に結合する第1の標的認識成分；および
- (ii) Ig E に特異的に結合する第2の標的認識成分。

【請求項 2】

以下のものを含む、二重特異性抗体：

- (i) 阻害性受容体 IR p 60 に特異的に結合する第1の標的認識成分；および
- (ii) c K I T に特異的に結合する第2の標的認識成分。

【請求項 3】

以下のものを含む、二重特異性抗体：

- (i) 阻害性受容体 IR p 60 に特異的に結合する第1の標的認識成分；および
- (ii) F c R I に特異的に結合する第2の標的認識成分。

【請求項 4】

以下のものを含む、二重特異性抗体：

- (i) 阻害性受容体 IR p 60 に特異的に結合する第1の標的認識成分；および
- (ii) C C R 3 に特異的に結合する第2の標的認識成分。

【請求項 5】

以下のものを含む、二重特異性抗体：

- (i) 阻害性受容体 IR p 60 に特異的に結合する第1の標的認識成分；および

10

- (ii) 阻害性受容体 IR p 60 に特異的に結合する第1の標的認識成分；および

20

(i i) I L - 5 R に特異的に結合する第 2 の標的認識成分。

【請求項 6】

前記抗体が前記細胞に結合することにより、アレルギー性反応が阻害される請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

前記第 1 および第 2 の標的認識成分は、架橋剤、リンカー化合物、キャリア、合成スペーサー、固定化基質、および、(G l y ₄ S e r) ₃ モチーフに基づく柔軟な領域のいずれか 1 つを介して連結される請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 8】

前記第 1 および第 2 の標的認識成分は架橋される請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 10

【請求項 9】

前記認識成分は、天然に存在する抗体、組換え抗体、単鎖 F v (s c F v)、二機能性 s c F v 、ジアボディー、F (a b) ユニット、F (a b ') ユニット、二重特異性 F (a b ') コンジュゲート、化学的に架橋された二機能性抗体、線状抗体、あるいは抗体の F (a b ') ₂ 抗原結合性フラグメントのいずれか 1 つから選択される請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 10】

前記認識成分は F (a b ') ユニットである請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 20

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の少なくとも 1 つを活性な薬剤として含む医薬組成物。

【請求項 12】

緩衝剤、添加剤、安定化剤、希釈剤および / または賦形剤をさらに含む請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー性湿疹、様々なアレルゲンに対するアレルギー性の障害および応答、全身性アナフィラキシー、全身性肥満細胞過剰増殖、限局性強皮症 / 色素性じんま疹、マスト細胞白血病、アテローム性動脈硬化、移植片拒絶、多発性硬化症、線維形成性肺疾患、神経線維腫症、ケロイド、強皮症、リウマチ様関節炎、変形性関節炎、急性痛風、眼の瘢痕性類天疱瘡、クローン病、腹膜癒着、慢性移植片対宿主病 (G V H D) 、好酸球增多筋痛症候群、気管支喘息、鼻ポリープ症、ヴェーゲナー肉芽腫症、間質性肺疾患、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、および特発性肺線維症からなる群から選択される疾患または状態を治療するための医薬組成物の製造における、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の少なくとも 1 つの使用。 30

【請求項 14】

前記疾患または状態は、外因性気管支喘息、アレルギー性鼻炎、オンコセルカ皮膚炎、アトピー性皮膚炎、鼻ポリープ症、小結節、好酸球増加症、リウマチ、皮膚炎および腫れ (N E R D S) 、脈管炎性肉芽腫性疾患、一時的脈管炎、チャーグ・ストラウス症候群、多関節炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、多発性硬化症、移植片拒絶、気管支喘息、間質性肺疾患、好酸球性胸膜滲出、一過性肺好酸球浸潤物 (L o e f f l e r) 、組織球症、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、特発性肺線維症、局所的好酸球増加症、幼児期におけるクラミジア肺炎、好酸球増加症候群、クローン病、春季角結膜炎母斑、若年性炎症結膜炎母斑、および木村病からなる群から選択される請求項 13 に記載の使用。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は免疫薬理学の分野に関連する。より具体的には、本発明は、予防手段および治療手段の両方である、アレルギー性炎症の調節因子として機能する二重特異性分子に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願全体を通して言及されるすべての刊行物は、それにおけるすべての引用参考文献を含めて、全体が参考として本明細書中に組み込まれる。

【0003】

A. アレルギー性炎症

アレルギー性炎症は、様々な細胞タイプ（例えば、炎症性細胞および構造的細胞など）を伴う複雑な現象である。マスト細胞はアレルギー性炎症の十分に確立された開始因子であり、炎症性細胞（主として、好酸球）を引き寄せ、活性化し、最終的にはその炎症性細胞と相互に作用する。アレルギー性炎症は様々な病状（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性湿疹など）を構成する。これらの疾患の中で、また、一例として、喘息は幼児期の最も一般的な病気であり、西欧諸国では20%にまで達すると考えられ、現在増加している [Busse WW, Lemanske RF Jr. (2001), N Engl J Med., 344: 3501]。

【0004】

アレルギーの分野における実験により、これらの病理の基礎となる細胞的機構および分子的機構への洞察がもたらされている。これらの研究は、アレルギー性応答が、多くの場合、二相的であるという理解をもたらしている。第1の早期段階がマスト細胞の活性化によって開始され（下記参照）、その一方で、第2の後期段階が炎症性細胞（主に、T細胞、好酸球および一部の好塩基球）の浸潤によってもたらされる [Broide DH, Firestein GS. (1991), J Clin Invest., 88: 10482]。しかしながら、知識は有効な治療的手段を未だもたらしていない。現在使用されている方法では、症状の緩和（すなわち、抗ヒスタミン剤および抗ロイコトリエン剤）または非選択的な抗炎症治療（すなわち、グルココルチコイド）のいずれかが提供される。加えて、1つだけの抗体（例えば、IgE）、T細胞サイトカイン（例えば、抗IL-5）またはいくつかの転写因子（例えば、STAT-6、GATA-3またはFOG-1）を標的とする新しく開発された免疫薬理学的治療は、いまのところ、有効であるとは判明していない。

【0005】

B. マスト細胞

マスト細胞は、顕著な細胞質顆粒を含有する、組織に存在するFc RI保有細胞である。アレルギー性反応における非常に重要な役割を有することのほかに、マスト細胞はまた、線維症、腫瘍、自己免疫疾患および生来的免疫にも関与している。マスト細胞は、身体中至るところ、結合組織および粘膜表面に広く分布し、通常、血管および末梢神経の非常に近いところに存在する。従って、マスト細胞は、マスト細胞が数分以内および/または数時間の期間の両方で反応し得る環境刺激（例えば、微生物およびアレルゲンなど）にさらされ、事前に形成された媒介因子および新たに合成された媒介因子の調節された分泌を受ける。

【0006】

活性化されたとき、マスト細胞は、事前に形成された顆粒構成成分（例えば、ヒスタミン、プロテオグリカンおよびプロテアーゼ）、PGD2、LTC4、PAF、および、より少ない程度ではあるが、LTB4、および、様々なサイトカイン（例えば、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、RANTES、IFN-、TGF-、TNF- およびGM-CSF）をはじめとする様々な炎症性媒介因子を放出する [Puxeddu I. et al. (2003), Int J Biochem Cell Biol., 35: 16013]。

【0007】

10

20

30

40

50

アレルゲンが、Fc RIに結合した2つの隣接するIgE分子に結合することによって引き起こされる古典的な「アレルギー性」IgE依存的マスト細胞活性化に加えて、マスト細胞を刺激する他の方法が存在する。IgEに依存しないマスト細胞活性化が後期段階の状況および慢性的炎症では特に重要である場合がある。特筆すべきことに、抗IgE治療が現在、喘息の治療のために承認されているが、そのような抗IgE治療は少しの改善を誘導するにすぎない。このことは、喘息の発症におけるIgE以外に依存する経路の関与、ならびに、治療的介入のための新しい標的の必要性を強調している。実際、本発明者らの研究室（ならびに他の研究室）で行われた研究は、数多くの媒介因子がマスト細胞を活性化することができることを示している [Philipovsky A.M.他(2003)、Blood, 101: 1898~4; Feldweg, A.M.他(2003)、Eur. J. Immunol., 33: 2262~8]。なかでも、幹細胞因子(SCF)（これは、活性化だけでなく、マスト細胞の分化、生存、増殖、成熟化、走化性、接着に非常に関わっている）、および、神経増殖因子(NGF)（これはまた、マスト細胞の活性化を誘導する）。

【0008】

マスト細胞のIgE独立刺激はまた、その活性のために不可欠な類似する構造的特徴とともに有する多塩基性化合物（例えば、化合物48/80、ニューロペプチド(VIP、CGRP、サブスタンスP、ニューロテンシン）、および、好酸球由来の主要塩基性タンパク質(MBP)によっても引き起こされ得る [Philipovsky A.M.他(2003)、同上同頁]。

【0009】

好酸球は、転写因子(GATA-1&2およびc/EBR)およびサイトカイン(IL-3、GM-CSFおよびIL-5)（「好酸球生存サイトカイン」）の調節のもとで分化する骨髄由来の顆粒球である [Kaatz Maa他(2004)、Int. J. Mol. Med., 14: 1055~160]。特筆すべきことに、CD4+のTh2細胞がこれらのサイトカインの主要な産生体である [Umland SP他(1988)、Am J Respir Cell Mol Biol., 18: 631~42]。好酸球は、通常、血液に入り、胃腸管内に遊走するが、炎症性状態では、様々な組織に集積し得る。そのような組織において、好酸球は、局所的に放出された「生存サイトカイン」の作用のために、プログラム化細胞死が始まる前の数日間生存することができる。好酸球は寄生虫感染における宿主の防御機構に関連し、また、様々な特発性好酸球増加症候群だけなく、アレルギー性の免疫学的障害および悪性障害の病理発生に関係している [Bain, B.J. (2004)、Am J Hematol., 77: 82~5; Klion, A.D.他(2004)、J. Allergy Clin. Immunol., 113: 30~7]。LAR（遅発型喘息反応）において、好酸球はその細胞毒性顆粒タンパク質の放出によって組織損傷（大部分は上皮の損傷）に関わり得る。加えて、喘息に関連した組織修復および線維症に関与するエフェクタ-細胞として好酸球を暗示する証拠が現れつつある [Levi-Schaffer, F.他(1999)、Proc Natl Acad Sci USA, 96: 9660~5]。

【0010】

好酸球は、事前に形成された顆粒媒介因子（主要塩基性タンパク質(MBP)、好酸球カチオン性タンパク質(ECP)、好酸球由来ニューロトキシン(EDN)および好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)など）を貯蔵し、脂質媒介因子(PAF、LTc4およびPG E2など）、ならびに、前炎症性および免疫調節性のサイトカインおよびケモカイン(IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-16、GM-CSF、SCF、NGF、TNF-、TGF-、INF-、MIP-1、RANTESおよびエオタキシンなど）を合成する [Philipovsky A.M.他(2002)、Mol Immunol., 38: 1369]。好酸球の塩基性タンパク質は、喘息患者から得られた生物学的流体に検出される濃度で気道上皮細胞に対してインビトロで非常に毒性であることが見出されていた。さらに、好酸球はマトリ

10

20

30

40

50

ツクスメタロプロテイナーゼ (MMP) - 9 およびマトリックスメタロプロテイナーゼの組織阻害剤 (TIMP) - 1 / 2 を産生する。好酸球はまた、ヘパラナーゼを含有し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) および b - 繊維芽細胞増殖因子 (b - FGF) のための供給源である [Munitz, A. 他 (2004)、Allergy, 59: 268 ~ 75]。このことは、喘息関連および喘息を伴う線維症における好酸球の役割を明瞭に示している。

【0011】

好酸球の活性化およびその後の媒介因子放出が、アレルギー性状況および他の疾患の両方で、一連のアゴニストによって誘導され得る。実際、いくつかの前炎症性の媒介因子 (すなわち、C5a、PAF)、サイトカイン (すなわち、IL-5、GM-CSF、IL-3、IL-2、INF など)、免疫グロブリン (すなわち、IgG、IgA) およびケモカイン (すなわち、CCR3) に対する受容体 [Munitz (2004)、同上同頁] が好酸球の表面に発現する。しかしながら、好酸球の活性化をインピボで (特に、慢性アレルギー性気道炎症の状況で) 促進することにおけるこれらの受容体の役割は不明である。好酸球活性化の阻止が現在、喘息の治療のために続行中であるので、これは、単に学術的な疑問ではない。抗IL-5 治療による近年の結果は、好酸球活性化の基本的機構を特定する必要性を再確認させている。これは、この試薬が喘息患者における好酸球の脱顆粒化に対する著しい影響を有していなかったからである [Kay, A. B. 他 (2003)、Am J Respir Crit Care Med, 167: 1586 ~ 7]。好酸球はまた、マスト細胞においてもまた発現されるいくつかのさらなる阻害性 / 活性化因子様の Ig スーパーファミリー細胞表面受容体 (例えば、LIR-3 / ILT-5、LIR-1 / ILT-2、LIR-2 / ILT-4、LIR-7 / ILT-1 など) を発現することが見出され [Tedla N. 他 (2003)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 1174 ~ 9]、また、様々なシグレクト (singlec) を発現することが見出されている [Nutku, E. 他 (2003)、Blood, 101: 5014 ~ 20]。

【0012】

好酸球はアレルギー性炎症プロセスの後期段階のときに組織におけるマスト細胞と接触する。近年、これら 2 つの細胞の間での重要なクロストークが存在することを示す証拠が現れている。本発明者らの研究室で行われた研究では、好酸球の生存が TNF - RI および TNF - RII を介してマスト細胞由来の TNF - によって高まることが示されている [Temkin, V. 他 (2001)、Cytokine, 15: 20 ~ 6]。さらに、事前に形成されたマスト細胞由来のトリプターゼにより、IL-6 および IL-8 の産生およびヒト末梢血好酸球からの放出が、マイトジエン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) / AP-1 経路を開始する PAR-1 によって誘導され、その一方で、IgE 活性化マスト細胞により産生された GM-CSF により、好酸球の生存および好酸球力チオニン性タンパク質 (ECP) の放出が誘導される。ヒトの肺由来マスト細胞は、纖維芽細胞と同時培養されたとき、膜結合型 SCF に依存するプロセスによって MBP に対して応答性になる。特筆すべきことに、好酸球もまた SCF および NGF を合成する。まとめると、このことはすべて、アレルギー性炎症の後期段階および慢性的段階におけるマスト細胞および好酸球の重要性を強化している [Temkin, V. 他 (2002)、J Immunol., 169: 2662; Hartman M. 他 (2001)、Blood, 97: 10865 ~ 6; Solomon, A. 他 (1998)、J. Allergy Clin. Immunol., 102: 456 ~ 60]。

【0013】

近年、マスト細胞の脱顆粒化が、マスト細胞に発現し、かつ、マウスおよびヒトのマスト細胞に対して機能的である、表面のさらなる活性化因子様および阻害性の受容体 (例えば、Fc RIIIB、gp49A/B1/B2、PIR-B、様々な LIR / ILT およびシアル酸結合性 Ig 様レクチン (singlec) など) によって調節されることが明らかになっている [Katz HR (2002)、Curr Opin Immunol. 14: 50 ~ 55]。

10

20

30

40

50

、 1 4 : 6 9 8 7]。

【 0 0 1 4 】

C . 阻害性受容体

マスト細胞および好酸球がともに、 Ig 受容体スーパーファミリー（これは細胞外部分における 1 つだけの V タイプ Ig 様ドメインによって特徴づけられる；例えば、 KIR 、 LIR /ILT 、 LAIR 、 gp49B1 など）または c 型（カルシウム依存性）レクチンスーパーファミリー（例えば、 MAF A 、 CD94 / NKG2A など）のいずれかに属するいくつかの阻害性受容体を発現することができます明らかになってきている。この大きなファミリーの免疫阻害性受容体は、コンセンサスなアミノ酸配列、すなわち、免疫受容体のチロシン型阻害性モチーフ（ ITIM ）によって特定することができる。 ITIM はこれらの分子の細胞質ドメインに存在する。原型となる ITIM 配列は 6 個のアミノ酸から構成される： (I l e / V a l / L e u / S e r) - X - T y r - X - X - (L e u / V a l) 、式中、 X は任意のアミノ酸を表す。活性化されたとき、これらの阻害性受容体は、多くの場合には Src ファミリーのキナーゼによるチロシンのリン酸化を受け、これにより、 Src 相同性 2 (SH2) ドメインを有する細胞質ホスファターゼ（例えば、 SHP-1 、 SHP-2 、 SHIP-1 および SHIP-2 など）を動員するための結合部位を提供する [Ravetch J V 、 Lanier LL (2000) 、 Science 、 290 : 848] 。

【 0 0 1 5 】

以前に記載されたように、マスト細胞は IgE 依存性 (Fc RI 媒介) の刺激物質または IgE 非依存性の刺激物質によって活性化され得る。 IgE 依存性の機構を介するマスト細胞の活性化は、 ITAM (免疫受容体のチロシン型活性化因子様モチーフ) と呼ばれる Fc RI 受容体の細胞内成分におけるチロシンリン酸化残基への s y k および l y n の迅速な動員をもたらす。この作用の結果は、ヒスタミンおよび他の事前に形成された媒介因子の放出および合成、ならびに、 30 分未満で完了する迅速なプロセスによる脂質媒介因子の放出である。加えて、 SCF および NGF (これらはマスト細胞を活性化する) が Src ファミリーのキナーゼに依存している。興味深いことに、 IgE 依存性刺激物質および IgE 非依存性刺激物質はともに、マウスマodelにおいて少なくともインビボでは阻害性受容体によって調節される。従って、 ITAM ドメインまたはキナーゼ活性を脱リン酸化する SHP-1 、 SHP-2 、 SHIP-1 および SHIP-2 の動員により、マスト細胞活性化のダウンリギュレーションがもたらされる。この阻害は、マウスのマスト細胞における gp49B1 阻害性受容体について十分に詳しく記載されており、この場合、阻害性受容体が Fc RI と同時連結することにより、分泌顆粒媒介因子（ヒスタミン、 -ヘキソサミニダーゼ）および LTC4 の放出の阻害がもたらされた [Katz H. R. 他 (1996) 、 Proc Natl Acad Sci USA 、 93 : 10809] 。

【 0 0 1 6 】

IRp60 (阻害性受容体タンパク質 60) は、 Ig スーパーファミリーに属する阻害性受容体である。 IRp60 は多くの細胞タイプ（例えば、 T 細胞、 NK 細胞および顆粒球など）において発現する。 NK 細胞上における IRp60 の架橋は NK 細胞溶解活性のダウンリギュレーションをもたらす。加えて、過バナジン酸ナトリウムによる IRp60 の処理は、顕著な IRp60 チロシンリン酸化、ならびに、 SHP-1 および SHP-2 の両方との会合をもたらした [Cantoni C. 他 (1999) 、 Eur J Immunol. 、 29 : 3148] 。さらに、 IRp60 の架橋は、抗 CD3 mAb を使用するリディレクテド (re-directed) 殺傷アッセイにおける T 細胞クローンの細胞溶解活性を阻害した。重要なことに、 IRp60 のリガンドは未だ不明である。

【 0 0 1 7 】

D . 二重特異性抗体 (BsAb)

近年では、抗体治療が非常に様々な疾患（例えば、ガン、マラリアおよび喘息など）のための新しい治療様式になってきている。それにもかかわらず、抗体の効力はさらなる改

10

20

30

40

50

善を必要とすることが広く認められている。

【0018】

二重特異性抗体は、2つの異なる結合特異性を有するタンパク質であり、これは、通常、異なる細胞における2つの異なる抗原を認識するように設計される。従って、1つの結合部位は標的細胞（すなわち、感染細胞またはガン細胞）上における抗原に対して特異的であり、その一方で、もう一方の結合部位が免疫エフェクター細胞上における抗原を特異的に認識する。従って、エフェクター細胞機構が標的細胞上において発揮され、これにより、適切な免疫応答がもたらされる [Hudson, P. J. 他 (2003)、Nat. Med.、9: 129~34]。

【0019】

第一世代の二重特異性抗体が、2つの確立されたハイブリドーマ細胞株を融合して、クアドローマを形成すること [Milstein C, Cueille AC (1983)、Nature、305、537] によって、または、それぞれのF(ab')フラグメントを化学的に架橋すること [Karpovsky B. 他 (1984)、J Exp Med.、160: 1686] によって作製された。そのような二重特異性抗体を用いて行われたインビトロ研究、インビボ研究および臨床研究では、そのような処置の治療的可能性が確認された [van de Winkel J. G. 他 (1997)、Immuno 1 Today、18: 562]。

【0020】

二重特異性抗体を用いた新規な方法はこれまで、認識される2つの異なる抗原を同じ細胞に存在させなければならなかった。Daeeron 他 [米国特許出願公開第2004/0038894号] は、阻害性KIR、すなわち、キラー細胞細胞免疫グロブリン受容体（これは主としてNK細胞において発現され、MHCクラスI分子に対する細胞表面受容体として機能する）、および、同時に、刺激性受容体（例えば、ITAM保有受容体、例えば、活性化しているIg受容体、Fc RI、CD3/TCRなど）を認識する二重特異性抗体が、この刺激性受容体をKIRと細胞外または細胞内で架橋する能力を有するという可能性を記載する。この架橋は、この場合、この刺激性受容体の活性化の調節をもたらし、その最終的な結果が免疫応答および炎症性応答の調節である。この予測は、ヒトIgEおよびヒトFc RIに対する二重特異性抗体の作製を記載したTamm 他によって実際に確認されている [Tamm, S. W. 他 (2004)、Allergy、59(7): 772]。この抗体は、ヒトのマスト細胞および好塩基球による抗原誘導されたヒスタミン放出を阻害することができた。

【0021】

本発明者らは、マスト細胞および好酸球における阻害性受容体の発現、具体的には、これらの細胞における阻害性受容体IRp60の発現を特徴づけている（下記の実施例を参照のこと）。

【0022】

本発明において、本発明者らは、その標的細胞特異的なモジュールのために細胞特異的な様式で、阻害性受容体IRp60と結合し、これを活性化することができる二重特異性抗体の作製を記載する。

【0023】

本研究の具体的な焦点は、マスト細胞、好酸球および好塩基球のような、アレルギー性応答に関与する細胞を標的化することであり、従って、アレルギー関連疾患を治療するための新しいより効率的な細胞特異的薬剤を提供することである。

【0024】

従って、阻害性受容体IRp60（BsAbの第1の成分）と、マスト細胞、好酸球または好塩基球に対して特異的である1つの他のマーカー（BsAbの第2の成分）とを認識し、これらを活性化するBsAbであって、このマーカーが、阻害性受容体（すなわち、BsAbの第1の成分）の活性化によってそのシグナル伝達経路が阻害される活性化因子（または受容体）であるBsAbを提供することが本発明の1つの目的である。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明の他の使用および目的が、説明が進むに従い明らかになる。

【発明の開示】

【0026】

第1の態様において、本発明は、2つの異なる標的認識成分を含む、標的細胞を標的化するための二重特異性複合体に関連し、この成分のそれぞれは、標的細胞上に位置する第1および第2の標的に特異的にそれぞれ結合する分子またはその任意の機能的フラグメントを含み、1つの標的が阻害性受容体IRp60またはその相同体であり、第2の標的が、阻害性受容体により媒介される阻害性経路を活性化する細胞特異的な活性化因子である。最も重要なことに、この複合体が標的細胞に結合することにより、アレルギー性反応が阻害される。10

【0027】

1つの実施形態において、この標的認識成分は、架橋剤、リンカー化合物、キャリア、合成スペーサー、固定化基質、および、(Gly₄Ser)₃モチーフに基づく柔軟な領域のいずれか1つを介して連結される。好ましくは、この標的認識成分は架橋される。

【0028】

別の実施形態において、この細胞は造血系譜に由来し、好ましくは、マスト細胞、好酸球および好塩基球のいずれかである。

【0029】

さらなる実施形態において、この二重特異性複合体の標的是、免疫グロブリン、Fc受容体、サイトカイン受容体、増殖因子受容体、接着分子、Igスーパーファミリー受容体、ケモカイン受容体、炎症性媒介因子受容体、ホルモン受容体、補体因子受容体、プロテアーゼにより活性化された受容体、および、酵素からなる群から選択することができる。20

【0030】

二重特異性複合体の認識成分は、天然に存在する抗体、合成抗体または組換え抗体、単鎖Fv(scfv)、二機能性scfv、ジアボディー、F(ab)ユニット、F(ab')ユニット、二重特異性F(ab')コンジュゲート、化学的に架橋された二機能性抗体、線状抗体、抗体のF(ab')₂抗原結合性フラグメント、あるいはそれらの任意の機能性フラグメントのいずれか1つから選択することができる。好ましくは、認識成分は二重特異性F(ab')コンジュゲート(すなわち、一緒に連結されている2つのF(ab')ユニット)である。30

【0031】

1つの特定の実施形態において、二重特異性複合体の標的細胞はマスト細胞であり、第2の標的是、IgE、cKITTまたはFcRIのいずれかである。

【0032】

1つの具体的な実施形態において、本発明は、IRp60またはその任意の相同体およびIgEを認識する二重特異性F(ab')コンジュゲートを含む、標的細胞を標的化するための二重特異性複合体を提供する。

【0033】

この具体的な実施形態において、F(ab')ユニットは、2つの異なる抗体(IRp60に対する抗体およびIgEに対する抗体)のF(ab')フラグメントに対応する。40

【0034】

別の具体的な実施形態において、本発明は、IRp60またはその任意の相同体およびcKITTを認識する二重特異性F(ab')コンジュゲートを含む、標的細胞を標的化するための二重特異性複合体を提供する。

【0035】

さらなる具体的な実施形態において、本発明は、IRp60またはその任意の相同体およびFcRIを認識する二重特異性F(ab')コンジュゲートを含む、標的細胞を標的化するための二重特異性複合体を提供する。50

【0036】

上記の二重特異性複合体のいずれか1つはマスト細胞活性の阻害剤として機能することができる。

【0037】

別の特定の実施形態において、標的細胞は好酸球であり、第2の標的は、IL-5受容体(IL-5R)、および、エオタキシンに対する受容体(CCR3)のいずれかである。従って、本発明の二重特異性複合体は、IRp60またはその任意の相同体およびIL-5RまたはCCR3を認識する二重特異性F(a b')コンジュゲートを含む複合体であり得る。この複合体は好酸球活性の阻害剤として機能することができる。

【0038】

本発明において記載される二重特異性複合体はアレルギーエフェクター細胞活性の阻害剤として機能することができ、アレルギー性反応、ならびに、マスト細胞および/または好酸球および/または好塩基球により媒介される反応のいずれかによって誘導される状態を治療するために特に好適である。この状態は、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、季節性アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー性湿疹、様々なアレルゲンに対するアレルギー性の障害および応答、全身性アナフィラキシー、全身性肥満細胞過剰増殖、限局性強皮症/色素性じんま疹、マスト細胞白血病、アテローム性動脈硬化、移植片拒絶、多発性硬化症、線維形成性肺疾患、神経線維腫症、ケロイド、強皮症、リウマチ様関節炎、変形性関節炎、急性痛風、眼の瘢痕性類天疱瘡、クローン病、腹膜癒着、慢性移植片対宿主病(GVHD)、好酸球增多筋痛症候群、外因性気管支喘息、鼻ポリープ症、ウェーベナー肉芽腫症、内因性気管支喘息、間質性肺疾患および他の肺疾患、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、類肉腫症、特発性肺線維症、新生物疾患および骨髄増殖性疾患、T細胞リンパ腫およびホジキン病からなる群から選択される。10

【0039】

第2の認識標的がIgEまたはcK1TまたはFcRIである二重特異性複合体は、マスト細胞に関連した状態の治療における薬剤としての使用に特に好適であり、この場合、この状態は特に、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、季節性アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー性湿疹、様々なアレルゲンに対するアレルギー性の障害および応答、全身性アナフィラキシー、全身性肥満細胞過剰増殖、限局性強皮症/色素性じんま疹、マスト細胞白血病、アテローム性動脈硬化、移植片拒絶、多発性硬化症、線維形成性肺疾患、神経線維腫症、ケロイド、強皮症、リウマチ様関節炎、変形性関節炎、急性痛風、眼の瘢痕性類天疱瘡、クローン病、腹膜癒着、慢性移植片対宿主病(GVHD)である。20

【0040】

第2の認識標的がIL-5RまたはCCR3である二重特異性複合体は、好酸球に関連した状態の治療における薬剤としての使用に特に好適であり、この場合、この状態は特に、外因性気管支喘息、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、オンコセルカ皮膚炎、アトピー性皮膚炎、鼻ポリープ症、小結節、好酸球増加症、リウマチ、皮膚炎および腫れ(NEDS)、脈管炎性肉芽腫性疾患、一時的脈管炎、チャーグ・ストラウス症候群、多関節炎、ウェーベナー肉芽腫症、多発性硬化症、移植片拒絶、内因性気管支喘息、間質性肺疾患および他の肺疾患、好酸球性胸膜滲出、一過性肺好酸球浸潤物(Loeffler)、組織球症、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、類肉腫症、特発性肺線維症、局所的好酸球増加症、ネコひっかき病、無熱性結核、幼児期におけるクラミジア肺炎、新生物疾患および骨髄増殖性疾患、気管支原性ガン、好酸球増加症候群、T細胞リンパ腫およびホジキン病、クローン病、春季角結膜炎、若年性炎症結膜炎母斑、木村病、グレイヒ病である。40

【0041】

別の態様において、本発明は、本明細書中に記載されるような二重特異性複合体を活性な薬剤として含む医薬組成物を提供する。この医薬組成物は医療のために使用することが50

できる。

【0042】

1つの実施形態において、この医薬組成物は、第2の認識標的が IgE または cKITT または FcRI のいずれかであり、かつ、マスト細胞の過活性または過形成に由来する任意の疾患または状態の治療における使用のために特に好適である二重特異性複合体を活性な薬剤として含む。この疾患は、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー性湿疹、様々なアレルゲンに対するアレルギー性の障害および応答、全身性アナフィラキシー、全身性肥満細胞過剰増殖、限局性強皮症／色素性じんま疹、マスト細胞白血病、アテローム性動脈硬化、移植片拒絶、多発性硬化症、線維形成性肺疾患、神経線維腫症、ケロイド、強皮症、リウマチ様関節炎、変形性関節炎、急性痛風、眼の瘢痕性類天疱瘡、クローン病、腹膜癒着、慢性GVHD、気管支喘息、鼻ポリープ症、ウェーゲナー肉芽腫症、間質性肺疾患および他の肺疾患、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、類肉腫症、特発性肺線維症、新生物疾患および骨髄増殖性疾患、T細胞リンパ腫およびホジキン病からなる群から選択される。10

【0043】

別の実施形態において、この医薬組成物は、第2の認識標的が IL-5R またはCCR3 であり、かつ、好酸球の過活性または過形成に由来する任意の疾患または状態の治療における使用のために特に好適である二重特異性複合体を活性な薬剤として含む。この状態は、外因性気管支喘息、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、オンコセルカ皮膚炎、アトピー性皮膚炎、鼻ポリープ症、小結節、好酸球増加症、リウマチ、皮膚炎および腫れ（NEDS）、脈管炎性肉芽腫性疾患、一時的脈管炎、チャーグ・ストラウス症候群、多関節炎、ウェーゲナー肉芽腫症、多発性硬化症、移植片拒絶、気管支喘息、間質性肺疾患および他の肺疾患、好酸球性胸膜滲出、一過性肺好酸球浸潤物（Loeffler）、組織球症、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、類肉腫症、特発性肺線維症、局所的好酸球増加症、ネコひっかき病、無熱性結核、幼児期におけるクラミジア肺炎、新生物疾患および骨髄増殖性疾患、気管支原性ガン、好酸球増加症候群、T細胞リンパ腫およびホジキン病、クローン病、春季角結膜炎母斑、木村病、グレイヒ病からなる群から選択される。20

【0044】

本発明の医薬組成物は、緩衝剤、添加剤、安定化剤、希釈剤および／または賦形剤をさらに含むことができ、本発明の医薬組成物はまた医薬配合物と呼ぶことができる。

【0045】

さらなる態様において、本発明は、マスト細胞および／または好酸球の過活性または過形成に関連した任意の疾患または状態を治療するための医薬組成物の調製における本発明において記載される二重特異性複合体の使用に関係し、この場合、この疾患は、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー性湿疹、様々なアレルゲンに対するアレルギー性の障害および応答、全身性アナフィラキシー、全身性肥満細胞過剰増殖、限局性強皮症／色素性じんま疹、マスト細胞白血病、アテローム性動脈硬化、移植片拒絶、多発性硬化症、線維形成性肺疾患、神経線維腫症、ケロイド、強皮症、リウマチ様関節炎、変形性関節炎、急性痛風、眼の瘢痕性類天疱瘡、クローン病、腹膜癒着、慢性移植片対宿主病（GVHD）、好酸球增多筋痛症候群、気管支喘息、鼻ポリープ症、ウェーゲナー肉芽腫症、間質性肺疾患および他の肺疾患、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、類肉腫症、特発性肺線維症、新生物疾患および骨髄増殖性疾患、T細胞リンパ腫およびホジキン病からなる群から選択される。40

【0046】

本発明のこの態様の1つの特定の実施形態は、第2の認識標的が IgE または cKITT または FcRI である二重特異性複合体、あるいは、そのような二重特異性複合体を含む医薬組成物の、マスト細胞の機能を阻害することにおける使用である。50

【0047】

本発明のこの態様の別の特定の実施形態は、第2の認識標的がIL-5RまたはCCR3である二重特異性複合体の、あるいは、そのような二重特異性複合体を含む医薬組成物の、好酸球の機能を阻害することにおける使用である。

【0048】

本発明のさらにさらなる態様において、本発明は、マスト細胞の過活性および過形成に関連した任意の疾患または状態を治療する方法を提供し、この場合、この方法は、第2の認識標的がIgEまたはcKITTまたはFc_{RI}である本発明の二重特異性複合体の治療効果的な量、または、そのような二重特異性複合体を含む医薬組成物の治療効果的な量を、それを必要としている対象に投与することを含む。 10

【0049】

別のさらなる態様において、本発明は、好酸球の過活性および過形成に由来する任意の疾患または状態を治療する方法を提供し、この場合、この方法は、第2の認識標的がIL-5RまたはCCR3である本発明の二重特異性複合体の治療効果的な量、または、そのような二重特異性複合体を含む医薬組成物の治療効果的な量を、それを必要としている対象に投与することを含む。

【0050】

加えて、本発明は、マスト細胞の活性を阻害する方法を提供し、この場合、この方法は、マスト細胞を、第2の認識標的がIgEまたはcKITTまたはFc_{RI}である本発明の二重特異性複合体、または、そのような二重特異性複合体を含む医薬組成物と、好適な量の時間、接触させることを含む。 20

【0051】

あるいは、好酸球の活性を阻害する方法が提供され、この場合、この方法は、好酸球を、第2の認識標的がIL-5RまたはCCR3である本発明の二重特異性複合体、または、そのような二重特異性複合体を含む医薬組成物と、好適な量の時間、接触させることを含む。

【0052】

本発明は、下記の図面を参照して、より詳細に記載される。

図面の簡略説明

図1は阻害性NK受容体についてのヒトマスト細胞のスクリーニングを示す。NK細胞に対する阻害性機能が知られている受容体の大きな集団のFACS分析により、ヒトマスト細胞がIRp60を高レベルで発現することが明らかにされた。この発現は、他の阻害性受容体が発現していないなかった[n=4]ので特異である。 30

図2はIRp60がマスト細胞および好酸球において発現することを示す。

図2A：ヒトマスト細胞はIRp60を発現する。CBMCおよびHLMCにおけるIRp60発現のFACS分析。IRp60が、モノクローナル抗IRp60抗体を使用し、その後、抗マウスFITCを使用して、CBMC[左側]およびHLMC[右側]において検出された。黒色ピークは陰性のイソ型コントロールを表す。白色ピークは抗IRp60染色を表す。n=10[CBMC]およびn=3[HLMC]を表す。 40

図2B：IRp60の発現が好酸球の主要塩基性タンパク質(MBP)によって調節される。CBMCを好酸球由来MBP[左側]またはポリ-L-アルギニン[右側]と24時間インキュベーションし、IRp60の発現をFACSによって分析した。黒色ピーク[iso]は、IgGを使用する陰性のイソ型コントロールを表す。灰色ピーク[EM]は、富化培地単独により処理されたCBMCの抗IRp60染色を表す。白色ピークはMBP処理CBMC[左側]またはポリ-L-アルギニン処理CBMC[右側]の抗IRp60染色を表す。

図3はIRp60の架橋はIgE媒介による放出を阻害することを示す。

図3A：抗IRp60による刺激の後におけるIgE活性化CBMCからの-ヘキソサミニダーゼおよびトリプターゼのパーセント放出。

図3B：抗IRp60による刺激の後におけるIgE活性化CBMCからのIL-4のパ 50

ーセント放出。

C B M C を抗 I R p 6 0 被覆プレートでインキュベーションし、抗 I g E 抗体により 30 分間活性化した。 - ヘキソサミニダーゼおよびトリプターゼの放出レベルを、記載されるような酵素発色法アッセイによって評価し、% 放出として表した。 I L - 4 の放出レベルを E L I S A によって評価し、 p g / m L で表した。 - ヘキソサミニダーゼの放出を記載されるように評価した。 E M 、富化培地単独； X 、架橋剤 [ヒツジ抗マウス、ヤギ抗マウス I g E] ；抗 I R p 6 0 、抗 I R p 6 0 により被覆されたプレート； I g G 、イソ型により被覆されたプレート。

図 4 は I R p 6 0 の架橋は S C F 誘導による C B M C の生存を阻害することを示す。 C B M C を、 S C F [1 0 0 n g / m L] とともに、または、 S C F を伴うことなく、抗 I R p 6 0 被覆プレートで 24 時間および 48 時間インキュベーションし、ヨウ化プロピジウム [P I] について染色し、 P I について陽性の細胞を F A C S によって分析した。データは全細胞の P I 陽性細胞の % として示される。 E M 、富化培地単独； X 、架橋剤 [ヒツジ抗マウス、ヤギ抗マウス I g E] ； I R p 6 0 、抗 I R p 6 0 により被覆されたウェル； I s o 、イソ型により被覆されたウェル。

図 5 は I R p 6 0 の架橋は I g E 誘導による [C a₂₊] 流入を阻害することを示す。 C B M C 上の I R p 6 0 を抗 I R p 6 0 抗体およびヒツジ抗マウス抗体とのインキュベーションによって架橋し、細胞にカルシウム Green - 1 A M を負荷した。 [C a₂₊] が F L - 1 の幾何平均によって表される。 E M 、富化培地単独； X 、架橋剤 [ヒツジ抗マウス、ヤギ抗マウス I g E] ； I R p 6 0 、抗 I R p 6 0 ； I s o 、イソ型。

図 6 は I R p 6 0 チロシンリン酸化およびホスファターゼ動員を示す。

図 6 A : C B M C をオルトバナジン酸ナトリウムで処理した。 I R p 6 0 を、抗 I R p 6 0 または I g G 1 [陰性コントロール] を使用して沈殿させ、ホスホチロシン [p Y 9 9] 、 S H P - 1 、 S H P - 2 および S H I P - 1 に対してプロットした。

図 6 B : I R p 6 0 チロシンリン酸化は受容体架橋に依存的である。 C B M C を、抗 I R p 6 0 / I g G 1 被覆プレートにおいて 0 秒間、 15 秒間、 30 秒間、 60 秒間および 120 秒間、または、 I g G 被覆ウェルにおいて 30 秒間および 60 秒間インキュベーションし、その後、沈殿させ、ウェスタンプロットをホスホチロシン [p Y 9 9] に対して、または、タンパク質のためのコントロールとしての I R p 6 0 に対して行った。

図 7 はマウスマスト細胞は L M I R 1 を発現することを示す。 B A L B / マウス由来の骨髄マスト細胞および新しく単離された腹膜マスト細胞をモノクローナル抗体により染色し、 F A C S によって分析した。 B M M C 、骨髄マスト細胞； M P M C 、腹膜マスト細胞。

図 8 は L M I R 1 の中和はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおける強化されたマスト細胞活性化およびその後の好酸球浸潤をもたらすことを示す。 O V A 誘導によるアレルギー性腹膜炎を記載されたように誘導し、 O V A による抗原攻撃後 45 分または 48 時間に屠殺し、腹膜腔を媒介因子分析および細胞計数ならびにフローサイトメトリーのためにそれぞれ洗浄した。トリプターゼおよび - ヘキソサミニダーゼのレベルを、記載されるような酵素発色アッセイを使用して評価した。抗原攻撃後 48 時間で集められた洗浄液からの細胞を C C R 3 について染色し、 F A C S により分析した。

図 8 A : L M I R 1 の中和は抗原攻撃後 45 分において腹膜トリプターゼレベルにおける劇的な増大をもたらした。

図 8 B : L M I R 1 の中和は抗原攻撃後 45 分において腹膜 - ヘキソサミニダーゼレベルにおける劇的な増大をもたらした。

図 8 C : 増大した数の好酸球が、 L M I R 1 中和後（抗原攻撃後 24 時間）、腹膜腔に浸潤した。

図 8 D : L M I R 1 の中和は抗原攻撃後 24 時間ににおいて腹膜エオタキシン - 2 レベルにおける劇的な増大をもたらした。

図 9 は I R p 6 0 がヒト好酸球において発現することを示す。

図 9 A : ヒトマスト細胞上における阻害性受容体の発現パターン。 I R p 6 0 、 p 1 4 0

10

20

30

40

50

、 L I R 3 / I L T 5 、 F c R I I B 、 L I R 1 / I L T 2 、 L I R 3 / I L T 5 、 p 58 . 1 、 p 58 . 2 、 p 70 および N K G 2 A / C D 9 4 の、 C B M C における発現を示す F A C S 分析 (n = 1 0) 。

図 9 B : 鼻ポリープの好酸球は著しいレベルの I R p 6 0 を発現する。左側のピークは、イソ型コントロールと一致した抗体に対応し、一方、右側のピークは I R p 6 0 についての染色を示す。

図 1 0 は I R p 6 0 はヒト好酸球の g M - C S F 媒介による生存を阻害することを示す。グラフは、抗 I R p 6 0 またはイソ型一致コントロールおよびヒツジ抗マウスによる架橋、ならびに、様々な時点での示された濃度の G M - C S F による処置の後におけるアボトーシス好酸球の割合を示す。
10

図 1 0 A : G M - C S F との 1 8 時間のインキュベーションの後。

図 1 0 B : G M - C S F との 3 6 時間のインキュベーションの後。

図 1 1 は I R p 6 0 はヒト好酸球の G M - C S F 媒介による活性化を阻害することを示す。

図 1 1 A : I R p 6 0 を架橋したときに著しく阻害された、 I L - 1 、 I L - 4 および I F N - の G M - C S F 媒介による放出を示すヒストグラム。

図 1 1 B : I R p 6 0 を架橋したときに完全に阻止された、 I L - 8 の G M - C S F 媒介による放出を示すヒストグラム。

図 1 2 は I R p 6 0 はヒト好酸球のエオタキシン依存的走化性を阻害することを示す。

図 1 2 A : グラフは、エオタキシンの異なる濃度に向かって移動した、抗 I R p 6 0 、抗 C C R 3 、イソ型 (I s o) または富化培地単独 (E M) による処理の後における好酸球の数を示す。
20

図 1 2 B : ヒストグラムは、抗 I R p 6 0 、抗 C C R 3 、イソ型 (I s o) または富化培地単独 (E M) とのインキュベーションの後、 F A C S によって測定された、好酸球におけるエオタキシン誘導による形状変化を示す。

図 1 3 は二重特異性 F (a b ') 2 フラグメントの作製および特徴づけを示す。

図 1 3 A : 起こり得る物質損失をモニターするために、二重特異性 F (a b ') の合成における各段階から得られたサンプルを非変性 S D S - P A G E で泳動した [F a b ' 作製 : k D a 、サイズマーカー ; I g G 、出発抗体 ; i n t 、 3 回のゲルろ過からのサンプル ; F a b ' 、カップリングのための準備ができた得られた F a b ' フラグメント] 。カップリング後、還元性 S D S - P A G E を行って、 B s A b 複合化を確認した [B s A b : k D a 、サイズマーカー ; B s A b 、二重特異性抗体 ; I g G 、完全な抗体のコントロール] 。 B s A b の重鎖は約 3 7 k D a において明らかに三量体化している。
30

図 1 3 B : F A C S による B s A b 二重特異性の評価。抗ヒト I g E 、抗ヒト I R p 6 0 または I E 1 を使用して、新しい非感作ヒトマスト細胞 [C B M C] 、および、ヒト I g E により感作された R B L 細胞 [I g E - R B L] の両方を染色し、その後、抗マウス F I T C により染色した。染色が F L - 1 チャネルでの平均蛍光強度 [M F I] として表された。

図 1 4 は I E 1 はインビトロで I g E 誘導によるマスト細胞脱顆粒化を阻害することを示す。 I g E 感作のヒトマスト細胞を、抗 I g E 媒介による活性化の前に、 5 μ g / m L の I E 1 またはイソ型コントロールと 3 0 分間インキュベーションした。 - ヘキソサミニダーゼの放出を、発色酵素アッセイを使用して測定した [E M 、富化培地により処理された細胞 ; X 、抗 I g E 処理 ; i s o 、一致するイソ型コントロール] 。

図 1 5 は L E 1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいてトリプターゼ放出を阻害することを示す。

図 1 5 A : オバルブミン感作マウスに 3 μ g の L E 1 またはイソ型コントロールを注射し、続いて、 3 0 分後にオバルブミンにより抗原攻撃した。 4 5 分後、マウスを屠殺し、トリプターゼを、発色酵素アッセイを使用して腹膜洗浄液において測定した [S a l . 、生理的食塩水攻撃のマウス ; O V A 、オバルブミン攻撃のマウス ; L E 1 、 L E 1 による前処理、その後、オバルブミン攻撃 ; I s o 、イソ型による前処理、その後、オバルブミン
40

攻撃]。

図15B : L E 1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいてエオタキシン - 2 放出を阻害する。オバルブミン感作マウスに 3 μ g の L E 1 またはイソ型コントロールを注射し、続いて、30分後にオバルブミンにより抗原攻撃した。24時間後、マウスを屠殺し、エオタキシン - 2 を E L I S A によって腹膜洗浄液において測定した [S a l . 、生理的食塩水抗原のマウス ; O V A 、オバルブミン攻撃のマウス ; L E 1 、 L E 1 による前処理、その後、オバルブミン攻撃 ; I s o 、イソ型による前処理、その後、オバルブミン攻撃]。

図16は L E 1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいて好酸球の動員を阻害することを示す。オバルブミン感作マウスに 3 μ g の L E 1 またはイソ型コントロールを注射し、続いて、30分後にオバルブミンにより抗原攻撃した。48時間後、マウスを屠殺し、腹膜洗浄液中の細胞を 2×10^5 個の細胞に正規化し、好酸球集団をより良好に明らかにするために C C R 3 - F I T C および C D 4 8 - P E について染色した。
10

図16A : F A C S 分析を、腹膜腔における好酸球の割合を定量するために行った。

図16B : F A C S 分析で得られた結果を表すヒストグラム [S a l i n e 、生理的食塩水攻撃のマウス ; O V A 、オバルブミン攻撃のマウス ; L E 1 、 L E 1 による前処理、その後、オバルブミン攻撃 ; I s o 、イソ型による前処理、その後、オバルブミン攻撃]。

図17は L E 1 は受動的皮膚アナフィラキシーのマウスモデルにおいてマスト細胞の脱颗粒化を阻害することを示す。マウスを、L E 1 またはイソ型コントロールによる前処理と同時に I g E 抗 D N P により感作した。2時間後、マウスをエバンスブルー溶液と一緒に静脈内 D N P ボーラスによって抗原攻撃した。皮膚のアナフィラキシーを青色色素のスポットサイズによって目視評価した [S a l i n e + D N A 、 I g E なし ; I g E + D N P 、 I g E のみ ; I g E + L E 1 + D N P 、 L E 1 前処理部位 ; I g E + i s o t y p e + D N P 、イソ型前処理部位]。
20

図17A : 青色色素スポットアッセイを示す皮膚の区域。

図17B : 異なる試料を用いた図17Aと同じ図。

【発明を実施するための最良の形態】

【0053】

下記の略号が本明細書全体を通して使用される :

- B s A b : 二重特異性抗体
- C B M C : ヒト臍帯血マスト細胞
- E C P : 好酸球カチオン性タンパク質
- F C S : ウシ胎児血清
- H L M C : ヒト肺マスト細胞
- I E 1 : I R p 6 0 および I g E を認識する二重特異性抗体
- I T A M : 免疫受容体のチロシン型活性化モチーフ
- I T I M : 免疫受容体のチロシン型阻害性モチーフ
- L E 1 : L M I R - 1 および I g E を認識する二重特異性抗体
- m A b : モノクローナル抗体
- M A P K : マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
- M B P : 好酸球由来主の要塩基性タンパク質
- N G F : 神経増殖因子
- S C F : 幹細胞因子
- S H 2 : S r c 相同性 2
- S i g l e c : シアル酸結合性 I g 様レクチン

【0054】

アレルギー、特に、喘息は、主要な増大しつつある健康問題となっている一方で、有効かつ選択的な、副作用のない治療はそれらについて未だない。

【0055】

本発明者らは、副作用が事実上なく、かつ、下記の実施例において明らかにされるよう
50

にアレルギー性反応を特異的に阻害することにおいて効果的である、アレルギーおよび喘息を治療するための新規な方法を提供する。

【0056】

本発明は、マスト細胞および好酸球を選択的に標的化および阻害する二重特異性複合体を提供する。アレルギー性応答に関与する2つの重要な細胞、すなわち、マスト細胞および好酸球を標的化することによって、本発明の二重特異性複合体は、既知または未知であっても、どのアレルゲンに対しても有用であり、また、任意のアレルギー性状態（例えば、喘息、アトピー性湿疹、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎）に対しても有用である。

【0057】

従って、本発明の二重特異性複合体は2つの異なる標的認識成分を含む。この成分は、好みしくは、任意の好適な手段を介して連結される抗体またはその誘導体（例えば、scFv、F(ab)、F(ab')）、抗原結合性フラグメントなど）である。1つの特定の例において、実験手順（「二重特異性抗体の作製」）で記載されるように、認識成分は、記載されるように、架橋剤の5'，5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)（DNTB）を使用して化学的に架橋される[Graziano, R.F. および Gupta, P. (2004)、二重特異性抗体の化学的作製、Methods in Molecular Biology、第283巻、C.M.Niemeyer編、Humana Press Inc.、Totowa, NJ]。

【0058】

最も重要なことは、両方の認識成分の標的が同じ細胞において突き止められる。一方の標的が阻害性受容体IRp60またはその任意の相同体（例えば、LMIR1、マウスの相同体[Kumagai, H. 他 (2003)、Biochem. Biophys. Res. Commun.、307: 719~729]）である。認識成分が阻害性受容体に結合することにより、標的細胞の活性の阻害をもたらす阻害性経路の引き金が引かれる。複合体の特異性が、第2の認識成分の標的（これは常に細胞特異的標的である）によって提供される。選ばれた1つの標的が、例えば、IgE（これはマスト細胞において特異的に発現する）である。マスト細胞特異的である他の好みしい標的がcKITおよびFcRIである。同様に、好酸球に向けられる複合体は、例えば、IL-5RまたはCCR3を標的とする第2の認識成分を有する。IgEの場合、この免疫グロブリンは通常、その受容体FcRIに結合し、従って、抗IgE抗体がその標的に結合することにより、その受容体の活性化がもたらされる。

【0059】

従って、本発明の二重特異性複合体は、好みしくは、IRp60と、マスト細胞および好酸球ならびに好塩基球に対して特異的である第2の標的とを標的とする二重特異性の抗体である。

【0060】

そのような二重特異性抗体を得るために、本発明者らは、最初に、IRp60の発現およびその作用機構を調べた（実施例1～実施例11を参照のこと）。

【0061】

IRp60は、最初、NK細胞において機能的および分子的に特徴づけられた[Contoni, C. 他 (1999)、Eur. J. Immunol.、29 (10): 3148~59]。この場合、特異的な抗体によるIRp60の架橋はNK細胞の細胞毒性および細胞溶解活性を強く阻害したことでも示された。本発明者らは、マスト細胞におけるIRp60の架橋がCa²⁺の流入および媒介因子の放出を阻害することを示している。同様に、好酸球におけるIRp60の架橋により、この阻害性受容体が、好酸球の活性化、生存および走化性を調節することが明らかにされた。（i）IRp60がアレルギーのエフェクター細胞上において発現し、かつ機能的であり、かつ、（ii）IRp60が、アレルギー応答をインピボで調節することに関与するという事実は全く予想外であったことに留意することは、特に、この阻害性受容体がリンパ球/NK集団に特有であるとして

10

20

30

40

50

最初に記載されたので、重要である。さらに、本明細書中に記載される結果は、IRp60が、FcR_{IIB}とは対照的に、非常に強力な阻害性受容体であることを示している。この性質は、おそらくは、IRp60が4つのITIMを有し、一方、FcR_{IIB}は1つだけしか有しないという事実によって説明される。加えて、IRp60は、ヒトの原始的なマスト細胞および好酸球に対して機能的である唯一のIgスーパーファミリー阻害性受容体である。その上、本明細書中に記載されるインビボ実験では、アレルギー性炎症時におけるこの阻害性受容体の関連性が明らかにされる。

【0062】

図1に示されるように、IRp60が肺組織のマスト細胞で発現しており、このことは、IRp60が健康および疾患においてマスト細胞の調節における機能的重要性を有し得ることを示している。IRp60はまた、NK細胞 [Canton i (1999)、同上同頁；データは示されず]、T細胞、単球、顆粒球および好塩基球 [データは示されず]でも発現する。従って、IRp60は様々な細胞タイプの強力な調節因子であるかもしれない。マスト細胞上におけるIRp60の発現は、炎症性環境におけるこれらの細胞の応答がこの受容体によって調節され得ることを示唆する。実際、本発明者らは、マスト細胞上におけるIRp60の発現が、様々なサイトカインまたは媒介因子 [例えば、IL-3、IL-4、IL-13、TNF-、NGFおよび単量体IgE]とのその培養の後で変化していないことを見出した。図2は、驚くべきことに、IRp60が亜活性化濃度で好酸球由来のMBPによってダウンレギュレーションされたことを示している。さらに、MBPは、FcR_{IIB}を含むいくつかの受容体のダウンレギュレーションを誘導するが、IgEにより感作されたヒトマスト細胞ではc-kitまたはFcRのダウンレギュレーションを誘導しなかった [データは示されず]。この発見は、マスト細胞および好酸球が相互作用する慢性的なアレルギー性炎症の状況では極めて重要である。実際、本発明者らおよび他の研究者らは、MBPがマスト細胞の活性化を調節し得ることを示している [Piliponsky (2003)、同上同頁]。MBPは、纖維芽細胞と同時培養されたCBMCを活性化することが示されているが、纖維芽細胞が存在しない懸濁状態ではCBMCを著しく活性化しない。MBPは、阻害性受容体の発現を操作することによってマスト細胞活性化の閾値を調節していることが仮定され得る。以前に述べられたように、マスト細胞の活性化は、FcRおよびc-kitなどの受容体により媒介される活性化シグナルと、FcR_{IIB}およびIRp60などの受容体によって媒介される阻害性シグナルとの間での微妙なバランスで保たれている可能性が非常に高い。阻害性シグナルを低下させることによって、MBPはこのバランスをマスト細胞の活性化に向かって変化させるかもしれない。

【0063】

マスト細胞は、主としてIgEを介してアレルギーにおいて活性化されることが知られているが、マスト細胞はまた、IgEに依存しない活性化のときに脱颗粒化することができる。従って、IRp60の影響を両方の様式で調べた。IRp60の架橋は、IgEにより活性化されたCBMCからの-ヘキソサミニダーゼ、トリプターゼおよびIL-4の放出を阻害するが、化合物48/80により媒介されるCBMCの活性を阻害しない。このことは、IRp60が、チロシンリン酸化を伴う経路を妨害するが、GTP依存性のGタンパク質経路はおそらくは妨害しないことを示している。加えて、FcR媒介によるカルシウム可動化、脱颗粒化、ならびに、エイコサノイドおよびサイトカインの合成が、早い段階でのチロシンキナーゼ活性化事象（特に、Sykの活性化）に依存することが明らかである [Simon M他 (2005)、J. Biol. Chem.、280: 4510~7]。これに一致して、IRp60の架橋はIgE媒介のカルシウム流入を完全に阻止することができた。加えて、IRp60の架橋はCBMCのSCF媒介による生存を阻害する。このデータは、いくつかの報告が、マスト細胞に対するSCF媒介作用を阻止する阻害性受容体の能力を明らかにしているので、驚くほどのことではない。例えば、FcR_{IIB}は、SCF媒介による生存を阻止することが示された [Mabec O他 (2002)、Mol. Immunol.、38: 1295~9]。そのうえ、gp

10

20

30

40

50

49B1は、SCFを介してマスト細胞の活性化を低下させることが報告された [Feldweg A.M.他(2003)、Eur. J. Immunol.、33:2262~8]。まとめると、これらのデータは、IRp60による阻害を受けやすい他のマスト細胞機能の予測を可能にする。しかし、さらなる機能（例えば、Toll様受容体によるパターン認識）および他の免疫機能などに対するその作用は未だ調べられていない。

【0064】

最も重要なことは、IRp60の観測された作用機構が、いくつかの重要な態様では、ヒトマスト細胞におけるFc R I I Bの作用機構と著しく異なるので、今回の結果は予想外であった。Fc R I I Bは1つだけのITIM配列を含有し、これに対して、IRp60は4つのITIMを含有し、そのうちの3つが正統的であり（I/S/L/V-x-Y-x-x-L/Vのコンセンサスに従う）であり、その一方で、4番目は正統的でない [Cantonni(1999)、同上同頁]。その後のホスファターゼ動員のための結合部位としてこのITIMの実際の役割は依然として不明である。だが、この部位はチロシンリン酸化を受けることができる〔データは示されず〕。別の違いは、IRp60はSHP-1およびSHIP-1のみを動員するだけで、SHP-2を動員しないことが示されていることである。この観測結果は、IgSF13 (IRp60の近縁ファミリーのメンバー) が同じホスファターゼ配置パターンに従っているという最近報告されたデータ [Sui L.他(2004)、Biochem Biophys. Res. Commun.、319:920~8] を裏付けている。様々な阻害性受容体による差のあるホスファターゼ動員の可能性が存在するが、この結果の意味は依然として調べる必要がある。

【0065】

従って、本発明において記載される二重特異性抗体、または、そのような二重特異性抗体を含む組成物は、マスト細胞および好酸球、すなわち、アレルギーの2つの重要なエフェクター細胞に対する阻害性機構（経路）を選択的に活性化するために設計され、従って、これらの標的細胞のみにおいて阻害性経路を選択的に開始させる。この阻害は、下記で詳しく記載されるように、それらの機能または活性の阻害によって行われる。

【0066】

マスト細胞または好酸球の活性（または機能）として、下記のプロセスのいずれか1つが理解される：成熟化、生存、脱顆粒化、プライミング（細胞を作用のために調製し、細胞を待機状態に変化させること）、走化性、接着、増殖、ならびに、サイトカイン、増殖因子、アラキドン酸代謝物、ケモカインおよびリン脂質代謝物などの合成。これらのプロセスの活性化は、これらの細胞に対して特異的である受容体の刺激（すなわち、誘導または活性化）に依存する。さらに、これらのプロセスはどれも、マスト細胞または好酸球の活性を阻害し、また、アレルギー性の反応およびマスト細胞／好酸球媒介による反応により誘導される状態を治療する二重特異性複合体の能力を明らかにするためのパラメーターとして使用することができる。

【0067】

従って、二重特異性複合体（例えば、本発明において記載される二重特異性抗体）がその2つの標的（すなわち、阻害性受容体IRp60および第2の活性化因子標的）に結合することにより活性化される阻害性経路は、連続または同時に起こる下記の事象力スケードによって記載することができる：（a）阻害性受容体の細胞内ITIMドメインのリン酸化；（b）細胞内ホスファターゼ（例えば、SHP-1、SHP-2、SHIP-1、SHIP-2またはPTEN）の動員；（c）活性化された標的に存在するITAMまたはチロシンリン酸化ドメインの脱リン酸化。

【0068】

従って、本明細書中に記載される二重特異性抗体は、アレルギー性の反応およびマスト細胞／好酸球媒介による反応の治療、ならびに、マスト細胞／好酸球の過活性または過形成に由来する任意の状態の治療においてインビボまたはエクスピボで使用することができる。

【0069】

10

20

30

40

50

I R p 6 0 活性化の生物学的関連性をインビボで調べるために、本発明者らはアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいてこの受容体を中和した（実施例 7 および実施例 14）。I R p 6 0 は C M R F - 3 5 H の対立遺伝子イソ型である [C a n t o n i C 他 (1 9 9 9) 、 E u r . J . I m m u n o l . , 2 9 : 3 1 4 8 ~ 5 9]。インビボ機能はどうも、今のところ、I R p 6 0 に帰属されていないので、マウス C M R F - 3 5 H ファミリーのメンバー [C L M - 1 と呼ばれる] が、S H P - 1 の動員を介して破骨細胞形成を阻害することが示された [C h u n g , D . H . 他 (2 0 0 3) 、 J . I m m u n o l . , 1 7 1 (1 2) : 6 5 4 1 ~ 8]。近年、マウスのマスト細胞が、V タイプ I g フォールド配列および I T I M 配列における重要な機能性残基がよく保存されてヒト I R p 6 0 と 8 0 % 同一であり、かつ、チロシンリン酸化を介して S H P - 1 および S H P - 2 を動員することができる L M I R 1 と呼ばれる I g スーパーファミリー受容体を発現することが報告されている [K u m a g a i (2 0 0 3) 、 同上同頁]。今回の結果は、L M I R 1 の中和が L M I R 1 処置マウスの腹膜洗浄液におけるトリプターゼおよび - ヘキソサミニダーゼのレベルを高めることを示している。加えて、その後の好酸球性炎症が強くなった。このことは、I R p 6 0 （およびその未だ明らかにされていないリガンド）がインビボでのアレルギー性環境において同様に役割を有することを示している。
10

【 0 0 7 0 】

最後に、I R p 6 0 および I g E の架橋の影響をインビトロおよびインビボの両方で調べるために、本発明者らは 2 組の二重特異性構築物（I E 1、二重特異性の抗 I R p 6 0 - 抗 I g E ; L E 1、二重特異性の抗 L M I R 1 - 抗 I g E ）およびそれらの一一致するイソ型コントロールを作製している。I E 1 はヒトマスト細胞の I g E 媒介による脱顆粒化をインビボで阻害し、一方、L E 1 は、アレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいて、トリプターゼおよびエオタキシン - 2 の放出、ならびに好酸球の浸潤を阻害した。さらに、L E 1 はマウス P C A モデルにおいて皮膚アナフィラキシーを阻害した。このことは、I R p 6 0 および I g E （または L M I R 1 および I g E ）の架橋が、マスト細胞および好酸球の機能および活性をアレルギー性炎症性の状況で阻害するための効率的な方法であることを証明している。
20

【 0 0 7 1 】

本明細書中において本明細書および下記の請求項の節で使用される用語「治療する」（“t r e a t ” または t r e a t i n g およびそれらの派生語）は、状態の進行を実質的に阻害すること、または、遅くすること、または、逆戻りさせること、あるいは、状態の臨床的症状を実質的に緩和すること、あるいは、状態の臨床的症状の出現を実質的に予防することを包含する。
30

【 0 0 7 2 】

本発明の方法によって使用される医薬組成物は投薬単位形態物で調製することができ、または、製薬の分野で広く知られている方法のいずれかによって調製され得る。加えて、医薬組成物は、医薬的に許容され得る添加剤、例えば、医薬用の許容され得るキャリア、賦形剤または安定化剤、および、場合により、他の治療的構成成分をさらに含むことができる。当然のこととして、許容され得るキャリア、賦形剤または安定化剤は、用いられる投薬量および濃度において被投与者に対して非毒性である。
40

【 0 0 7 3 】

本発明の組成物の治療的用量の大きさは、当然のことではあるが、患者群（年齢、性別など）、治療すべき状態の性質、および、投与経路（これらのすべてが主治医によって決定されなければならない）により変化する。

【 0 0 7 4 】

本発明の医薬組成物は、全身的に、例えば、非経口注射（例えば、静脈内注射、腹腔内注射または筋肉内注射）によって投与することができる。あるいは、医薬組成物は、皮下投与、経皮投与、局所的投与、関節内投与、結膜下投与または粘膜投与をはじめとする任意の好適軟経路によって、例えば、経口投与、鼻腔内投与、吸入投与または眼内投与によって送達することができる。治療を必要としている領域への局部的投与を、例えば、手術
50

時または局所的適用時における局部的注入によって達成することができる。

【0075】

経口投与の場合、医薬調製物は液体形態（例えば、溶液、シロップまたは懸濁物）であり得るか、または、錠剤およびカプセルなどのような固体形態であり得る。吸入による投与の場合、組成物は、好都合には、滴剤またはエアロゾル噴霧剤の形態で送達される。注射による投与の場合、配合物は、例えば、アンプルにおけるか、または、保存剤が添加された多回服用容器における単位投薬形態物で提供される場合がある。

【0076】

従って、本発明の二重特異性抗体は、併存する2つの大きな治療的および経済的な利点を有する。第1に、本発明の二重特異性抗体はアレルゲン特異的でなく、従って、2つ以上のアレルゲンに対してアレルギー性である患者において使用することができ、また、臨床的状況では頻繁に発生するように、アレルゲンがたとえ不明であっても使用することができる。第2に、将来の治療的使用において、本発明の二重特異性抗体は、面倒な静脈内経路によってではなく、スプレー剤、クリーム、点眼薬および点鼻薬などによって局所的に送達することができる。静脈内経路はまた、(1)副作用に対する危険性がより大きいために、(2)薬物動態学的に、通常、薬物が排除され、排出され、分解するので、薬物の半減期がより短いために、また、(3)局部的に投与されるならば、著しくより少ない薬物が必要とされるために、できることなら避けられる。10

【0077】

特定の疾患、状態または障害の治療において効果的である本発明の治療用組成物または医薬組成物の量は、疾患、状態または障害の性質に依存するが、標準的な臨床的技術によって決定することができる。加えて、インビトロアッセイを、インビボ実験と同様に、最適な投薬量範囲を特定することを助けるために、場合により用いることができる。配合物において用いられる正確な用量はまた、投与経路、および、疾患、状態または障害の重篤度に依存し、医師の判断および各患者の状況に従って決定されなければならない。効果的な用量を、インビトロ試験系または動物モデル試験系から得られる用量応答曲線から外挿することができる。量は、マスト細胞または好酸球がアレルギー性反応を引き起こすことを可能とするプロセスの1つを阻害するために十分でなければならない。本明細書中に記載されるマウスモデルの場合、 $3 \mu\text{g}$ の二重特異性抗体 L E 1 が、この応答を誘導するためには十分であった。これは、約 27 pmole に相当する量である。20

【0078】

本明細書中で使用される「効果的な量」は、選択された結果を達成するために必要な量を意味する。例えば、本発明の組成物の効果的な量は、マスト細胞または好酸球の活性を阻害するために、従って、アレルギー性反応、ならびに、マスト細胞および／または好酸球および／または好塩基球により媒介される反応を治療するために有用である。30

【0079】

本発明の抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得ることを理解しなければならない。

【0080】

タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製が、Current Protocols in Immunology (Wiley and Sons Inc.) の第2章に記載される。40

【0081】

モノクローナル抗体を、免疫化された動物（特に、ラットまたはマウス）の脾臓またはリンパ節から採取されたB細胞から、ハイブリッド細胞の成長に有利である条件のもとでの不死化B細胞との融合によって調製することができる。モノクローナル抗体を作製する技術が多くの論文および書籍に記載される（例えば、上記のCurrent Protocols in Immunology の第2章など）。このような動物の脾臓細胞またはリンパ節細胞を、その第2章に記載されるようなモノクローナル抗体の作製のために、タンパク質より免疫化された動物の脾臓細胞またはリンパ節細胞と同じ方法で使用すること50

ができる。モノクローナル抗体を作製する際に使用される技術が、KohlerおよびMilstein [KohlerおよびMilstein (1975) 、Nature、256 : 495 ~ 497] によって、また、米国特許出願 4376110 号においてさらに記載される。

【 0082 】

抗体の F(ab) フラグメントおよび F(ab')₂ フラグメントならびに他のフラグメントが、典型的には、酵素を使用するタンパク質分解切断によって、例えば、パパイン (F(ab) フラグメントを作製するために) またはペプシン (F(ab')₂ フラグメントを作製するために) などを使用して作製される。

【 0083 】

構造的には、本発明において記載される二重特異性抗体は下記のように定義することができる。下記の 3 工程のプロセスによって作製された合成 F(ab')₂ フラグメント (すなわち、それぞれが異なる決定基を認識する 2 つの F(ab') フラグメントのコンジュゲート) : (1) マウスまたはラットの完全な IgG 分子 (これは、本明細書中で定義されるように、目的とする標的のそれぞれ 1 つに対して特異的である) をペプシンにより処理し、従って、F(ab')₂ フラグメントを作製する工程 ; (2) 各 F(ab')₂ を 2 - メルカプトエチルアミンとの処理によって還元し、F(ab') フラグメントを作製する工程 ; および (3) 各抗体の F(ab') フラグメントをもう一方のフラグメントと再コンジュゲート化し、従って、二重特異性のハイブリッド F(ab')₂ を作製する工程。従って、前述の二重特異性抗体は、F(ab')₂ 分子が IgG 分子のペプシン処理の生成物として定義されることを考慮すれば、すべての面で、完全な F(ab')₂ 分子 (約 110 KDa の重量) である。

【 0084 】

将来の臨床的適用のために、本発明の二重特異性抗体は、マウス抗体の応答に対するヒト抗体を抑えるために、ヒト化プロセスによって改良することができる。迅速な新しい方策が、近年、そのような抗体のために適用され得る抗体ヒト化のために開発されている。これらの技術は親和性を維持し、かつ、元の抗体の抗原特異性およびエピトープ特異性を保持する [Rader, C. 他 (1998) 、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 : 8910 ~ 8915 ; Mateo, C. 他 (1997) 、 Immunotechnology, 3 : 71 ~ 81] 。例えば、動物由来の抗体とは異なり、「ヒト化」抗体は、多くの場合、対象の免疫系との望ましくない反応を受けない。

【 0085 】

従って、本明細書中で使用される用語「ヒト化 (された) 」およびその派生語は、ゼロを越えて、100%までの任意のパーセントのヒト抗体物質を、そのような抗体がヒトに投与されたとき、その抗体が免疫原性となる可能性をより小さくするために十分な量および組成で含む抗体を示す。用語「ヒト化 (された) 」は、ヒト由来の抗体についてもまた解釈されるか、または、ヒトの免疫系をコードする遺伝子の機能的な部分を含むように遺伝子操作された非ヒト細胞 (従って、完全にヒト型である抗体を產生する) に由来する抗体についてもまた解釈されることが理解されつつある。

【 0086 】

まとめると、本明細書中に記載される二重特異性抗体は、一般にはアレルギー性の炎症性疾患において、また、マスト細胞 / 好酸球に関連した疾患 (下記参照) においてマスト細胞および好酸球のエフェクター機能を下方調節するための新規な方法を表す : マスト細胞 / 好酸球に関連した疾患は、例えば、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、季節性アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー性湿疹、様々なアレルゲンに対するアレルギー性の障害および応答、全身性アナフィラキシー、全身性肥満細胞過剰増殖、限局性強皮症 / 色素性じんま疹、マスト細胞白血病、アテローム性動脈硬化、移植片拒絶、多発性硬化症、線維形成性肺疾患、神経線維腫症、ケロイド、強皮症、リウマチ様関節炎、変形性関節炎、急性痛風、眼の瘢痕性類天疱瘡、クローン病、腹膜癒着、慢性移植片対宿主病 (GVHD) 、好酸球增多筋痛症候群、外因性気管支喘息、鼻ポリープ症、ヴェー

10

20

30

30

40

50

ゲナー肉芽腫症、内因性気管支喘息、間質性肺疾患および他の肺疾患、慢性好酸球性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、類肉腫症、特発性肺線維症、トキソカラ症、フィラリア症、住血吸虫症、旋毛虫症、新生物疾患および骨髄増殖性疾患、T細胞リンパ腫およびホジキン病などである。

【0087】

本発明から利益を受け得る1つの特定の集団が、肥満細胞過剰増殖を患う個体の集団である。肥満細胞過剰増殖は、多すぎるマスト細胞が体内に存在することによって特徴づけられる一群の障害である。肥満細胞過剰増殖は皮膚性または全身性である場合がある。過度なマスト細胞およびそれらのシグナル伝達は、骨および筋肉の痛み、腹部不快感、恶心および嘔吐、胃潰瘍、下痢、皮膚損傷、非常に低い血圧および失神およびショックの症状発現をもたらす。これまで、肥満細胞過剰増殖のための治療はどれも特異的ではない。治療は通常、疾患の症状発現を緩和するための抗ヒスタミン剤または医薬品に基づいている。しかしながら、マスト細胞に特異的な治療は1つも見出されていない。従って、マスト細胞を標的とする本発明の二重特異性抗体、または、そのような二重特異性抗体を含む組成物は、この疾患を治療するために使用される理想的な薬剤である。

10

【0088】

好塩基球の活性化により媒介される状態もまた、本発明の二重特異性抗体により治療される潜在的な標的である。これは、好塩基球細胞が、マスト細胞の機能と重なる機能を果たしていると考えられるからである。好塩基球は、マスト細胞と共に多くの特徴（特に、高親和性 IgE 受容体 Fc_RI の発現、ならびに、高含有量のヒスタミンおよび顆粒貯蔵トリプターゼ）を示す。さらに、好塩基球は高レベルの I R p 6 0 を発現する（本発明者らのデータは示されず）。好塩基球の IgE 依存的活性化が阻害性受容体 Fc_RI I B によって阻害され得るので、二重特異性抗体が I R p 6 0 / IgE に結合することによりまた、阻害性経路がこれらの細胞において引き起こされる可能性が非常に高い。本発明の二重特異性抗体を用いて治療され得る特定の状態は、造影剤に対するアナフィラキシー応答、筋弛緩剤に対するアナフィラキシー応答、および、好塩基球白血病である。

20

【0089】

本明細書中に記載される二重特異性抗体の潜在的可能性は、上記で議論された範囲を越えることさえあり得る。他の細胞に対する適正なエフェクター機構を考えると、特定の細胞タイプのピンポイント標的化が所望される、自己免疫疾患などの他の疾患が治療され得ることが考えられる。

30

【0090】

本発明は請求項によって定義され、その内容は、本明細書の開示に含まれるとして解釈しなければならない。

【0091】

開示および記載される場合、本発明は、本明細書中に開示される特定の例、プロセス工程および材料に限定されないことを理解しなければならない。これは、そのようなプロセス工程および材料はいくらか異なる場合があるからである。本発明の範囲は、添付されている請求項およびその均等物によってのみ限定されるので、本明細書中で使用される用語法は、特定の実施形態を記載するという目的のためだけであり、限定であることを意図しないこともまた理解しなければならない。

40

【0092】

本明細書および添付された請求項において使用されるように、“a”、“a n”および“t h e”的単数形は、文脈がそうでないことを明瞭に示さない限り、複数の指示対象を包含することに留意しなければならない。

【0093】

本明細書および下記の請求項の全体を通して、文脈を別途要求しない限り、語「含む（comprise）」および変化体（例えば、“comprises”および“comprising”など）は、言及された完全体（integer）もしくは工程または完全体もしくは工程の群を包含することを意味し、しかし、任意の他の完全体もしくは工程ま

50

たは完全体もしくは工程の群を排除することを意味しないことが理解される。

【0094】

下記の実施例は、本発明の様々な態様を実施する際に本発明者らによって用いられる技術を表す。これらの技術は、本発明を実施するための好ましい実施形態の例示である一方で、当業者は、本開示に照らして、数多くの改変が、本発明の精神および意図された範囲から逸脱することなくなされ得ることを認識することを理解しなければならない。

【実施例】

【0095】

実験手順

・抗体および試薬

すべての細胞培養培地、試薬および緩衝液を Biological Industries (Beit Haemek、イスラエル) から購入した。SCF は Amgen, Inc. [Thousand Oaks、カリフォルニア州、米国] からの譲渡である。様々な阻害性受容体を認識する下記の mAb を、文献に記載される標準的な手順によって調製し、使用した：P192 および E59 [抗 IRp60]、XA-185 [抗 CD94]、11PB6 [抗 p58.1]、GL183 [抗 p58.2]、Z27 [抗 p70]、Q66 [抗 p140]、AZ158 [抗 p70/p140]、F278 [抗 LIR1/ILT2]。LIR3/ILT5 を認識する抗体 [15F3] は Colonna M. (Washington University, St Louis、米国) によって譲渡された。抗 LMIR1 を R&D Systems [Minneapolis、ミネソタ州、米国] から購入した。ヒト肺マスト細胞の精製のための抗ヒト CD117 抗体を BD - Pharmingen [San Diego、カリフォルニア州、米国] から購入した。抗ヒトトリプターゼ抗体 [クローン AA1] およびイソ型コントロール抗体 [IgG1 および IgG2A] を Dako [Glostrup、デンマーク] から購入した。ヒツジ抗マウス F(ab')₂ 抗体を ICN Biomedicals [Aurora、オハイオ州、米国] から購入した。キメラマウス / ヒト IgE 抗 NP 抗体を Serotec [Raleigh、ノースカロライナ州、米国] から購入した。ヤギ抗マウス 鎮特異的抗体を Sout Hern Biotech [Birmingham、アラバマ州、米国] から購入した。ポリクローナル抗ヒトホスホチロシン [pY99] 抗体、SHP-1/2 抗体および SHIP-1 抗体を Santa Cruz [Santa Cruz、カリフォルニア州、米国] から購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化された抗ウサギ抗体および抗マウス抗体、フルオレセインイソチオシアナート [FITC] コンジュゲート化抗マウス抗体、Cy⁵ コンジュゲート化抗マウス抗体およびフィコエリトリンコンジュゲート化抗マウス抗体をすべて Jackson Laboratories [West Grove、ペンシルバニア州、米国] から購入した。発色性基質を Sigma [St. Louis、ミズーリ州、米国] から購入した。カルシウムグリーン-1 AM を Molecular Probes [Eugene、オレゴン州、米国] から購入した。Ficoll-paque を Amersham Biosciences [Uppsala、スウェーデン] から購入した。すべての他の試薬は、別途言及されない限り、Sigma から購入され、入手可能な最高の化学規格であった。

【0096】

・二重特異性抗体 [BsAb] の作製

別個のエピトープを認識する完全なマウス IgG 抗体またはラット IgG 抗体に由来する二重特異性の F(ab')₂ フラグメントを、わずかな改変とともに、基本的には Brennan および Graziano によって記載されるように作製した。マウスの抗ヒト IgE および抗ヒト IRp60 を、固定化ペプシンビーズを製造者のプロトコルに従って使用して、記載されるように、37°で 4 時間、振とう浴において消化した。F(ab')₂ フラグメントを、vivaspin カラムでの遠心分離ゲルろ過を使用して精製し、還元性緩衝液 [1 mM の EDTA、1 mM の 2-メルカプトエチルアミン、10 mM の亜ヒ酸ナトリウム、0.1 M のリン酸ナトリウム、pH 6.8] において 25°で一晩イン

10

20

30

40

50

キュベーションすることによって F a b ' フラグメントに還元した。抗 I R p 6 0 のみには、5' , 5 - ジチオビス [2 - ニトロ安息香酸] [E l l m a n 試薬] を 1 0 m M の最終濃度に加え、インキュベーションを 2 5 °で 4 時間続けた。その後、両方の抗体をゲルろ過によって清浄化し、カップリング緩衝液 [1 m M の E D T A 、 0 . 1 M のリン酸ナトリウム、 pH 6 . 8] に移し、混合し、 2 5 °で一晩インキュベーションした。得られた F (a b ') 2 をゲルろ過によって精製し、 P B S において回収し、分光光度法を使用して定量した。特異性を F A C S によって評価した。マウスの I g E および L M I R 1 について、ラット I g G は、固定化ペプシンとの 5 時間のインキュベーションを除いて同じプロセスを受けた。下記の標的組を認識する B s A b を作製した： I E 1 [h I g E - I R p 6 0] 、 h I g E - イソ型 [コントロール] 、 L E 1 [m I g E - L M I R 1] 、 m I g E - イソ型 [コントロール] 。

【 0 0 9 7 】

- ・マスト細胞を用いたアッセイのための方法

- a . マスト細胞の精製および培養

今日までのマスト細胞に関する知識のほとんどが、齧歯類のマスト細胞およびヒトのマスト細胞株に対して行われた研究に依ることは注目に値する。本発明者らの研究室では、ヒト治療に集中しており、臍帯血、肺、皮膚および腸からヒトマスト細胞を精製し、ヒトマスト細胞を特異的に培養するための技術が開発されている。

【 0 0 9 8 】

従って、ヒト臍帯血マスト細胞 [C B M C] を、臍帯血単核前駆体を以前に記載されたように培養することによって得た [P i l i p o n s k y (2 0 0 3) 、 同上同頁] 。簡単に記載すると、新鮮な臍帯血をハンクス溶液により希釀し、 F i c o l l - P a que に載せ、遠心分離した [3 5 0 × g 、 2 5 分間] 。単核細胞をハンクス溶液により 2 回洗浄し、 1 0 % (v / v) の熱不活化ウシ胎児血清 [F C S] 、ペニシリン [1 0 0 U / m L] 、ストレプトマイシン [1 0 0 μ g / m L] 、リボヌクレオシド / デオキシリボヌクレオシド、 S C F [1 0 0 n g / m L] 、 I L - 6 [1 0 n g / m L] [P e p r o t e c h 、 R o c k y H i l l 、 ニュージャージー州、米国] および P G E ₂ [0 . 3 μ M] [S i g m a] を含有する 1 0 0 m L の最少必須培地 [M E M] - A l p h a により再懸濁した。培養培地を毎週取り替えた。 C B M C を、 8 週間 ~ 1 2 週間の培養の後、 9 7 % を越える細胞が、細胞内フローサイトメトリー [F A C S 、 下記参照] によってアッセイされるようにトリプターゼについて陽性であるとき、使用した。ヒト肺マスト細胞 [H L M C] を、肺ガン患者から手術により摘出された健全そうに見える肺試料から、タンパク質溶解、グラジエントおよび陽性の磁石分取を記載されるように使用して精製した [P i l i p o n s k y A M 、 他 (2 0 0 3) 、 同上同頁] 。肺サンプルおよび臍帯血を、 H a d a s s a h M e d i c a l S c h o o l (J e r u s a l e m 、 イスラエル) の施設内ヘルシンキ委員会のガイドラインに従って得た。それらの使用は委員会によって承認された。

【 0 0 9 9 】

- b . フローサイトメトリー [F A C S]

フローサイトメトリーを、 B e c t o n - D i c k i n s o n F A C S c a l i b u r および C e l l Q u e s t ソフトウェアを使用して行った。すべての段階を 1 0 0 μ L の体積で丸底 9 6 ウェル培養プレート [N u n c 、 R o s k i l d e 、 デンマーク] において行った。大部分の細胞 [約 1 0 ⁵ 個 / サンプル] を氷冷の H B A 緩衝液 [B S A [0 . 1 % (w / v)] および N a N ₃ 「 0 . 0 1 % (w / v) 」] を含有するハンクス溶液] により洗浄し、その後、抗 I R p 6 0 または適切なイソ型コントロールのいずれかとインキュベーションし [4 ° 、 3 0 分間] 、その後、冷 H B A により 2 回洗浄した。その後、細胞を二次抗体とインキュベーションし [推奨される希釀度での F I T C コンジュゲート化抗マウスまたは C y ⁵ コンジュゲート化抗マウス、 4 ° 、 3 0 分間] 、その後、さらに 2 回洗浄し、 F A C S によって直ちに分析した。細胞内 F A C S を、一次抗体を加える前の 2 つの段階を除いて本質的には同じに行った。この場合、細胞を、最初に 2 % ホルムア

ルデヒドにおいて固定処理し [4、10分間]、BSA [10% (w/v)]、ヤギ血清 [0.1% (w/v)]、サポニン [0.1% (w/v)] および HEPES [10 mM] を含有する HBA によりプロッキング処理した [4、10分間]。サポニン [0.1% (w/v)] および HEPES [10 mM] を含有する HBA もまた、インキュベーションおよび洗浄のために用いた。

【0100】

c. マスト細胞の活性化および阻害

活性化の5日前に、CBMCをキメラマウス / ヒト IgE 抗NP抗体 [5 µg / mL] とインキュベーションした。活性化のために、Immunolon-2HB 96 ウェルプレート [Thermo Labsystems、Franklin、マサチューセッツ州、米国] をヒツジ抗マウス F(ab')₂ [PBSにおいて 25 µg / mL] の存在下または非存在下でインキュベーションし [37、4時間]、その後、PBS により 2 回洗浄した。次いで、プレートを、抗 I Rp 60 [20 µg / mL]、イソ型コントロールまたは PBS とインキュベーションし [37、4時間]、PBS により 2 回洗浄した。活性化の当日において、細胞 [2 × 10⁵ 細胞 / サンプル] を、SCF [100 ng / mL] が補充された温い Tyrode ゼラチン - カルシウム緩衝液 [137 mM の NaCl、12 mM の NaHCO₃、5.5 mM の L-グルコース、2 mM の KCl、0.3 mM の Na₂HPO₄、0.1% (w/v) のゼラチン、1.8 mM の CaCl₂、0.9 mM の MgCl₂] で 2 回洗浄した。その後、細胞を被覆プレートに移し、抗マウス IgE の鎖特異的抗体 [5 µg / mL] または化合物 48/80 [10 µg / mL] のいずれかを加え、細胞を 37 度で 30 分間インキュベーションした。最後に、細胞を直ちに遠心分離し [1500 × g、1 分間]、上清から分離し、3 回の凍結 / 融解サイクルによって溶解し、溶解物を回収して、放出された媒介因子の量について評価されるまで -80 度で保存した。

【0101】

d. 媒介因子放出アッセイ

-ヘキソサミニダーゼおよびトリプターゼを、わずかな改変とともに、記載されるように発色性アッセイによって測定した [Woolhisser, M. R. 他 (2004)、Clin. Immunol. 110 (2): 172~80; Greenfeder S. 他 (2003)、Biotechniques 34 (5): 910~2、914]。

-ヘキソサミニダーゼについては、18 µL のサンプル [上清または細胞溶解物] を 42 µL の基質溶液 [48 mM のクエン酸および 56 mM の Na₂HPO₄ (pH 4.5)] における 8 mM の p-ニトロフェニル-N-アセチル-D-グルコサミニド] と混合し、37 度で 2 時間インキュベーションした。反応を 120 µL の氷冷グリシン [0.2 M] (pH 10.7) の添加によって停止させ、O.D. を 410 nm の吸光度において標準的な分光光度計で直ちに読み取った。トリプターゼについては、48 µL のサンプルを 2 µL の基質溶液 [100% DMSO における 25 mM の N-p-トシリ-gly-p-royl-lys-p-ニトロアニリド] と十分に混合し、発色するまで 37 度でインキュベーションし、上記のように直ちに読み取った。パーセント放出を、O.D. 曲線の直線範囲内で、下記の式を使用して計算した：%R = 100 × 上清 / [溶解物 + 上清]。IL-4 の放出を市販の ELISA キット [Diaclone、Besançon、フランス] によって測定した。

【0102】

e. 生存アッセイ

CBMC [2 × 10⁵ 細胞 / サンプル] を、増殖因子を含まない MEM - Alpha により洗浄し、上記で記載されたように被覆された培養プレートにおいて、SCF [100 ng / mL] を含む MEM - Alpha または SCF を含まない MEM - Alpha の 200 µL においてインキュベーションした。24 時間および 48 時間で、サンプルを PBS におけるヨウ化プロピジウム溶液 [10% (v/v)] の 5 µL の添加によって染色し、直ちに FACS によって分析した。

10

20

30

40

50

【0103】

f. 受容体発現の調節

CBMC [3 × 10⁵ 細胞 / サンプル] を、 TNF - [20 ng / mL]、 IL - 3 [20 ng / mL]、 IL - 4 [20 ng / mL]、 NGF [50 ng / mL] [すべてを Peprotech (Rocky Hill, ニュージャージー州、米国) から購入した]、キメラ IgE [5 μg / mL] [Serotec]、好酸球MBP [0.01 μM ~ 0.1 μM] (これは記載されたように精製された; Piliponsky (2003)、同上同頁) またはポリ - L - アルギニン [25 μM ~ 100 μM] のいずれかの存在下、37℃で、0時間、4時間、12時間および24時間培養した。これらの時点でのIRp60の発現をFACSによって評価した。

10

【0104】

g. 細胞内 Ca²⁺ の可動化

カルシウムセンサーを負荷する前に、CBMC [3 × 10⁵ 細胞 / サンプル] 上のIRp60を抗IRp60またはイソ型とのインキュベーション [10 μg / mL、氷上で30分間] によって架橋し、その後、洗浄し、MEM - Alphaにおけるヒツジ抗マウスF(ab')2とインキュベーションした [25 μg / mL、氷上で30分]。細胞にMEM - Alpha [FCS、2% (v/v)] におけるカルシウムグリーン - 1 AMを負荷し [5 μM、45分間、37℃]、洗浄し、37℃に暖められた400 μLのTyrodeゼラチン - カルシウム緩衝液に懸濁した。細胞を、100秒間、サイトメーター内を自由に流れさせ、そのとき、抗IgE [5 μg / mL] を加えた。FL - 1の幾何平均の変化を合計で5分間にわたって記録した。

20

【0105】

h. 免疫沈殿およびウェスタンプロット

CBMCを、市販の溶解緩衝液 [Pierce, Rockford, IL, 米国] を使用して溶解し、10% SDS - PAGEで泳動し、PVDFメンブレン [Pierce] に転写し、IRp60 [抗IRp60、1 μg / mL] に対してプロットした。IRp60沈殿のために、CBMC [8 × 10⁶ 細胞 / サンプル] をオルトバナジン酸ナトリウム [4 mM、10分間、37℃] で処理し、または、被覆プレートにおいて様々な時間インキュベーションした。IRp60を、市販のキット [SeizeTM Classic Mammalian Kit、Pierce] を製造者の説明書に従って使用してCBMCから沈殿させた。サンプルを記載されるように泳動し、ホスホチロシン [pY99]、SHP - 1/2 およびSHIP - 1に対してプロットした。検出のために、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート化された抗マウス抗体または抗ウサギ抗体を、製造者によって推奨されるように使用した。

30

【0106】

・好酸球を用いたアッセイのための方法

a. 好酸球の精製

好酸球を軽度のアトピー性者（血中好酸球レベル、5% ~ 10%）の末梢血から精製した。書面によるインフォームドコンセントを、Hadassah - Hebrew Universityのヒト実験ヘルシンキ委員会により制定されたガイドラインに従ってすべての志願者から得た。簡単に記載すると、静脈血 (50 ml ~ 100 ml) をヘパリン添加シリングに集め、6% デキストラン (Amersham Biosciences)において沈降させた。白血球を Ficoll - Hypaque での遠心分離（密度、1.077；25分間、700 g、22℃；Amersham Biosciences）に供した。好中球および混入しているリンパ球を、抗CD16Ab および抗CD3Ab に結合させた微小磁石ビーズ (Miltenyi Biotech) を用いて顆粒球濃縮ペレットに捕捉した。好酸球を、細胞懸濁物を磁石カラム (MACS) に通すことによって精製した。細胞を、Kimura染色によって少なくとも98%の純度で回収し、生存性はトリパンブルー染色により少なくとも98%であった。CD56+細胞またはCD3+細胞はいずれも、FACS分析によって、混入画分において観測されなかった（データは示され

40

50

す)。

【0107】

b. フローサイトメトリー

フローサイトメトリー(FACS)分析のために、細胞(1×10^5 個)を、0.1%のBSAおよび0.02%のアジ化ナトリウムが補充されたHBSS(HB-A)の $100 \mu l$ の最終体積において氷上で30分間、(FcRをブロッキングするために)15%のヒト血清とインキュベーションした。好酸球を、様々な阻害性受容体を認識する種々のAbと一緒に培養し、その後、ヤギ抗マウスFITC Ab(1/200)と一緒に培養した。生存実験のために、アネキシン-Pi染色を、R&Dアネキシン-Piキットを製造者の説明書に従って使用して行った。

10

【0108】

染色後、細胞をFACSCaliburシステム(BD Biosciences)で分析した。それぞれの染色について、少なくとも10000個の事象を集め、データ分析を、CellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を使用して行った。

【0109】

c. 細胞の培養および活性化

96ウェルプレート(Nunc)をPBSにおけるヒツジ抗マウスFab'2によりプレコーティングした(25 μg/ml、2時間、37°C、5%CO₂)。その後、プレートをPBSにより3回洗浄し、P192(抗IRp60)Abまたは関連性のないイソ型一致のコントロールAbと一緒にインキュベーションし(1 μg/ml~5 μg/ml、2時間、37°C、5%CO₂)、再び3回洗浄した。新しく分離された好酸球を、RPMI 1640、200U/mlのペニシリン、200 μg/mlのストレプトマイシンおよび5%(v/v)の熱不活化FCSを含有する培地(富化培地(EM))においてこれらのプレコーティングされたウェルに播種し(2×10⁵個/200 μl)、IL-5またはGM-CSFを種々の濃度で加えた(1ng/ml~100ng/ml)。細胞を18時間~24時間インキュベーションした(37°C、5%CO₂)。インキュベーションが終了したとき、細胞を遠心分離し(250g、5分間、4°C)、上清を集め、小分けし、サイトカインまたは纖維芽細胞増殖アッセイについて評価されるまで-80°Cで保存した。

20

【0110】

生存アッセイのために、細胞を下記のように懸濁状態で活性化した:P192(抗IRp60)Abまたは関連性のないイソ型一致のコントロールAbを細胞に加えた(2×10⁵個、1 μg/ml~5 μg/ml、30分間、4°C)。細胞を洗浄し、ヒツジ抗マウスFab'2を加えた(25 μg/ml、30分間、4°C)。その後、細胞を3回洗浄し(250g、5分間、4°C)、IL-5またはGM-CSFを異なる時点(12時間~48時間)について加えた(1ng/ml~100ng/ml)。生存性を、上記で記載されたようにフローサイトメトリーによって評価した。

30

【0111】

d. サイトカインの定量

IL-8を、DuoSet(R&D Systems)を使用して好酸球培養上清において定量した。アッセイ感度についての下限はIL-8について7pg/mlであった。IL-1b、IFN-αおよびIL-4を、10個の異なるサイトカインを検出するFlow Cytomixキットを製造者の説明書に従って使用して検出した。

40

【0112】

e. 走化性アッセイ

好酸球の遊走を、マイクロウェル二重チャンバーシステム(ChemoTxチャンバー:フィルター細孔サイズ5 μm、直径60mmのウェル;Neuro Probe Inc.、Gaithersburg, MD)を使用して測定した。組換えヒトエオタキシン(1ng/ml~100ng/ml)を三連で底部チャンバー内のウェルに加え、枠取られたフィルターで覆った。次いで、抗IRp60またはイソ型一致コントロールによっ

50

て活性化された好酸球の懸濁物（3 0 0 0 0 細胞 / 3 0 μ l）を、各ウェルを覆っているフィルターの上に置き、チャンバーシステムを9 0 分間インキュベーションした（3 7 、5 % CO₂）。インキュベーション後、フィルターの上における非遊走の好酸球の懸濁物を、ティッシュペーパーを使用して除き、下部チャンバーにおける細胞をフローサイトメトリーによって計数した（F A C S c a l i b u r、Beckton Dickinson）。簡単に記載すると、相対的な細胞カウント数を、事象を6 0 秒間にわたって取得することによって得た。

【0 1 1 3】

f . 形状変化アッセイ

エオタキシン誘導による好酸球の形状変化を、フローサイトメトリー分析を使用することによって評価した。抗I R p 6 0 またはイソ型一致コントロールによって活性化された好酸球の懸濁物を組換えヒトエオタキシン（1 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l）と5分間～1 0 分間インキュベーションした（3 7 、5 % CO₂）。その後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリー（F A C S c a l i b u r、Beckton Dickinson）によって分析し、1 0 0 0 0 細胞のF S C を取得した。

10

【0 1 1 4】

g . 繊維芽細胞増殖アッセイ

サブコンフルエンントの纖維芽細胞単層物の増殖を[³ H] - チミジン取り込みによって評価した。纖維芽細胞を、2 0 0 m l の補充されたD M E M / 1 0 % F C S において、一晩、9 6 ウェルプレートに播種し（5 X 1 0 ³ 細胞 / ウェル）、補充されたD M E M / 0 . 5 % F C S により2回洗浄し、I R p 6 0 またはイソ型一致コントロールによって2 4 時間活性化された好酸球の上清を用いて刺激した。[³ H] - チミジン（N E N T M L i f e S c i e n c e P r o d u c t s , I n c . , B o s t o n , M A ）を最後の2 4 時間のパルス（1 μ C i / ウェル）として加え、サンプルを以前に記載されたように処理した。

20

【0 1 1 5】

・動物およびアレルギー性腹膜炎モデル

アレルギー性腹膜炎を、オバルブミン[O V A]を記載[Z u a n y - A m o r i m他（1 9 9 4 ）、A n n N Y A c a d S c i 、7 2 5 : 3 4 ~ 4 3]のように使用して8週齢～1 0 週齢のメスのB A L B / c マウスにおいて誘導した。簡単に記載すると、0日目および7日目に、マウスを、3 0 0 μ L の生理的食塩水における1 . 6 m g のミヨウバン水酸化物に吸着させた1 0 0 μ g のO V A により皮内に感作した。マウスを、1 1 日目に、3 0 0 μ L の生理的食塩水における3 0 μ g のO V により腹腔内に抗原攻撃し、その後、マウスを媒介因子分析および好酸球定量のために4 5 分後または4 8 時間後のいずれかでそれぞれ屠殺した。腹膜腔を、カルシウムを含まないT y r o d e ゼラチン緩衝液の5 m L により洗浄した。腹腔洗浄液を遠心分離し[1 5 0 × g 、5 分間]、細胞ペレットを媒介因子分析および好酸球定量のために2 m L のT y r o d e ゼラチン緩衝液に再懸濁した。すべての実験において、抗L M I R 1をアレルゲン攻撃の3 0 分前に投与した[1 μ g / マウス～2 0 μ g / マウス、腹腔内]。すべての実験プロトコルがH e b r e w U n i v e r s i t y (J e r u s a l e m) の動物実験委員会により承認された。

30

【0 1 1 6】

二重特異性抗体を試験するためのアレルギー性腹膜炎モデルは、マウスを1 1 日目に3 0 0 μ L の生理的食塩水における3 0 μ g のオバルブミンにより腹腔内に抗原攻撃することを伴った。抗原攻撃の3 0 分前に、B s A b [L E 1 またはコントロール、1 0 0 μ L の生理的食塩水における3 μ g] を反対側に注射した。マウスを、媒介因子分析または好酸球計数のために、抗原攻撃の4 5 分後または4 8 時間後に吸入イソフルランによりそれぞれ屠殺した。洗浄液を記載されるようにトリプターゼについて評価した。好酸球計数のために、洗浄液を遠心分離し、細胞数を正規化し、細胞を、F I T C コンジュゲート化抗マウスC C R 3 およびP E コンジュゲート化抗マウスC D 4 8 を使用して染色し、最後にF A C S によって分析した。

40

50

【0117】

受動的皮膚アナフィラキシーを、わずかな改変を伴って記載されるように生じさせた [Fung - Leung 他 (1996)、J. Exp. Med., 183: 49 ~ 56]。簡単に記載すると、8週齢～10週齢の健康なメスの BALB/cマウスに生理的食塩水または IgE 抗ジニトロフェノール [クローン S P E 7、25 μL の生理的食塩水における 0.5 μg] を背中の4カ所で皮下注射した。同時に、BsAb [LE1 またはコントロール、25 μL の生理的食塩水における 3 μg] を IgE 感作部位の2つに注射した。2時間後、マウスを 200 μL の生理的食塩水における 1 mg のジニトロフェニル - HS A + 0.75% のエバンスブルーにより皮下に抗原攻撃した。皮膚アナフィラキシーを血管から皮膚内への色素漏出によって目視評価した。

10

【0118】

統計学的分析

活性化アッセイ、生存アッセイおよび媒介因子放出アッセイを、三連または四連で、かつ、常に少なくとも3つの異なるドナーから行った。データは平均 ± S.D として表される。データを ANOVA によって分析し、その後、ペアードスチューデント t 検定 [分散が等しいと仮定して] および Tukey - Kramer ポストホクによって分析した。

【0119】

実施例 1

CBMC は IRp60 を発現する

ヒトマスト細胞における阻害性受容体の発現パターンを調べるために、様々な阻害性受容体を認識する mAb の大きなパネルを使用するスクリーニング法を用いた。図 1A に示されるように、FACS 分析は、CBMC が高レベルの IRp60 を発現し、LIR1 / ILT2、LIR3 / ILT5、p58.1、p58.2、p70、p140 または NKG2A / CD94 を発現していないことを明らかにした [n = 10]。10 個のドナーのうちの 1 つが CD94 を発現し、NKG2A を発現していなかった。加えて、CBMC は Fc RIIIB (知られている阻害性受容体) について陽性に染色された [データは示されず]。

20

【0120】

成熟組織のマスト細胞が IRp60 を発現するかどうかを評価するために、HLMC を IRp60 発現について染色した。図 1B に示されるように、HLMC は著しいレベルの IRp60 を同様に発現する [n = 3]。次に、これらの細胞を、この発現パターンが抗体依存的であるかどうかを調べるために、IRp60 を認識する異なる mAb [すなわち、P192 および E59] を用いてスクリーニングした。両方の抗体は、同じようなレベルの IRp60 を CBMC および HLMC の表面において認識した [それぞれ、n = 3、5、データは示されず]。IRp60 は、[Fc RIIIB を除いては] CBMC 上において発現する唯一の阻害性受容体であったので、FACS データはウェスタンプロット分析により確認された。抗 IRp60 は、以前に報告されたように [Cantonie C 他 (1999)、同上同頁]、ヒトマスト細胞上における約 60 kDa のタンパク質を認識する [データは示されず] [n = 3]。

30

【0121】

実施例 2

好酸球由来 MBP は CBMC 上における IRp60 の発現をダウンリギュレーションする

本発明者らは次に、CBMC 上における IRp60 の発現を調節する、アレルギー性の炎症環境において見出される様々な媒介因子の能力を調べた。このために、CBMC を、TNF-、IL-3、IL-4、単量体 IgE、NGF および好酸球由来 MBP の存在下で様々な時点について培養した。MBP を除いて、これらの媒介因子はどれも、IRp60 の発現に著しい影響を及ぼさなかった。図 2 に示されるように、MBP は、12 時間から始まり、24 時間後に著しい影響に達した IRp60 の発現レベルにおける低下を誘導した [n = 3、p < 0.01]。等モル濃度範囲 [25 nM ~ 100 nM] でのポリ -

40

50

L - アルギニンは I R p 6 0 の発現に影響しなかったので、M B P の影響は電荷依存的であった。

【 0 1 2 2 】

実施例 3

I R p 6 0 の架橋は C B M C からの I g E 依存的な媒介因子放出を阻害する

C B M C の表面における I R p 6 0 の発現は、それらの応答がこの受容体によって調節され得ることを示唆する。C B M C の脱颗粒化を阻害する I R p 6 0 の能力を評価するために、C B M C を I g E により感作し、抗 I R p 6 0 被覆プレートにおいて抗 I g E 抗体または化合物 4 8 / 8 0 を使用して脱颗粒させるために誘発した。図 3 A および図 3 B に示されるように、I R p 6 0 の架橋は、- ヘキソサミニダーゼ、トリプターゼおよび I L - 4 の I g E 媒介による放出を強く、かつ、著しく阻害した：- ヘキソサミニダーゼ [4 7 . 6 1 ± 2 . 0 0 % 対 1 1 . 7 1 ± 1 . 1 2 % (抗 I R p 6 0 に関して)] 、 p < 0 . 0 0 1] ; トリプターゼ [6 0 . 9 0 ± 7 . 3 5 % 対 1 4 . 1 1 ± 1 . 4 5 % (抗 I R p 6 0 に関して)] 、 p < 0 . 0 0 1] および I L - 4 [8 . 4 1 ± 1 . 1 9 % 対 0 . 3 2 ± 0 . 0 9 % (抗 I R p 6 0 に関して)] 、 p < 0 . 0 0 1] 。興味深いことに、図 3 C に示されるように、I R p 6 0 の架橋は、- ヘキソサミニダーゼ、トリプターゼおよび I L - 4 の化合物 4 8 / 8 0 媒介による放出を阻害しなかった [データは示されず] 。

10

【 0 1 2 3 】

実施例 4

I R p 6 0 の架橋は I g E 誘導による [C a 2 +] 流入を阻害する

20

C B M C の F c R I 依存的活性化における初期工程の 1 つは細胞内カルシウム流入である。従って、カルシウム流入に対する I R p 6 0 架橋の影響を、カルシウムセンサーのカルシウムグリーン - 1 A M を使用して調べた。図 4 に示されるように、抗 I g E 添加の 1 0 秒 ~ 2 0 秒のうちに、顕著な [C a 2 +] の増大が観測された。この増大は、I R p 6 0 の架橋に応答して完全になくなつた [n = 3] 。

【 0 1 2 4 】

実施例 5

I R p 6 0 の架橋は S C F 媒介による C B M C 生存を阻害する

S C F はこれまで、ヒトマスト細胞のための最も重要な生存因子である。S C F のシグナル伝達は、c - k i t に結合し、S r c キナーゼおよびホスファチジルイノシトール - 3 - キナーゼのリン酸化を伴うシグナル伝達カスケードを開始したときにその作用を発揮する。c - k i t のシグナル伝達を妨害する I R p 6 0 の能力を調べるために、C B M C を、架橋された抗 I R p 6 0 被覆プレートにおいて S C F [1 0 0 n g / m l] の存在下または非存在で培養し、その後、ヨウ化プロピジウム [P I] 陽性細胞の F A C S 分析を行った。図 5 に示されるように、I R p 6 0 の架橋は両方の時点でマスト細胞の生存を著しく阻害した [2 4 時間および 4 8 時間でそれぞれ、 1 0 . 0 2 ± 0 . 7 9 % および 3 7 . 6 8 ± 0 . 6 9 % の P I + 細胞、これに対して、 1 . 8 3 ± 0 . 3 8 % および 3 . 6 5 ± 0 . 3 3 % の P I + 細胞、 p < 0 . 0 0 1] [n = 3] 。

30

【 0 1 2 5 】

実施例 6

I R p 6 0 はチロシンのリン酸化を受け、S H P - 1 および S H I P - 1 を動員する

40

上記で述べられたように、N K 細胞上における I R p 6 0 の阻害性作用は S H P - 1 および S H P - 2 の動員を介して媒介される。ヒトマスト細胞上における I R p 6 0 の阻害性活性の機構を明らかにするために、C B M C をオルトバナジン酸ナトリウムで処理し、あるいは、架橋し、沈殿させ、ホスホチロシン、S H P - 1 、S H P - 2 および S H I P - 1 についてプロットした。図 6 A に示されるように、オルトバナジン酸塩の前処理および I R p 6 0 の架橋を行つたとき、I R p 6 0 はチロシンのリン酸化を受けた。加えて、図 6 B において明らかにされるように、I R p 6 0 は S H P - 1 および S H I P - 1 と共に沈殿し、S H P - 2 とは共沈殿しなかつた [n = 3] 。

【 0 1 2 6 】

50

実施例 7

I R p 6 0 はアレルギー性腹膜炎マウスモデルにおいてマスト細胞の活性化およびその後の炎症性応答を調節する

I R p 6 0 が、マスト細胞の活性化をインビボで調節する際ににおいて役割を有するかどうかを理解するために、アレルギー性炎症のマウスモデルを使用した。マスト細胞の役割が不明確である実験的な喘息プロトコルとは異なり、マウスのアレルギー性腹膜炎モデルにおけるマスト細胞の役割は十分に明らかにされている [Z u a n y - A m o r i m (1 9 9 4)、同上同頁]。バイオインフォマティク分析により、L M I R 1 が I R p 6 0 のマウス相同意体であることが明らかにされた [データは示されず]。従って、本発明者らは、マウスのマスト細胞が L M I R 1 を発現するかどうかを調べた。図 7 に示されるように、B M M C および腹膜マスト細胞はともに著しいレベルの L M I R 1 を発現する。続いて、L M I R 1 の調節作用を、この受容体を認識する中和抗体を加えることによって調べた。図 8 A に示されるように、マイクロモル濃度での抗 L M I R 1 モノクローナル抗体で前処理されたマウスは、アレルゲンの抗原攻撃に対する応答において高まったマスト細胞活性化を示し、また、増大したトリプターゼレベルおよびヘキソサミニダーゼレベルが腹膜洗浄液において測定された。加えて、図 8 B に示されるように、腹膜洗浄における生じた好酸球性炎症が強くなり、全体的な好酸球性炎症が、オバルブミン処理マウス群およびオバルブミン / イソ型コントロール群に対する比較では増大していた。

【 0 1 2 7 】

実施例 8

I R p 6 0 がヒト好酸球において発現する

ヒトマスト細胞上における阻害性受容体の発現パターンを調べるために、様々な阻害性受容体を認識する m A b の大きなパネルを使用するスクリーニング法を用いた。図 9 A に示されるように、F A C S 分析により、好酸球が、高レベルの I R p 6 0 、 p 1 4 0 、 L I R 3 / I L T 5 および F c R I I B を発現し、L I M 1 / I L T 2 、 L I R 3 / I L T 5 、 p 5 8 . 1 、 p 5 8 . 2 、 p 7 0 または N K G 2 A / C D 9 4 を発現していないことが明らかにされた (n = 1 0)。興味深いことに、分析された好酸球の 3 0 % のみが p 1 4 0 を発現していた。

【 0 1 2 8 】

成熟組織の好酸球が I R p 6 0 を発現するかどうかを評価するために、鼻ポリープの好酸球を I R p 6 0 発現について染色した。図 9 B に示されるように、鼻ポリープの好酸球もまた同様に著しいレベルの I R p 6 0 を発現する (n = 3)。次に、これらの細胞を、この発現パターンが抗体依存的であるかどうかを調べるために、I R p 6 0 を認識する異なる m A b (すなわち、P 1 9 2 および E 5 9) を用いてスクリーニングした。両方の抗体は、類似するレベルの I R p 6 0 を末梢血好酸球および鼻ポリープ好酸球の表面において認識した (それぞれ、 n = 3 および 5) (データは示されず)。

【 0 1 2 9 】

実施例 9

I R p 6 0 はヒト好酸球の I L - 5 媒介および G M - C S F 媒介の生存を阻害する

I L - 5 、 G M - C S F および I L - 3 は、好酸球の生物学における重要なサイトカインであり、「好酸球生存因子」と呼ばれることが多い。ヒトにおいて、低親和性の 鎖に結合したとき、3つのサイトカインのすべてが、それらのシグナル伝達経路を働かせる共通の 鎖を動員する。このシグナル伝達経路はチロシンのリン酸化および S r c ファミリーのキナーゼ (例えば、L y n および S y k など) の動員に依存する。従って、本発明者らは、I R p 6 0 が、これらのサイトカインが伝達する抗アポトーシス作用を調節し得るかどうかを評価することを目指した。このために、新しく単離された好酸球を抗 I R p 6 0 またはイソ型一致コントロールおよびヒツジ抗マウスにより架橋した。その後、I L - 5 または G M - C S F を異なる濃度で様々な時点について加えた。図 1 0 A および図 1 0 B に示されるように、I R p 6 0 は G M - C S F および I L - 5 の抗アポトーシス作用を阻害した (データは示されず)。例えば、18時間のインキュベーションおよび 5 0 n g

10

20

30

40

50

/ m¹ の GM-CSF で、非処理群におけるアポトーシス細胞の割合は 23.16 ± 0.65 % であり、これに対して、GM-CSF で処理された細胞は 1.25 ± 0.23 % でしかなかった。抗 IRp60 の架橋および GM-CSF により処理された細胞は 15.62 ± 3.9 % がアポトーシス性であった。この作用はまた、36 時間でも認められ、この場合、GM-CSF で処理された細胞は 13.85 ± 0.6 % がアポトーシス性であり、IRp60 で処理された細胞は 36.7 ± 0.45 % がアポトーシス性であった。興味深いことに、IL-5 および GM-CSF の抗アポトーシス作用を阻害する IRp60 の能力は、両方の時点で、濃度が 5 ng / m¹ から 50 ng / m¹ に増大するに従って高まった (6.7 ± 1.7 %, 9.45 ± 1.95 %, 15.6 ± 3.9 %, それぞれ、5 ng / m¹, 20 ng / m¹, 50 ng / m¹ の GM-CSF, 18 時間, 19.6 ± 0.2 10 1 %, 27.5 ± 0.63 %, 36.7 ± 0.45 %, それぞれ、5 ng / m¹, 20 ng / m¹, 50 ng / m¹ の GM-CSF, 36 時間)。

【0130】

実施例 10

IRp60 はヒト好酸球の IL-5 媒介および GM-CSF 媒介の活性化を阻害する IL-5, GM-CSF および IL-3 はまた、好酸球を活性化することができる。従って、本発明者らは、IRp60 の架橋が活性化因子様作用を同様に阻害するかどうかを調べた。図 11A および図 11B に示されるように、IRp60 の架橋は、IL-8, IL-1b, IL-4 および IFN- の GM-CSF 媒介による放出を完全に阻止した。 20

【0131】

実施例 11

IRp60 はヒト好酸球のエオタキシン依存的走化性を阻害する
好酸球が炎症組織に移動することを調節する非常に重要な因子の 1 つがエオタキシンである。多くのことがエオタキシンのシグナル伝達に関して知られていないが、いくつかの報告では、エオタキシンがチロシンのリン酸化および Src ファミリーのキナーゼ（例えば、Hck および Fgr など）の動員を誘導することが明らかにされている。従って、本発明者らは、IRp60 が好酸球のエオタキシン依存的活性化を阻止し得るかどうかを評価した。2つのパラメーターを調べた（走化性および形状変化）。 30

【0132】

走化性アッセイ（図 12A）のために、3 × 10⁵ 個の好酸球を、抗 IRp60、抗 CCR3 またはイソ型とインキュベーションし（すべて 5 μg / mL で、氷上で 30 分間）、その後、ヒツジ抗マウスとインキュベーションし（25 μg / mL、氷上で 30 分間）、徹底的に洗浄した。細胞を 100 μL の体積の培地においてトランスウェルプレート（ポリカーボネットフィルター、3 μm の細孔、Corning Costar-Corp）の上部チャンバーに置き、ヒトエオタキシン（HBSS + 0.5 % BSA において）を、0 ng / mL, 1 ng / mL, 10 ng / mL および 100 ng / mL で下部チャンバーに置いた。インキュベーション後、下部チャンバーにおける細胞をフローサイトメトリーによって計数した：相対的な細胞カウント数を、事象を 60 秒間にわたって取得することによって得た。 40

【0133】

形状変化アッセイ（図 12B）のために、3 × 10⁵ 個の好酸球を、抗 IRp60、抗 CCR3 またはイソ型とインキュベーションし（すべて 5 μg / mL で、氷上で 30 分間）、その後、ヒツジ抗マウスとインキュベーションし（25 μg / mL、氷上で 30 分間）、徹底的に洗浄した。エオタキシン誘導による好酸球の形状変化を、ゲート処理された自己蛍光 / 前方散乱（FSC）を使用して評価した。このアッセイでは、差のある自己蛍光が、白血球タイプおよび変化を FSC で特定して、アゴニストに対する応答での形状変化を測定するために使用される。簡単に記載すると、顆粒球を、デキストラン沈降、Percoll グラジェント遠心分離および低浸透圧赤血球溶解によって単離し、形状変化緩衝液 (0.9 mmol / L の CaCl₂、0.5 mmol / L の MgCl₂、10 mmol / L のグルコース、10 mmol / L の HEPES および 0.1 % の BSA を伴う PBS 50

S)において37で30分間プレインキュベーションした。細胞を振とう水浴において37でインキュベーションし、反応を、細胞を氷上に置き、形状変化緩衝液における冷たい4%パラホルムアルデヒドの600μLにより固定処理することによって停止させた。細胞をFACS calibrationフローサイトメーター(Beckton Dickinson)でのフローサイトメトリーによってさらに分析した。好酸球をFL2チャンネル(585nm)でのそれらの高い自己蛍光によって識別し、5000細胞のFSCを取得した。細胞形状における変化率を下記のように計算した： $100 \times \{ [FSC(\text{ケモカイン}) - FSC(\text{培地})] / FSC(\text{培地}) \}$ 。阻害剤による前処理は基礎FSCを著しく変化させなかった。

【0134】

10

図12Aおよび図12Bに示されるように、IRp60の架橋は、エオタキシンにより誘発される好酸球の走化性応答を阻害した(図12A)。加えて、IRp60はエオタキシン誘導による形状変化を完全に阻止した(図12B)。

【0135】

実施例12

IgE-IRp60BsAbの作製

BsAb作製プロセスの各工程をモニターするために、サンプルを、起こり得る物質喪失を評価するために、それぞれのゲルろ過の後で採取した。サンプルを、カップリング前の反応物Fab'フラグメントおよびカップリング後のF(ab')₂生成物を評価するためにSDS-PAGEで泳動した。図13Aに示されるように、非変性SDS-PAGEはFab'反応物の1つを約50kDaにおいてカップリング前に示す。カップリング後、還元性SDS-PAGEは、2つのIgGサイズコントロールに隣接して、2つの約37kDaの重鎖フラグメントおよび2つの約25kDaの軽鎖に分離したBsAbを示す。IE1の二重特異性認識をFACSによって評価した。図13Bに示されるように、IE1は、IgE感作のRBL細胞を、抗ヒトIRp60とではなく、抗ヒトイgEと同様に認識し、これに対して、新鮮なヒトマスト細胞を、抗ヒトイgEとではなく、抗ヒトイRp60と同様に認識した。作製プロセスの平均見かけ収率は約40%であった。

20

【0136】

実施例13

インビトロでのマスト細胞脱颗粒化の阻害

30

マスト細胞の活性化を阻害するIE1の潜在的能力を評価するために、IgE感作のヒトマスト細胞をIE1または一致するイソ型コントロールとインキュベーションし、その後、抗IgE抗体を使用して活性化した。図14に示されるように、IE1はマスト細胞からの-ヘキソサミニダーゼの放出をほぼ完全に阻害した。

【0137】

実施例14

インビトロでのアレルギー性応答の阻害

単離されたヒトマスト細胞においてインビトロで認められた作用がまたインビトロでも認められるかどうかを明らかにするために、マウスのIgEおよびLMIR1(マウスのIRp60相同体)を認識するBsAbを作製した(これはLE1と称される)。LE1またはその一致するイソ型コントロールを、2つのアレルギー性応答モデルにおいて動物にさらに投与した。アレルギー性腹膜炎では、図15に示されるように、LE1は、アレルゲン攻撃の後、脱颗粒化途中の腹膜マスト細胞からのトリプターゼの放出を完全に阻害した。そのうえ、図16Aおよび図16Bに示されるように、好酸球カウント数が、アレルゲン攻撃の前にLE1により処理された群では劇的に低下した。このことは、より少ない好酸球がマスト細胞によって腹膜に動員されたことを意味する。受動的皮膚アナフィラキシーでは、LE1は、ヒスタミンに由来する色素漏出、および、皮膚マスト細胞からの口イコトリエン放出を完全に阻害した(図17A～図17B)。

40

【図面の簡単な説明】

【0138】

50

【図1】阻害性NK受容体についてのヒトマスト細胞のスクリーニングを示す。

【図1 cont.】阻害性NK受容体についてのヒトマスト細胞のスクリーニングを示す。

【図2A】IRp60がマスト細胞において発現することを示す。図2A：ヒトマスト細胞はIRp60を発現する。

【図2B】IRp60が好酸球において発現することを示す。図2B：IRp60の発現が好酸球の主要塩基性タンパク質(MBPs)によって調節される。

【図3】IRp60の架橋はIgE媒介による放出を阻害することを示す。図3A：抗IRp60による刺激の後におけるIgE活性化CBMCからのIL-4ヘキソサミニダーゼおよびトリプターゼのパーセント放出。図3B：抗IRp60による刺激の後におけるIgE活性化CBMCからのIL-4のパーセント放出。

【図4】IRp60の架橋はSCF誘導によるCBMCの生存を阻害することを示す。

【図5】IRp60の架橋はIgE誘導による[Ca₂₊]流入を阻害することを示す。

【図6】IRp60チロシンリン酸化およびホスファターゼ動員を示す。図6A：CBMCをオルトバナジン酸ナトリウムで処理した。図6B：IRp60チロシンリン酸化は受容体架橋に依存的である。

【図7】マウスマスト細胞はLMIR1を発現することを示す。

【図8A-B】LMIR1の中和はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおける強化されたマスト細胞活性化およびその後的好酸球浸潤をもたらすことを示す。図8A：LMIR1の中和は抗原攻撃後45分において腹膜トリプターゼレベルにおける劇的な増大をもたらした。図8B：LMIR1の中和は抗原攻撃後45分において腹膜IL-4ヘキソサミニダーゼレベルにおける劇的な増大をもたらした。

【図8C-D】LMIR1の中和はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおける強化されたマスト細胞活性化およびその後的好酸球浸潤をもたらすことを示す。図8C：増大した数の好酸球が、LMIR1中和後(抗原攻撃後24時間)、腹膜腔に浸潤した。図8D：LMIR1の中和は抗原攻撃後24時間において腹膜エオタキシン-2レベルにおける劇的な増大をもたらした。

【図9A】IRp60がヒト好酸球において発現することを示す。図9A：ヒトマスト細胞上における阻害性受容体の発現パターン。

【図9A cont.】IRp60がヒト好酸球において発現することを示す。図9A：ヒトマスト細胞上における阻害性受容体の発現パターン。

【図9B】図9B：鼻ポリープの好酸球は著しいレベルのIRp60を発現する。左側のピークは、イソ型コントロールと一致した抗体に対応し、一方、右側のピークはIRp60についての染色を示す。

【図10】IRp60はヒト好酸球のgM-CSF媒介による生存を阻害することを示す。図10A：GM-CSFとの18時間のインキュベーションの後。図10B：GM-CSFとの36時間のインキュベーションの後。

【図11】IRp60はヒト好酸球のGM-CSF媒介による活性化を阻害することを示す。図11A：IRp60を架橋したときに著しく阻害された、IL-1、IL-4およびIFN-γのGM-CSF媒介による放出を示すヒストグラム。図11B：IRp60を架橋したときに完全に阻止された、IL-8のGM-CSF媒介による放出を示すヒストグラム。

【図12】IRp60はヒト好酸球のエオタキシン依存的走化性を阻害することを示す。図12A：グラフは、エオタキシンの異なる濃度に向かって移動した、抗IRp60、抗CCR3、イソ型(Iso)または富化培地単独(EM)による処理の後における好酸球の数を示す。図12B：ヒストグラムは、抗IRp60、抗CCR3、イソ型(Iso)または富化培地単独(EM)とのインキュベーションの後、FACSによって測定された、好酸球におけるエオタキシン誘導による形状変化を示す。

【図13】二重特異性F(ab')2フラグメントの作製および特徴づけを示す。図13A：起こり得る物質損失をモニターするために、二重特異性F(ab')の合成における

10

20

30

40

50

各段階から得られたサンプルを非変性 SDS-PAGE で泳動した [Fab' 作製 : kDa、サイズマーカー ; IgG、出発抗体 ; int、3回のゲルろ過からのサンプル ; Fab'、カップリングのための準備ができた得られた Fab' フラグメント]。図 13B : FACS による BSAb 二重特異性の評価。

【図 14】IE1 はインピトロで IgE 誘導によるマスト細胞脱顆粒化を阻害することを示す。

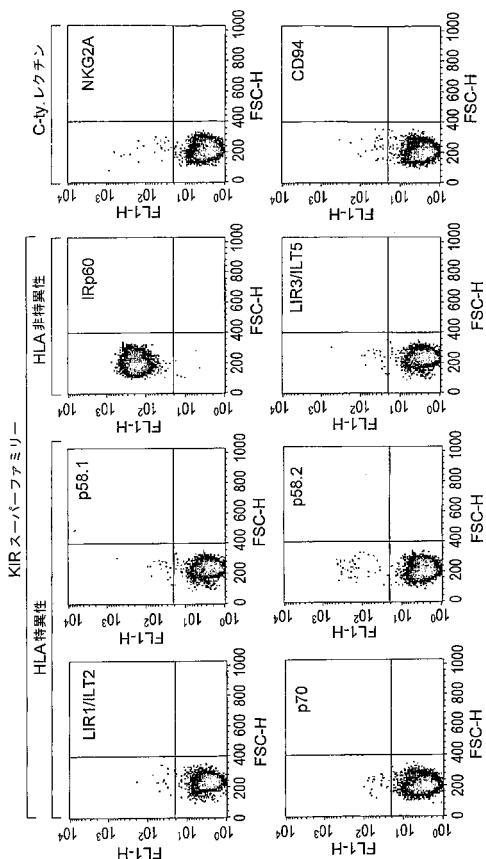
【図 15】LE1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいてトリプターゼ放出を阻害することを示す。図 15A : オバルブミン感作マウスに 3 μg の LE1 またはイソ型コントロールを注射し、続いて、30 分後にオバルブミンにより抗原攻撃した。図 15B : LE1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいてエオタキシン - 2 放出を阻害する。
10

【図 16A】LE1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいて好酸球の動員を阻害することを示す。図 16A : FACS 分析を、腹膜腔における好酸球の割合を定量するために行った。

【図 16B】LE1 はアレルギー性腹膜炎のマウスモデルにおいて好酸球の動員を阻害することを示す。図 16B : FACS 分析で得られた結果を表すヒストグラム [Saline、生理的食塩水攻撃のマウス ; OVA、オバルブミン攻撃のマウス ; LE1、LE1 による前処理、その後、オバルブミン攻撃 ; Iso、イソ型による前処理、その後、オバルブミン攻撃]。

【図 17】LE1 は受動的皮膚アナフィラキシーのマウスモデルにおいてマスト細胞の脱顆粒化を阻害することを示す。図 17A : 青色色素スポットアッセイを示す皮膚の区域。
20
図 17B : 異なる試料を用いた図 17A と同じ図。

【図 1】



【図 1 cont.】

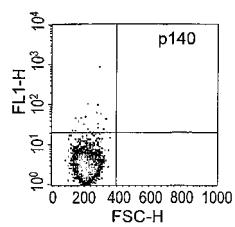


Fig. 1 (続き)

Fig. 1

【図 2A】

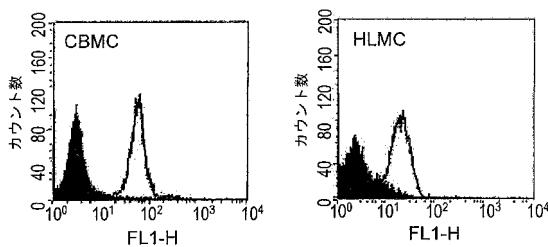


Fig. 2A

【図2B】

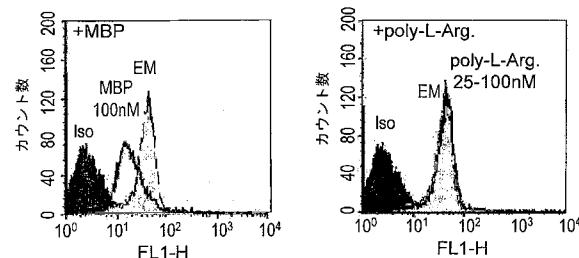


Fig. 2B

【図3】

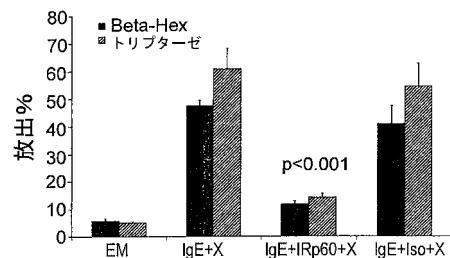


Fig. 3A

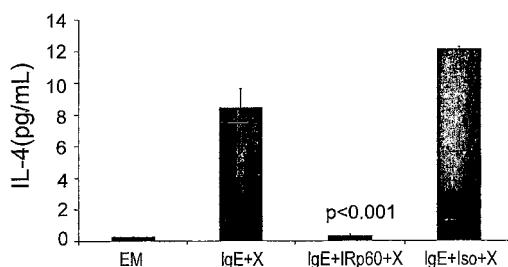


Fig. 3B

【図4】

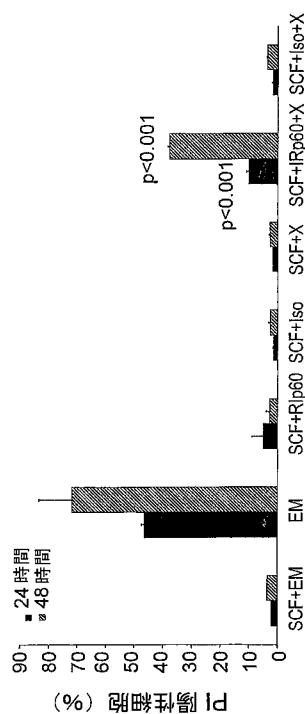


Fig. 4

【図5】

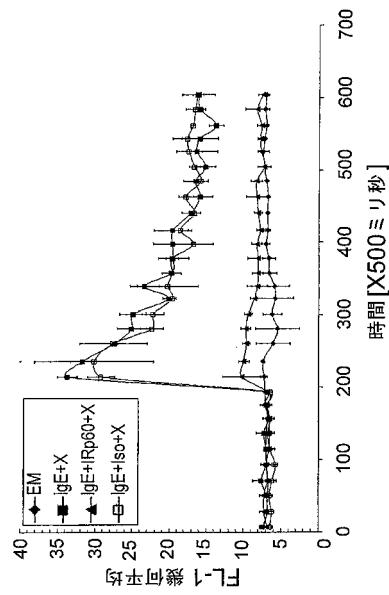


Fig. 5

【図6】

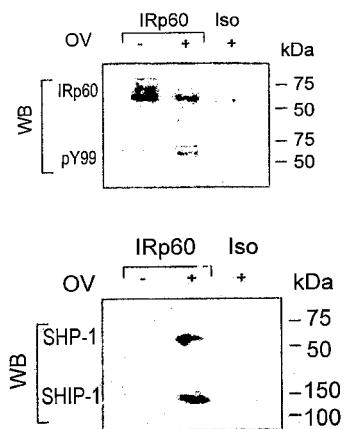


Fig. 6A

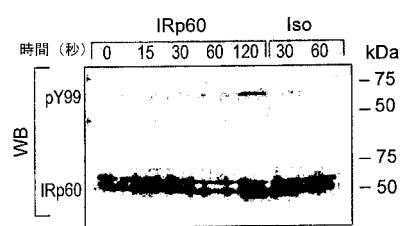


Fig. 6B

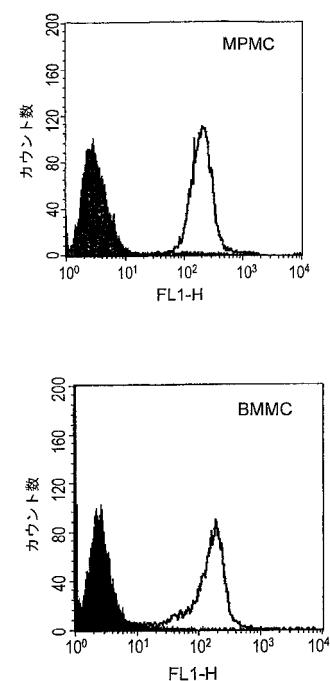


Fig. 7

【図8 A - B】

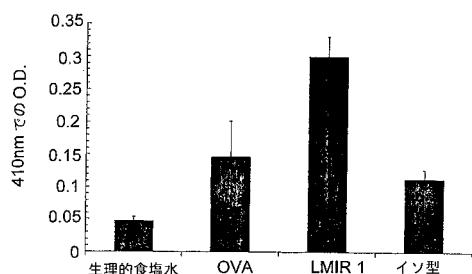


Fig. 8A

【図8 C - D】

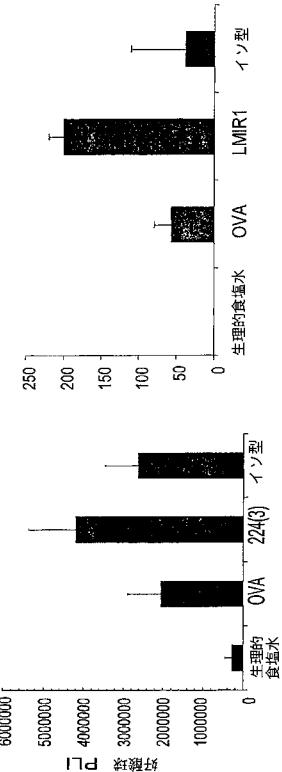


Fig. 8D

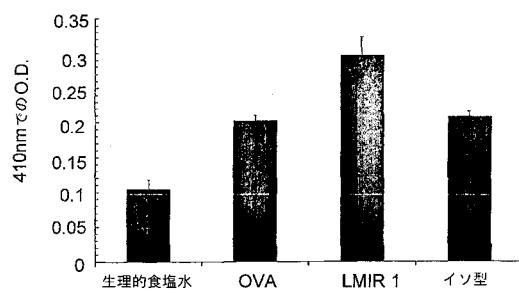
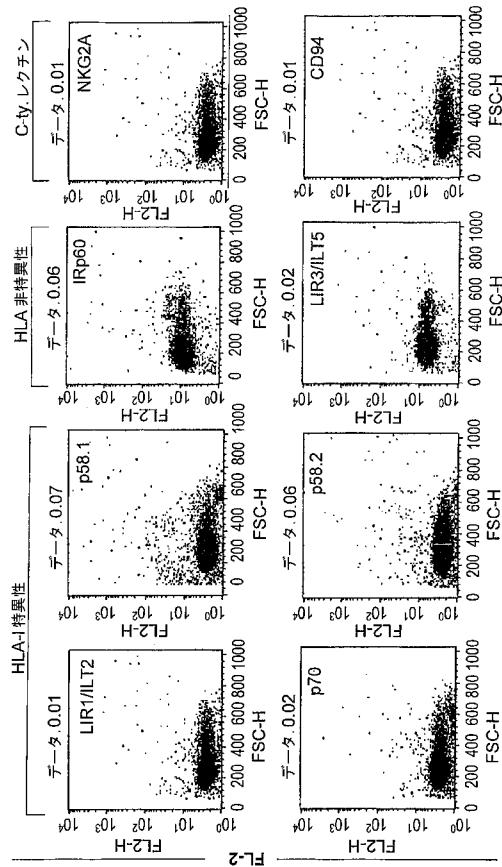


Fig. 8B

Fig. 8C

【図 9 A】



【図 9 A c o n t .】

Fig. 9A

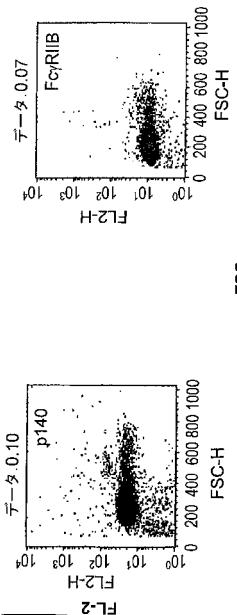


Fig. 9A (続き)

【図 9 B】

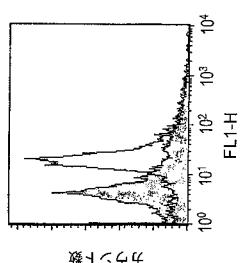


Fig. 9B

【図 10】

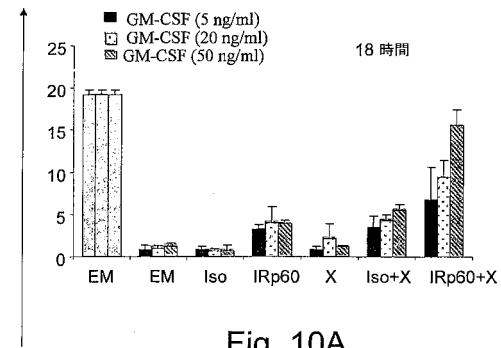


Fig. 10A

アポトース細胞 (%)

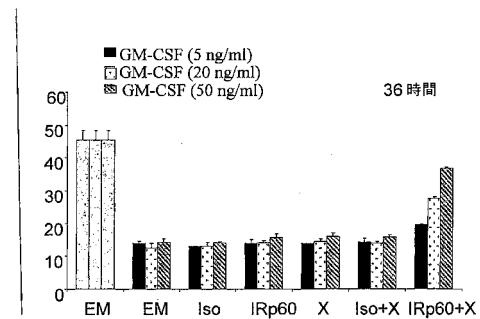


Fig. 10B

【図 1 1】

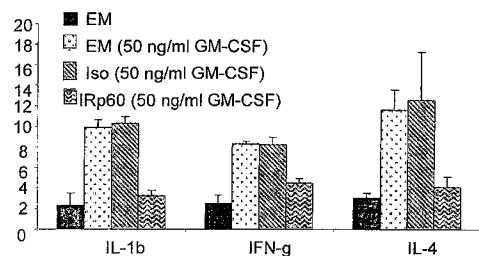


Fig. 11A

【図 1 2】

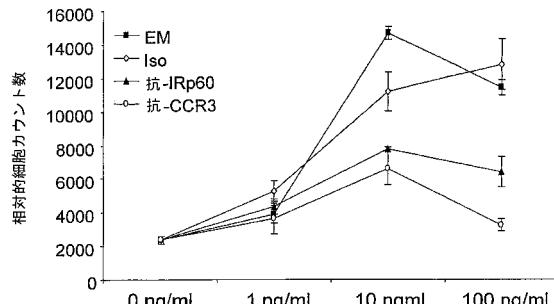


Fig. 12A

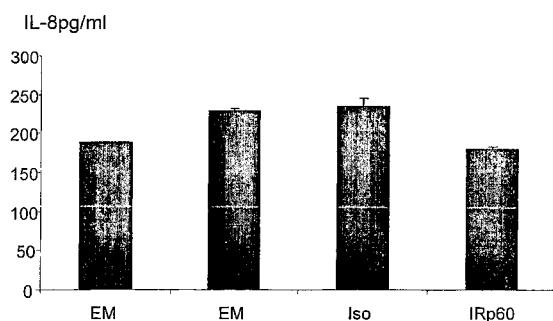


Fig. 11B

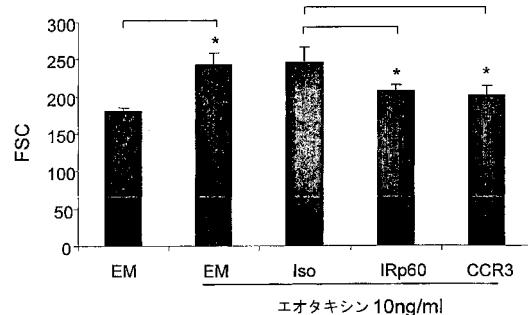


Fig. 12B

【図 1 3】

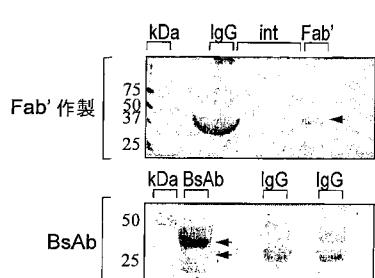


Fig. 13A

【図 1 4】

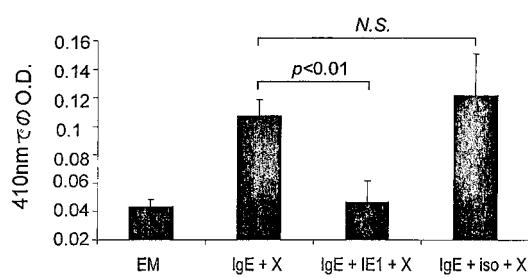


Fig. 14

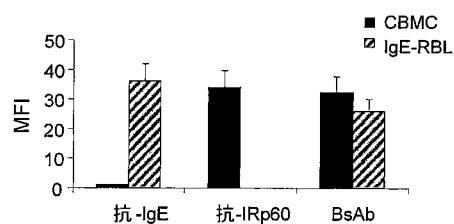


Fig. 13B

【図 15】

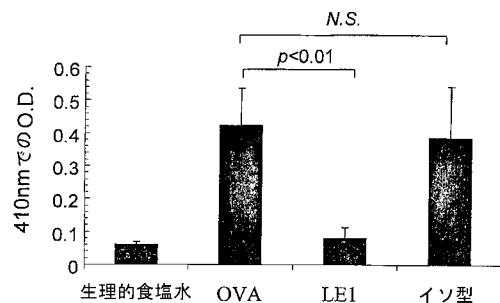


Fig. 15A

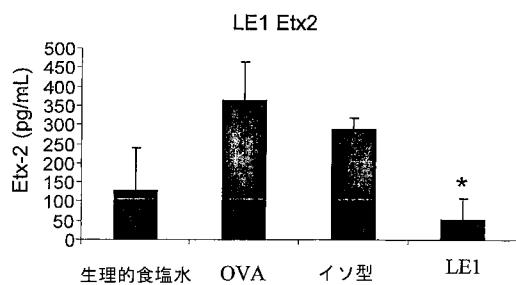


Fig. 15B

【図 16 A】

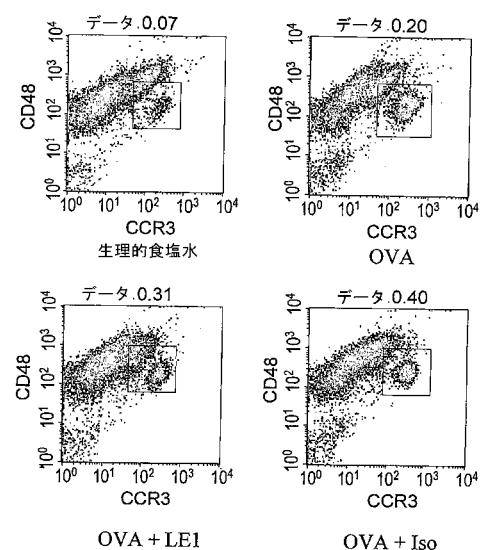


Fig. 16A

【図 16 B】

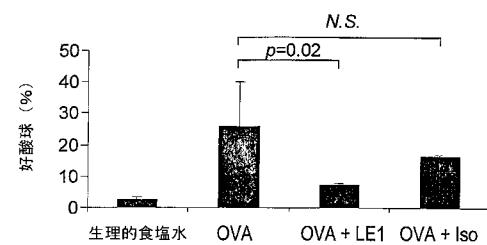


Fig. 16B

【図 17】

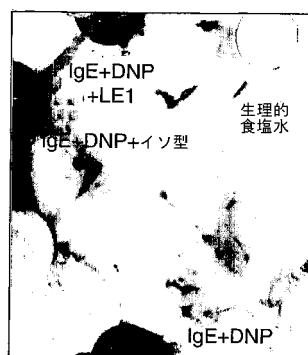


Fig. 17A

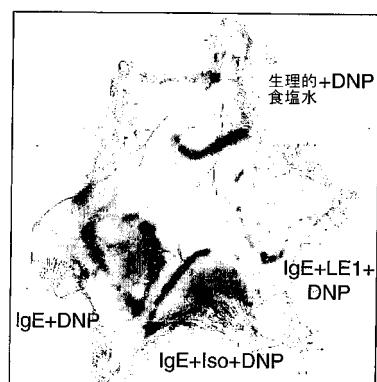


Fig. 17B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 101
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 101
A 6 1 P 19/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
	A 6 1 P 19/06

(74)代理人 100103816

弁理士 風早 信昭

(74)代理人 100120927

弁理士 浅野 典子

(72)発明者 レヴィ - シャファー , フランセスカ

イスラエル , 93149 エルサレム , ヒルデシェイマー ストリート 3 / 34

(72)発明者 バシェレット , イドウ

イスラエル , 71724 モディイン , イエフダ ストリート 9

(72)発明者 ムニツツ , アリエル

イスラエル , 93715 エルサレム , モシェ コル ストリート 13 / 4

(72)発明者 モレッタ , ロレンツオ

イタリア , アイ - 16145 ジェノヴァ , ヴィアレ デレ サクラメンティン 3 / 16

(72)発明者 モレッタ , アレッサンドロ

イタリア , アイ - 16145 ジェノヴァ , ヴィア ニッソア 18

審査官 福間 信子

(56)参考文献 國際公開第03/064662 (WO , A1)

J Allergy Clin Immunol , (2000) , vol.106, no.3, p.429-440

Eur J Immunol , (1999) , vol.29, no.10, p.3148-3159

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-90

BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed