

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4309656号
(P4309656)

(45) 発行日 平成21年8月5日 (2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日 (2009.5.15)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y

請求項の数 27 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-561645 (P2002-561645)	(73) 特許権者	596168317
(86) (22) 出願日	平成13年12月13日 (2001.12.13)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-530419 (P2004-530419A)		GENENTECH, INC.
(43) 公表日	平成16年10月7日 (2004.10.7)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/048691		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開番号	W02002/061090		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(87) 国際公開日	平成14年8月8日 (2002.8.8)	(74) 代理人	100109726
審査請求日	平成16年12月2日 (2004.12.2)		弁理士 園田 吉隆
(31) 優先権主張番号	60/256,164	(74) 代理人	100101199
(32) 優先日	平成12年12月14日 (2000.12.14)		弁理士 小林 義敦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	シモンズ, ローラ シー.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			10, バーリングゲーム, グローブ アベニ
			ュー 1313

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 原核生物で生成させた抗体とその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリンをコードするポリヌクレオチド分子であって、(1) 第1のプロモーター-シストロン対を形成する第1のプロモーターと第1のシストロン及び(2) 第2のプロモーター-シストロン対を形成する第2のプロモーターと第2のシストロンを含み、前記第1のプロモーター-シストロン対の第1のシストロンが免疫グロブリン軽鎖をコードする核酸配列に作用可能に連結した第1の翻訳開始領域 (T I R-L) を含み、前記第2のプロモーター-シストロン対の第2のシストロンが免疫グロブリン重鎖をコードする核酸配列に作用可能に連結した第2の翻訳開始領域 (T I R-H) を含み、原核宿主細胞の前記ポリヌクレオチドの発現において軽鎖及び重鎖が生物学的に活性な免疫グロブリンを形成するように折り畳まれ構築されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 2】

第1及び第2のプロモーターが、p h o A、t a c、l p p、l a c-l p p、l a c、a r a、t r p、t r c 及び T 7 プロモーターからなる群から選択される原核生物プロモーターである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 3】

両プロモーターが、P h o A プロモーターである、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 4】

T I R-L 及び T I R-H のそれぞれが原核生物分泌シグナル配列又はその T I R 変異

体を含み、ここで該 T I R 変異体は該分泌シグナル配列の初めの 2 から 14 コドン内での配列置換を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 5】

原核生物分泌シグナル配列が S T I I、O m p A、P h o E、L a m B、M B P 及び P h o A 分泌シグナル配列からなる群から選択される、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 6】

T I R - L と T I R - H が等しい翻訳強度となる、請求項 1 のポリヌクレオチド分子。

【請求項 7】

相対翻訳強度の組合せが T I R - L 及び T I R - H に対し、それぞれ 1 及び 1 であって、1 は 13 の T I R 相対翻訳強度レベルの最小レベルである、請求項 6 のポリヌクレオチド分子。

10

【請求項 8】

原核宿主細胞で免疫グロブリンを発現させるための組換えベクターであって、請求項 1 のポリヌクレオチド分子を含んでなるベクター。

【請求項 9】

請求項 8 の組換えベクターを含んでなる原核宿主細胞。

【請求項 10】

グラム陰性細菌細胞である、請求項 9 の原核宿主細胞。

【請求項 11】

大腸菌である、請求項 10 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 12】

D s b A、D s b C、D s b G 及び F k p A からなる群から選択される少なくとも 1 つの原核生物ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】

ポリヌクレオチドが D s b A 及び D s b C の両方をコードする、請求項 12 の宿主細胞。

【請求項 14】

大腸菌が内因性プロテアーゼ活性の欠乏した株のものである、請求項 11 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 15】

大腸菌株の遺伝子型が d e g P 及び p r c 遺伝子を欠き、突然変異 s p r 遺伝子をもつ、請求項 14 に記載の宿主細胞。

【請求項 16】

原核宿主細胞で生物学的に活性な免疫グロブリンを生産する方法であって、宿主細胞内での (1) 第 1 のプロモーター-シストロン対を形成する第 1 のプロモーターと第 1 のシストロンと (2) 第 2 のプロモーター-シストロン対を形成する第 2 のプロモーターと第 2 のシストロンとを含むポリヌクレオチドの発現であって、前記第 1 のプロモーター-シストロン対の第 1 のシストロンが免疫グロブリン軽鎖をコードする核酸配列に作用可能に連結した第 1 の翻訳開始領域 (T I R - L) を含み、前記第 2 のプロモーター-シストロン対の第 2 のシストロンが免疫グロブリン重鎖をコードする核酸配列に作用可能に連結した第 2 の翻訳開始領域 (T I R - H) を含み、前記ポリヌクレオチドの発現において軽鎖及び重鎖が生物学的に活性な免疫グロブリンを形成するように折り畳まれ構築される発現；及び前記免疫グロブリンの回収を含む方法。

40

【請求項 17】

第 1 及び第 2 のプロモーターが、p h o A、t a c、l p p、l a c - l p p、l a c、a r a、t r p、t r c 及び T 7 プロモーターからなる群から選択される原核生物プロモーターである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

50

両プロモーターが、PhoAプロモーターである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

TIR-L及びTIR-Hのそれぞれが原核生物分泌シグナル配列又はそのTIR変異体を含み、ここで該TIR変異体は分泌シグナル配列の初めの2から14コドン内での配列置換を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項20】

原核生物分泌シグナル配列がSTII、OmpA、PhoE、LamB、MBP及びPhoA分泌シグナル配列からなる群から選択される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

TIR-LとTIR-Hが等しい翻訳強度となる、請求項16の方法。

10

【請求項22】

相対翻訳強度の組合せがTIR-L及びTIR-Hに対し、それぞれ1及び1であって、1は13のTIR相対翻訳強度レベルの最小レベルである、請求項21の方法。

【請求項23】

原核宿主細胞が大腸菌である、請求項16に記載の方法。

【請求項24】

原核宿主細胞でのDsbA、DsbC、DsbG及びFkpAからなる群から選択される少なくとも1つの原核生物ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を更に含む、請求項16に記載の方法。

【請求項25】

ポリヌクレオチドがDsbA及びDsbCの両方をコードする、請求項24の方法。

20

【請求項26】

大腸菌が内因性プロテアーゼ活性の欠乏した株のものである、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

大腸菌株の遺伝子型がdegP及びprc遺伝子を欠き、突然変異spr遺伝子をもつ、請求項26に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

30

本発明は、一般に、分子生物学及びタンパク質技術の分野に関する。より具体的には、本発明は組換え生産抗体及びその使用に関する。

【発明の背景】

【0002】

近年、種々の疾患および疾病用診断薬および治療薬として、抗体使用への期待の高まりが見られる。多くの研究および臨床の用途には多量の機能性抗体が必要であり、従って、大規模で、実用的な生産システムを用いる必要がある。特に有用なものは、大腸菌または枯草菌などの原核生物から酵母、植物、昆虫細胞および哺乳類細胞にわたる種々の発現宿主を用いた抗体の組換え生産である。Kipriyanov及びLittle (1999) Mol. Biotech. 12:173-201。

40

その他の抗体生産システムに比べ、細菌、特に大腸菌は数多くの独特な利点を提供する。用いる未加工材料（すなわち、細菌細胞）は高価なものではなく、かつ増殖させやすく、従って、生産コストを削減できる。世代時間が短く、かつ、スケールアップが容易であることから、大規模タンパク質生産にとって細菌培養はより実用的な手段となる。大腸菌などの多くの細菌種のゲノム構造および生物学的活性は詳しく研究されており、かつ、広範な発現ベクターが利用でき、望ましい抗体の発現がより便宜になっている。真核生物に比べ、この生産プロセスには組換え遺伝子の操作、宿主へのマルチコピーの安定した形質転換、発現誘導および産物の特徴付けをはじめとする少ない工程しか関与しない。Pluckthun及びPack Immunotech 3:83-105 (1997)。さらに、大腸菌によりランダムなアプローチへの独特な方法が可能となる。プラスミドによる形質転換やファージによるトランスフェ

50

クシヨンの圧倒的な効率のために、大腸菌系は多くの種類の抗体変異体のファージライブラリー構築のために使用でき、このことは機能的ゲノム研究において特に重要である。

【0003】

現在では、細菌系を用いて抗体断片が生産されている。他のいずれの異種タンパク質とも同様に、抗体断片は大腸菌において細胞質で発現された封入体のリフォールディングを介して、または発現とそれに続く細菌ペリプラズムへの分泌を介してのいずれかで産生され得る。一般に、分泌かリフォールディングかの選択はいくつかの考察によって導かれる。一般に、分泌がより迅速でより広く用いられる方法である。

Opper等、米国特許第6,008,023号には、そこで抗体断片（例えば、F a b）を標的腫瘍治療における使用のために酵素と融合させる大腸菌の細胞質発現系が記載されている。Zemel-Dreazen等 Gene 27:315-322 (1984)は大腸菌における抗体軽鎖の分泌およびプロセッシングを報告している。Lo等, P C T国際公開、W093/07896はその重鎖のC H 2領域を欠く四量体抗体の大腸菌生産を報告している。軽鎖をコードする遺伝子およびC H 2欠失重鎖が同一の発現ベクター、ある単一プロモーターの制御下に構築された。この著者らは発現系は最適化されておらず、かつ、発現レベルは中程度であるということを認めていた。2つの発現単位（すなわち、シストロン）が1つのプロモーターの制御下にある同様のポリシストロン性の系は、大腸菌で抗体断片を生産するためにCarter等によって米国特許第5,648,237号でも用いられている。

【0004】

抗体断片を発現するための細菌系の広範な使用とは対照的に、大腸菌で機能的に完全な抗体を高生産量で発現および回収する試みは殆どなかった。完全抗体の複雑な特性および大きなサイズのために、発現された軽鎖および重鎖ポリペプチドの本来のフォールディングおよび構成を達成するのが困難であることが多く、その結果再構成四量体抗体の産生量が低くなる。さらに、原核生物で作製された抗体はグリコシル化していないので、エフェクター機能を欠いており、当技術分野では大腸菌は完全抗体を作製するのに有用な系ではないであろうと示唆されてきた。Pluckthun及びPack (1997) Immunotech 3:83-105 ; Kipriyanov及びLittle Mol. Biotech. 12:173-201 (1999) ; ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH, pp 203-252 (Oxford Press)におけるPluckthun等 (1996) ; HANDBOOK OF EXP. PHARMCOL vol 3: The Pharmacol. of Monoclonal Antibodies, pp269-315 (ed. M. Rosenberg及びG.P. Moore ; Springer-Verlag, ベルリン)におけるPluckthun (1994)。

研究および臨床研究における最近の進展により多くの場合で、完全抗体は抗体断片よりも好ましいということが示唆されている。Fc領域を含む完全抗体はイン・ビボ(in vivo)において分解およびクリアランスに対しより抵抗力があり、それにより循環においてより長い生物学的半減期を有する傾向がある。この特徴は抗体を持続性治療を必要とする疾病の治療薬として用いる場合には特に望ましい。

【0005】

さらに、多くの場合で、治療上の使用にはエフェクター機能を欠く完全抗体がより望ましい。Friend等, Transplantation 68: 1632-1637 (1999)はヒトにおいて器官同種移植の急性拒絶症状の治療のために用いた場合のグリコシル化C D 3モノクローナル抗体の重症サイトカイン放出症候群などの毒性作用を記載している。C D 3抗体はF c R結合の結果としてT細胞受容体複合体を架橋結合することによってT細胞活性化およびサイトカイン放出をもたらす。米国特許第5,585,097号は天然のC D 3抗体の特定のグリコシル化部位の残基を突然変異させることで非グリコシル化されたC D 3抗体を作製することを記載している。Armour等, Eur. J. Immunol. 29:2613-2624 (1999)は標的抗原を保持する細胞（すなわち、血小板細胞）の枯渇が望ましくない場合の、治療適用におけるH P A-1 a陽性血小板に特異的な非破壊性抗体（すなわち、エフェクター機能を欠いている）の使用を記載している。Thompson,等, J. Immunol Meth 227:17-29 (1999)はT G F β 2に対する完全なヒト抗体のエフェクター機能はT G F β 2によって媒介される繊維性病変の治療における使用に必要なでないことを示している。Reddy,等, J. Immunol. 164:1925-1933 (2000)は自己免疫疾患の治療における強力な抗体-F c γ受容体結合の障害を記載している。Isaa

10

20

30

40

50

cs,等, Clin. Exp. Immunol. 106:427-433(1996)はイン・ビボ(in vivo)で純粋なブロッキング作用が必要な場合には、非グリコシル化されたモノクローナル抗体変異体またはFc受容体結合を阻害するよう操作された変異体がよりよい選択であり得ると示唆している。

【0006】

現在、抗体のエフェクター機能を排除または軽減する試みは、標的細胞を枯渇させることができないと考えられているIgG4イソ型を用いることか、エフェクター機能にとって重要なFc領域の残基が変異しているFc変異体を作製することのいずれかに焦点を合わせている。例えば、米国特許第5,585,097号参照。しかしながら、これらのいずれのアプローチにも制限がある。例えば、Isaacs,等 (1996)上掲,及びThompson,等 (1999),上掲によって記載されるように、IgG4イソ型は一定レベルのエフェクター機能を保持すると示されている。Reddy等 (2000),上掲もFcエフェクター機能を排除するにはCD4に対するIgG4mAbのさらなる変更が必要であったと報告している。Fc変異体は一次配列における残基変更のために望ましくない免疫応答を誘発する場合がある。

【発明の概要】

【0007】

本発明は原核生物で完全抗体を生産する必要性に関する。ある実施形態では、本発明は原核生物の宿主細胞における免疫グロブリンの生産方法を提供し、これは独自に設計された個別シストロン発現ベクターを用いることを含んでなる。本発明の個別シストロン発現ベクターはポリヌクレオチド発現カセットを含んでなり、これは免疫グロブリン軽鎖の発現のための第1のプロモーターシストロン対と免疫グロブリン重鎖の発現のための第2のプロモーターシストロン対とを含んでなり、これによって軽鎖および重鎖の発現は別個のプロモーターによって独立に制御される。発現カセットポリヌクレオチド内の各シストロンは全長抗体の軽鎖または重鎖をコードする核酸配列に機能しうる形で連結された翻訳開始領域(TIR)を含んでなる。いくつかの実施形態では、本発明の発現ベクター内のTIR配列を軽鎖および重鎖について種々の翻訳強度組み合わせを提供するよう操作する。多くの原核生物が本発明の発現ベクターの宿主として好適である。好ましくは、宿主はグラム陰性菌である。より好ましくは、宿主は大腸菌である。ある実施形態では、宿主細胞は異種タンパク質の大量生産に好適な遺伝子改変した大腸菌株である。いくつかのプロモーターを本発明の発現ベクターに使用してよい。好ましいプロモーターは大腸菌PhoAプロモーターである。

【0008】

本発明はまた新規な個別シストロン発現ベクターを用いて原核生物の宿主で産生された全長非グリコシル化された抗体を提供する。本発明は、限定されるものではないがヒト抗体、アフィニティー成熟抗体、変異Fc領域を含む抗体、多特異性抗体、および抗体誘導体をはじめとする種々の抗体改変または変異体を包含する。細胞障害剤と結合した全長抗体を含んでなる免疫複合体組成物も考慮される。

本明細書に記載される全長抗体の種々の診断および治療的使用も考慮される。ある治療的用途では、患者に全長抗体をもう1つの治療薬と組み合わせて用いる。

【好ましい実施態様の詳細な説明】

【0009】

I. 定義

ここで使用されているように、「ベクター」という用語は、その他の核酸を、それが連結している場所へ輸送することのできる核酸分子を指す。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、付加的なDNAセグメントをライゲーションすることができる環状二重鎖DNAループを指す。他のタイプのベクターはファージベクターである。その他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムヘライゲーションすることができる。所定のベクターは、それらが導入された宿主内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター、及びエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は

、宿主細胞への導入によって宿主細胞のゲノムと一体化し、宿主ゲノムと共に複製する。さらに、所定のベクターは、それらが作用可能に連結している遺伝子の発現を方向づける。このようなベクターは、ここでは、「組換え発現ベクター」（あるいは単に「組換えベクター」）と呼ばれている。一般的に、組み換えDNA技術での用途の発現ベクターは、しばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は相互交換可能に使用することができる。

ここで使用される「シストロン」という用語は、概してポリペプチド鎖及び隣接コントロール領域をコードしているヌクレオチド配列を含む翻訳単位に相当する遺伝子要素を指すことを意図する。「隣接コントロール領域」は例えば、翻訳開始領域（T I R；下記に定義されるようなもの）及び末端領域を含む。

【0010】

「ポリシストロン性」発現ベクターは、1つの単一プロモーターの調節コントロールのもとで多くのシストロンを含む及び発現する単一のベクターを指す。ポリシストロン性ベクターの一般的な例は、1つのプロモーターのコントロール条件で2つの異なるポリペプチドを含み、発現する「2シストロン性」ベクターである。2シストロン性又はポリシストロン性ベクターの発現において、多数の遺伝子がまず単一の転写単位として転写され、次いで別々に翻訳される。

本発明に係る「個別シストロン性」発現ベクターとは、各シストロンがそれぞれのプロモーターの支配下にある、少なくとも2つの別々のプロモーター-シストロンの対を有する単一のベクターを意図する。個別シストロン性発現ベクターの発現では、別々の遺伝子の転写と翻訳の両段階が分離し、独立している。

【0011】

ここで使用される、「翻訳開始領域」又はT I Rとは、関心のある遺伝子の翻訳開始の効力を提供する核酸領域を意図する。一般的に、特定のシストロン内にあるT I Rは、リボソーム結合部位（R B S）と5'及び3'からR B Sの配列を包含する。R B Sは、最小で、シャイン-ダルガーノ領域及び開始コドン（A U G）を含むと定義される。従って、T I Rはまた、翻訳される核酸配列の少なくとも一部を含む。好ましくは、本発明のT I Rは、シストロン内の軽鎖又は重鎖をコードする配列の前にくるシグナルペプチドをコードする分泌シグナル配列を含む。T I R変異体は、T I Rの特性、例えば以下に定義されるようなその翻訳強度等を変えるT I R領域内配列変異（特に置換）を含んでなる。好ましくは、本発明のT I R変異体は、シストロン内の軽鎖及び重鎖をコードする配列の前にくる分泌シグナル配列の初めの2～約14、好ましくは約4～12、より好ましくは約6のコドン内での配列置換を含んでなる。

ここで使用される用語「翻訳強度」とは、T I Rの一以上の変異体がポリペプチドの直接分泌に使用され、その結果を同じ培地及びアッセイ条件下で野生型T I R又は幾つかの他のコントロールに比較して得た、コントロールシステムにおける分泌ポリペプチドの測定を意図する。いずれかの見解に限定する訳ではないが、ここで使用される「翻訳強度」は、例えば、m R N A安定性、リボソーム結合部位に結合するリボソームの能力、及び膜を超える転位座の機序の測定を含みうる。

【0012】

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、細胞膜、通常は内側の膜又は原核生物の内側と外側の膜を通して、対象となる新しく合成されたタンパク質の方向付けに使用することのできる短いシグナルペプチドをコードする核酸配列を意図する。このようにして、対象となるタンパク質、例えば免疫グロブリン軽鎖又は重鎖ポリペプチドは、原核宿主細胞の周辺に、あるいは培地中に分泌される。分泌シグナル配列によってコードされるシグナルペプチドは、宿主細胞に内在しても、あるいはそれらは外因性でもよく、発現されるポリペプチドに本来あるシグナルペプチドを含む。分泌シグナル配列は、典型的には発現されるポリペプチドのアミノ末端に存在し、典型的にはポリペプチドの生合成と分泌の間に細胞質から酵素的に取り除かれる。従って、シグナルペプチドは、通常、成熟タン

10

20

30

40

50

パク質産物には存在しない。

ここで使用される「宿主細胞」（又は「組換え宿主細胞」という用語は、遺伝的に変化した、又は外因性ポリヌクレオチド、例えば組換えプラスミド又はベクター等の挿入によって遺伝的に変化した細胞を呼ぶことを目的とする。この用語は、特定の対象細胞だけではなく、これらの細胞の子孫をも意味すると理解される。突然変異又は環境による影響のどちらかによって、ある種の修飾が次の世代で生じるため、実際は、このような子孫は親細胞と同一ではない可能性があるが、やはりここで使用されるような「宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。

【0013】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、最も広い意味で互換性をもって使用され、モノクローナル抗体（全長及び無傷のモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多特異性抗体（例えば、所望の生物学的活性を示す限りにおいての二重特異性抗体）を含む。天然発生抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された4つのポリペプチド鎖、2つの同一の重鎖（H）及び2つの同一の軽鎖（L）を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（ V_H ）及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2及びCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ V_L ）及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン C_L を含む。 V_H 及び V_L 領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存的な領域で分散された相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変の領域にさらに細分される。各 V_H 及び V_L は、3つのCDRと4つのFRを含み、次の順番でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

あらゆる脊椎動物種由来の抗体の軽鎖は、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる、定常ドメインのアミノ酸配列に基づく2つの明らかに異なる型の1つに当てはまる。

【0014】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によれば、抗体（免疫グロブリン）を異なるクラスに分けることができる。5つの免疫グロブリンの主なクラス；IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、これらの幾つかはサブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG-1、IgG-2、IgA-1、IgA-2などに更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの種々のクラスのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られており、一般的には、例えばAbbas等、Cellular and Mol. Immunology, 第4版（2000）に記載されている。抗体は、大きな融合分子の一部であることもあり、抗体と一以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有的又は非共有的な関わりによって形成されうる。

用語「全長抗体」、「無傷の抗体」及び「完全抗体」は、ここで互換性をもって使用され、下記に定義されるような抗体断片ではない、実質的に無傷の形態である抗体を意図する。この用語は、特にFc領域を含む重鎖をもった抗体を意図する。全長抗体は、天然配列抗体又は抗体変異体でありうる。全長抗体は、ヒト、ヒト化及び／又は親和性成熟したものであり得る。

【0015】

「抗体断片」は無傷の抗体の一部のみを含み、一般的には無傷の抗体の抗原結合部位を含んでいるので抗原に結合する能力は残っている。この定義によって包含される抗体断片の例には：(i) V_L 、 C_L 、 V_H 及びCH1ドメインを有するFab断片；(ii) CH1ドメインのC末端で一以上のシステイン残基を有するFab断片であるFab'断片；(iii) V_H 及びCH1ドメインを有するFd断片；(iv) V_H 及びCH1ドメインとCH1ドメインのC末端に一以上のシステイン残基を有するFd'断片；(v) 抗体の1つの腕の V_L 及び V_H ドメインを有するFv断片；(vi) V_H ドメインからなるdAb断片；(vii) 単離されたCDR領域；(viii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された2つのFab'断片を含む二価抗体である、 $(Fab')_2$ 断片；(ix) 一本鎖抗体分子（例えば、一本鎖Fv；scFv）；(x) 同じポリペプチド鎖に軽鎖可変ドメイン（ V_L ）と連結した重鎖可変ドメイン（ V_H ）を含む、2つの抗原結合部位を有する「ダイアボ

ディ」；(xi) 相補的な軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域を形成する、タンデム F d セグメント (VH-CH1-VH-CH1) を含む「直鎖状抗体」を含む。

【0016】

「生物学的に活性な」又は「機能性の」免疫グロブリンとは、構造的な、制御性の、生化学的な又は生物物理学的な現象において一以上のその本来の活性を発揮する能力のあるものである。例えば、生物学的に活性な抗体は、抗原に特異的に結合する能力を有し、その結合は、言い換えると、シグナル伝達又は酵素活性のような細胞の又は分子の現象を誘発あるいは変化させる。また、生物学的に活性な抗体は、レセプターのリガンド活性化を阻害したり、あるいはアゴニスト抗体として働いたりすることもある。一以上のその本質的な活性を発揮する全長抗体の能力は、ポリペプチド鎖の適切な折り畳みと構造化を含む、幾つかの要素に依存する。ここで使用されるように、開示される方法によって作成された生物学的に活性な免疫グロブリンは、典型的に、複数のジスルフィド結合によってつながり、適切に折り畳まれた、2つの同一のL鎖と2つの同一のH鎖を有するヘテロ四量体である。

10

ここで用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらには、典型定期に異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

20

【0017】

ここでのモノクローナル抗体は特に「キメラ」抗体を含み、それは、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種から誘導された抗体又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された抗体又は他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいて、それらの抗体の断片の対応する配列と同一又は相同である（米国特許第4,816,567号；Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)）。

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、そのレシピエントの高頻度可変領域由来の残基が、マウス、ラット又はウサギなどのヒト以外の種の高頻度可変領域（ドナー抗体）に由来する所望の特異性、親和性及び容量を持つ残基で置換されている。ある場合は、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、ドナー抗体にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密化するために施される。一般にヒト化抗体は、高頻度可変領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含有するであろう。また、任意にはヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含有するであろう。さらなる詳細については、Jones等, Nature 321: 522-525 (1986)；Riechmann等, Nature 332: 323-329 (1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照のこと。また、次の論文及びそこで挙げられている文献を参照：Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle及びGross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

30

40

【0018】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に一致するアミノ酸配列を有するもの、及び／又はここで開示されたヒト抗体を製造するいずれかの技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。

50

「親和性成熟」抗体とは、変化を有しない親抗体と比較し、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、抗体の一又は複数のCDRにおける一又は複数の変化を伴うものである。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当該分野において知られる手順によって生産される。Marks等 Bio/Technology 10:779-783(1992)は、VH及びVLドメイン混合による親和性成熟について記載している。CDR及び／又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、Barbas等, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等, Gene 169:147-155(1995); Yelton等, J. Immunol. 155:1994-2004(1995); Jackson等, J. Immunol. 154(7):3310-9(1995); 及びHawkins等, J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)に記載されている。

10

【0019】

「Fc領域」という用語は、無傷の抗体のパパイン消化で生じ得る免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Fc領域は、天然配列Fc領域又は変異体Fc領域である。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、ヒトIgG重鎖のFc領域は、通常、Cys226の位置のアミノ酸残基、又は約位置Pro230からFc領域のカルボキシル末端まで伸展すると定義される。免疫グロブリンのFc領域は、一般的に、二つの定常ドメイン、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含み、場合によってはCH4ドメインを含む。ここで「Fc領域鎖」とは、Fc領域の二つのポリペプチド鎖のうちの一つを意味する。

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」及び「ADCC」とは、Fcレセプター(FcRs)を発現する非特異的細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)が標的細胞上で結合抗体と認識され、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞介在性反応を意味する。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFcγRIIのみを発現するのに対し、単球はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。関心ある分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号又は同5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、関心ある分子のADCC活性は、例えば、Clynes等 PNAS (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

20

30

【0020】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcγRIIレセプターには、FcγRIIIA(「活性型レセプター」)及びFcγRIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcγRIIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcγRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。他のFcRs、ここでは、将来的に同定されるものも含めて、「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターFcRn (Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976); 及びKim等,

40

50

J. Immunol. 24:249 (1994)) も含まれる。

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。補体の活性化経路は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した分子(例えば、抗体)に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

【0021】

「親和性結合」は、分子(例えば、抗体)とその結合相手(例えば、抗原又はFcRnレセプター)の1つの結合部位の間の非共有的な相互作用全体の力を指す。分子Xの相手Yに対する親和性は、溶液中に存在する半数のX分子の結合部分を占有するのに必要なYの濃度である、解離定数(Kd)によって表される。低親和性抗体は抗原(又はFcRnレセプター)に弱く結合し、すぐに解離する傾向にあるが、高親和性抗体は抗原(又はFcRnレセプター)とより強く結合し、より長く結合し続ける。

ここで用いられる「細胞障害剤」という用語は、細胞の機能を障害し又は妨害し、及び/又は細胞の破壊を引き起こす物質のことをいう。この用語は放射性同位体(例えばAt²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、及びLuの放射性同位体)、化学療法剤、及び断片及び/又はその変異体を含む細菌性、真菌性、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素又は小分子毒素等の毒素を含むことが意図されている。

【0022】

「化学療法剤」は、癌のような症状の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類、；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins)(特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュカロマイシン(duocarmycin)(合成類似体、KW-2189及びCBI-TMIを含む)；エレテロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、コロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofوسفamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediyne)抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン γ_1^I 及びカリケアマイシン θ^I_1 、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；エスペラマイシン(esperamicin)；並びにネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediyne)抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ド

10

20

30

40

50

キソルビシン(モルフォリノドキシソルビシン、シアノモルフォリノドキシソルビシン、2-
 -ピロリノドキシソルビシン及びデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソル
 ビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシ
 ン(mitomycins)、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、
 オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、
 ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ス
 トレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノ
 スタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；メトトレキセート及び5-フルオロウラ
 シル(5-FU)のような抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、
 プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体
 ；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのよ
 うなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azaur
 idine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタ
 ビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)、5-FUのようなピリミジン類似
 体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール
 、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグル
 テチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolic acid)のよ
 うな葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシ
 ド；アミノレブリン酸；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビス
 アントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；
 デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziqune)；エルフォルニチン(elfornithine
)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド
 (etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；
 メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイ
 ド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopi
 damol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラル
 ビシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン
 ；P S K(登録商標)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン(rhizoxin)；シゾフィラン；ス
 ピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニユアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(
 triaziqune)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecene
 s)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及び
 アングイデン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン(ma
 nnomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobrom
 an)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオ
 テパ；タキソイド、例えばバクリタキセル(タキソール(登録商標)、Bristol-Myers Squi
 bb Oncology, Princeton, NJ)及びドキセタキセル(タキソテア(登録商標)、Rhone-Pou
 lenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオ
 グアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのよ
 うなプラチナ類似体；ピンブラスチン；プラチナ；エトポシド(VP-16)；イフォスフ
 アミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベル
 ビン(navelbine)；ノバントロン(novantrone)；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプ
 テリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；CPT-11；トポイソ
 メラーゼインヒビターRFS2000；ジフルオロメチロールニチン(DMF O)；レチノ
 イン酸；カペシタビン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、
 酸類又は誘導体が含まれる。また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は
 阻害するように働く抗ホルモン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン(raloxifene)
 、4(5)-イミダゾール類を阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリ
 オキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリ
 ストーン(onapristone)、及びトレミフェン(Fareston)を含む抗エストロゲン；及び抗ア
 ンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド、

10

20

30

40

50

ロイプロリド、及びゴセレリン；並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0023】

「阻害」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物活性を抑制又は減少させるものである。このような阻害は、あらゆる手段、例えばレセプターのリガンド結合、レセプター複合体の形成、レセプター複合体におけるチロシンキナーゼレセプターのチロシンキナーゼ活性及び／又はチロシンキナーゼ残基のリン酸化を妨害することによって、あるいはレセプターによって引き起こすことができる。例えば、VEGFアンタゴニスト抗体は、VEGFに結合し、VEGFの能力を阻害して血管内皮細胞の増殖を誘導する。好ましい阻害抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を完全に抑制する。

10

「アゴニスト抗体」はレセプターのような抗原に結合しそれを活性化する抗体である。一般には、アゴニスト抗体のレセプター活性化能は、レセプターの天然のアゴニストリガンドに少なくとも質的に類似し（また本質的に量的に類似し）ている。

哺乳動物細胞系で作られる対応抗体「と実質的に等しい有効性で抗原に結合する」本発明の抗体は、哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞によって発現される抗体の結合親和性の、約10倍、好ましくは約5倍、より好ましくは約2倍以内の親和性又は結合活性を有する抗原に結合する能力を有するものである。

「疾患」は抗体で治療することで恩恵を得るあらゆる症状のことである。これには、問題の疾患に哺乳動物を罹患させる素因になる病理状態を含む、慢性及び急性の疾患又は病気が含まれる。ここで治療される疾患の例は、これに限定されるものではないが、良性及び悪性の腫瘍；非白血病性及びリンパ悪性腫瘍；ニューロン、神経膠、星状細胞、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮、ストロマ及び割腔の疾患；及び炎症、血管形成及び免疫性疾患が含まれる。

20

【0024】

ここでの「自己免疫疾患」とは、個人の自身の組織から生じる、また該組織に対する非悪性疾患又は障害のことである。ここでの自己免疫疾患には、特に悪性又は癌腫の疾患又は病状は含まれず、なかでも、B細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(PLL)、毛様細胞白血病及び慢性骨髄芽球白血病は含まれない。自己免疫疾患又は障害の例には、これらに限るものではないが、炎症反応、例えば乾癬及び皮膚炎(例えばアトピー性皮膚炎)を含む炎症性皮膚病；全身性強皮症及び硬化症；炎症性腸疾患(例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎)に関連した反応；呼吸困難症候群(成人性呼吸困難症候群；ARDS)；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；アレルギーによる病状、例えば湿疹及び喘息及びT細胞の浸潤に関連した他の病状及び慢性炎症反応；アテローム性動脈硬化症；白血球付着欠損症；リウマチ様関節炎；全身性エリテマトーデス(SLE)；真性糖尿病(例えば、I型真性糖尿病又はインシュリン依存性真性糖尿病)；多発性硬化症；レーノー症候群；自己免疫甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；ショルゲン(Sjorgen)症候群；若年発症糖尿病；及び結核に典型的に見出されるTリンパ球及びサイトカインにより媒介される急性及び遅延高血圧に関連した免疫反応、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び血管炎；悪性貧血(アジソン病)；白血球血管外遊出に関連した疾患；中枢神経系(CNS)炎症疾病；多臓器傷害症候群；溶血性貧血(限定するものではないが、クリオグロブリン血症又はクームズ陽性貧血を含む)；重症筋無力症；抗原-抗体複合体媒介性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランベルト-イートン筋無力症症候群；類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ライター病；stiff-man症候群；ベーチット疾患；巨細胞動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性神経障害；免疫血小板減少性紫斑病(ITP)又は自己免疫血小板減少病等が含まれる。

30

40

【0025】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を称するか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌の

50

より特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫(hepatoma)、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮の癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。

本明細書において「治療」とは、処理されている個体または細胞の自然の経過を変更しようとする臨床的介入をさし、予防のためかまたは臨床病理学の治療単位の間実施され得る。治療の望ましい作用としては疾病の発生または再発の防止、症状の軽減、疾病のいずれかの直接もしくは間接的病的結果の減少、転移の防止、疾病進行速度の低下、病状の改善もしくは緩和、および予後の寛解もしくは改善が挙げられる。

10

「有効量」とは、所望の治療または予防結果を達成するために、用量で、および必要な時間の間有効な量をさす。抗体の「治療上有効量」は病状、年齢、性別、個体の体重、および個体において所望の応答を惹起する抗体の能力などの因子によって異なり得る。また治療上有効量は治療上有益な作用が抗体のいずれかの毒性または有害な作用に優る場合のものである。「予防上有効量」とは、所望の予防結果を達成するために、用量で、および必要な時間の間有効な量をさす。典型的には、予防用量は疾病に先立って、またはその初期段階で対象に用い、予防上有効な量は治療上有効量よりも少ない。

【0026】

I I. 本発明を実施するための様式

本発明は原核生物系における免疫グロブリンの組換え生産に関する。本発明は免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖の発現が独立に調節される独自に設計された発現ベクター（すなわち、個別シストロン系）に基づくものである。本明細書に示されるいくつかの実施例で例示するように、抗体生産のための既存の原核生物系には重大な問題があり、それでは軽鎖および重鎖遺伝子の転写が1つのプロモーターの制御下にある（すなわち、ポリシストロン性系）。かかる系では2種の免疫グロブリン鎖の発現レベルが不均衡となる傾向がある。2種の遺伝子が単一の転写単位から発現される場合には、典型的には第1の遺伝子が第2の遺伝子よりも高レベルで発現される。この作用は第2の遺伝子の2種の遺伝子間のリボソーム結合効率のようなさらなる因子への翻訳依存性に起因する。従って、ポリシストロン性系は重鎖を上回る過剰の軽鎖を生産する。この特別な問題は理論上は実験的に翻訳カップリングを増加させることで改善される。しかしながら、鎖の間に効率的な翻訳カップリングが得られるとしても、ポリシストロン性系は好ましい軽鎖と重鎖の発現比の決定を複雑にするさらなる困難がある。両鎖は同一メッセージ上でつながっている第1の遺伝子（軽鎖）の翻訳を操作すると第2の遺伝子（重鎖）の翻訳に影響を及ぼす。軽鎖と重鎖の望ましい発現比を達成するためにかかる複雑な配置を克服するには相当な時間と努力が必要であろう。

20

30

【0027】

今、驚くべきことに原核生物系に関連する問題は軽鎖および重鎖遺伝子のシストロンの各々が個別のプロモーターと対をなし、その制御下にあり、従って、2種の遺伝子の転写と翻訳の双方の分離と独立が可能となる個別シストロン系を用いることで解決できるということが発見された。一般に、抗体の個々の鎖について高発現レベルを得ることが望ましいが、全長の、正しくフォールディングされた、生物学的に活性な抗体の生産を最大化するためにより重要なことは軽鎖と重鎖の望ましい発現比を得ることである。

40

本発明の個別シストロン発現系は主として免疫グロブリンの生産について例示されているが、本明細書に記載されるアプローチは多量体タンパク質が産生され、かつ、機能的であるためには最終タンパク質複合体が個々の単位／鎖の適切な構成を必要とするいずれの系にも適用可能であると理解されるべきである。本アプローチは、限定されるものではないが、例えば、T細胞受容体、クラスIおよびクラスII MHC分子、インテグリン、CD8、CD28および因子V β 分子、および関連誘導体、変異体および融合タンパク質をはじめとするジスルフィド結合を含むタンパク質複合体の生産に特に有用である。

【0028】

50

抗原特異性

本発明はどんな適当な抗原結合特異性を有する抗体にも適用可能である。本発明の抗体は生物学的に重要なポリペプチドである抗原に特異的であるのが好ましい。より好ましくは、本発明の抗体は哺乳類における疾病または疾患の治療または診断に有用である。本発明に従って作製された全長の非グリコシル化された抗体は阻止抗体、アゴニスト抗体または抗体接合体などの治療用抗体として特に有用である。治療用抗体の限定するものではない例としては、抗VGEF、抗IgE、抗CD11、抗CD18、抗CD40、抗組織因子(TF)、抗HER2、および抗TrkC抗体が挙げられる。非ポリペプチド抗原(腫瘍関連糖脂質抗原など)に対して向けられる抗体も考慮される。

【0029】

抗原がポリペプチドである場合、それは膜貫通分子(例えば、レセプター)あるいはリガンド、例えば成長因子でありうる。抗原の例には、例えば、レニン；ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク； α -1-アンチトリプシン；インシュリンA-鎖；インシュリンB-鎖；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；VILIC因子、IX因子、組織因子(TF)、及びフォンウィルブラント因子等の凝固因子；プロテインC等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化剤(t-PA)等のプラスミノゲン活性化剤；ボンベシン；トロンビン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；エンケファリナーゼ；RANTES(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1- α)；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ミューラー阻害物質；リラキシンA-鎖；リラキシンB-鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド； β -ラクタマーゼ等の微生物タンパク質；DNアーゼ；IgE；CTLA-4のような細胞毒性Tリンパ球関連抗原(CTLA)；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子(VEGF)；ホルモン又は成長因子のレセプター；プロテインA又はD；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)、又はNGF- β 等の神経成長因子等の神経栄養因子；血小板誘導成長因子(PDGF)；aFGF及びbFGF等の繊維芽成長因子；上皮成長因子(EGF)；TGF- α 及びTGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、又はTGF- β 5を含む、TGF- β のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インシュリン様成長因子-I及び-II(IGF-I及びIGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インシュリン様成長因子結合タンパク質；CD3、CD4、CD8、CD19、CD20及びCD40等のCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質(BMP)；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子(CSFs)、例えば、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン(IL)、例えば、IL-1からIL-10；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス性抗原、例えばAIDSエンベロープの一部等；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン；調節タンパク質；インテグリン、例えばCD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4及びVCAM；腫瘍関連抗原、例えばHER2、HER3又はHER4レセプター；及び上に列挙したポリペプチドの何れかの断片が含まれる。

【0030】

本発明に包含される抗体に対する好適な抗原には、CDタンパク質、例えばCD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34、及びCD46；ErbBレセプターファミリーのメンバー、例えばEGFレセプター、HER2、HER3又はHER4レセプター；細胞接着分子、例えばLFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7インテグリン、及びその α 又は β サブユニットを何れか含む α v/ β 3インテグリン(例えば、抗CD11a、抗CD18又は抗CD11b抗体)；成長因子、例えばVEGF；組織因子(TF)；TGF- β α インターフェロン(α -IFN

10

20

30

40

50

); インターロイキン、例えば I L - 8 ; I g E ; 血液型抗原 A p o 2、細胞死受容体 ; f l k 2 / f l t 3 レセプター ; 肥満 (O B) レセプター ; m p l レセプター ; C T L A - 4 ; プロテイン C 等々が含まれる。ここで最も好ましい標的は、 V E G F、T F、C D 1 9、C D 2 0、C D 4 0、T F G - β 、C D 1 1 a、C D 1 8、A p o 2 及び C 2 4 である。

他の分子と場合によっては結合されていてもよい、可溶性抗原又はその断片を、抗体を産生するための免疫原として使用することができる。レセプターのような膜貫通分子に対しては、これらの分子の断片 (例えば、レセプターの細胞外ドメイン) を免疫原として使用することができる。あるいは、膜貫通分子を発現する細胞を免疫原として使用することもできる。そのような細胞は天然源 (例えば、癌株化細胞) から取り出すことができ、又は膜貫通分子を発現するために組換え法により形質転換された細胞でありうる。抗体の調製に対して有用な他の抗原とその形態は当業者には明らかであろう。

本発明の抗体は単一特異性、二特異性、三特異性またはより多い多特異性であってもよい。多特異性抗体は単一分子の異なるエピトープに特異的であってもよく、または異なる分子上のエピトープに特異的であってもよい。多特異性抗体を設計および作製する方法は当技術分野で周知である。例えば、Millstein 等 (1983) Nature 305:537-539 ; Kostelny 等 (1992) J. Immunol. 148:1547-1553 ; WO93/17715 参照。

【 0 0 3 1 】

ベクター構築

本発明の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を用いて入手すればよい。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞などの抗体産生細胞から単離および配列決定すればよい。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチドシンセサイザーまたは P C R 技術を用いて合成してもよい。入手したら、軽鎖および重鎖をコードする配列を原核生物の宿主において異種ポリヌクレオチドを複製および発現可能な組換えベクターに挿入する。本発明の目的のためには、入手でき当技術分野で周知である多数のベクターが使用できる。適当なベクターの選択は主としてベクターに挿入される核酸の大きさおよびベクターで形質転換される特定の宿主細胞によって異なる。各ベクターは種々の成分を含むが、これはその機能 (異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはその双方) およびそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性によって異なる。一般に、ベクター成分としては限定されるものではないが、複製開始点、選抜マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位 (R B S)、シグナル配列、異種核酸挿入部分および転写終結配列が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

一般に、レプリコンおよび宿主細胞と適合する種由来の制御配列を含むプラスミドベクターをこれらの宿主とともに用いる。通常、ベクターは複製部位、ならびに形質転換細胞における表現型選抜を提供し得るマーカー配列を有する。例えば、大腸菌は典型的には p B R 3 2 2、大腸菌種由来のプラスミドを用いて形質転換する。p B R 3 2 2 はアンピシリン (A m p) およびテトラサイクリン (T e t) 耐性をコードする遺伝子を含み、従って、形質転換細胞を同定するための容易な手段を提供する。p B R 3 2 2、その誘導体、または他の微生物のプラスミドまたはバクテリオファージはまた内因性タンパク質の発現のために微生物によって使用され得るプロモーターを含んでもよく、または含むよう改変してもよい。特定の抗体の発現に用いる p B R 3 2 2 誘導体の例は Carter 等、米国特許第 5,648,237 号および本明細書の以下の「実施例」の項に詳細に記載されている。

さらに、レプリコンと宿主微生物と適合する制御配列とを含むファージベクターを形質転換ベクターとしてこれらの宿主とともに用いてもよい。例えば、 λ G E M . T M . - 1 1 などのバクテリオファージを組換えベクターの作製に利用してもよく、これを用いて大腸菌 L E 3 9 2 などの感受性宿主細胞を形質転換してもよい。

【 0 0 3 3 】

本発明の発現ベクターは少なくとも 2 種のプロモーター-シストロン対、一方は免疫グロブリン軽鎖用であり、もう一方は免疫グロブリン重鎖用を含んでなる。プロモーターと

はシストロンの上流（5'）に位置する非翻訳調節配列であり、これがその発現を調節する。原核生物のプロモーターは典型的には2つのクラスに、誘導性および構成的に分類される。誘導プロモーターとは培養条件の変化、例えば、栄養素の有無または温度の変化に応じてその制御下のシストロンの転写レベルの増加を惹起するプロモーターである。

構成および誘導プロモーターの双方ともを本発明に使用してよいが、本明細書に開示される発現ベクターでは高度に調節する誘導プロモーターが好ましい。種々の可能性ある宿主細胞によって認識される多数のプロモーターがよく知られている。制限酵素消化によって供給源DNA由来のプロモーターを除去し、単離したプロモーター配列を本発明のベクターに挿入することで、選択したプロモーターを軽鎖および重鎖をコードするシストロンDNAに機能しうる形で連結すればよい。天然のプロモーター配列および多数の異種プロモーターの双方とも、これを用いて標的遺伝子の増幅および／または発現に向けることができる。しかしながら、異種プロモーターが好ましく、これはそれらが一般に天然の標的ポリペプチドプロモーターと比べ、より多量の転写および発現された標的遺伝子のより多い産生量を可能にするからである。

【0034】

原核生物宿主との使用に適したプロモーターには、PhoAプロモーター、βガラクターマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えばtac又はtrcプロモーターが含まれる。しかしながら、細菌において機能的な他のプロモーター（例えば、他の既知のバクテリア又はファージプロモーター）も同様に適している。そのヌクレオチド配列に関する詳細は公開されており、当業者は、リンカー又はアダプターを用いてそれらを標的の軽鎖及び重鎖をコードするシストロンと連結させて任意の必要な制限部位を供給することができる（例えば、Siebenlist等、(1980) Cell, 20:269を参照）。本発明の使用により好ましいプロモーターは、PhoAプロモーターである。

本発明のある態様では、組換えベクター内の各シストロンは分泌シグナル配列要素を含んでなり、これは発現されたポリペプチドの、膜を超える移行を方向付けする。一般に、シグナル配列はベクターの成分であってよく、またはベクターに挿入される標的ポリペプチドDNAの一部であってもよい。本発明の目的のために選択されたシグナル配列は宿主細胞によって認識され、プロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。異種ポリペプチド本来のシグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核生物の宿主細胞については、シグナル配列を例えば、アルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定性エンテロトキシンII（STII）リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpAおよびMBPからなる群から選択される原核生物のシグナル配列で置換する。本発明の好ましい実施形態では、発現系の両シストロンに用いるシグナル配列はSTIIシグナル配列またはその変異体である。

【0035】

もう1つの態様では、本発明の免疫グロブリンの生産が宿主細胞の細胞質で起こり得、従って各シストロン内に分泌シグナル配列が存在する必要がない。それに関しては、免疫グロブリン軽鎖および重鎖は細胞質内で発現され、折りたたまれ、さらに構造化されて機能性免疫グロブリンを形成する。特定の宿主株（例えば、大腸菌trxB⁻株）はジスルフィド結合形成に都合のよい細胞質条件を提供し、それによって発現されたタンパク質サブユニットの適当な折りたたみおよび構成を可能にする。Proba及びPluckthun, Gene, 159:203 (1995)。

本発明は、分泌され、かつ、適切に構築された全長抗体の産生量を最大化するために発現される軽鎖と重鎖の量比を調節できる発現系を提供する。かかる調節は軽鎖と重鎖の翻訳強度を同時に調節することで達成される。

【0036】

翻訳強度を調節するある技術がSimmons等、米国特許第5,840,523号に開示されている。それではシストロン内の翻訳開始領域（TIR）の変異体を利用している。所定のTIRについては、様々な翻訳強度を有する一連のアミノ酸または核酸配列変異体を作製し、そ

れによってこの因子を特定の鎖の所望の発現レベルに適合させる便宜な方法を提供することができる。T I R変異体はアミノ酸配列を変更し得るコドン変更をもたらす（ただし、ヌクレオチド配列ではサイレントな変更が好ましい）従来の突然変異誘発技術によって作製すればよい。T I Rの変更としては、例えば、シグナル配列の変更の他に、シャインーダルガーノ（Shine-Dalgarno）配列数または間隔の変更が挙げられる。変異シグナル配列を作製するある好ましい方法は、コード配列の開始点にシグナル配列のアミノ酸配列を変更しない（すなわちこの変更はサイレントである）「コドンバンク」を作製することである。これは各コドンの3番目のヌクレオチドの位置を変更することで達成すればよく、さらに、ロイシン、セリン、およびアルギニンなどのいくつかのアミノ酸は複数の1番目および2番目位置を有し、これがバンク作製を複雑にし得る。突然変異誘発のこの方法はYanura等(1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

10

【0037】

その中の各シストロンについて様々なT I R強度を有する1セットのベクターを作製することが好ましい。この限定セットにより各鎖の発現レベル、ならびに、種々のT I R強度組み合わせの下での全長産物の産生量の比較が提供される。シモンズ(Simmons)ら米国特許第5,840,523号に詳細に記載されるように、T I R強度はレポーター遺伝子の発現レベルを定量化することで決定すればよい。本発明の目的のために、ベクター内のT I Rの特定の対についての翻訳強度の組み合わせは（N－軽、M－重）（ここで、Nは軽鎖の相対T I R強度であり、Mは重鎖の相対T I R強度である）で表される。例えば、（3－軽、7－重）はベクターが軽鎖発現について約3の相対T I R強度を提供し、かつ、重鎖発現について約7の相対T I R強度を提供することを意味する。翻訳強度比較を基に、本発明の発現ベクター構築物で組み合わせる所望の個々のT I Rを選択する。

20

【0038】

本発明の全長抗体を発現させるのに好適な原核生物の宿主細胞としては、グラム陰性またはグラム陽性生物などの古細菌および真正細菌が挙げられる。有用な細菌の例としてはエシェリキア属（例えば、大腸菌）、桿菌（例えば、枯草菌）、腸内細菌、シュードモナス種（例えば、P. アエルギノサ(aeruginosa)）、ネズミチフス菌、セラチア・マルセスキンス、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌属、根粒菌、ビトレオスシラ(Vitreoscilla)、またはパラコッカス(Paracoccus)が挙げられる。グラム陰性細胞を用いるのが好ましい。より好ましくは、大腸菌細胞を本発明の宿主として用いる。好ましい大腸菌株は株W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology 2巻 (ワシントンD. C. : American Society for Microbiology, (1987), pp.1190-1219; ATCC 寄託番号 27, 325) および遺伝子型W3110・fhuA (・tonA) ptr3 lac Iq lacL8・ompT・(nmpc-fepE) degP41 kan^Rを有する33D3株 (米国特許第5,639,635号) をはじめとするその誘導体である。もちろん大腸菌294 (ATCC 31, 446)、大腸菌B、大腸菌 λ 1776 (ATCC 31, 537) および大腸菌RV308 (ATCC 31, 608) などの他の株およびその誘導体も好適である。これらの例は例示であって限定されるものではない。所定の遺伝子型を有する前記の細菌のいずれかの誘導体を構築する方法は当技術分野では周知であり、例えば、Bass等, Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。もちろん、細菌細胞におけるレプリコンの複製可能性を考慮して適当な細菌を選択する必要がある。例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、またはpKN410などの十分に周知のプラスミドをレプリコンを供給するために用いる場合には、大腸菌、セラチア、またはサルモネラ種が宿主として用いるのに好適であり得る。好ましくは、宿主細胞は最少量のタンパク質分解酵素しか分泌すべきでなく、さらなるプロテアーゼ阻害剤を細胞培養に加えることが望ましい場合もある。

30

40

【0039】

抗体産生

宿主細胞を前記の発現ベクターで形質転換して誘導プロモーター用に必要に応じて改変

50

した従来の栄養培地で培養し、形質転換体を選抜し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅する。

形質転換とはDNAが染色体外要素としてか、または染色体成分によってのいずれかで複製可能であるようにDNAを原核生物の宿主に導入することを意味する。形質転換は、用いる宿主細胞に応じてかかる細胞に適当な標準的な技術を用いて行う。一般に、かなりの細胞壁障壁を含む細菌細胞には塩化カルシウムを用いるカルシウム処理を用いる。もう1つの形質転換法はポリエチレングリコール/DMSOを用いる。用いられるさらにもう1つの技術はエレクトロポレーションである。

本発明のポリペプチドを生産するために用いられる原核細胞は当技術分野で周知であり、かつ、選択した宿主細胞の培養に好適な培地で増殖させる。好適な培地の例としては必要な栄養素を補ったルリアーブロス（LB）が挙げられる。好ましい実施形態では、発現ベクターを含有する原核細胞の増殖を選択的に可能にするために培地は発現ベクターの構成を基に選択した選抜剤も含んでもよい。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖のために、アンピシリンを培地に加える。

【0040】

炭素、窒素、および無機リン酸供給源の他に、いずれかの必須サプリメントも適当な濃度で単独でまたは他のサプリメントもしくは窒素錯体供給源などの培地との混合物として取り入れて含めてもよい。所望により、培養培地はグルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトールおよびジチオスレイトールからなる群から選択される1種以上の還元剤を含んでもよい。

原核生物の宿主細胞を好適な温度で培養する。大腸菌増殖には、例えば、好ましい温度は約20℃ないし約39℃、より好ましくは約25℃ないし約37℃にわたり、さらにより好ましくは約30℃である。培地のpHは、主として宿主生物にもよるが、約5ないし約9にわたるいずれpHであってもよい。大腸菌には、pHは好ましくは約6.8ないし約7.4であり、より好ましくは約7.0である。

本発明の発現ベクターに誘導プロモーターを用いる場合には、タンパク質発現はプロモーターの活性化に好適な条件下で誘導する。本発明のある態様では、2個のPhoAプロモーターを用いて軽鎖および重鎖の転写を制御する。従って、形質転換された宿主細胞を誘導のためにリン酸制限培地で培養する。好ましくは、リン酸制限培地は以下の実施例2に詳細に記載されるシー・アール・エー・ピー（C.R.A.P）培地である。用いるベクター構築物によっては、当技術分野で周知のように種々の他の誘導物質を用いてもよい。

【0041】

本発明の発現された軽鎖および重鎖ポリペプチドは宿主細胞のペリプラズムに分泌されそこから回収される。タンパク質回収は典型的には、一般に浸透圧ショック、超音波処理または溶解といった手段による微生物の破壊を伴う。細胞を破壊したら、細胞細片または全細胞を遠心分離または濾過によって回収すればよい。タンパク質は、例えば、親和性樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製してもよい。あるいは、タンパク質が培養培地に移行され、そこで単離する場合もある。細胞は産生されたタンパク質のさらなる精製のために濾過され遠心分離された培養物または培養上清から除去してもよい。発現されたポリペプチドはポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）およびウェスタンブロット・アッセイなどの一般に知られている方法を用いてさらに単離および同定すればよい。

本発明のある態様では、抗体生産を培養プロセスによって大量に実施する。組換えタンパク質の生産には種々の大規模流加培養手順が利用できる。大規模培養は少なくとも1000リットルの容量を有し、好ましくは約1,000ないし100,000リットルの容量を有する。これらの発酵槽は攪拌羽根を用いて酸素および栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー供給源）を分配する。小スケール培養とは一般に容積が約100リットルしかない培養槽での培養をさし、約1リットルないし約100リットルにわたり得る。

【0042】

培養プロセスでは、タンパク質発現の誘導は典型的には細胞が好適な条件下で所望の密

度、例えば、約180-220のOD₅₅₀まで増殖した後に始め、この段階で細胞は初期定常期にある。用いるベクター構築物によって、当技術分野で周知であり、かつ、前記の種々の誘導物質を使用してよい。細胞を誘導前により短い期間増殖させてもよい。通常、細胞は約12-50時間誘導するが、より長い、またはより短い誘導時間を用いてもよい。

本発明のポリペプチドの産生量および品質を改善するために、種々の培養条件を改変してよい。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切な構成および折りたたみを向上させるために、Dsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbDおよびもしくはDsbG)またはFkpA(シャペロン活性を有するペプチジルプロリルシス、トランスイソメラーゼ)などのシャペロンタンパク質を過剰発現するさらなるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換してもよい。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞で産生された異種タンパク質の適切な折りたたみおよび可溶性を促進すると実証されている。Chen等(1999) J. Bio. Chem. 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6,083,715号; Georgiou等, 米国特許第6,027,888号; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun (2000) J. Bio. Chem. 275:17106-17113; Arie等 (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。2つの重鎖および2つの軽鎖を含む全長の、二価抗体の形成および折りたたみには十分なジスルフィド結合が特に重要である。

【0043】

発現された異種タンパク質(特に、タンパク質分解に感受性のもの)のタンパク質分解を最小に抑えるために、タンパク質分解酵素を欠く特定の宿主株を本発明に用いてもよい。例えば、宿主細胞株はプロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVIおよびその組み合わせなどの周知の細菌プロテアーゼをコードする遺伝子において遺伝的変異を達成するように改変してもよい。いくつかの大腸菌プロテアーゼを欠く株は入手可能であり、例えば、Joly等(1998), 上掲; Georgiou等, 米国特許第5,264,365号; Georgiou等, 米国特許第5,508,192号; Hara等, Microbial Drug Resistance 2:63-72 (1996)に記載されている。

好ましい実施形態では、タンパク質分解酵素を欠き、かつ、1種以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。これらの株のいくつかを下記の実施例の項でさらに記載する。

【0044】

抗体精製

好ましい実施形態では、本明細書で生産された抗体タンパク質をさらに精製して、さらなるアッセイおよび使用のために実質的に均質な調製物を得る。当技術分野で周知の標準的なタンパク質精製法を用いればよい。以下の手順は好適な精製手順の例である: 免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカまたはDEAEなどの陽イオン交換樹脂でのクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、および例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過。

ある態様では、本発明の全長抗体産物の免疫親和性精製に固相に固定したタンパク質Aを用いる。タンパク質Aは黄色ブドウ球菌由来の41kDの細胞壁タンパク質であり、高親和性で抗体のFc領域と結合する。Lindmark等(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。タンパク質Aを固定する固相はガラスまたはシリカ表面を含んでなるカラムであることが好ましく、制御された孔を有するガラスカラムまたはケイ酸カラムがより好ましい。いくつかの適用では、夾雑物の非特異的付着を防ごうとしてカラムをグリセロールなどの試薬でコーティングした。

精製の第1の工程として、前記の細胞培養物由来の調製物を固相に固定したタンパク質Aに適用して全長抗体をタンパク質Aに特異的に結合させる。次いで、固相を洗浄して固相に非特異的に結合した夾雑物を除去する。最後に、全長抗体を溶出させることで固相から回収する。

【0045】

活性アッセイ

本発明の全長非グリコシル化抗体は、種々の当技術分野で周知のアッセイによってその物理的／化学的特性および生物学的機能について特性決定すればよい。本発明のある態様では、本発明の原核生物の宿主細胞で作製された抗体と異なる発現ベクター設計または異なる宿主細胞系などのその他の発現系で作製された同様の抗体とを比較することが重要である。特に、本発明の個別シストロンベクターによって発現された全長抗体量を種々のポリシストロン性ベクターによって発現されたものとを比較すればよい。タンパク質定量法は当技術分野で十分に知られている。例えば、発現されたタンパク質のサンプルをクーマシー染色したSDS-PAGEでその定量的強度について比較すればよい。あるいは、注目される特定のバンド（例えば、全長バンド）を例えば、ウェスタンブロットゲル解析および／またはAMES-RPアッセイによって検出すればよい。

10

精製した全長抗体は、限定されるものではないが、N末端配列決定、アミノ酸解析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析、イオン交換クロマトグラフィーおよびパパイニン消化をはじめとする一連のアッセイによってさらに特性決定してもよい。

【0046】

本発明の特定の実施形態では、本明細書で生産された全長抗体をその生物学的活性について解析する。本発明の抗体はその抗原結合活性について調べるのが好ましい。本明細書で使用する当技術分野で周知の抗原結合アッセイとしては、限定するものではないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびタンパク質Aイムノアッセイなどの技術を用いるいずれかの直接または競合結合アッセイが挙げられる。例示的抗原結合アッセイを以下の実施例の項に示す。

20

ある実施形態では、本発明は非グリコシル化された全長抗体を考慮する。この抗体の独特の特徴（すなわち、エフェクター機能は欠くが完全なFc領域を有すること）によりインビボでの抗体の半減期が重要であるがエフェクター機能（すなわち、補体およびADCC）は不必要であるか有害である多数の適用にとって所望の候補となる。特定の実施形態では、産生された全長抗体のFc活性を測定して確実に望ましい特性のみが維持されているようにする。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実施して確実に抗体がFcγR1結合を欠くが（従って、ADCC毒性を欠く）、FcRn結合能力は保持するようにする。また、C1q結合アッセイを実施して抗体がC1qと結合できず、従ってCDC活性を欠くということを確認してもよい。インビトロおよびインビボ細胞障害性アッセイを実施してCDCおよびまたはADCC活性の枯渇を確認してもよい。これらのアッセイを実施するための技術は当技術分野で周知である。例示的な手順の詳細を実施例の項で示す。

30

【0047】

ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する方法は当該分野でよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体は非ヒトである供給源からそこに導入された一又は複数のアミノ酸残基を有している。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と称され、典型的には「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は本質的には高頻度可変領域配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより、Winterと共同研究者（Jones等（1986）Nature, 321:522-525；Riechmann等（1988）Nature, 332:323-327；Verhoeyen等（1988）Science, 239:1534-1536）の方法に従って実施できる。従って、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの高頻度可変領域残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

40

抗原性を軽減するには、ヒト化抗体を産生するために使用するヒトの軽及び重可変ドメインの両方の選択が非常に重要である。いわゆるベストフィット法では、齧歯類抗体の可変領域の配列を既知のヒト可変配列ライブラリー全体に対してスクリーニングする。齧歯

50

類のものと最も類似するヒトの配列をヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる (Sims等 (1993) J. Immunol., 151:2296、Chothia等 (1987) J. Mol. Biol., 196:901)。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から取り出す特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを複数の異なるヒト化抗体に使用できる (Carter等 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285、Presta等 (1993) J. Immunol. 151:2623)。

【0048】

更に、抗体は、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的特徴を保持した状態でヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調整する。三次元免疫グロブリンモデルは容易に入手可能であり、当業者には知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元コンフォメーション構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは入手可能である。これらのディスプレイを調べることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原への結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、例えば標的抗原に対する高親和性等の望ましい抗体特徴が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0049】

抗体変異体

ここに記載する抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望まれうる。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体の核酸中に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び／又は挿入及び／又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特徴を有するとするならば、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、その最終コンストラクトに達するまでなされる。アミノ酸変化は、配列が作製される時点で対象抗体アミノ酸配列に導入されてもよい。

突然変異誘発の好ましい位置である抗体の所定の残基又は領域の特定のために有用な方法は、Cunningham及びWells, Science 244: 1081-1085 (1989)に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され (例えば、arg, asp, his, lys, 及びglu等の荷電残基)、中性又は負荷電アミノ酸 (最も好ましくはアラニン又はポリアラニン) に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。ついで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更なる又は他の変異体を導入することにより精密にされる。しかして、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を分析するために、all a スキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された全長抗体を所望の活性についてスクリーニングする。

【0050】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び／又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例には、N末端メチオニル残基を持つ抗体又は細胞障害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素 (例えばADEPT) 又はポリペプチドへの、抗体のN又はC末端への融合物を含む。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基が異なる残基で置換されている。置換突然変異に対して最も興味深い部位は高頻度可変領域を含むが、FR変化も考えられる。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表1に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表1に「例示的な置換」と名前を付け、又はアミノ酸の分類に関して以下に更に記載する

ような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてもよい。

【0051】

【表1】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノロイシン	leu
Leu (L)	ノロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノロイシン	leu

【0052】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、（a）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（b）標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は（c）側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

（1）疎水性：ノロイシン, met, ala, val, leu, ile;

（2）中性の親水性：cys, ser, thr;

10

20

30

40

50

- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

抗体の適切な配置の維持に関与しない任意のシステイン残基は、一般にセリンで置換し、分子の酸化的安定性を向上させて異常な架橋を防止する。逆に、抗体にシステイン結合を付加して、その安定性を向上させてもよい。

【0053】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位（例えば6-7部位）を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された全長抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

【0054】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離（天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合）又は初期に調製された変異体又は抗体の非変異体のオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

本発明の抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸修飾を導入し、それによって変異体Fc領域を作成することが望ましい。Fc領域変異体は一又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば置換）を含むヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域）を含みうる。

一実施態様では、Fc領域変異体は、変更された新生児Fcレセプター（FcRn）結合親和性を示しうる。そのような変異体Fc領域は、Fc領域のアミノ酸位置238、252、253、254、255、256、265、272、286、288、303、305、307、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、386、388、400、413、415、424、433、434、435、436、439又は477の任意の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobatのEUインデックスのものである。FcRnへの減少した結合性も持つFc領域変異体は、Fc領域のアミノ酸位置252、253、254、255、288、309、386、388、400、415、433、435、436、439又は447の任意の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobatのEUインデックスのものである。上述のFc領域変異体は、あるいはFcRnへの増加した結合性を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、3

80、382、413、424又は434の任意の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobalのEUインデックスのものである。

【0055】

FcγRへの結合性が低減されたFc領域変異体は、Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438又は439の任意の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobalのEUインデックスのものである。

10

例えば、Fc領域変異体はFcγRIへの減少した結合性を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、265、269、270、327又は329の任意の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobalのEUインデックスのものである。

Fc領域変異体はFcγRIIへの減少した結合性を示し、Fc領域のアミノ酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438又は439の任意の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobalのEUインデックスのものである。

20

【0056】

関心のあるFc領域変異体はFcγRIIIへの減少した結合性を示し得、Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435又は437の一又は複数においてアミノ酸修飾を含んでいてもよく、ここでFc領域の残基の番号付けはKobalのEUインデックスのものである。

変更された(すなわち改善されたか減少させられた)C1q結合性及び/又は補体依存性細胞障害性(CDC)を持つFc領域変異体は国際公開第99/51642号に記載されている。そのような変異体はFc領域のアミノ酸位置270、322、326、327、329、331、333又は334の一又は複数においてアミノ酸置換を含みうる。Fc領域変異体については、Duncan及びWinter Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; 及び国際公開第94/29351号をまた参照のこと。

30

【0057】

免疫複合体

本発明は、また、細胞障害剤、例えば化学療法剤(ここで上に定義及び記載したようなもの)、毒素(例えば、小分子毒素又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的に活性な毒素で、その断片及び/又は変異体を含む)、又は放射性同位元素(すなわち、放射性コンジュゲート)に結合した抗体を含有する免疫複合体に関する。

抗体と一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシン(米国特許第5,208,020号)、トリコテン(trichothene)、及びCC1065のコンジュゲートがまたここで考えられる。

40

本発明の一実施態様では、抗体は一又は複数のメイタンシン分子(例えば1抗体分子当たり約1から約10のメイタンシン)に結合される。メイタンシンは、例えばMay-SH3に還元されていてもよいMay-SS-Meに転換され、修飾された抗体と反応して(Chari等, Cancer Research 52: 127-131 (1992))メイタンシノイド-抗体免疫複合体を生じうる。

【0058】

興味のある他の免疫複合体は一又は複数のカリケアマイシン分子に結合した抗体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質はピコモルに満たない濃度で二本鎖DNAの破

50

壊を生じ得る。使用できるカリケアマイシンの構造類似体には、限定されるものではないが、 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-アセチル- γ_1^I 、P S A G及び θ^I_1 (Hinman等 Cancer Research 53: 3336-3342 (1993)及びLode等 Cancer Research 58: 2925-2928 (1998))が含まれる。出典明示により取り込まれる米国特許第5,714,586号；同第5,712,374号；同第5,264,586号；及び同第5,773,001号を参照のこと。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュドモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカナ(Phytolacca americana)プロテイン(P A P I、P A P I I及びP A P - S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば1993年10月28日に公開された国際公開第93/21232号を参照のこと。

本発明は更に抗体と核溶解(nucleolytic)活性を持つ化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；DNase)の間に形成された免疫複合体を更に考える。

様々な放射性同位元素が放射性コンジュゲート抗体の生産に利用できる。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及びLuの放射性同位元素が含まれる。

【0059】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサレンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-D T P A)は抗体に放射性ヌクレオチドを結合するためのキレート剤の例である。国際公開94/11026号を参照のこと。リンカーは細胞中で細胞障害薬の放出を容易にする「切断可能リンカー」でありうる。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフイド含有リンカー(Chari等 Cancer Research 52: 127-131 (1992))を使用することができる。

あるいは、抗体と細胞障害剤を含む融合タンパク質を、例えば組換え法又はペプチド合成法によって作製してもよい。

他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体を結合させることができ、ここで、抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いてキレート剤を使用して、循環系から未結合コンジュゲートを除去し、ついで細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)に結合した「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0060】

抗体誘導体

本発明の抗体および抗体変異体をさらに改変して当技術分野で周知であり、かつ、容易に入手できるさらなる非タンパク質部分を含めてもよい。好ましくは、抗体の誘導体化に

好適な部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの限定するものではない例としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキソラン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダム共重合体のいずれか）およびデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、およびその混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドがその水中安定性のために製造において有利であり得る。ポリマーはいずれの分子量のものであってもよく、分枝していてもよいし、していなくてもよい。抗体に結合するポリマー数は異なってよく、1以上のポリマーを結合する場合にはそれらは同一分子であっても異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に用いるポリマーの数およびまたは種類は、限定されるものではないが、改良される抗体の特定の性質または機能、抗体誘導体が所定の条件下で治療に用いられるかどうかをはじめとする考慮を基に決定すればよい。

【0061】

一般に、本明細書に記載の原核生物の発現系によって産生される全長抗体は非グリコシル化されており、Fc領域のエフェクター活性を欠いている。天然の全長抗体の1以上のエフェクター機能を少なくとも部分的に回復させることが望ましい場合もある。従って、本発明は非グリコシル化された全長抗体のFc領域中の同定した残基部位に好適な部分を結合させることによってエフェクター機能を回復させる方法を考慮する。この目的のために好ましい部分はPEGであるが、他の炭水化物ポリマーも使用してよい。ペグ化(pegylation)は当技術分野で周知のいずれかのペグ化反応によって実施すればよい。例えば、EP401384；EP0154316；W098/48837参照。ある実施形態では、まずシステイン残基を、抗体または抗体変異体が通常グリコシル化されている位置または抗体の表面上の位置などの抗体の同定した位置の残基と置換する。好ましくは、システインを1以上の位置297、298、299、264、265および239（KabatにみられるようなEU指針に従う番号付け）の残基と置換する。発現後、システイン置換した抗体変異体は遊離システイン残基と化学結合した種々の形態のPEG（または予備合成炭水化物）を含み得る。

【0062】

製薬製剤

全長抗体の治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより（Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編, (1980)）、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製され貯蔵される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及び／又はTWEEN（商品名）、PLURONICS（商品名）又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0063】

ここでの製剤は、治療される特定の徴候のために必要ならば一以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものも含んでよい。そのような分子は、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて好適に存在する。

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリペプチド-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル、コロイド状ドラッグデリバリー系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編, (1980)に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0064】

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、全長抗体を含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリペプチドポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号))、L-グルタミン酸と γ エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOSITTM（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア）、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、37℃の水分に暴露された結果として変性し又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

【0065】

用途

本発明の抗体は、例えば、それが認識する特定ポリペプチドを精製、検出、及び標識するのに使用され、インビトロ及びインビボの診断及び治療方法を含む。

一態様では、本発明の抗体は、生物学的試料の特定抗原を質的及び量的に測定する免疫測定法に使用することができる。抗原-抗体結合を検出するための通常の方法には、例えば酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)又は組織免疫組織化学を含む。多くの方法では、検出の目的で抗体に結合する標識を使用する。抗体とともに使用される標識は、抗体への結合を妨害しないあらゆる検出可能な機能性を有する。多くの標識が知られ、放射性同位体である³²P, ³²S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H及び¹³¹I、希土類キレートなどのフルオロフォア、又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、アンベリフェロン(umbelliferone)、例えばホタルルシフェラーゼ及びバクテリアルシフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)などのルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼなどのサッカライドオキシダーゼ、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどのヘテロサイクリックオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカル、放射性核種の画像(例えばTechnocium)などである。

【0066】

これらの標識を共有結合的に抗体ポリペプチドと結合させるためには、従来の方法が利用できる。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジジン、及びその類似物質などのカップリング剤が、上述の蛍光性、化学発光性、及び酵素的な標識で抗体をタグ化するのに用いられる。例えば、米国特許3,940,475号（蛍光定量法）及び3,645,090号（酵素法）；Hunter等, Nature 144:945 (1962)；David等, Biochemistry 13:1014-1021 (1974)；Pain等, J. Immunol. Methods 40:219-230 (1981)；及びNygren Histochem. and Cytochem. 30:407-412 (1982)を参照のこと。ここでの好ましい標識は、西洋わさびペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ等の酵素である。酵素を含むこのような標識の抗体ポリペプチドへの結合は、イムノアッセイ技術分野における当業者にとって、標準的な操作可能な方法である。例えば、O'Sullivan等, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzymology, ed. J.J.Langone 及びH. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp147-166を参照のこと。このような結合方法は、本発明の抗体ポリペプチドとの使用に適している。

10

抗体を標識する代わりに、抗原を生物学的流体において検出可能な物質を含む競合標識抗原標準と非標識抗体とを利用する競合イムノアッセイによってアッセイしてもよい。このアッセイでは、生物学的サンプル、標識抗原標準および抗体を結合させ、非標識抗体と結合した標識抗原標準の量を求める。生物学的サンプル中の試験した抗原の量は抗体と結合した標識抗原標準の量と反比例する。

20

【0067】

ある態様では、本発明の非グリコシル化された全長抗体はインビトロまたはインビボで特定の表面抗原発現を検出およびプロファイルするのに特に有用である。前記で論じたように、非グリコシル化された全長抗体はエフェクター機能（すなわち、ADCCまたはCDC活性）を発揮しない。従って、抗体が細胞表面抗原と結合する場合に、望ましくない細胞障害性現象を惹起しない。表面抗原は特定の細胞または組織種に特異的である場合があり、従って、細胞または組織種のマーカーとなる。表面抗原マーカーは特定の細胞または組織種の種々の分化ステージで異なって発現されるのが好ましい。従って、かかる表面抗原に対して向けられる全長抗体をマーカーを発現する細胞または組織集団のスクリーニングのために用いてもよい。例えば、本発明の抗体を用いて胚幹細胞、造血幹細胞および間葉幹細胞などの幹細胞をスクリーニングおよび単離してもよい。また、本発明の抗体を用いてHER2、HER3またはHER4受容体などの腫瘍関連表面抗原を発現する腫瘍細胞を検出してもよい。

30

【0068】

本発明の全長抗体をアフィニティー精製剤として用いてもよい。このプロセスでは、当技術分野で十分に知られている方法を用いて全長抗体をセファデックス樹脂またはフィルターペーパーなどの固相に固定化する。固定化抗体を精製される抗原を含有するサンプルと接触させ、その後支持体を、固定化全長抗体と結合している精製される抗原を除いてサンプル中の実質的にすべての物質を除去する好適な溶媒で洗浄する。最後に、支持体を抗原を全長抗体から放出するグリシン緩衝液、pH 5.0などの別の好適な溶媒で洗浄する。

40

本発明の抗体をアンタゴニストとして用いてインビトロおよびインビボの双方で特定の抗原活性を部分的にまたは完全にブロックしてもよい。さらに、本発明の少なくともいくつかの抗体は他の種由来の抗原活性を中和できる。従って、本発明の抗体を用いて例えば、抗原を含有する細胞培養物において、本発明の抗体と交差反応する抗原を有するヒト被験者においてまたは他の哺乳類被験体（例えば、チンパンジー、ヒヒ、マモセット、カンクイザルおよびアカゲザル、ブタまたはマウス）において特定の抗原活性を阻害することができる。ある実施形態では、本発明の抗体を、抗体を抗原と接触させ、その結果抗原活性が阻害されることによって抗原活性を阻害するために使用してもよい。好ましくは抗原はヒトタンパク質分子である。

50

【0069】

もう1つの実施形態では、本発明の抗体を抗原活性が有害である疾患を患う被験体において抗原を阻害する方法に使用してもよく、これは被験体に本発明の抗体を投与し、その結果被験体において抗原活性が阻害されることを含んでなる。好ましくは、抗原はヒトタンパク質分子であり、かつ、被験体はヒト被験者である。あるいは、被験体は本発明の抗体と結合する抗原を発現する哺乳類であってもよい。なおさらに、被験体は抗原が導入されている（例えば、抗原の投与によって、または抗原導入遺伝子の発現によって）哺乳類であってもよい。本発明の抗体は治療目的でヒト被験者に投与してもよい。さらに、本発明の抗体は獣医学的目的でまたはヒト疾病の動物モデルとして抗体と交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳類（例えば、霊長類、ブタまたはマウス）に投与してもよい。後者に
10
関しては、かかる動物モデルは本発明の抗体の治療有効性を評価するのに（例えば、投与の用量および経時変化を調べるのに）有用であり得る。治療上有用である本発明のブロッキング抗体としては、例えば、限定されるものではないが、抗VEGF、抗IgE、抗CD11および抗組織因子抗体がある。本発明の抗体を1種以上の抗原分子の異常発現およびまたは活性と関連する疾病、疾患または症状を診断、治療、阻害または予防するために用いてもよく、これには、限定されるものではないが、悪性および良性腫瘍；非白血病性およびリンパ性悪性腫瘍；神経細胞、グリア、アストロサイト、視床下部およびその他の腺性、マクロファージ、上皮、間質および胞胚腔の疾患；および炎症性、血管原性および免疫疾患が挙げられる。

【0070】

ある態様では、本発明のブロッキング抗体はリガンド抗原に特異的であり、リガンド抗原が関与するリガンド-受容体相互作用をブロッキングするか、または干渉することで抗原活性を阻害し、それによって対応するシグナル経路およびその他の分子または細胞事象を阻害する。本発明はまた必ずしもリガンド結合を妨げないが受容体活性化に干渉し、それによって通常リガンド結合によって惹起される応答をいずれも阻害する受容体特異的抗体を特色とする。本発明はまた好んで、またはもっぱらリガンド受容体複合体と結合する抗体を包含する。本発明の抗体はまた特定の抗原受容体のアゴニストとして作用し得、それによってリガンド介在性受容体活性化のすべてまたは一部の活性のいずれかを増強、強化または賦活化する。
20

【0071】

ある実施態様では、細胞障害剤に結合させた抗体を含んでなる免疫複合体が患者に投与される。好ましくは、それが結合する抗原及び／又は免疫複合体は細胞によって内部移行され、それが結合する標的細胞を殺す免疫複合体の治療効果を増加させる。好適な実施態様では、細胞障害剤は標的細胞中の核酸を標的とし又はこれを妨害する。そのような細胞障害剤の例には、ここに記載した化学療法剤（例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン）の任意のもの、放射性同位元素、又はリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。
30

本発明の抗体は、単独で又は他の治療用組成物と組み合わせて使用することができる。例えば、抗体は、別の抗体、化学療法剤（群）（化学療法剤のカクテルを含む）、他の細胞障害剤（群）、抗血管形成剤（群）、サイトカイン、及び／又は成長阻害剤（群）と共に同時投与されうる。全長抗体が腫瘍成長を阻害する場合、腫瘍成長もまた阻害する一又は複数の他の治療剤（群）と全長抗体を組み合わせることが特に望ましいであろう。例えば、転移性乳癌の治療において、VEGF活性を阻害する抗VEGF抗体は、抗Erbb2抗体（例えばHERCEPTIN（登録商標）抗HER2抗体）と組み合わせることができる。別法として、又は付加的に、患者は併用放射線療法（例えば外的ビーム照射あるいは抗体のような放射標識剤での治療法）を受けてもよい。上に言及したそのような併用療法には併用投与（2又はそれ以上の薬剤が同一の又は別の製剤中に含まれる）、及び別個の投与が含まれ、後者の場合は、全長抗体の投与が補助療法又は療法群の投与の前、及び／又はそれに続いて行われ得る。
40

【0072】

全長抗体（及び補助治療薬）は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内、並びに局所的な治療が所望される場合には病巣内投与を含む、適切なあらゆる方法によって投与される。非経口注入は、筋肉内、静脈内、関節内、腹腔内、又は皮下投与を含む。更に、全長抗体は、パルス注入によって特に減少した用量の抗体で適切に投与される。好ましくは、投薬は注射、より好ましくは静脈内又は皮下注射によって、投与が短期的か長期的かにも部分的に依存してなされる。

本発明の全長抗体組成物が処方され、用量決定(dose)され、良好な医学的実務に適合する方式で投与される。ここで考慮すべき因子には、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与計画、及び医学実務者に知られている他の因子が含まれる。全長抗体は、問題の疾患の予防又は治療に現在使用されている一又は複数の他の薬剤と共に製剤する必要はないが、場合によってはそのようにされる。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する全長抗体の量、疾患又は治療のタイプ、及び上述した他の因子に依存する。これらは、一般にはこれまでに使用されているのと同じ用量と投与経路で、あるいはこれまでに使用された用量の約1から99%で用いられる。

【0073】

疾患の予防又は治療に対して、（単独で又は化学療法剤等の他の薬剤と組み合わせて使用される場合の）全長抗体の適切な用量は、治療すべき疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重篤さ及び経路、全長抗体の投与が予防目的か治療目的か、過去の治療、患者の臨床履歴及び全長抗体に対する反応、及び担当医師の裁量に依存する。全長抗体は、一時に又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプと重篤さに応じて、約1 μ g/kgから15mg/kg（例えば、0.1mg/kg－10mg/kg）の全長抗体が、例えば一又は複数の別々の投与であろうと、あるいは連続注入によるものでであろうと、患者への初期候補投与量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に依存し、約1 μ g/kgから100mg/kg又はそれ以上の範囲でありうる。数日間又はそれ以上にわたる繰り返し投与の場合は、状態に応じて、疾患徴候の望ましい抑制が起こるまで治療を続ける。抗体の好適な投与量は、約0.05mg/kgから約10mg/kgの範囲でありうる。従って、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg又は10mg/kgの一以上の用量（又はその任意の組合せ）が患者に投与されうる。このような用量は間欠的に、例えば毎週又は3週間毎に投与されうる（例えば、患者は約2～約20、例えば約6用量の抗体を受ける）。初回の高負荷投与量に続いて1回以上の低用量が投与されてもよい。例示的な投与計画は、約4mg/kgの初回負荷投与量に続いて毎週の約2mg/kgの抗体の維持用量を投与することを含む。しかし、他の用量計画も有用でありうる。この療法の進行は、常套的な技術及びアッセイで容易に監視される。

【0074】

製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器の又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、症状を治療するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内溶液バッグでありうる）。組成物中の少なくとも一つの活性剤は全長抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌のような選択した症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、（a）組成物の中に収容し、その組成物が全長抗体を含む第1の容器と；（b）組成物の中に収容し、その組成物が更なる細胞障害剤を含む第2の容器とを含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、第1及び第2抗体組成物を癌の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含む。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第2の（又は第3の）容器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジを含む、商業上及び使

用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例 1】

【0075】

発現ベクターの構築

組織因子に特異的な抗体（抗TF抗体）および血管内皮細胞増殖因子に特異的な抗体（抗VEGF抗体）の発現のために種々の発現ベクターを作製した。各ベクター構築物のために、発現カセットを大腸菌プラスミドpBR322のフレームワークにEcoRI部位でクローニングした。Sutcliffe (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90。各発現カセットは少なくとも以下の構成要素を含む：（1）転写制御のためのphoAプロモーター；（2）翻訳開始のための、大腸菌trp由来のシャイン-ダルガーノ配列または熱安定性エンテロトキシンII（STII）遺伝子、または双方の組み合わせ；および（3）転写を終結させるλt₀ターミネーター。細菌の発現カセットの基本的構成要素は当技術分野で周知であり、例えば、菊池ら, Nucleic Acids Res. 9 (21):5671-5678 (1981)（phoAプロモーターについて）；Scholtissek及びGrosse, Nucleic Acids Res. 15:3185 (1987)（λt₀ターミネーターについて）；Yanofsky等, Nucleic Acids Res. 9:6647-6668 (1981)（trpについて）；Picken等, Infect. Immun. 42:269-275 (1983)（STIIについて）；Chang等, Gene 55:189-196 (1987)（trpとSTIIシャイン-ダルガーノ配列の併用について）に記載されている。さらに、STIIシグナル配列またはそのサイレントコドン変異体が軽鎖または重鎖のコード配列の前にあり、ポリペプチドのペリプラズムへの分泌に向かわせる。Picken等, Infect. Immun. 42:269-275 (1983)；Simmons及びYansura, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996)。

【0076】

ポリシストロン性ベクター

本発明の個別シストロン系の増強された特性を例示するために、比較のために全長抗体のためのいくつかのポリシストロン性ベクターを構築した。ポリシストロン性ベクターでは、軽鎖および重鎖遺伝子のための2個のシストロンは単一のPhoAプロモーターの転写制御下にある。

抗TF抗体発現のための最初のポリシストロン性ベクター、pXTFPVはこれまでに公開されているベクター、pAK19（これは抗体断片Fab'発現のためのものであった）の発現カセットを用いて構築した。Carter等(1992) Bio/Technology 10:12-16。本来のpAK19の構造および全長形pXTFPVの構成が図1に示されている。発現カセットは5'から3'末端に、PhoAプロモーター、軽鎖のシストロン、重鎖のシストロンおよび転写ターミネーターλt₀を含む。

軽鎖停止コドンと重鎖の前のSTIIシグナル配列の先頭の間の距離は81塩基対である。ポリシストロン性抗VEGFベクターを構築するために、抗VEGF軽鎖および重鎖のコード配列をpXTFPV中の抗TF軽鎖および重鎖のコード配列と置換した。抗VEGF発現カセットをPhoAプロモーターの～50bpのHindIII断片上流を欠失させることでさらに改変し、重鎖シャイン-ダルガーノ配列の非翻訳領域上流でいくつかのヌクレオチド変更も行った。得られた抗VEGFのためのポリシストロン性ベクターはpY0317。Fab-CH3と名づけた。

いくつかのさらなるポリシストロン性抗TF構築物、pATF20、pATF30、pATF40、pATF90、pATF110、pATF100、pATF120を同様に作製した。これらのポリシストロン性プラスミドの発現カセット配列はpXTFPVのものとは主として5'非翻訳領域および重鎖の分泌シグナル配列の前の領域において異なる。さらに、構築物によっては、pXTFPVといくつかのさらなるポリシストロン性プラスミドの間にはSTIIシグナル配列にサイレントコドンの相違も存在する。Simmons及びYansura, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996)。

【0077】

個別シストロンベクター

本発明を実施するために、個別シストロンを含むベクターを免疫グロブリン軽鎖および重鎖遺伝子の独立した発現を提供するように設計した。かかるベクターでは、各鎖のシストロン単位はそれ自身のPhoAプロモーターの制御下にあり、 λ t₀ターミネーターが続く。さらに、各シストロン単位は軽鎖または重鎖のコード配列のTIR上流を含んでなる。個別シストロンベクターの構成は図7に示されている。発現カセットは5'から3'に第1のPhoAプロモーター、次いで軽鎖のシストロン(TIR-L+軽鎖)および第1の λ t₀ターミネーター、ならびに第2のPhoAプロモーター、次いで重鎖のシストロン(TIR-H+重鎖)および第2の λ t₀ターミネーターを含んでなる。TIR-LおよびTIR-Hの双方ともそれにさらにSTII分泌シグナル配列またはその変異体を含む。pATF50の(抗TF用; 配列番号1)およびpXVG2AP11の(抗VEGF用; 配列番号2)発現カセット配列がそれぞれ図20および21に示されている。抗TF用のさらなる個別シストロンベクター、pATF70、pATF60、pATF80、pATF130、pATF140、およびpXTF2AP77は軽鎖および重鎖翻訳についてのTIR強度の種々の組み合わせを表し、前記のようにpATF50とはSTIIシグナル配列におけるサイレントコドン変更に関して異なっている。Simmons及びYansura, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996)。

【実施例2】

【0078】

ポリシストロン性ベクターを用いる全長抗体の大腸菌発現

まず、全長抗体を公開されているベクター、pAK19から誘導したポリシストロン性ベクターを用いて実施例1に記載の方法に従って大腸菌で作製した。まず、小スケール誘導を行って種々の構築物を用いて得られた発現レベルを評価および比較した。

材料および方法

各構築物の小スケール発現には、大腸菌株33D3(W3110・fhuA(・tonA)ptr3 lac Iq lacL8・ompT・(nmpc-fepE)degP41kan^R)を宿主細胞として用いた。形質転換後、選抜した形質転換体ピックアップをカルベニシリン(50ug/ml)を添加した5mlのルリアーベルタニ培地に播種し、30℃にて培養ホイール上で一晚増殖させた。次いで、各培養物をC.R.A.Pリン酸制限培地(pHをKOHで7.3に調節し、qsをSQ H₂Oで872mlとしてオートクレーブし; 55℃まで冷却し、110mlの1M MOPS pH7.3、11mlの50%グルコース、7mlの1M MgSO₄を添加した、3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07gのKCl、5.36gの酵母抽出物(食用)、5.36gのHycaseSF Sheffield)に希釈した(1:50または1:100)。次いで、培養物を誘導するためにカルベニシリンを50ug/mlの濃度で加え、この培養物を培養ホイール上で30℃にて約24時間増殖させた。特に断りのない限り、すべての振盪フラスコ誘導は2mlの容量で実施した。

【0079】

誘導した培養物から非還元全細胞溶解物を以下のように調製した：(1)1OD₆₀₀ mlのペレットをマイクロチューブ中で遠心分離し；(2)各ペレットを90ulのTE(10mM Tris pH7.6、1mM EDTA)に再懸濁し；(3)各サンプルに10ulの100mMヨード酢酸(シグマ I-2512)を加えていずれかの遊離システインをブロックしてジスルフィド入れ替えを防ぎ；(4)各サンプルに20ulの10% SDSを加えた。このサンプルにボルテックス処理し、~3分間の間約90℃まで加熱し、次いで再度ボルテックス処理した。このサンプルを室温まで冷却した後、~750~1000ulのアセトンを加えてタンパク質を沈殿させた。このサンプルをボルテックス処理して約15分間室温まで静置した。マイクロチューブ中で5分間遠心分離した後、各サンプルの上清を吸引除去して各タンパク質ペレットを50ulのdH₂O+50ulの2Xノベックス(NOVEX)サンプルバッファーに再懸濁した。次いで、このサンプルを約90

10

20

30

40

50

℃で～3～5分間加熱し、十分にボルテックス処理して室温まで放冷した。次いで、最後に5分間遠心分離を行って上清を無菌チューブに移した。

工程(2)で細胞再懸濁溶液に10 μ lの1M DTTを加え、かつ、工程(3)でIAAの添加を省略した以外は非還元サンプルのための前記のものと同様の以下の工程によって還元サンプルを調製した。タンパク質沈殿を2Xサンプルバッファー+dH₂Oに再懸濁するときに還元剤も100mMの濃度まで加えた。

調製後、各サンプルの5～10 μ lを10ウェル、1.0mmノベックス(NOVEX)製12%Tris-グリシンSDS-PAGEに乗せて～120ボルトで1.5～2時間電気泳動した。次いで、得られたゲルをクーマシーブルーで染色するか、またはウェスタンブロット解析に用いるのいずれかとした。

【0080】

ウェスタンブロット解析のためには、SDS-PAGEゲルをニトロセルロース膜(ノベックス(NOVEX))にエレクトロブロットした。次いで、この膜を1X NET(150mM NaCl、5mM EDTA、50mM Tris pH7.4、0.05% Triton X-100)+0.5%ゼラチンの溶液を用いて室温で振盪しながら約30分～1時間ブロッキングした。ブロッキング工程後、膜を1X NET+0.5%ゼラチン+抗Fab抗体の溶液(ヒトIgG Fabに対するペルオキシダーゼ結合ヤギIgG画分;CAPPEL#55223)の中に入れた。抗体のロットによって抗Fab抗体希釈液は1:50, 000ないし1:1, 000, 000とした。膜を室温で振盪しながら一晩抗体溶液に入れた。翌朝、膜を1X NET+0.5%ゼラチンで最低3×10分、次いでTBS(20mM Tris pH7.5、500mM NaCl)で1×15分洗浄した。抗Fab抗体によって結合されたタンパク質バンドをアマシャム・ファルマシア・バイオテック・イーシーエル(Amerxham Pharmacia Biotech ECL)検出を用い、膜をX線フィルムに曝露することによって可視化した。

発現されたタンパク質バンドのいくつかをさらにN末端配列解析に付し、これではSDS-PAGE電気泳動後に誘導培養物由来のサンプルをPVDF膜にエレクトロブロットした(松平, J. Bio. Chem. 262: p. 10035-10038 (1987))。適当なPVDFバンドを140Cまたは140DオンラインPTHアナライザーを備えたアプライド・バイオシステム(Applied Biosystems)(フォスターシティ、カリフォルニア)494HTまたは494cLCシーケンサーで配列決定した(Henzel等, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 6:239-247 (1994))。

【0081】

結果

ポリシストロン性ベクターは限られた量の全長抗体しか産生しなかった

抗TF抗体(pXTFPV)および抗VEGF抗体(pY0317. Fab-CH3)のためのポリシストロン性プラスミドを構築し、33D3株に形質転換し、実施例1および前記の方法および材料に記載のように誘導した。次いで、非還元全細胞溶解物サンプルを調製してウェスタンブロットによって解析した。結果が図2に示されている。矢印が示すように、抗TF抗体については少量の明らかに全長の、正しく折りたたまれた抗体が認められ(レーン2)、抗VEGF抗体サンプルでは全長バンドは実質的に検出されなかった(レーン3)。次いで、還元サンプルを調製し、SDS-PAGEによって分離し、PVDF膜にトランスファーした。次いで、抗TFおよび抗VEGF抗体双方について誘導したタンパク質バンドを切り出し、N末端アミノ酸解析に付した。結果は両構築物について最大のプロセッシングされた成熟タンパク質およびプロセッシングされていない前駆体タンパク質(これでは分泌シグナル配列が切断されていない)を示した。従って、ポリシストロン性ベクターpXTFPVおよびpY0317. Fab-CH3は全長抗TFまたは抗VEGF抗体の相当な分泌および構成に向かわせることはできなかった。

効率の悪い分泌という問題を解決するために、図3に示されるように軽鎖および重鎖のTIR強度組み合わせを調節したさらなるポリシストロン性ベクターを作製した。本実験の目的は軽鎖および重鎖のよりよい分泌を達成する翻訳レベルを決定することであった。

T I R強度の種々の組み合わせを用いて全長抗体の最大蓄積のための軽鎖と重鎖の好ましい発現比を決定することもできよう。すべての構築物は実施例1の技術に従って設計し構築した。種々のT I R強度組み合わせの以下の構築物を構築した：p a T F 2 0（1－軽鎖、1－重鎖）、p a T F 3 0（3－軽、1－重）、p a T F 4 0（1－軽、3－重）、p a T F 9 0（3－軽、3－重）、p a T F 1 0 0（3－軽、7－重）、p a T F 1 1 0（7－軽、3－重）、p a T F 1 2 0（7－軽、7－重）。括弧内の数はSimmons等, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996)、および米国特許第5,840,523号に記載のように軽鎖および重鎖のT I R相対強度を表す。

【0082】

種々のT I R強度組み合わせのポリシストロン性ベクターを用いる発現産物のウェスタンブロット結果が図4に示されている。4Aは還元条件下のサンプルを示し、これでは軽鎖と重鎖は分離している。および4Bは非還元条件下のサンプルを示し、これではジスルフィド結合は完全に残存している。還元サンプルは、この抗F a b抗体を用いて軽鎖は重鎖よりもより容易に検出できるという事実を考慮しても、すべてのT I R強度組み合わせで重鎖に優る大量の過剰な軽鎖を明らかに示す（図4A）。最も高いT I R強度組み合わせ（p a T F 1 2 0（7－軽、7－重））では、少量のプロセッシングされていない軽鎖が蓄積しはじめ、このことは分泌がブロックされているということを示す。非還元ウェスタンブロットは全長抗体といくつかの中間型の蓄積を示す（図4B）。最大レベルの全長抗体はp a T F 4 0（1－軽、3－重）で、次いでp a T F 1 0 0（3－軽、7－重）達成される。図4Aに示されるように、これらの構築物は双方とも重鎖発現に対して相対的に低い比率の軽鎖を含み、このことは折りたたまれた全長抗体レベルは軽鎖と重鎖の相対発現レベルと相関があるということを示す。

【実施例3】

【0083】

個別シストロンベクターを用いる全長抗体の大腸菌発現

T I R強度組み合わせを調節した個別シストロンベクターを構築するために、まず軽鎖または重鎖のみを発現させるために構築した一連の単一シストロンプラスミドで個々の鎖各々の分泌のための好ましいT I R強度を求めた（図5）。従って、抗T F軽鎖および重鎖双方の個々の発現のための種々のT I Rを含む一連の単一シストロンプラスミドを構築した。ベクター構築およびタンパク質発現に用いた方法および材料はポリシストロン性ベクター発現に用いたものと同様であり、これは前記の実施例1および2に記載されている。

調べたT I R強度の範囲は1の相対強度から13の最大相対強度に及んだ。このように構築したプラスミドで形質転換し誘導した培養物由来の還元全細胞溶解物をS D S－P A G Eによって解析し、その結果が図6に示されている。重鎖および軽鎖の双方について、T I Rを7の相対強度まで増加させるにつれ分泌タンパク質レベルが上昇する。次いで重鎖の場合には、T I R相対強度が13まで上がると成熟タンパク質レベルが低下する。軽鎖発現に13のT I R相対強度を用いる場合には、成熟タンパク質レベルは一定のままであるが、この構築物を用いると前駆体物質が蓄積し始める。この結果は軽鎖および重鎖の個々の発現について、最も好ましいのT I Rは7であるということを示唆した。7のT I Rを用いて産生される軽鎖および重鎖タンパク質バンドをN末端アミノ酸解析によって完全にプロセッシングされた成熟型のタンパク質であることを確認した。

【0084】

個々の抗体鎖各々について最も好ましいT I Rを決定したら、次の工程は2個のシストロンを1つのプラスミド上で1つにまとめることに関する。7のT I Rの2個の構築物を各遺伝子の発現がそれ自身のP h o Aプロモーターの制御下に維持されるよう結合した（図7）。形質転換および誘導後、この発現プラスミド（p x T F 2 A P 7 7）から還元全細胞溶解物を調製しS D S－P A G Eによって解析した（図8）。クーマシーブルー染色によって4種の抗体関連バンドが検出された。次いで、これらのタンパク質バンドをN末端アミノ酸解析によって重鎖および軽鎖双方の前駆体および成熟型であることを決定した

。従って、個々の鎖各々について好ましいT I R強度が決定されていたが、個別のプロモーターの制御下に維持される2個のシストロンを単一構築物上で結合した場合には、両鎖の同時協調発現は効率の悪いタンパク質分泌をもたらした。この結果は最も好ましいT I R組み合わせは個別シストロン構築物との関連において軽鎖および重鎖の個々のT I Rを同時に変更することで求めるべきであるということを示唆した。

【0085】

一連の新規構築物を作製して個別シストロン系との関連において軽鎖および重鎖のT I R強度組み合わせを求めた。図9に示されるT I R系列はポリシストロン性系列のものと似ており、p a T F 5 0 (1-軽、1-重)、p a T F 7 0 (3-軽、1-重)、p a T F 6 0 (1-軽、3-重)、p a T F 8 0 (3-軽、3-重)、p a T F 1 3 0 (7-軽、3-重)、p a T F 1 4 0 (3-軽、7-重)、およびp x T F 2 A P 7 7 (7-軽、7-重)を含む。すべての発現誘導(2mL)は33D3株で同時に実施した。SDS-PAGE分離のためにサンプルを回収し、ウェスタンブロット結果が図10に示されている。還元サンプル(図10A)はポリシストロン性ベクターから得た結果と比べ、軽鎖および重鎖のより一層の分布を示す。p a T F 8 0 (3-軽、3-重)およびp a T F 1 4 0 (3-軽、7-重)を用いると小レベルの軽鎖前駆体が蓄積し、一方、p a T F 1 3 0 (7-軽、3-重)およびp x T F 2 A P 7 7 (7-軽、7-重)については相当量の軽鎖および重鎖前駆体が認められる。非還元サンプルは種々のレベルの全長抗体と中間体種を示す(図10B)。全長抗体の最大の蓄積はp a T F 5 0 (1-軽、1-重)で起こり、翻訳レベルはp a T F 8 0 (3-軽、3-重)まで徐々に上昇するので、中間体種レベルは大幅に上昇する。多量のプロセッシングされていない軽鎖および重鎖を含む2種の構築物(p a T F 1 3 0およびp x T F 2 A P 7 7)は全長抗体ならびに中間体種レベルの著しい低下を示す。従って、この結果は抗T F全長抗体について最も好ましいT I R組み合わせはプラスミドp a T F 5 0で表される(1-軽、1-重)であるということを示唆した。

【0086】

次いで、個別シストロン系による高産生量の全長抗体をさらに例示するために、ポリシストロン性構築物(p a T F 2 0 (1-軽、1-重)、p a T F 3 0 (3-軽、1-重)およびp a T F 4 0 (1-軽、3-重))および個別シストロン構築物(p a T F 5 0 (1-重、1-軽)、p a T F 6 0 (1-軽、3-重)、p a T F 7 0 (3-軽、1-重)およびp a T F 8 0 (3-軽、3-重))を用いる発現を同時に比較した。非還元サンプルは個別シストロン系を用いる全長抗体および中間体種のより高い産生レベルを明らかに示す(図11)。ゲルで示されるように、最良のポリシストロン性構築物、p a T F 4 0 (1-軽、3-重)は示される個別シストロン構築物の各々よりもさらに劣る。

p A K 1 9から誘導したポリシストロン性プラスミドと個別シストロンプラスミド間の同様の比較により大腸菌における全長抗体の発現のためのこの新規技術の利点がさらに示される。解析には抗組織因子および抗V E G F抗体双方のための発現プラスミドを含めた。抗組織因子の発現に関しては、ポリシストロン性プラスミドp x T F P Vおよび個別シストロンプラスミドp a T F 5 0 (1-軽、1-重)を33D3株に形質転換し、リン酸制限培地で誘導した。非還元サンプルを調製し(I A A処理)、クーマシー染色SDS-PAGEによって解析した(図12)。検出法としてクーマシーブルー染色のみを用いて、個別シストロンサンプルから誘導された全長抗体タンパク質バンドが認められた(レーン3)。次いで、N末端アミノ酸解析によってこのタンパク質バンドが予想通り抗組織因子軽鎖および重鎖の双方を含むと決定した。かかるタンパク質バンドはポリシストロン性プラスミドを用いるクーマシー染色では明らかでない(レーン2)。またサンプルをポリクローナルヤギ抗ヒトF a b抗体を用いるウェスタンブロットによって解析した(図13)。この高感度検出法を適用することにより、ポリシストロン性プラスミドを用いて少量の全長抗体が認められる(レーン2)が、個別シストロンプラスミドを用いると発現レベルは著しく上昇する(レーン3)。

【0087】

ポリシストロン性ベクター (pY0317, Fab-CH3) および個別シストロンベクター、pXVG2AP11 (1-軽、1-重) を用いる抗VEGF抗体の発現を含んでなる同様の実験も実施した。プラスミドを33D3株に形質転換し、リン酸制限培地で誘導した。非還元サンプルを調製し (IAA処理)、ポリクローマルヤギ抗ヒトFab抗体を用いるウェスタンブロットによって解析した (図14)。ポリシストロン性ベクターを用いると、全長抗体は実質的に全く明らかでなかった。サンプルの多くは分離しておらずスミアなもの (レーン2)、極めて高い過剰な軽鎖発現を相関していると思われるパターンとして現れる。対照的に、個別シストロン系を用いる場合には、分離した全長抗体タンパク質バンドが認められる (矢印; レーン3)。このように、全長抗VEGFの発現については、本発明の個別シストロンベクターにより実質的に検出可能でない全長抗体からウェスタンブロットによって容易に検出可能であるレベルまで発現レベルが上がる。

10

【実施例4】

【0088】

大腸菌で発現される全長抗体の大規模生産 (培養) 及び精製

また、全長抗TF及び抗VEGF抗体を、培養工程を利用して大規模に生産した。これらの培養に使用される生物は: 59A7 W3110 ΔfhuA (ΔtonA) phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC degP41 kan^S ilvG⁺ Δ prc::kanR prc suppressor; 43H1 W3110 ΔfhuA (ΔtonA) phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ptr3 degP41 kan^S ΔompTΔ(nmpc-fepE) ilvG⁺ prc::kanR prc suppressor; 33D3 W3110 ·fhuA (·tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ·ompT·(nmpc-fepE) degP41 kan^R; and 58H7 W3110 ΔfhuA (ΔtonA) Δ ptr3 ΔompT ΔdegP lac Iq ΔlacYを含む。

20

各10リットル培養のために、0.5mLの凍結保存培養物 (10-15%のDMSOを含む) を解凍し、0.5mLのテトラサイクリン溶液 (5mg/mL) または10mLのアmpiシリン溶液 (2mg/mL) のいずれかと2.5mLの1Mリン酸ナトリウム溶液とを添加した500mLのLB培地を含む2Lの振盪フラスコに播種するのに用いた。この種培養物を30℃にて振盪しながら約16時間増殖させ、次いで、10リットル培養層に播種するのに用いた。

【0089】

培養層に最初に約7.0リットルの1.1gのグルコース、100mLの1M硫酸マグネシウム、10mLの微量元素溶液 (1リットルの最終容量において、100mLの塩酸、27gの塩化第二鉄六水和物、8gの硫酸亜鉛七水和物、7gの塩化コバルト六水和物、7gのモリブデン酸ナトリウム二水和物、8gの硫酸銅五水和物、2gのホウ酸、5gの硫酸マンガン一水和物)、20mLのテトラサイクリン溶液 (エタノール中の5mg/mL) または250mLのアmpiシリン溶液 (2mg/mL) のいずれか、1バッグのHCD塩 (37.5gの硫酸アンモニウム、19.5gのリン酸水素二カリウム、9.75gのリン酸二水素ナトリウム二水和物、7.5gのクエン酸ナトリウム二和物、11.3gのリン酸二水素カリウム)、200gのNZアミンA (タンパク質加水分解物) および100gの酵母抽出物を含有する培地を入れた。30℃にて20slpmで通気しながら培養を実施し、7.0±0.2のpHで制御した (ただし、この範囲を超える逸脱が時折起こることもある)。培養層の背圧は1棒ゲージで維持し、振盪速度は650rpmに設定した。培養槽の背圧および振盪速度は培養槽内の酸素移動速度を操作し、結果的に細胞の呼吸速度を制御するために変更してよい。

30

40

【0090】

培養槽に振盪フラスコから細胞含有培地を播種した後、コンピューターを使ったアルゴリズムを用いて濃縮グルコール溶液を培養槽に加え培養槽内で培養物を高細胞密度まで増殖させた。pHを制御する必要に応じて、水酸化アンモニウム (58%溶液) および硫酸 (24%溶液) も培養槽に加えた。起泡を制御する場合にはL-61 (消泡剤-他のものを用いてもよい) も添加した。培養物が約40OD550の細胞密度に達した時点で、培養槽にさらに100mLの1M硫酸マグネシウムを加えた。さらに、培養物が約20OD550に達した時点で濃縮塩飼料 (最終容量1250mL中の12.5gの硫酸アンモニ

50

ウム、32.5 gのリン酸水素二カリウム、16.25 gのリン酸二水素ナトリウム二水和物、2.5 gのクエン酸ナトリウム二水和物、18.75 gのリン酸二水素カリウム、10 mlの2.7%塩化第二鉄および10 mlの微量元素)を培養槽に2.5 ml/分の速度で添加しはじめ、約1250 mlを培養に添加するまで継続した。典型的には培養は70-80時間継続した。培養の間、培養槽の溶存酸素設定値に達したら、溶存酸素濃度を設定値に制御するために溶存酸素プローブシグナルに基づいて濃縮グルコース溶液を加えた。結果として、この制御計画では、培養槽中の酸素移動能に影響を及ぼす振盪速度または背圧などの培養槽操作パラメーターの操作が相応して細胞の酸素取り込み速度または代謝速度も操作した。質量分析計を用いて培養からの排気の組成をモニターしたが、これにより培養における酸素取り込みおよび二酸化炭素発生速度の算出が可能となる。

10

【0091】

非還元可溶性サンプルを以下のように調製した：凍結させた、培養の経過の間に採取した1 mLの全ブロスサンプルを室温で解凍した。100 μ Lの解凍全ブロスを500 μ Lの抽出バッファーに加えた。(抽出バッファー：10 mM Tris、pH 6.8、5 mM EDTA、加えたての0.2 mg/mLの鶏卵リゾチームおよび5-10 mMの最終濃度に調製したてのヨード酢酸。)全ブロスサンプルおよび抽出バッファーを氷上で5-10分間インキュベートし、次いで、 2×10 パルス超音波処理し、次いで、4°Cおよび14,000 rpmで15-20分間遠心分離した。上清を可溶性画分として回収した。SDS-PAGEおよびイムノブロットによる解析のために、可溶性画分を還元剤を含まない2Xノベックス・トリシン(Novex Tricine)サンプルバッファーに1:4希釈した。10 μ Lのこの調製物を15ウェルノベックス(Novex)4-12%ビストリスヌページ(Bis-Tris NuPage)ゲルに乗せMOPSバッファーを用いて200 Vで電気泳動した。次いで、ゲルをイムノブロットまたはクーマシーブルーでの染色のいずれかに用いた。

20

可溶性画分のサンプルをAME5-RPアッセイによる解析に付した。このアッセイは第1カラムが軽鎖を捕捉する親和性カラムであり、かつ、第2カラムが逆相カラムであるデュアルカラムHPLCアッセイである。デュアルカラム形式には一体ワークステーションが組み込まれていた。溶媒リザーバーは溶媒1A、アフィニティーローディングバッファー；溶媒1B、逆相水性バッファーおよびアフィニティー溶出バッファー、水中の0.1% TFA；溶媒2A、水；溶媒2B、逆相有機溶出バッファー、0.09% TFA/80%アセトニトリルである。第1カラムは制御された孔を含むガラス上に固定化された固定化抗軽鎖(カップ)Fab抗体(AMES)を含むアフィニティーカラム(30 $\times$ 2.1 mm)であった。アフィニティーカラムに関するすべての手順は周囲温度で実施した。第2のカラムはポリマーベースのPOROS R220充填剤を含む逆相カラム(30 $\times$ 2.1 mm)であった。逆相カラム温度は60°Cに維持した。

30

【0092】

アフィニティーカラムは30%ローディングバッファー(5 ml)で平衡化し、50 μ Lのサンプルを0.1 ml/分の流速でロードした。フロースルーは廃棄した。サンプルをロードした後、非特異的に結合した成分を減少させるためにアフィニティーカラムを30%ローディングバッファー(2 ml)、次いで100%ローディングバッファー(5 ml)で洗浄した。最後に水で洗浄してアフィニティーカラムを溶出用に準備した(3 ml)。ここで、アフィニティーカラムを逆相カラムに接続し(バルブを切り換えることで)2 ml/分の流速で溶出バッファー(2 ml)で溶出してアフィニティー捕捉された成分を逆相カラムに移動させた。この移動工程の間に一体UV検出器をアフィニティーカラムの後で、かつ、逆相カラムの前に設置し、このようにしてアフィニティーカラムの溶出(これが逆相カラムへの添加物となる)をモニターする。この検出器の他に、第2の検出器を逆相カラムの後ろに加えてそのフロースルーをモニターしてアフィニティーカラムから溶出されたすべての成分が逆相カラムによって実際に捕捉されたことを確認した。

40

次いで、逆相カラムへの接続を解除した後ローディングバッファー(4 ml)でアフィニティーカラムの再平衡化を実施した。

ロードした逆相カラムは0.1% TFA水溶液(2 ml)で洗浄した。流速は1 ml/

50

分に設定し、迅速グラジエント（１分）を３５％の溶媒２Ｂ（０．１％ＴＦＡ／８０％アセトニトリル）まで、次いで、緩降下グラジエントを１４分にわたって５０％溶媒２Ｂまで実施した。溶出は４分にわたる９０％溶媒２Ｂまでのグラジエントで完了する。次いで、１分にわたって逆相カラムを初期状態に戻し、２ｍｌ／分で３分間再平衡化した。カラム溶出液は２８０および２１４ｎｍでモニターした。定量は積分したピーク面積を既知の濃度の標準のものと比較することで実施した。

【００９３】

グラジエントプロフィールにわたって画分を回収し、必要に応じてプールして凍結乾燥した。ピーク画分はＮ末端配列解析およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析に用いられる通常の手順を用いて部分的に特性決定した。それらは液体クロマトグラフィー／質量分析（ＬＣ／ＭＳ）によっても解析した。Ｎ末端配列解析、ＬＣ／ＭＳおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥはクロマトグラムでのピーク５が主に４量体型の全長抗体（すなわち、２個の軽鎖および２個の重鎖）を含んでいると示した。

大腸菌４３Ｈ１株においてポリシストロン性プラスミドｐａＴＦ２０（１－軽、１－重）またはｐａＴＦ４０（１－軽、３－重）を用いる全長抗ＴＦ抗体の産生を個別シストロンベクターｐａＴＦ５０（１－軽、１－重）を用いるものと比較した。また、培養はｐａＴＦ５０プラスミドで形質転換した３３Ｄ３および５９Ａ７株で実施した。培養サンプルのＡＭＥ５－ＲＰアッセイによる解析により表２に示される以下のＡＭＥ５－ＲＰアッセイピークの５個の力価を得た。

（表２）

抗ＴＦプラスミド	大腸菌宿主	AME5-RP Peak 5 (mg/L)
paTF20	43H1	13
paTF40	43H1	18
paTF50	43H1	134
paTF50	33D3	115
paTF50	59A7	156

【００９４】

このように、ＡＭＥ５－ＲＰ結果が示すように、個別シストロンベクターｐａＴＦ５０はポリシストロン性ベクターと比べ、有意に多い産生量の完全抗ＴＦ抗体を産生した。

培養産物は以下のように精製した：細菌細胞ペーストを２０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ 7.4、０．１４ＭのＮａＣｌで１：５（ｗ／ｖ）希釈し、次いでＭ１１０Ｙマイクロフリューダイザー（microfluidizer）（マイクロフリューディクス・コーポレーション（Microfluidics Corp.），ニュートン、マサチューセッツ）を用いて溶解した。溶解した細胞を含有する溶液を遠心分離して（４３００×ｇ、３０分）清澄にし細胞細片を除去した。上清にポリエチレンイミン（ビーエーエスエフ・コーポレーション（BASF Corp.），レンセリア、ニューヨーク）を加え最終濃度を０．２％とし、次いで遠心分離した（４３００×ｇ、３０分）。上清を濾過（０．２μｍ）してタンパク質Ａアフィニティー樹脂、プロセップ（Prosep）Ａ（ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ）に適用した。０．１Ｍ酢酸ｐＨ 2.9を用いて大腸菌由来ＩｇＧ₁を溶出した。タンパク質Ａプールを尿素を加えて調整し最終濃度を２Ｍとし、ｐＨを５．５に調整し、次いで精製水で希釈してＳＰセファロースＦＦ（アマシャムファルマシアバイオテク株式会社、ウプサラ、スウェーデン）に適用した。ＳＰセファロースＦＦカラムを２０ｍＭのＭＥＳ ｐＨ 5.5で洗浄し、次いで、２０ｍＭのＭＥＳ ｐＨ 5.5中の０から０．２５ＭまでのＮａＣｌの直線グラジエントを用いてＩｇＧ₁を溶出した。ＳＰセファロースＦＦグラジエント画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥで解析してプールした。ＳＰセファロースＦＦプールはｐＨ 8.0に調整してＱセファロースＦＦ（アマシャムファルマシアバイオテク株式会社、ウプサラ、スウェーデン）に適用した。ＱセファロースＦＦカラムを２５ｍＭのＴｒｉｓ ｐＨ 8.0、５０ｍＭ ＮａＣｌで洗浄し、次いで２５ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ 8.0、１５０ｍＭ ＮａＣｌを用いてＩｇＧ₁を溶出した。ＱセファロースＦＦプールは１０ｋＤａの再生セルロース膜（ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ）を用いる限外濾過、次いで２０ｍ

M 酢酸ナトリウム pH5.5、0.14M NaCl へのダイアフィルトレーションによって作製した。

【実施例 5】

【0095】

大腸菌で産生された全長抗体の特性決定

本発明の大腸菌宿主細胞で産生された全長抗体が所望の特性を有していることをさらに確認するために、培養によって調製し、実施例 4 の手順にしたがって精製した抗 TF 抗体産物を質量分析、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸解析および N 末端配列決定をはじめとする一連のアッセイによってさらに特性決定した。

10

【0096】

MALDI-TOF-MS 解析：

MALDI-TOF-MS をディレイドエクストラクションを備えたボイジャー・ディーイー・バイオスペクトロメトリー・ワークステーション (Voyager DE Biospectrometry WorkStation) (ペルセプティブ・バイオシステムズ (Perseptive Biosystems), フレーミングハム、マサチューセッツ) で実施した。窒素レーザーを用いてサンプルに紫外光 (337 nm) を照射し、240 スキャンの平均をとった。この装置は直線配置 (1.2 m の飛行経路) で操作し、20 kV の加速電圧を用いて 60 ns 遅れた後にイオンをフライトチューブの下方に進ませる。サンプル (1.0 μ l) を 1 μ l のマトリックスと混合しこの混合物の 1 μ l を標的に加えて真空乾燥させた (50 $\times$ 10⁻³ Torr)。タンパク質標準を用いてイオンの質量割当のために 2 点外部校正を行った。4-ヒドロキシ桂皮酸マトリックスを全長抗 TF 抗体の解析に用いた。

20

【0097】

イオン交換クロマトグラフィー：

HP1100 装置でベーカー・ボンド・シーエスエックス (Baker Bond CSX) カラム (4.6 $\times$ 250 mm) を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを実施した。カラムはバッファー A (25 mM の酢酸ナトリウム、pH 4.8) を用いて 1 ml/分の流速で 20 分間平衡化した。サンプルはバッファー A で約 1 mg/ml に希釈し、約 50 μ g を注入した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C に維持した。直線グラジエントを 40 分にわたって 60% バッファー B (バッファー A + 500 mM NaCl) まで適用し、5 分間 60% バッファー B の状態にした。カラム流出液を 280 nm でモニターした。

30

【0098】

サイズ排除クロマトグラフィー

HP1100 装置でのサイズ排除クロマトグラフィーには TSK G3000SW-XL カラム (7.8 $\times$ 300 mm; トソハス (TosoHaas)) を用いた。カラムは 250 mM の塩化ナトリウムを含有する 100 mM のリン酸カリウムバッファー pH 6.3 を用いて 0.5 ml/分の流速で平衡化した。サンプルは溶出バッファーで 1 mg/ml に希釈し、約 100 μ g をカラムに注入した。実施時間は 30 秒とした。ゲル濾過標準のサンプル (バイオーラッド (Bio-Rad)) も溶出バッファーで 5 倍希釈した後に注入した。

40

【0099】

アミノ末端配列解析

サンプルを透析によって 0.1% 酢酸に交換した。83 μ g を含有するアリコートを実用プライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 477A/120A 自動化タンパク質シーケンサーを用いるエドマン分解法による N 末端配列解析用にロードした。外部標準とのピーク高比較を用いて PTH アミノ酸を定量化した。

【0100】

アミノ酸解析：

15 μ g の脱塩サンプルを含有するアリコートを加水分解アンブル中でサバント・スピードバック (Savant SpeedVac.) において蒸発乾固させた。6 N の HCl (ピアス (Pierce)) を加えた後、アンブルを減圧下で密閉し、110 $^{\circ}$ C にて 24 または 72 時間インキュベ

50

トした。さらなるアリコートをして1時間前に調製した10%過酸化水素および90%蟻酸を含有する溶液とともに0-5℃にて4時間インキュベートすることによる過蟻酸酸化に付した。次いで、過蟻酸をサバント・スピードバック(Savant SpeedVac)中で蒸発によって除去し、その後サンプルを前記のように6N HCl中での24時間加水分解に付した。T r p 決定のために、25ugの各ロットを含有する三つ組のアリコートをアンプル中で乾燥させ、窒素雰囲気下、減圧下で、7%メルカプト酢酸(ベーカー(Baker)) / 93% 6N HCl(ピアス(Pierce))溶液中で110℃にて24時間インキュベートした。加水分解後、すべてのサンプルをサバント・スピードバック(Savant SpeedVac.)中で蒸発乾燥させた。

加水分解物を0.2Nのクエン酸ナトリウムバッファー、pH 2.2(ベックマン(Beckman))中で再構成し、ポストカラムニンヒドリン検出を行うベックマン(Beckman) 6300陽イオン交換装置を用いるアミノ酸解析に付した。440nmおよび570nmでの吸光度の合計を表すシグナルをピーイーネルソン・ターボクロム(PE Nelson Turbochrom)4データシステムによってモニターした。アミノ酸定量は1または2nmolの各成分を含有する外部標準混合物とのピーク面積またはピーク高比較によって達成した。

前記の種々のアッセイから得られた結果から本発明の発現ベクターを用いて大腸菌において産生された全長抗TF抗体はCHO細胞などの真核生物の宿主細胞において産生された抗TF抗体のものと同様の構造特性を共有するということが確認された。

【実施例6】

【0101】

大腸菌において産生された全長抗体の機能解析

これまでの実施例に従って大腸菌から産生され精製された抗体は全長であり、かつ、非グリコシル化されている。以下の実験は抗体が1) 堅固な二価の抗原結合活性を示し; 2) C1q結合活性を欠き、そのためにCDC機能が枯渇しており; 3) FcγR1結合能を欠き、そのためにADCC機能が枯渇しており; 4) クリアランスに対する耐性が改良されているために強力なFcRn結合を示し、そのためにイン・ビボ(in vivo)での半減期をより長くするということを示すために実施した。

【0102】

TF抗原結合

全長抗TF抗体をELISAアッセイを用いて抗原結合について評価した。マキシソープ(MaxiSorp) 96ウェルマイクロウェルプレート(ヌンク, ロスキレ, デンマーク)(Nunc, Roskilde, Denmark)を4℃にて50mMの炭酸塩バッファーpH 9.6中の1ug/mlの残基1-219を含んでなる可溶性組織因子(TF)(ジェネンテック)で一晩コーティングした。プレートを室温にてPBS、0.5%ウシ血清アルブミン、10ppmのプロクリン300(スベルコ(Supelco)、ベレフォンテ、ペンシルバニア)、pH 7.2で1時間ブロッキングした。PBS、0.5%ウシ血清アルブミン、0.05%のポリソルベート20、0.25%のCHAPS、0.2%のウシγグロブリン(シグマ、セントルイス、ミズーリ)、pH 7.2(アッセイバッファー)中の抗体の3連続希釈液(0.27-200ng/ml)をプレートに加え、プレートを2時間インキュベートした。結合したIgGはペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体(ジャクソン・イムノリサーチ、ウェストグローブ(WestGrove)、ペンシルバニア)をアッセイバッファーに加え、プレートを1時間インキュベートし、基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(キルケゴール&ペリー研究所、ゲイサーズバーグ、メリーランド)を加えることで検出した。プレートを工程の間にPBS、0.05%ポリソルベート20、pH 7.2で洗浄した。450nmの吸光度をチテレック・スタッカー・リーダー(Titerek stacker reader)(アイシーエヌ(ICN)、コスタメサ、カリフォルニア)で読み取った。滴定曲線は4パラメーター非直線回帰曲線フィッティングプログラム(カレイダグラフ、シナジーソフトウェア、リーディング、ペンシルバニア)を用いてフィッティングした。

TF抗原結合ELISAアッセイの結果が図15に示されている。大腸菌で作製された

全長抗TF抗体をCHO細胞で作製された異なるイソ型の抗TF抗体と比較する。大腸菌製IgG1抗体はCHO細胞系で作成された他の抗TF抗体に少なくとも匹敵する抗原結合活性を示す。

【0103】

C1q結合

ヒトC1qの精製した大腸菌産生抗TF抗体への結合をイツソギー(Idsugie)ら(2000)、ジャーナル・オブ・イムノロジー164:p. 4178-4184に記載されるようにELISA結合アッセイを用いて測定した。便宜には、コスター(Costar)96ウェルプレートを4℃にてコーティングバッファー(0.05M炭酸ナトリウムバッファー)、pH9中の種々の濃度の抗体で一晩コーティングした。次いで、プレートをPBS/0.05%TWEEN20(商標)、pH7.4で3回洗浄し、200ulのチメロサルを含むELISA希釈液(0.1M NaPO₄/0.1M NaCl/0.1%ゼラチン/0.05%TWEEN20(商標)/0.05%プロクリン300)で室温にて1時間ブロッキングした。プレートを洗浄バッファーで3回洗浄し、2ug/mlのC1q(キデル(Quidel)、サンディエゴ、カリフォルニア)の100ulのアリコート各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄バッファーで6回洗浄した。100ulのヒツジ抗ヒトC1qペルオキシダーゼ結合抗体(バイオデザイン(Biodesign))の1:1000希釈液を各ウェルに加え、室温にて1時間インキュベートした。このプレートを洗浄バッファーで6回再洗浄し、100ulのOPD(オーフェニレンジアミンジヒドロクロリド(シグマ))を含有する基質バッファー(PBS/0.012%H₂O₂)を各ウェルに加えた。黄色の外見によって認められる酸化反応を30分間進行させ、100ulの4.5N H₂SO₄を加えて停止した。次いで、マイクロプレートリーダー(SPECRAMAX250(商標)、モレキュラー・デバイスズ・コーポレーション(Molecular Devices Corporation))を用いて(492-405)nmで吸光度を読み取った。平行して、適当な対照を実施した(すなわち、用いた各濃度の抗体についてC1qを含まずにELISAを実施し、また抗体を含まずにELISAを実施した)。各サンプルについて、C1q結合はug/mlでの濃度に対する吸光度(492-405)nmをプロットし、4パラメーター曲線フィッティングプログラム(カレイダグラフ(商標))を用いてEC₅₀値を比較することで求めた。このアッセイの結果が図16に示されている。CHO細胞により発現された抗体、I-1095-1-リツキシマブを陽性対照として用いた。大腸菌製全長抗TF抗体からは高抗体濃度でさえC1q結合が検出されなかった。

【0104】

Fcγ受容体結合

FcγR1の精製した抗TF抗体への結合を以下のELISA結合アッセイを用いて測定した。100ulのPBS中の1ug/mlの受容体-GST融合物を加えることでFcγR1αサブユニット-GST融合物をヌンク(Nunc)F96マキシソープ(Maxisorb)プレート(カタログ番号439454)上にコーティングし、4℃で48時間インキュベートした。アッセイに先立って、プレートを250ulの洗浄バッファー(0.5%TWEEN20を含有するPBS pH7.4)で3回洗浄し、250ulのアッセイバッファー(50mM Tris緩衝生理食塩水、0.05%のTWEEN20、0.5%のRIA級ウシアルブミン(シグマA7888)および2mMのEDTA pH7.4)でブロッキングした。1mlのアッセイバッファーで10ug/mlに希釈したサンプルをFcγR1αサブユニットコーティングしたプレートに加え、オービタルシェーカー上で25℃にて120分間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで5回洗浄して非結合複合体を除去し、100ulのアッセイバッファー中の1:10,000で特異的なセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ヤギ抗ヒトIgGγ重鎖(ベーリンガー・マンハイム1814249)を加え、25℃にてオービタルシェーカー上で90分間インキュベートすることでIgG結合を検出した。プレートを洗浄バッファーで5回洗浄して非結合HRPヤギ抗ヒトIgGを除去し、100ulの基質溶液(PBS中の0.4mg/

mlのo-フェニレンジイミンジヒドロクロリド、シグマP6912、6mMの H_2O_2 を加えることで結合した抗IgGを検出し、25℃で8分間インキュベートした。酵素反応を100ulの4.5N H_2SO_4 を加えて停止させ、比色産物を96ウェルプレートデンスイットメーター（モレキュラー・デバイス）で490nmで測定した。このアッセイの結果が図17に示されている。陽性対照、哺乳類293発現抗体は受容体と結合するが、FcγR1結合は大腸菌産生抗TF抗体については検出されない。

【0105】

FcRn結合

精製した抗TF抗体のFcRnへの結合を以下のELISA結合アッセイを用いて解析した。ELISAプレートを可溶性組織因子でコーティングし、前記のようにブロッキングした。PBS、0.5%ウシ血清アルブミン、0.05%ポリソルベート20、pH6.0（サンプルバッファー）中の抗TF抗体の2連続希釈液（1.6–200ng/ml）をプレートに加え、プレートを室温で2時間インキュベートした。サンプルバッファー中の3.6ug/mlのビオチン標識FcRn（リサーチ・オーガニクス(Research Organics)、クリーブランド、オハイオ製のビオチン-X-NHSを用いて調製した）をプレートに加えた。1時間インキュベートした後、サンプルバッファー中のストレプトアビジン標識したペルオキシダーゼ（アムデックス(Amdex)、コペンハーゲン、デンマーク）を加えることで結合したFcRnを検出し、プレートを1時間インキュベートし、基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（キルケゴール&ペリー研究所）を加えた。プレートを工程の間にPBS、0.5%BSA、0.05%ポリソルベート20、pH6.0で洗浄した。450nmの吸光度をサーモマックス・プレート・リーダー(Thermo_{max} plate reader)（モレキュラー・デバイス(Molecular Devices)、メンロパーク、カリフォルニア）で読み取った。滴定曲線を前記のようにフィッティングした。図18は大腸菌製全長抗TF抗体のFcRn結合活性は哺乳類の宿主細胞で作製された他の抗TF抗体（IgG4、IgG4b、IgG2）に匹敵するということを示す。

【実施例7】

【0106】

大腸菌で作製された全長αTF抗体の薬物動態学研究

大腸菌製全長抗TF抗体（IgG1大腸菌）を、対照としてCHO細胞で作製された2種の他の抗TF抗体（IgG2 CHOおよびIgG4b CHO）とともに単回IVボラス投与チンパンジー薬物動態学（PK）研究に付した。3個体のチンパンジーは抗TF抗体の存在について陰性反応が出た。各動物は0.10mg/kgの抗TF抗体（IgG1大腸菌、IgG2 CHOまたはIgG4 CHO）の単回IVボラス投与を受けた。血漿サンプルを以下のスケジュールに従って投与後28日まで採取した：投与前30および15分；IVボラス投与後2、15、30分；1、2、3、4、6、12時間；1、2、4、7、14、21および28日。血漿サンプルを、TFをコーティングとして、抗Fcモノクローナル抗体を検出抗体として用いるELISAによって抗TF抗体（ATF）含量についてアッセイした。チンパンジー血漿における定量化の限界は0.102ug/mlであった。

ELISA結果が図19に血漿ATF濃度対時間曲線の形で示されている。データをウィン・ノンリン(Win Nonlin)3.0のある1コンパートメント排出プロフィールにフィッティングした。クリアランス(CL)、排除半減期($T_{1/2}$)および容積(V)のPKパラメーター推定値が表3に記載されている。3個体のチンパンジーでのこの実験をもとに、大腸菌で作製された抗体とCHO細胞で作製されたものの間でPKパラメーター推定値に明らかな相違は認められなかった。

【表 3】

チンパンジーの 番号	202	336	569
抗体	IgG1 大腸菌	IgG4b CHO	IgG2 CHO
CL (ml/日/kg)	36.3	44.6	91.8
T _{1/2} (日)	0.938	0.926	0.694
V (ml/kg)	49.2	59.6	92.0

【実施例 8】

【0107】

個別シストロンベクターを用いる種々の全長抗体の発現および培養

以下の全長抗体：抗 V E G F (V N E R K)、Presta等, Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)に記載されるヒト化抗体のより高い親和性の変異体；Presta等, J. Immunol. 151:2623-2632 (1993)に記載されるヒト化抗 I g E 抗体；抗 C D 4 0、フランシスコ (Francisco)ら, Cancer Res. 60:3225-3231 (2000)に記載される抗 C D 4 0 抗体のヒト化型；抗 H E R - 2 (4 D 5 および 2 C 4 型；Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:4285-4289 (1992)およびFendly等, Cancer Res. 50:1550-1558 (1990))；およびヒト化抗 C D 1 8 (Eigenbrot等, Proteins: Structure, Function, and Genetics 18:49-62 (1994))の発現のための個別シストロンベクターも構築した。

個別シストロンプラスミドの構築のために、p a T F 5 0 の V_L および V_H 領域 (T I R 1 - 軽、T I R 1 - 重；実施例 1 参照) を列記された抗体の各々の V_L および V_H で置換した。実施例 3 に記載のように 3 3 D 3 株で発現誘導を実施した。サンプルを非還元条件下での S D S - P A G E 分離およびイムノブロットのために回収した。図 2 2 に示されるように、全長型の抗体である抗 V E G F、抗 I g E、抗 C D 4 0、4 D 5、2 C 4 および抗 C D 1 8 は個別シストロンベクターを用いて大腸菌で上手く発現された。このデータは個別シストロン発現系は大腸菌での抗体発現のための一般的に適用可能なアプローチであるということを示す。

【0108】

本明細書に記載される個別シストロン発現系の有用性をさらに示すために、種々の列挙された抗体を発現する前記のプラスミドを大規模生産（培養プロセス）に用いた。

これらの培養に使用された生物は：33D3 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R；61D6 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41；and 62A7 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 ilvG修復型を含む。

列挙した抗体の培養は、10リットルの規模で行われ、可溶性サンプルを調製し、実施例 4 に記載されるような A M E 5 - R P アッセイを施した。主に四量体型（2つの L 鎖と 2つの H 鎖）の全長抗体を含有する最大 5 の A M E 5 - P R アッセイ力価が、表 4 に示される。

(表 4)

抗体	大腸菌宿主	AME5-RP ピーク5, mg/L
抗 T F	61D6	112
抗 C D 1 8	61D6	34
抗 I g E (E 2 5 変異体)	33D3	77

抗 V E G F (VNERK変異体)	61D6	53
抗 C D 4 0	62A7	45
抗 H e r 2 (4 D 5 変異体)	62A7	55
抗 H e r 2 (2 C 4 変異体)	62A7	73

【実施例 9】

【0109】

大腸菌での D s b タンパク質及び全長抗体の同時発現

さらに、本発明の個別シストロン系を用いて、全長抗 T F 抗体を、抗体の適切な折り畳み及び構築を促進する能力を有する一以上の D s b タンパク質と同時発現させた。

これらの培養に使用された生物は：58H7 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) Δ ptr3 Δ ompT Δ d egP lac Iq Δ lacY; 及び 61D6 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmp c-fepE) degP41 を含む。

抗 T F をコードするプラスミド p a T F 5 0 または p x T F 2 A P 2 2 (軽鎖および重鎖の双方のための 2 つの T I R を含む p a T F 5 0 変異体) を用いて前記の生物のコンピテント細胞を形質転換した。d s b C (p J J 1 4 1)、d s b A (p J J 1 4 2)、または d s b A / C (p J J 2 4 7) のいずれかをコードするプラスミドを抗 T F プラスミド p a T F 5 0 または p x T F 2 A P 2 2 と同時形質転換した。

d s b C プラスミド p J J 1 4 1 を構築するために、カナマイシン耐性プラスミド p A C Y C 1 7 7 を A a t I I および H i n c I I で消化してアンピシリン耐性を破壊した。米国特許第 5, 6 3 9, 6 3 5 号に記載される t a c - d s b C プラスミド p J J 4 0 を C l a I で消化し、次いでクレノーおよびデオキシスクレオチドで埋めた。フェノール：クロロホルム抽出して沈殿させた後、直線化ベクターを A a t I I で消化して 1. 6 k b 断片をアガロースゲルから精製し、A a t I I / H i n c I I 消化した p A C Y C 1 7 7 に連結した。最終プラスミド p J J 1 4 1 は t a c - d s b C をコードし、カナマイシン耐性を付与する。同様に、同一の p J J 3 7 由来の A a t I I / C l a I (C l a I 部位は埋めてある) 断片と連結した A a t I I / H i n c I I 切断親ベクターを用いて d s b A プラスミド p J J 1 4 2 を構築したが、これは d s b A をコードし、これもまた米国特許第 5, 6 3 9, 6 3 5 号に記載されている。

【0110】

p J J 2 4 7 を構築するために、d s b A と d s b C の双方をコードするプラスミド、p J J 1 4 2 を K p n I および S c a I で消化した。D s b C を以下のプライマーを用いてプラスミド p J J 1 4 1 から P C R 増幅させた：

tacdsbCf1: CATACTGGTACCAGGATCTAGAGGGAAGATTTATG (配列番号：3)

tacdsbCr2: CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTG (配列番号：4)

プライマーは制限部位 (K p n I、S c a I) を含み、これには下線が引いてある。P C R 増幅させた後、断片をアガロースゲル電気泳動で精製して適当な酵素で消化して K p n I / S c a I 消化した p J J 1 4 2 に連結した。得られたプラスミド、p J J 2 4 7 は d s b A および d s b C を、一連の中では d s b A を最初に発現させる t a c プロモーターをコードする。プラスミドを d s b A 遺伝子の中央から d s b C 遺伝子の 3' 末端まで配列決定した。

軽鎖と重鎖双方のための 1 つの T I R を含む抗 T F と D s b C (p J J 2 4 1) または D s b A (p J J 2 3 7) のいずれかの双方をコードする単一プラスミドを構築してコンピテント宿主細胞を形質転換した場合もある。

抗 T F と d s b A とを同時発現するプラスミド p J J 2 3 7 を構築するために、抗 T F プラスミド p a T F 5 0 を A a t I I および H p a I で消化し、p J J 2 2 3 由来の A a t I I / H p a I 切断断片と連結した。この後者の断片は a r a C、p B A D プロモーター、d s b A、カナマイシン耐性、c o l E 1 複製開始点、および β-ラクタマーゼ遺伝子を含む。連結産物は個別 p h o A プロモーター下に抗 T F の L および H 鎖の双方、d s b A を発現させ、プラスミドにカナマイシンおよびアンピシリン耐性を付与するアラビノース誘導プロモーター (p B A D) を含む。このプラスミドを p J G 9 と名づけた。p J

J 2 3 7を作製するために、P C R増幅によってアラビノースレギュロンをt a cプロモーターに変更した。このために、以下のプライマーを用いた：

dsbAf11: TGCACGGTTAACATGCTGTGGTGTTCATGGTCGG (配列番号：5)

dsbAr12: TTTACCGTTAAACAAACATCGCCGGAAC (配列番号：6)

【0111】

下線を引いた部位はH p a I部位である。鋳型としてp J J 1 4 2 (t a c-d s b Aを含む)を用いて増幅し、断片をゲル精製してH p a Iで消化した。p J G 9ベクターをH p a IおよびN a e Iで消化してa r a C-p B A D-d s b A領域を除去した。H p a I-N a e I切断ベクターをゲル精製し、t a c-d s b A H p a I切断P C R断片に連結した。得られたプラスミドをp J J 2 3 7と名づけ、これはα T F LおよびH鎖を発現させる個別P h o Aプロモーターおよびd s b Aを発現させるt a cプロモーターを含む。

10

抗T Fとd s b Cとを同時発現するプラスミドp J J 2 4 1を構築するために、p J G 9をH p a IおよびN g o M I Vで消化した。N g o M I VはN a e Iと同一部位で切断する代わりに付着端を残す。D s b Cを鋳型としてp J J 1 4 1からd s b Aと同一の正のプライマー (d s b A f 1 1；配列番号5) および以下の逆のプライマーを用いてP C R増幅した：

dsbCr12: TCAGCTGCCGGCGTCCGATGCGAATTATTTACCG (配列番号：7)

下線を引いた部位はN g o M I V部位である。増幅した断片をゲル精製してN g o M I VとH p a Iで消化し、p J G 9に連結した。得られたプラスミドは抗T F LおよびH鎖を発現させる個別p h o Aプロモーターならびにd s b Cを発現させるt a cプロモーターを含む。

20

【0112】

抗T Fをコードするプラスミドおよび1以上のD s bタンパク質をコードするプラスミドを併用してコンピテント細胞を形質転換し、形質転換体を5 0 u g / m Lのカルベニシンおよびカナマイシンを含有するL Bアガープレート上にプレATINGした。そのような場合には、抗T Fおよび選択されたD s bタンパク質 (d s b Aまたはd s b C) の双方を発現する単一プラスミド、形質転換体を5 0 u g / m Lのカナマイシンを含有するL Bアガープレート上で選抜する。

実施例4に記載のように培養を1 0リットル規模で実施し、O D 5 5 0が1 5 0-2 0 0に到達した時点で5 0 m Lのイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド (I P T G) の2 0 0 m M溶液を培養物に加えた。記載されたものとは異なる回数でI P T Gを添加してもよいし、記載されたものとは異なる量のI P T Gを添加してもよい。実施例4に記載のように可溶性サンプルを調製してA M E 5-R Pアッセイに付した。種々のプラスミド／宿主株および得られたピーク5の力価が表5に要約されている。

30

(表5)

抗T F プラスミド	大腸菌宿主	Dsb プラスミド	AME5-RP Peak 5 (mg/L)
paTF50	58H7	なし	100
paTF50	61D6	なし	127
paTF50	58H7	pJJ141	174
pJJ241	58H7	pJJ241	212
paTF50	58H7	pJJ142	125
pJJ237	58H7	pJJ237	135
paTF50	61D6	pJJ247	584
pxTF2AP22	61D6	なし	118
pxTF2AP22	58H7	pJJ141	349
pxTF2AP22	58H7	pJJ142	134
pxTF2AP22	61D6	pJJ247	881

40

【実施例10】

【0113】

50

大腸菌での F k p A 及び全長抗体の同時発現

また、全長抗 T F 抗体を F k p A、シャペロン活性を有するペプチジルプロピル cis, trans-イソメラーゼと同時発現させた。

これらの培養に使用された生物は：58H7 (genotype W3110 Δ fhuA (Δ tonA) Δ ptr3 Δ ompT Δ degP lac Iq Δ lacY); 及び 59A7 (genotype W3110 Δ fhuA (Δ tonA) phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 deoC degP41 kan^S ilvG⁺ Δ prc::kanR prc suppressor) を含む。

t a c I I プロモーターの制御下に f k p A をコードする個別プラスミド (p J V G 2) を抗 T F プラスミド p a T F 5 0 と同時形質転換させた。p J V G 2 を作製するために、プラスミド p J J 2 2 2 f k p A を N h e I および N g o M I V で消化して f k p A を含む 0.8 kb 断片を作製した。この断片を電気泳動およびフェノール：クロロホルム抽出および沈殿によって精製した。p A C Y C 1 7 7 ベクター、p J J 1 4 2 の類似体上に t a c - D s b D を含むプラスミド p J J 2 3 9 を X b a I および N g o M I V で消化して誘導 t a c プロモーターおよびカナマイシン耐性を含む 3.9 kb の断片を作製した。この断片を電気泳動およびフェノール：クロロホルム抽出および沈殿によって精製した。これら 2 種の断片を連結して誘導 t a c プロモーター、f k p A およびカナマイシン耐性を含有する p J V G 2 を作製した。このプラスミドは f k p A を p B R 3 2 2 を基にしたプラスミドと同時発現させるのに使用できる適合性 p A C Y C 1 7 7 プラスミドであるという点で p J J 1 4 1 および p J J 1 4 2 と同様である。

【0114】

さらに、個別 p h o A プロモーターの制御下に抗 T F の両鎖およびアラビノースプロモーターの制御下に f k p A をコードする単一プラスミド (p J G 9 f k p A B 3) を用いて前記生物のコンピテント細胞を形質転換する。p J G 9 f k p A B 3 を作製するために、プラスミド p J J 2 2 2 f k p A を H p a I および N d e I を用いて消化し、a r a C、誘導プロモーター p B A D、f k p A およびカナマイシン耐性を含む 4.1 kb 断片を作製した。F k p A を最初に大腸菌染色体から P C R 増幅し、市販の p B A D 1 8 において p B A D プロモーターの後ろにクローニングした。断片を電気泳動およびフェノール：クロロホルム抽出および沈殿によって精製した。プラスミド p J G 9 を H p a I および N d e I で消化してアンピシリン耐性、α T F 抗体の L および H 鎖双方のための個別シストロンを含む 5.1 kb 断片を作製した。それを電気泳動およびフェノール：クロロホルム抽出および沈殿によって精製した。2 つの断片を連結して p J G 9 f k p A B 3 を作製したが、これは抗 T F 抗体の鎖、a r a C を発現させる個別プロモーター、f k p A、カナマイシン耐性、c o l E 1 複製開始点、およびアンピシリン耐性のみを発現させる p B A D プロモーターを含む。

抗組織因子プラスミド p a T F 5 0 および f k p A プラスミド p J V G 2 を共に用いてコンピテント細胞を形質転換した場合には、形質転換体を 50 μg/mL のカルベニシリンおよびカナマイシン双方を含有する L B アガープレート上に置いた。単一のプラスミド、p J G 9 f k p A B 3 で細胞を形質転換した場合には、50 μg/mL のカナマイシンを含有する L B アガープレート上で形質転換体を選抜した。

【0115】

培養は以下の改変を含むが実施例 4 に記載のように 10 リットル規模で実施した。プラスミド p J G 9 f k p A B 3 で形質転換された細胞を用いる培養に O D 550 がおよそ 150-200 で 200 mL の 40% アラビノース溶液を加えた。アラビノース添加の前に、グルコースを与える速度を培養物がグルコース制限されるように削減した。アラビノースを加えて消費した後、グルコースを与える速度を戻して培養物による最大グルコース取り込みを可能にした。O D 550 が 150-200 に達した時点でプラスミド p a T F 5 0 および p J V G 2 で同時形質転換した細胞を用いる培養物に 50 mL の 200 mM イソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (I P T G) 溶液を添加した。I P T G 添加は記載されたものと異なる時点で行ってもよいし、記載されたものと異なる量の I P T G を加えてもよい。実施例 4 に記載のように、可溶性サンプルを調製し、A M E 5-R P アッセイに付した。

p a T F 5 0 で形質転換した 5 9 A 7 宿主を用いる培養は p J G 9 f k p A B 3 プラスミドで形質転換した 5 9 A 7 宿主の 2 4 7 m g / L と比べ約 1 5 6 m g / L の A M E 5 - R P ピーク 5 力価をもたらした。同様に、プラスミド p a T F 5 0 で形質転換した 5 8 H 7 宿主を用いる培養は、p a T F 5 0 と p J V G 2 で同時形質転換された 5 8 H 7 宿主の 1 8 0 m g / L と比べ約 1 0 0 m g / L の A M E 5 - R P ピーク 5 力価をもたらした。

前記は特定の実施形態を指したが、本発明はそのように限定されるものではないということは理解されよう。当業者ならば、開示された実施形態に本発明の全体的な考えか逸脱することなく種々の改変をなすことができるということは思い浮かぶであろう。すべてのかかる改変は本発明の範囲内にあると意図される。

【図面の簡単な説明】

10

【0116】

【図1】既存の F a b 発現ベクター、p A K 1 9 を基にした全長抗体発現ベクター、p x T F P V の構造の模式的表示である。

【図2】2種のポリシストロン性全長抗体発現ベクターを用いる全長抗体の大腸菌発現を示す。誘導後、全細胞溶解物を S D S - P A G E イムノブロットによって解析した。レーン 1 は負の対照であり；レーン 2 は p x T F P V （抗 T F 抗体）であり；レーン 3 は p Y 0 3 1 7 . F a b - C H 3 （抗 V E G F 抗体）である。矢印は全長抗体に相当するバンドを示す。

【図3】軽鎖および重鎖について種々の T I R 翻訳強度組み合わせを有するポリシストロン性構築物を示す。

20

【図4】軽鎖（L）および重鎖（H）について種々の T I R 組み合わせを有するポリシストロン性ベクターを用いる全長抗 T F I g G 1 の大腸菌発現を示す。誘導後、全細胞溶解物を S D S - P A G E イムノブロットで解析した。（4 A）は還元サンプル。（4 B）は非還元サンプル。各レーンの上には軽鎖（「L」）および重鎖（「H」）についての相対 T I R 翻訳強度が記載されている。「n e g」：バックグラウンドベクター、p B R 3 2 2 のみを保持する誘導細胞。

【図5】種々の T I R 翻訳強度下の軽鎖および重鎖の個々の発現のための構築物の模式的表示である。

【図6】種々のプラスミドの還元全細胞溶解物サンプルのクーマシー染色ゲル結果であり、軽鎖（6 A）および重鎖（6 B）の分泌産生量に対する T I R 相対強度の作用を示す。

30

【図7】所定の T I R 強度を有する軽鎖および重鎖ベクターを組み合わせることによる全長抗体のための個別シストロン発現ベクター（p x T F 2 A P 7 7）の構築物を模式的に示す。

【図8】個別シストロンベクター p x T F 2 A P 7 7 で形質転換した還元全細胞溶解物のクーマシー染色を示す。

【図9】軽鎖および重鎖について種々の T I R 強度組み合わせを有する個別シストロン構築物を示す。

【図10】軽鎖（L）および重鎖（H）について種々の T I R 強度組み合わせを有する個別シストロン構築物を用いる全長抗 T F I g G 1 の大腸菌発現を示す。誘導後、全細胞溶解物を S D S - P A G E イムノブロットで解析した。（4 A）は還元サンプル。（4 B）は非還元サンプル。各レーンの上には軽鎖（「L」）および重鎖（「H」）についての相対 T I R 翻訳強度が記載されている。「n e g」：バックグラウンドベクター、p B R 3 2 2 のみを保持する誘導細胞。

40

【図11】ポリシストロン性対個別シストロン系を用いる全長抗体発現の比較である。誘導後、非還元全細胞溶解物を S D S - P A G E イムノブロットで解析した。軽鎖（L）および重鎖（H）についての種々の T I R 強度組み合わせが示されている。

【図12】抗 T F 抗体についての p A K 1 9 から誘導したポリシストロン性ベクター対個別シストロンベクターのクーマシー染色したゲルの比較である。レーン 1 は負の対照であり；レーン 2 は p x T F P V （p A K 1 9 から誘導したポリシストロン性）であり；レーン 3 は p a T F 5 0 （個別シストロン）である。矢印は全長抗体の位置を示す。

50

【図13】 pAK19から誘導したポリシストロン性ベクター対個別シストロンベクターを用いる全長抗TF抗体発現の比較である。誘導後、非還元全細胞溶解物をSDS-PAGEイムノブロットで解析した。レーン1は負の対照であり；レーン2はpxTFPV（pAK19から誘導したポリシストロン性）であり；レーン3はpaTF50（個別シストロン）である。矢印は全長抗体に相当するバンドを示す。

【図14】 pAK19から誘導したポリシストロン性ベクター対個別シストロンベクターを用いる全長抗VEGF抗体発現の比較である。誘導後、非還元全細胞溶解物をSDS-PAGEイムノブロットで解析した。レーン1は負の対照であり；レーン2はpY0317-Fab-CH3（pAK19から誘導したポリシストロン性）であり；レーン3はpxVG2AP11（個別シストロン）である。矢印は全長抗VEGF抗体に相当するバンドを示す。

10

【図15】 大腸菌において個別シストロンベクターpaTF50で作製された全長抗TF抗体の抗原（TF）結合を示す。2種のCHO製抗TF抗体（IgG2およびIgG4）を対照として用いた。

【図16】 大腸菌においてpaTF50で作製された全長抗TF抗体IgG1のC1q結合を示す。比較のため、もう1つの抗体、I-1095-1-リツキシマブを用いた。

【図17】 大腸菌においてpaTF50で作製された全長抗TF抗体のFcγR1α結合を示す。CHO細胞で作製された2種の抗IgE抗体を対照として用いた。

【図18】 対照として5種の他の抗体と比較した、大腸菌においてpaTF50で作製された全長抗TF抗体IgG1（32604-74大腸菌IgG1）のFcRn結合を示す。

20

【図19】 大腸菌においてpaTF50で作製された全長IgG1（IgG1大腸菌）、CHOで作製されたIgG2（IgG2 CHO）またはCHOで作製されたIgG4b（IgG4b CHO）のいずれかを単回IVボラス投与されたチンパンジーにおける血漿抗TF抗体（ATF-D3H44）濃度（ug/ml）の経時変化を示す。

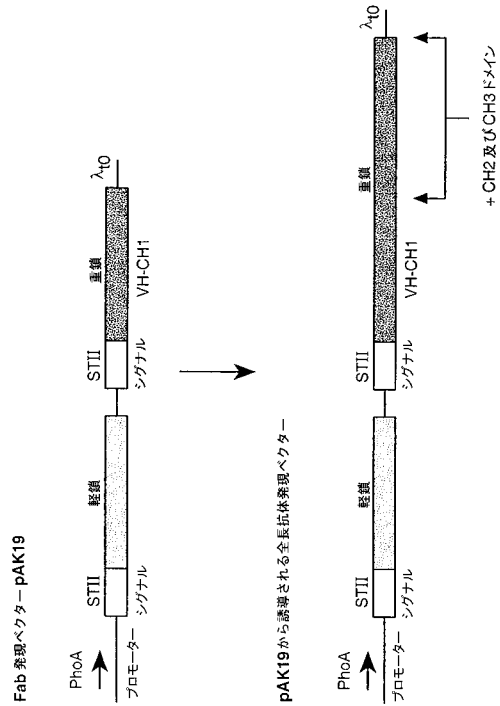
【図20a-20c】 個別シストロンベクターpaTF50の発現カセット配列を示す。

【図21a-21c】 個別シストロンベクターpxVG2AP11の発現カセット配列を示す。

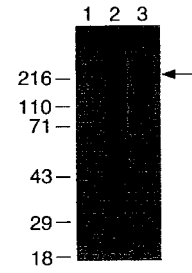
【図22】 個別シストロン系を用いる種々の全長抗体の発現を示す。誘導後、全細胞溶解物をSDS-PAGEイムノブロットで解析した。

30

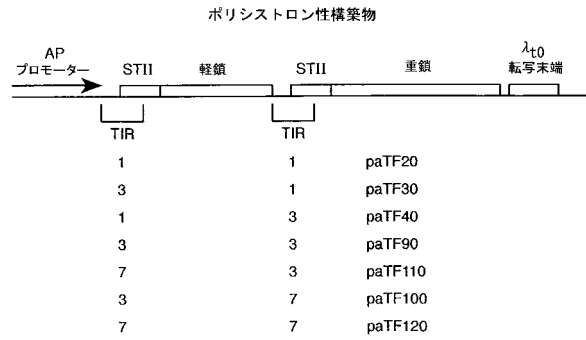
【図 1】



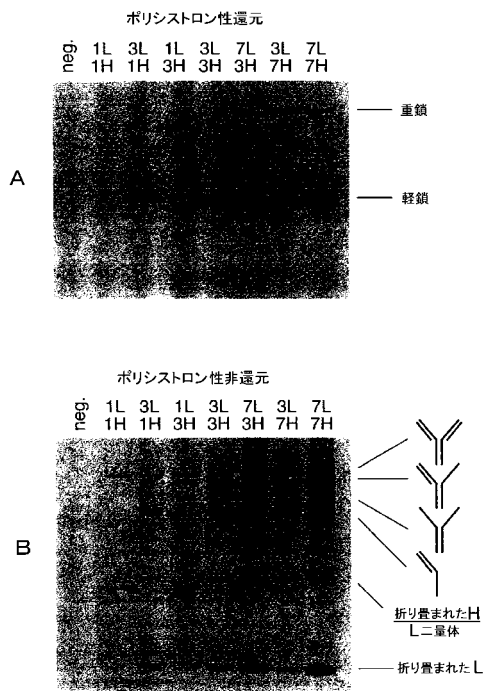
【図 2】



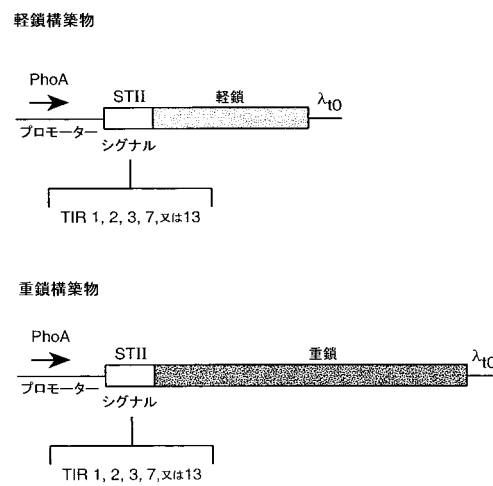
【図 3】



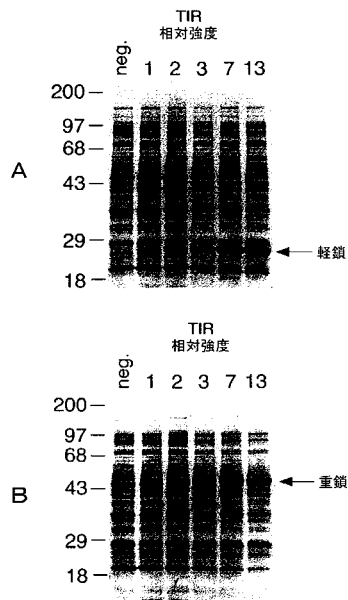
【図 4】



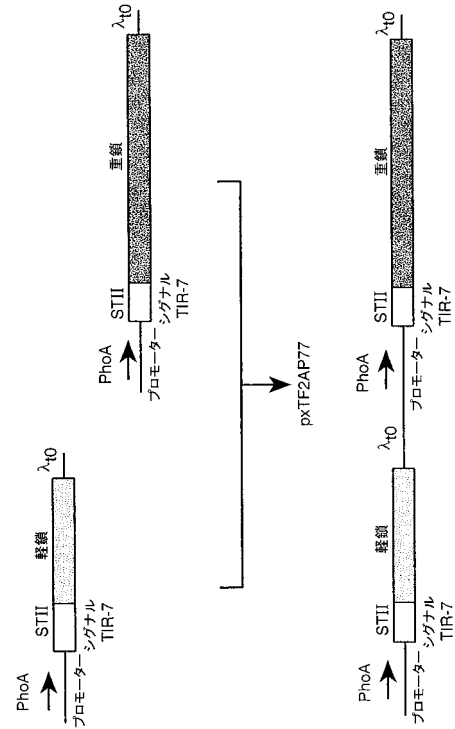
【図 5】



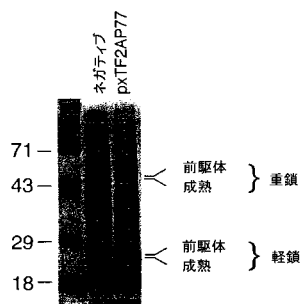
【図 6】



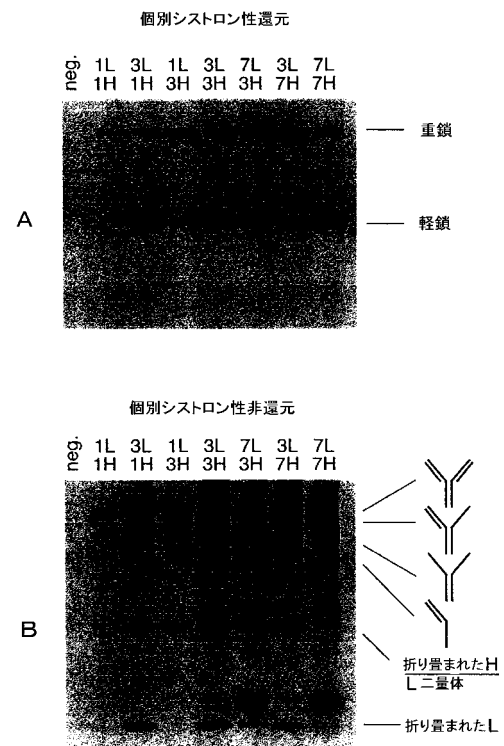
【図 7】



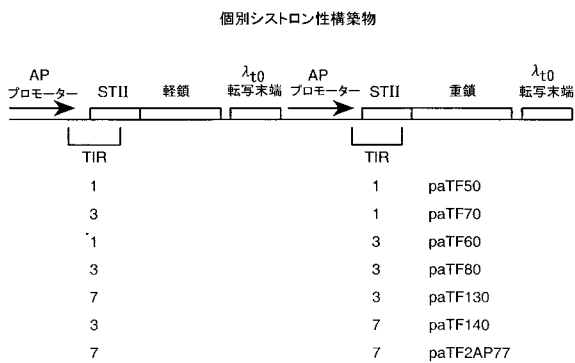
【図 8】



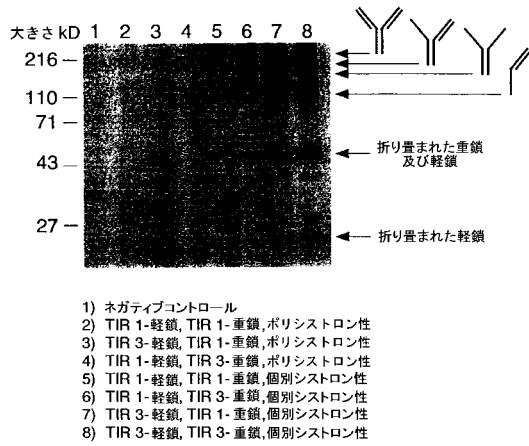
【図 10】



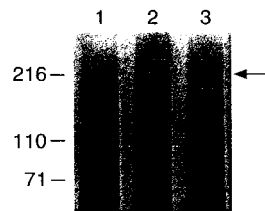
【図 9】



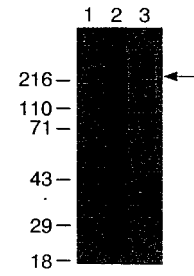
【図 1 1】



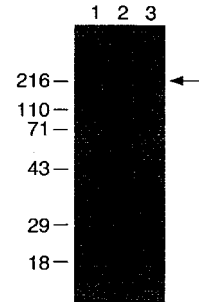
【図 1 2】



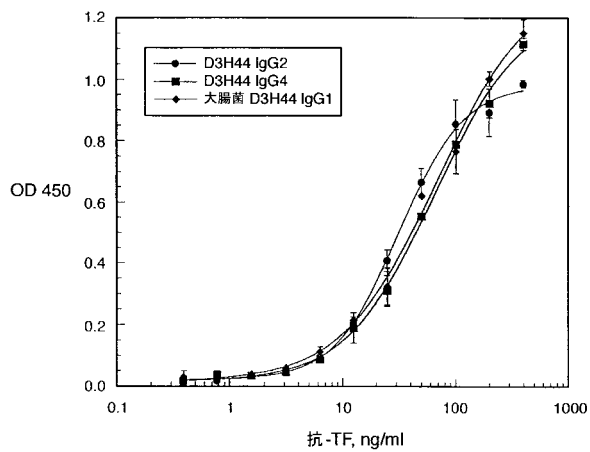
【図 1 3】



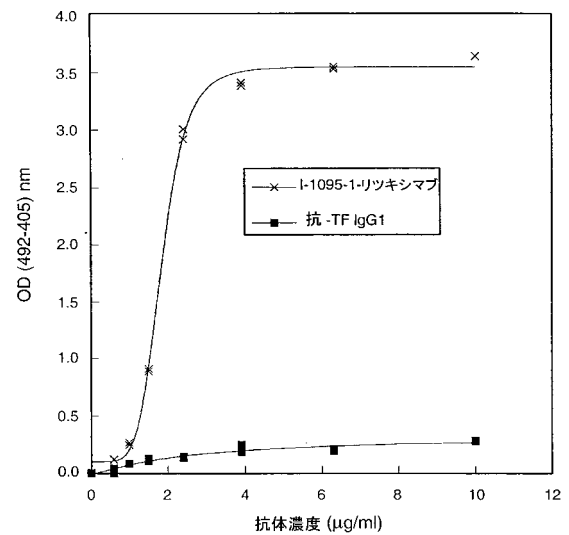
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



【図 20 b】

1201	CTGGGCTTGGC	GCCGCGGCGTT	TTTTATGTTT	GCCGCGCGCC	ATCTCGATG	ACCTGTGTGTC	CGAGTGTAGAA	GGTTTGGAGG	TTATCTGTAC	TGCGATGCTT
	GAGCCACACCG	CGGCGCGCGA	AAATACACAA	CGGCTGTGGG	TGGAGCTTAC	GGGCTGTGAC	GTCTCTCTCT	ATACGCTGTC	AGCTTACAGA	
1301	CGCCAGATGCG	CCGAAATATG	CCACACACG	CGGCTGTGAG	AGGTGAGTAC	GGGCTGTGAC	GGGCTGTGAC	CGAGATCCAG	CACTTCTGAC	CGAGTGTAGG
	GGTTTACAC	GGTTTCTACT	GGTTTCTACT	ACACTTCTCC	TGCTATCTCC	CGCGACATG	CTCATCTATG	GGCTACGCTC	GTAAGACACTG	CTGTGTATCC
1401	AGCTGTGCGG	CGATTACATG	AAGAGGTGTT	TGACGCTTCC	TGCTCTGTAA	AAAGTGTATC	TTTTCACAGG	GTGTGTATTA	GTGTGTACGG	CCGAGCTATT
	TGCGACGAC	CTGATGCTAT	AGCTGTGAT	ACTTGTGAG	AGGCTGTG	TTCTCATGTC	AGAGATGTTC	CTGATGTTCT	CTAGCTGTAT	
1501	TAGTGTGCTT	GTATTATATT	TTTATATGAT	TGTACATGAT	TACCGAGGTT	CACTGTAAAA	GGGATATGAC	AATATGATG	AGAGATATCG	CAATTCTCTT
	ATACGCGAA	CAAAAATATA	AAATATCACT	TACACTATAT	GTGCACTTCA	GTGCACTTCA	CCGATATATC	TTATTTATCT	TTTATATGAC	GTATGAGTAC
1601	TGCGATGCTG	TTGCTATATT	CTATATCTAG	TTTTCGCGAC	CGTACATGTC	CGTACATGTC	CGTACATGTC	CGGCTGTGTA	CGGCTGTGTA	CGGCTGTGTA
	ATGCTGTATC	ATGCTGTATC	GTATGAGTAC	TTTTCGCGAC	TTTTCGCGAC	TGCGATCTCT	CGACATCTCT	CGGCTGTGTA	CGGCTGTGTA	CGGCTGTGTA
1701	TTTCTCTGTC	CACTCTCTGCG	CTTCTATPMT	AGAGCTATCT	ACATGCTGTC	GGTCTCTGAG	GGTCTCTGAG	AGGCTCTGTA	AGGCTCTGTA	TTTCTCTGTC
	ATGCTGTATC	GTGCGATGAC	GAGTATGTA	TTTCTCTGTA	TTTCTCTGTA	TTTCTCTGTA	TTTCTCTGTA	TTTCTCTGTA	TTTCTCTGTA	TTTCTCTGTC
1801	CACTGTGCTG	GTGCGATGAC	TTATGCGATG	AGTTCTGAGA	CGTCTCTGTA	CGTCTCTGTA	CGTCTCTGTA	CGTCTCTGTA	CGTCTCTGTA	CGTCTCTGTA
	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
1901	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2001	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2101	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2201	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2301	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2401	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2501	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2601	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2701	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2801	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
2901	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3001	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3101	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3201	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3301	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3401	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3501	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3601	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3701	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC
3801	CGTCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC	GTGCTGTGTC					

【図 2 1 a】

[illegible]

【図 20 c】

2301.	TEFGACMAA ACACATGCTT 343 C D K K T	CCTACACATG GAGTGTGTAC H T C T	CCACACCTGC GGGTGACACG P P C P	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	MACTCTTGCG TTTGAGTGGC L L G	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
2401.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
2501.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
2571.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
2701.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
3101.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
3201.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I
3301.	TTCTGACGAC AGAGGAGGCT AGAGGAGGCT	CCCTGACGAC GAGTGTGTAC GAGTGTGTAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	ACCTACACAC ACCTACACAC ACCTACACAC	CCAGACCTGC GATTTGTGAC F A T T	GGACACCTCA CCCTGTGAGT G P S V	GTCTCTCTCT CAGAGAGAGT V F L F	TCTCCCTGAA AGGAGGAGTT P P K	TCCCTCCGAA AGGAGGAGTT P P K	ACCGACGACG TGGAGTGTAC P K D T	ACCTCATCA TGGAGTGTAC T L M I

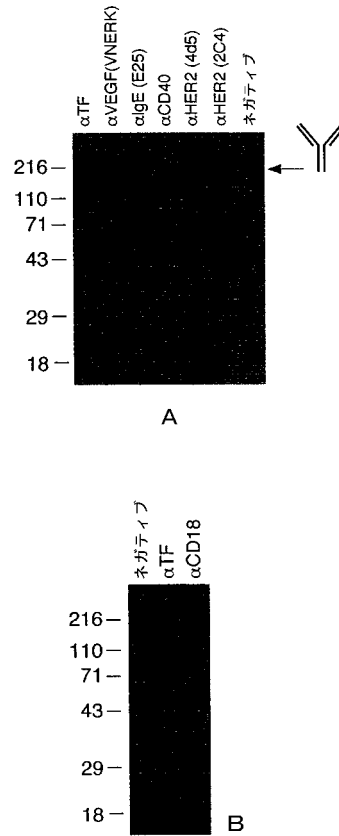
【図 2 1 b】

1201 CTGGCTGTGCG TTTTATGCTT GCGACGGCG ATCTCGGATG GCGAGTATGA GTTATGAGG GATCTGTGAC TGCATAGCTT
1301 GCGATCAAGS GCGCCCGGTA AATATACGA TATGAGGTAC TATACAGAGS GCGCTATCTT ATATGACATG ACCTGATGTA
GCGATCAAGS CGACACAGS CMAACAGS TGTATATAC AGTATAGGS GCGCTGTAC GAGTCTGAC CATCTCTGAC GAGTATGAG
GCGATTTAC GCGTGTGCTT GAGTGTGCC ATACTACTAC TCGATCTCC CCGAGTATG TTTCTATGCG GGTATAGTAC GAGTATGAG
1401 AGCTGTGTCG GCGTATGCTA AGAGATGATC TACAGATATC TCGATAGTA AAGTATGAT TTTCTATGCG GGTATAGTAC CCGAGTATG
CTTACAGAGC GTTATATGAT TTTCTATGAT ACTCTGTAGS AGCGTATAT TCGATATATC TACAGATATC TCGATAGTA AAGTATGAT
1501 TAGTGTGCTT TTTATGAT TTTATGAT TTTATGAT TCGACAGT TCGATATATC TCGATATATC TCGATATATC TCGATATATC
ATACAGGAAA CAAAATATTA AATATATCAT AACTATGATC ATCGCTGTCA ATCGCTGTCA GTGCATTTT
M K K N A F L L
1
TGCATCTAGT TCGCTGTGTT CTATCTCTAC AATCGCTAC GCTCAGGTTCT ACCTGTGTGA GTCGTGCGGT CTACCTATGCGT CTACCTATGCGT
ACGTATGATC ACGCAAAA GATAAGATG TTGTGAGTGC GCAATCTGAG TCGACATCTC CAGACCGGCA CCGGACACAG TCGTGTGCGC GATATAGAGA
10 A S H F V F S I A T N A Y A E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R
* 11 - 1025 重複
1101 TTSTCTGCGS GATGACTTGS CATGCTATGCG TCGCTATGAC AGCGTATGCG TGTATGATG CTGATCTGAC CAGGCTGTGA TCGATATGCG
ACAGAGACCG GTGCAAGGCG GTATGCTTAAG AGCGTATGCG CATATGATGCT CATATGATGCT CAGGCTGTGA TCGATATGCG TCGATATGCG
4301 CTTATACGGS TGAACGCG TATCTGTGGS ATTCTAAGS TCGTCTTATG TTTTCTTATG AACTCTTCA AAGCAGTGA TACTCTGTGA TGAACCTG
GATATGTGCC ACTGTGGS ATATGACGCC TAAATGTTC ACGAATATGA AAGAAATG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG ATGTGAGTCT ACTGTGTGA
77 Y T G E P T Y A D F K R T F S L T S T A Y L Q M S L
CGGCTGTGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG
1901 GCGGCTATGCG CTATATGATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG
GCGGCTATGCG CTATATGATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG TGTATATGCG
110 B A E D T A V Y C A K Y P Y Y Y G H W Y F D V W G Q G T L V
ACCTCTCTCT GCGCTCTGCG CAAAGCGTCA TCGCTCTTCC CCGTGTGCG CTCTCTCTGAG AGCACTGTC GGGGACGAG GAGCTCTGGC TCGCTGTGCA
TGCAGAGGA GCGAGAGGTG GTTCCGCGGT ACGAGAGG GAGACGCGGS GAGAGGTTC TGTGTGAGC CCGCTGTGAG CCGGACGAG CAGGACACTG
2001 AGCACTCTCT CCGGACAGCT TCGTCTGACA GCACTCTGAG TCCGCGGATC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC
143 T V S A S T K G P S V F P L A P S S K S G T A L G C L V K
12101 AGCACTCTCT CCGGACAGCT TCGTCTGACA GCACTCTGAG TCCGCGGATC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC
177 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
CTTCTCTGAG CAGTGTGATCA CTGTGCGTTC TACGATGTG GCGACACGGA CTAATATGCT CAACTGTGAT CAGACACAGCA GCGATACAGCA
2201 GAGCAAGTGC TGCACATGCT GATCTGAGTGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC TGTGTGAGC

【図 2 1 c】

2301 AAGTTGAGC CCAATCTTG TGAACAACT CACACATGCC CACGTGGGCC AGCACTGAAA CTCCTGGGGG GACCGTCACT CTCCTCTTC CCCCCAAGC
 TTCTACCTCG GTTTTAGAC ACTGTTTGA GTGTGTACGG GTGGACAGGG TCGTGGACCTT GAGGAGCCCC CTGGCAGTCA GAGGAGGAG GGGGGTTTGG
 243 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 L F P P K P
 2401 CMAAGCAC CTCATGATC TCCGAGACC CTGAGGTGAC ATGAGTGTGG GTGAGCTGAG GCACAGAGA CCTGAGGTG CCGTCACT AAGTTCACT GTTACGTGA
 GTTCTGNG GAGTACTAG AGGCTGNG GACTCCAGTG TAGCAGCAC CACTGTCACT CGGTGCTCT GGAATCTGAG TTAAGTTGA CCAATGACT
 K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D
 277 CAGGTGAG GTGATPAG CMAACAA GCGGCGGAG GAGCATACA ACAGACGTA CGGTGTGTC AGCTCTCA CGTCTCTCA CAGGACTGG
 GCGGACTTC CAGTATAC GTTCTGTTT CCGGCTTC CTGTCACT GTGTGCTGT TGTGTGCT GTGACACAG TCGAGAGGT GCGAGAGGT GTTCTGAC
 310 G V E V H N A K T K P R E Q Y N S T Y R V V S V L T Y L H Q D H
 2601 CTGAATGCA AGAGTACA GTGCAAGTC TCAACAAG CCCCACAG CCGATGAG AAACACTT CCAAGCCA AGGAGGCC CAGACACAC
 GACTTACCT TCTCATGTT CAGTTCAG AGGTGTTT GGGAGGTG GGGTGTGCT TTTGTGTA GTTTCGTT TCGGTGAG GTCTGTGG
 343 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
 2701 AGGTGAC CCGTCCCA TCCGGAAG AGATGACCA GAACAGCT AGCTGTGCTA AGCTTCTAT CCAAGGACA TCGCGTGA
 TCCATGNG GAGCGGGGT AGGCTCTT TCTACTGTT CTGTGTCAG TCGAGTCTA CAGACACTT TCGAAGATA GGTGCTGT AGCGTCACT
 377 V Y T L P S R E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
 2801 GTGGAGC AATGGCAC CAGACAA CMAAGAC AGCTCTCG TGTGTGCT CAGAGCTTC GTTCTCTCT ACAGCACT CACGTGAG
 CAGCTCTCG TTACCTGNG GCTCTGTT GAGTCTGNG TCGAGAGGC AGCACTGAG GTTGTGTA AGAGAGGA TGTGTGTA GTGCACTG
 410 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F L Y S K L T V D
 2901 AAGAGGT GCGAGAG GAGCTCTC TCACTGCT TCACTGCTA GCTGTGCTA AACTGCTA CCAAGAG CCACTGCTG TCTGAGTA
 TTCTGTCA CCGTCTCC CTTCAGAG AGTACAGC ACTACACT CCAAGAGT TGTGTGCT GCTGTCTG CCAAGAGC AGAGCTCA
 443 K S R W Q Q G N V F S C V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
 3001 AATAGCAT GAGGCTCT AGATGCTTA AGCTGCTT GCGCGGGC GTTGTGTT GTTACTCT GTTGTGCT GTTGTGCT GTTGTGCT GTTGTGCT
 TTATTCCTAC GCTGCGGA TCTAGGAT TCGAGCAA CAGGCGCG CCAAAATA CAATTGTA CAACTGCTA ATAGTCT ATTCGAAAT
 477 O
 3101 TCGGTGTT TATCAGTT AATGCTTA CCACTGAG CACGTGCT CACGTGCTA TCGTCACT CCGACACT CCGACACT CCGACACT
 ACCCATCA ATAGTCTA TTAAAGTT GGTCACTTC GTGCACTA CTTAGATG TTACGAGT AGCACTAG GCGTGTGAG TGGGACTAC
 3201 CTGTAGCAT AGCTTGTGTT ATCGGCTAC TCGCGGCT CTTCGGGT TCGGAGCT CCAAGACT CCAAGACT CCAAGACT CCAAGACT
 GATCTCTGA TCGAGCAA TAGGCTAG AGGCTCTG CAGGCTCTA GAGGCTCTA GAGGCTCTA GAGGCTCTA GAGGCTCTA GAGGCTCTA

【図 2 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
C 0 7 K 16/00 (2006.01) C 0 7 K 16/00
C 1 2 R 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19

(72)発明者 クリモウスキー, ローラ
アメリカ合衆国 ユタ 84103, ソルト レーク シティ, イースト セカンド アベニュー
474

(72)発明者 レイリー, ドロシア イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94112-3634, サンフランシスコ, マウント ベルノ
ン 334

(72)発明者 ヤンスラ, ダニエル ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, パシフィカ, カーメル アベニュー 330

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特開平08-116978 (JP, A)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1984年, Vol.81, p.3273-3277

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
C12P 21/08
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)