

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4450505号
(P4450505)

(45) 発行日 平成22年4月14日(2010.4.14)

(24) 登録日 平成22年2月5日(2010.2.5)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 C

C 0 7 K 16/12 (2006.01)

C 0 7 K 16/12

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 39/40 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 M

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 K 39/40

請求項の数 11 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-525563 (P2000-525563)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月22日(1998.12.22)
 (65) 公表番号 特表2003-521219 (P2003-521219A)
 (43) 公表日 平成15年7月15日(2003.7.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/027267
 (87) 国際公開番号 W01999/032645
 (87) 国際公開日 平成11年7月1日(1999.7.1)
 審査請求日 平成17年5月16日(2005.5.16)
 (31) 優先権主張番号 60/068,635
 (32) 優先日 平成9年12月23日(1997.12.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 09/215,163
 (32) 優先日 平成10年12月18日(1998.12.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC CRL-1794

(73) 特許権者 501497208
 ヘンリー エム. ジャクソン ファウンデ
 ーション フォー ザ アドバンスメント
 オブ ミリタリー メディシン
 アメリカ合衆国, メリーランド 2085
 2, ロックビル, スウィート 600, ロ
 ックビル パイク 1401
 (73) 特許権者 503149093
 サンオール モレキュラー コーポレーシ
 ョン
 アメリカ合衆国 33025 フロリダ州
 , ミラマー, ノース コンマース パーク
 ウェイ 2810
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 志賀毒素誘発性疾患を防御するヒト化モノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

志賀毒素 1 型 (S t x 1) タンパク質と結合する第 1 のモノクローナル抗体および志賀毒素 2 型 (S t x 2) タンパク質と結合する第 2 のモノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物であって、第 1 の抗体がヒト免疫グロブリン定常領域と、配列番号 19 および 21 に示す免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含み、第 2 の抗体がヒト免疫グロブリン定常領域と、配列番号 42 および 44 に示す免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含む、上記医薬組成物。

【請求項 2】

S t x 1 抗原と結合する第 1 のモノクローナル抗体および S t x 2 抗原と結合する第 2 のモノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物であって、第 1 の抗体の可変領域が A T C C 受託番号 C R L 1794 として寄託されたマウス 13C4 抗体の可変領域からなり、第 1 の抗体の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域からなり、第 2 の抗体の可変領域が A T C C 受託番号 C R L 1907 として寄託されたマウス 11E10 抗体の可変領域からなり、第 2 の抗体の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域からなる、上記医薬組成物。

【請求項 3】

第 1 または第 2 の抗体が I g G、I g A、および I g M からなる群より選択されるヒト定常領域を含む、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

10

20

第 1 または第 2 のモノクローナル抗体のヒト定常領域が I g G である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

第 1 または第 2 のモノクローナル抗体のヒト定常領域が I g G 1 - である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

製薬上許容される担体または希釈剤をさらに含んでなる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

腸出血性大腸菌 (E H E C) または他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる溶血性尿毒症症候群をもたらす感染症を治療または予防するための医薬の製造における、 S t × 1 タンパク質と結合する第 1 のモノクローナル抗体および S t × 2 タンパク質と結合する第 2 のモノクローナル抗体を含んでなる組成物の使用であって、第 1 の抗体がヒト免疫グロブリン定常領域と、配列番号 1 9 および 2 1 に示す免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含み、第 2 の抗体がヒト免疫グロブリン定常領域と、配列番号 4 2 および 4 4 に示す免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含む、上記使用。

10

【請求項 8】

E H E C または他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる溶血性尿毒症症候群をもたらす感染症を治療または予防するための医薬の製造における、 S t × 1 抗原と結合する第 1 のモノクローナル抗体および S t × 2 抗原と結合する第 2 のモノクローナル抗体を含んでなる組成物の使用であって、第 1 の抗体の可変領域が A T C C 受託番号 C R L 1 7 9 4 として寄託されたマウス 1 3 C 4 抗体の可変領域からなり、第 1 の抗体の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域からなり、第 2 の抗体の可変領域が A T C C 受託番号 C R L 1 9 0 7 として寄託されたマウス 1 1 E 1 0 抗体の可変領域からなり、第 2 の抗体の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域からなる、上記使用。

20

【請求項 9】

E H E C または他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる感染症を治療または予防するための医薬の製造における、 S t × 1 タンパク質と結合する第 1 のモノクローナル抗体および S t × 2 タンパク質と結合する第 2 のモノクローナル抗体の使用であって、第 1 の抗体がヒト免疫グロブリン定常領域と可変領域とを含み、該可変領域が配列番号 1 9 および 2 1 に示す免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域からなるか、または該可変領域が A T C C 受託番号 C R L 1 7 9 4 として寄託されたマウス 1 3 C 4 抗体の可変領域からなり、第 2 の抗体がヒト免疫グロブリン定常領域と可変領域とを含み、該可変領域が配列番号 4 2 および 4 4 に示す免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域からなるか、または該可変領域が A T C C 受託番号 C R L 1 9 0 7 として寄託されたマウス 1 1 E 1 0 抗体の可変領域からなり、前記感染症が溶血性尿毒症症候群をもたらす、上記使用。

30

【請求項 10】

第 1 または第 2 の抗体が I g G、I g A、および I g M からなる群より選択されるヒト定常領域を含む、請求項 7、8 または 9 に記載の使用。

【請求項 11】

40

第 1 または第 2 のモノクローナル抗体のヒト定常領域が I g G、好ましくは I g G 1 - である、請求項 10 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、米国仮出願第 60/068,635 号 (1997 年 12 月 23 日出願) に基づいて優先権を主張する。この仮出願は引用により本明細書中に含まれるものとする。

【0002】

政府の権利

本明細書中に記載の発明は、政府の目的のために製造、実施許諾、および使用に供される

50

場合、特許権者への使用料の支払いは不要とする。

【 0 0 0 3 】

発明の分野

本発明は、出血性大腸炎と生命を脅かす続発症である溶血性尿毒症症候群に関連する多ユニット細菌タンパク質のファミリーに関する。「志賀毒素ファミリー(Shiga toxin family)」のメンバーと定義されるこれらのタンパク質は、マウスモノクローナル抗体の単離および同定に利用されてきたものである。本発明はさらに、マウスの可変領域を含むヒト化モノクローナル抗体の構築に関する。本発明はまた、志賀毒素または志賀トキシソイドに対する抗体(モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の双方)、並びに病原性大腸菌によって引き起こされる疾患または感染症の治療、診断および予防における前記抗体の使用に関する。最後に、本発明は、志賀毒素ファミリーのタンパク質に対するヒト化モノクローナル抗体の調製に関する。

10

【 0 0 0 4 】

発明の背景

腸出血性大腸菌(EHEC)は、出血性の下痢または「出血性大腸炎」(HC)および溶血性尿毒症症候群(HUS)の食物による集団発生と関連がある(Spika, Jら, J. Pediatr., 109:287-291 (1986); Remis, R., Ann. Intern. Med., 101:624-626 (1984); Riley, Lら, N. Engl. J. Med., 308:681-685 (1983))。EHEC感染は死に至る場合もあり、EHEC感染症から重度の合併症を発症する可能性が最も高い若年者や高齢者に大きな脅威を与えている。過去数年間にわたりHCおよびHUSの集団発生や散発的発生が数件起こっており、このうち1993年の米国での集団発生が最も大きかった。この集団発生では、500件を超えるHCおよびHUSの症例が追跡調査され、Jack-in-the Boxファーストフードレストランのハンバーガーが汚染されていることを突き止めた(Centers for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep., 42:258(1993))。1996年の7月には、EHECの大規模な集団発生が日本で起こり、10,000人を超える感染者が発生し、8人が死亡した。日本の多くの子供たちは入院が必要であった。

20

【 0 0 0 5 】

主に、HCおよびHUSは、汚染食品、特に、ハンバーガーなどの熱処理が不十分な牛肉製品を摂取することによって伝染する(Doyleら, J. Appl. Environ. Microbiol. 53:2394 (1987); Samadpourら, J. Appl. Environ. Microbiol. 60:1038 (1994))。EHECはウシに広まっており、また熱処理を十分に行ったハンバーガーと熱処理が不十分なハンバーガーとを見分けることが難しいので、ファーストフードレストランに立ち寄ったり家庭でのバーベキューは悲惨な事態を招く場合がある。

30

【 0 0 0 6 】

HCおよびHUSはEHECおよびShigella dysenteriaeが産生する毒素によって媒介されるようである(概説は、O'Brien and Holmes, Microbiol. Rev., 51:206-220 (1987)を参照されたい)。これらの細菌は、1つのファミリーに属する近縁細胞毒素を産生する。本出願ではこれらをまとめて「志賀毒素(Shiga toxin)」と呼ぶことにする。志賀毒素(あるいは、「ペロ毒素」)は、細胞毒活性および腸管毒活性を有する(Strockbine, N.ら, Infect. Immun., 53:135-140 (1986))。

40

【 0 0 0 7 】

免疫学的に交差反応性を示さない点に基づいて、志賀毒素は2つのグループに分類されている(Strockbineら、前掲)。これらのグループは、志賀毒素1型(Stx1)および志賀毒素2型(Stx2)と呼ばれている。Stx1グループには、EHEC由来の始原型Stx1毒素並びにShigella dysenteriae 1型由来の志賀毒素が含まれる。近年、他のタイプの毒素が発見され、Stx2グループのメンバーとみなされている。これらは、Stx2e、Stx2cおよびStx2dである(Lindgrenら, Infection and Immunology, 61:3832 (1993); Schmitt, C.ら, Infect. Immun., 59:1065-1073 (1991); Marques, L.ら, FEMS Lett., 44:33-38 (1987))。

【 0 0 0 8 】

本出願では、用語「志賀毒素」には、志賀毒素およびStx1もしくはStx2グループの他の任

50

意の毒素またはこれらの変異体が含まれるものとする。略号「Stx」は毒素タンパク質自体を表すものとする。

【0009】

これらの毒素に曝された際の結果に関するこのような知見があるにも拘わらず、現在、HCまたはHUSに対する治療法やワクチンは知られていない。抗生物質には、細菌からの毒素放出を増加させて重度の合併症をさらに悪化させてしまうおそれがある。従って、志賀毒素によって生じるEHECの合併症を予防または治療するための化合物が求められている。このような化合物を使用して、感染患者を治療し、中枢神経系(CNS)、血液および腎臓に及ぼす毒素の全身作用を軽減することができる。さらに、毒素を中和することができれば、消化管中の細菌を死滅させるために抗生物質を安全に投与することができる。また、この

10

【0010】

志賀毒素の免疫学的交差反応性の知見からは、EHEC治療に対する薬理的なアプローチについて興味深い展望が得られる。現在、この疾患に対して使用できる予防薬または治療薬は知られていない。従って、当該技術分野には、志賀毒素に結合し得るモノクローナル抗体であって、これらの毒素の破壊的な作用を予防または軽減できるものを提供する必要性が存在する。また、当該技術分野では、このような抗体の結合部位に関するデータも必要であり、それにより、同様の能力を有する他の抗体を同定・単離できる。

20

【0011】

これに関連して、当該技術分野では、ヒト化モノクローナル抗体または他のヒト/マウスのキメラ・モノクローナル抗体も求められている。公知の研究では、マウス抗TNF(腫瘍壊死因子)モノクローナル抗体を投与された患者は、投与された抗体に対して抗マウス抗体応答を発現した(例えば、Exley A.R.ら, Lancet 335:1275-1277 (1990)を参照されたい)。治療レジメに対するこの種の免疫応答は、通常HAMA応答(ヒト抗マウス抗体の場合)と呼ばれ、治療の有効性を低下させ、治療を完全に無効にしてしまう場合すらある。ヒト化モノクローナル抗体またはヒト/マウスのキメラ・モノクローナル抗体は、HAMA応答を有意に低下させ、かつ治療の有効性を向上させることが分かっている(LoBuglioら, P.N.A.S. 86:4220-4224, 1989年6月)。

30

【0012】

発明の概要

当該技術分野におけるこれらの要求を満たすため、本発明者らは、志賀毒素1および志賀毒素2に対するヒト化マウスモノクローナル抗体を提供する。さらに、本発明では、志賀毒素の中和に係る可変領域、並びに可変領域の特定の相補性決定領域(CDR)を記載する。本発明は特に、マウスモノクローナル抗体13C4および11E10から誘導されるヒトモノクローナル抗体であって、Stx1およびStx2とそれぞれ特異的に反応するものを提供する。

40

【0013】

別の態様では、本発明は、志賀毒素誘発性疾患を予防または治療する医薬組成物、およびこのような組成物を用いる治療方法を包含する。

【0014】

上述の一般的な記載と以下に述べる詳細な記載は、双方とも例示と説明を行うものであり、特許請求の範囲に記載の本発明を詳細に説明することを意図していることは理解されるべきである。

【0015】

添付の図面は、本発明の理解を深めるためのものであり、本明細書に含まれ、その一部を構成するものである。図面には本発明の複数の実施形態を例示し、記載と併せて本発明の原理を説明するのに役立つ。

50

【0016】

本発明のさらなる特色および利点は、以下の説明において記載される。本発明の目的および他の利点は、本明細書に記載された説明および特許請求の範囲ならびに添付された図面において特に指摘された組成物および方法により実現され、達成されるであろう。これらの、および他の利点を達成するために、ならびに具体化されかつ広範に記載された本発明の目的に従って、本発明は、志賀毒素タンパク質に結合するヒト化モノクローナル抗体を記載するものである。

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、志賀毒素タンパク質と結合するヒト化モノクローナル抗体、志賀毒素が引き起こす疾患の治療または予防における前記抗体の使用に関する。抗体は2本のH鎖と2本のL鎖から構成されるタンパク質様構造をしている。高等脊椎動物の抗体は、そのH鎖（それぞれ μ 、 δ 、 γ 、 α 、 ϵ ）により5つの異なるクラス、すなわちIgM、IgD、IgG、IgA、IgEに区別される。各クラスはさらにサブクラスを有し、例えば、IgGはIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4であることができ、その場合にH鎖はそれぞれ 1、 2、 3または 4となる。これらのクラスまたはサブクラスにおけるL鎖の対は または のいずれかでありうる。

10

【0018】

抗体はさらに定常領域と可変領域とに二分される。H鎖とL鎖の双方において、そのカルボキシ末端側が定常配列領域を構成しており、そのアミノ末端側が可変配列領域を含んでいる。これらの可変領域内に相補性決定領域（CDR）が存在し、この領域は主として抗体に特徴的な、観察される抗原結合に関与している。

20

【0019】

「ヒト化」モノクローナル抗体は、もともとは非ヒト起源であるが、ヒト成分が代わりに使用されているモノクローナル抗体を意味する。好ましい実施形態において、本発明のヒト化モノクローナル抗体は、非ヒト起源に由来する可変領域とヒト起源に由来する定常領域を含むものである。

【0020】

上述したように、志賀毒素タンパク質（Stx）は、志賀毒素により誘発される疾患の集団発生と関係があるEHECおよびShigella dysenteriaeにより産生される多ユニット細菌タンパク質のファミリーをさす。志賀毒素タンパク質は、Shigella dysenteriae-1型のStxおよび大腸菌（E. coli）のStx1型および2型、および2型変異体毒素を包含するものとする。

30

【0021】

志賀毒素が引き起こすヒト疾患としては、出血性下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群、および血栓性血小板減少性紫斑病が挙げられる。

【0022】

より特定した実施形態において、本発明は、少なくとも2つの明確に特徴づけられたマウスモノクローナル抗体と同様の結合特異性を有するヒト化モノクローナル抗体に関する。これら2つのモノクローナル抗体は、Strockbine, N.A.ら, Infection and Immunity, 1985, 50:695-700およびPerera, L.P.ら, J. Clinical Microbiol., 1988, 26:2127-2131に記載されるようにAlison O'Brien博士の研究所において開発されたものであり、以下に示すとおりATCCに寄託されている。

40

【0023】

「同様の結合特異性」とは、毒素結合と適切な対照（例えば、図9および図11参照）により示されるような非特異的バックグラウンド結合とを区別するための標準的な結合アッセイにおいて十分に検出可能な結合レベルをいう。当業者であれば、ルーチンな技能および技術を用いて結合レベルを容易に試験することができる。

【0024】

別の好ましい実施形態において、ヒト化抗体はその構造特性によって特徴づけられる。こ

50

の実施形態の一面では、定常領域がヒト定常領域であり、可変領域がげっ歯類、好ましくはマウスに由来するものである。次のものに限定されるものではないが、本明細書中、特に図3および図6に示した4つの可変領域が好適である。当然、本発明は、例示した可変領域に関連する特徴的な結合を認めうるほどに低下させない修飾（すなわち、欠失、付加および置換）を含むものである。

【0025】

さらに別の実施形態において、本発明では可変領域のCDRが使用される。上記のように、CDRはL鎖とH鎖の両方の可変領域に存在し、抗原の結合に関与している。CDR領域は当業者によって容易に決定され得るため、本発明は具体的に示されたCDRに限定されない。実際、本発明者らにより作製された、以下で詳述するベクターは、志賀毒素に対する非ヒト抗体のどのようなCDRとともに使用するにも十分なものである。

10

【0026】

本発明の最も好ましい実施形態においては、ヒト化モノクローナル抗体の定常領域がIgG1 - に由来し、その可変領域が図3および図6に示した配列の全部または一部に由来する。更なる実施形態において、本発明はまた、これらのヒト化モノクローナル抗体をコードする発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【0027】

最後に、本発明は、これらのヒト化モノクローナル抗体を用いて志賀毒素産生菌による感染症を治療または予防するための医薬組成物ならびに方法を包含する。医薬組成物として、本発明は当分野で公知の希釈剤および担体、例えば患者に投与するのに適した食塩水、ショ糖溶液を含むが、これらに限定されない。本明細書中で用いる「患者」とは、イヌ、ウマ、マウスなどの感受性哺乳動物をさすが、特に好ましくはヒトのことである。

20

【0028】

本発明はさらに、治療上有効な量の、または予防上有効な量の本発明のヒト化モノクローナル抗体を投与することを包含する。当業者には理解されるように、治療上有効な量はEH EC介在HUSに関係する浮腫、血小板減少および尿毒症を軽減する用量である。同様に、予防上有効な量は曝された個体がこれらの症状を発現するのを防止する用量である。

【0029】

以下の実施例は本発明の特定の実施形態を例示するものである。

【0030】

30

抗Stx1抗体13C4のヒト化

以下の実施例1～3は、抗Stx1抗体13C4、およびそのヒト化相当物であるH13C4に関する。

【0031】

実施例1 . 13C4可変領域cDNAのクローニング

「13C4」抗体(抗Stx1)を産生するハイブリドーマ細胞は、1987年12月2日に、American Type Culture Collection, Rockville, MDに、受託番号CRL 1794として寄託され、ATCCから、または我々のようにAlison O'Brien博士から入手可能である(ハイブリドーマ作製の詳細については、Strockbine, N.A.ら, Infection and Immunity, 50:695-700 (1985)を参照のこと)。バイアル中の細胞を融解し、10% FBS(Irvine)を添加したIMDM(Mediatech)完全培地に再懸濁した。

40

【0032】

Midi RNA単離キット(Qiagen)を製造元の手順に従って用いて、 1×10^7 の「13C4」細胞から全RNAを単離した。このRNAを、0.03 U/ μ gプライマーRNA分解酵素阻害剤(5' -3')を含む10 mM Tris、0.1 mM EDTA(pH 8.4)に、最終濃度0.25 μ g/ μ lまで溶解した。

【0033】

図1は、可変領域遺伝子フラグメントをクローニングする戦略を示し、図2は、使用するオリゴヌクレオチドプライマーを一覧している。製造元の手順に従い、Superscript II-MLV逆転写酵素(Life Technologies)、ならびにマウス (oKA57、配列番号57)およびマウスCH1(JS300、配列番号6)特異的プライマー法を用いて、「13C4」全RNA(2 μ g)をcDNAに

50

変換した。次に、第1の鎖cDNA合成生成物を、膜型濃縮器(concentrator device)(Amicon Centricon 30またはMillipore UltraFree 15)を用いて精製した。回収したcDNAのうち、3 µlをPCR用の鋳型DNAとして使用した。典型的なPCR増幅反応液(100 µl)は、鋳型DNA、50 pモルの適切なプライマー(L鎖のためには、JSS9、JSS10、JSS11、JSS12、JS153およびJSS154-配列番号9~12; H鎖のためには、JSS1、JSS2、JSS3、JSS4、JSS8およびoKA-143-配列番号1~5および配列番号15)、2.5単位のExTaqポリメラーゼ(Pan Vera)、1 × ExTaq反応緩衝液、200 µM dNTP、ならびに2 mM MgCl₂を含んだ。初回インキュベーションを96にて1分間行って、それぞれの鋳型を変性させた。40または50回の熱サイクル(59~72にて30秒、72にて30秒、そして96にて1分、ならびに最後の72にて5分の伸長ステップ)によりH鎖生成物を増幅した。6回の熱サイクル(46、48または54にて30秒、72にて30秒、そして96にて1分)、その後の35回のステップサイクル(60にて1分、96にて1分、ならびに最後の72にて5分の伸長ステップ)によりL鎖生成物を増幅した。Wizard PCR精製システム(Promega)を製造元の手順に従って使用して、好結果の反応液から得たPCR生成物を精製した。

【0034】

次いで、H鎖およびL鎖PCR生成物(約400bp)を、細菌ベクターにクローニングしてDNA配列決定した。製造元の手順に従い、1:1、3:1および5:1のインサート対ベクターモル比にて、PCRフラグメントを、pCR2.1 T/A型(style)クローニングベクター(Invitrogen)にライゲートした。各ライゲーション反応液の半分を使用して、コンピテントXL1 Blue細胞を形質転換した。

【0035】

診断用制限酵素消化物をEcoRI(New England Biolabs)とともに用いて、DNAインサートを含むH鎖プラスミドクローンを同定した。次に、適切な大きさ(400 bp)のインサートを含むプラスミド(tKMC217B)のDNA配列を決定した。H鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列を図3に示す。

【0036】

L鎖PCR生成物は、違う方法で同定した。マウス脾細胞をSP2/0ミエローマ細胞系と融合させることによって、「13C4」抗体を発現するハイブリドーマ細胞系を作製した。SP2/0細胞系は、L鎖については偽遺伝子を転写する。偽遺伝子転写体は、RT-PCRによりcDNAに変換すると、AflIII制限部位を含む。L鎖候補クローン(tKMC226および227)を、製造元の手順を用いてAflIII(New England Biolabs)で消化して、適切な大きさのインサート(403bp; これらの生成物にはAflIII部位は存在しない)を含むクローンを同定した。L鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列は図3に示す。図中、CDRは下線を引いて示す。

【0037】

実施例2. 発現ベクターtKMC249Aの構築

次に、H鎖およびL鎖可変領域を、哺乳動物発現プラスミドベクターにサブクローニングして、組換えキメラマウス/ヒト抗体分子を産生した。このベクターは、CMV転写プロモーターの制御下で組換え抗体分子を産生する。H鎖分子は、可変領域配列をヒトIgG1定常ドメインに直接融合する直接cDNA構築物である。一方、L鎖分子は、可変領域をコードするフラグメントの3'側にマウスイントロン領域を有する。スプライシングの後、可変領域は、ヒト定常領域エキソンに融合される(図4)。哺乳動物細胞中のベクターのための選択マーカーは、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(neo)であり、薬剤G418(Cell Tech)を用いる。

【0038】

A. 発現ベクターの作製

H鎖およびL鎖発現ベクターを作製するためには、DNAフラグメントライゲーションステップおよび部位特異的突然変異誘発ステップを必要とした。CMVプロモーターに制御される転写により、両方の抗体鎖を発現するベクターが得られた。ネオマイシン耐性は、哺乳動物細胞のトランスフェクションについての優位な選択マーカーとして作用する。また、これらのベクターは、EcoRV/BstBIフラグメントとして任意のL鎖可変領域を、NruI/EcoR

10

20

30

40

50

Iフラグメントとして任意のH鎖可変領域を、およびEcoRI/NotIフラグメントとして任意のH鎖定常ドメインを簡便にクローニングできるように設計された。これらの制限部位は、ヒトおよびマウス可変領域において(たとえあったとしても)めったに存在しないために選択された。マウスJ領域/イントロンフラグメントはヒトエキソンに融合されて、転写後のスプライシングによりマウスヒトキメラL鎖が生成される。最後に、ベクターから全抗体発現カセットを切出す(BglII/NheI)ことが容易になるようにベクターは設計された。該発現カセットは、BamHI/NheIで切断された別のベクターにライゲートされ、両方の鎖のための機構(apparatus)を有する発現ベクターが作製された。

【0039】

ベクターのバックボーンとして、プラスミドpCDNA3(Invitrogen)を用いた。このプラスミドを、HindIII/XhoIで切断し、「L鎖ポリリンカー」DNAフラグメントを挿入して、開始「L鎖ベクター」pCDNA3.LCPLを作製した(図12を参照)。このリンカーは、後続するクローニングステップを容易にするために、制限部位HindIII、KpnI、ClaI、PmlI、EcoRV、XmaI、BamHIおよびXhoIを含んだ。L鎖リーダー、マウス抗CKMB L鎖ゲノムフラグメントおよび3' UTRを含むSmaI/BclI DNAフラグメントを、pCDNA3.LCPLのEcoRV/BamHI部位にクローニングした。このフラグメントに含まれるマウスイントロン、エキソンおよび3' UTRは、Richard Near博士(Near, R.I.ら, 1990, Mol. Immunol. 27:901-909)から入手したLCPXK2に由来した。その後、突然変異誘発を行い、NruI(209)、MluI(229)およびBstBI(2962)を除去し、NheI(1229)およびBamHI(1214)部位を導入して、プラスミドpCDNA3mut.LCP L.LCVKを作製した(図12を参照)。

【0040】

第2の「H鎖ベクター」であるpCDNA3mut.HCPLは、pCDNA3mut.LCPL.LCVKプラスミドから、L鎖発現領域(HindIII/XhoI)を制限部位HpaI、BspEI、EcoRV、KpnIおよびXhoIからなる「H鎖ポリリンカー」と置き換えることによって構築した。このプラスミドを、EcoRVおよびKpnIで消化した。次に、H鎖リーダーおよび抗CKMB IgG2bマウスH鎖ゲノムフラグメントを含むSmaI/KpnIで消化したDNAフラグメントを、EcoRV/KpnIで消化したプラスミドにライゲートした。その後、3' UTR、およびSalI部位の上流にあるNotIを含むKpnI/SalIオリゴヌクレオチドフラグメントを、KpnI/XhoIで消化したプラスミドにクローニングし、(XhoI部位をロックアウトし)、プラスミドpCDNA3mut.HCPL.HCV2bを作製した(図13を参照)。

【0041】

次いで、ヒトL鎖定常ドメインを、EcoNI/XhoIフラグメントとしてpCDNA3mut.LCPL.LCVKにクローニングし、プラスミドtKMC180C2を生成した。ヒトIgG1定常ドメインを、EcoRI/NotIフラグメントとしてpSUN10にクローニングし、プラスミドpJRS313を作製した。13C4の可変領域を、(上述したように)これらの2つのベクターにクローニングした。次いで、ヒトH鎖ベクターtKMC229C由来のBglII/NheIフラグメントを、BamHI/NheIで切断したヒトL鎖ベクターtKMC231Dにクローニングして、tKMC249を作製した(図4を参照)。

【0042】

B. 可変領域の発現ベクターへのサブクローニング

発現ベクターにクローニングするフラグメントに適合したプライマーを用いたPCRにより、可変領域遺伝子フラグメントを再度増幅した(図2および4を参照)。H鎖順方向プライマー(oKA143、配列番号15)は、H鎖リーダーのC末端をコードする5'端、およびクローニングのためのNruI制限部位を含む。一方、H鎖逆方向プライマー(oKA144、配列番号14)はクローニングのための3' EcoRI制限部位を加える。L鎖順方向プライマー(oKA145、配列番号16)は、クローニングのために、L鎖可変領域のN末端においてEcoRV制限部位を導入する。一方、L鎖逆方向プライマー(oKA146、配列番号17)は、連結する領域-エキソンスプライス部位のための3' DNA配列、続いてクローニングのためのBstBI制限部位を加える。

【0043】

PCR反応は、上述した試薬、およびPvuI(New England Biolabs)で消化されたプラスミド1

10

20

30

40

50

～ 2 ngを鋳型として用いて行った。これらの鋳型はそれぞれ、96 にて1分の初回インキュベーションにより変性した。H鎖生成物を、35回の熱サイクル(55または60 にて30秒、72 にて30秒、そして96 にて1分、ならびに最後の72 にて5分の伸長ステップ)により増幅した。L鎖生成物を、8回の熱サイクル(55または60 にて30秒、72 にて30秒、そして96 にて1分)、ならびにその後30回のサイクル(60 にて1分、96 にて1分、ならびに最後の72 にて5分の伸長ステップ)により増幅した。

【 0 0 4 4 】

Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元の手順に従って使用して、13C4 H鎖PCR生成物(約400bp)を精製し、続いてNruIおよびEcoRI(New England Biolabs)で消化した。消化したPCR生成物は、Wizard PCR精製システム(Promega)を製造元の手順に従って使用して精製し、NruI/EcoRIで消化し、かつゲル精製したpJRS313にライゲートして、プラスミドtKMC229Cを得た(図4を参照)。この構築物において、H鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列、および制限部位の適切なスプライシングを確認した。

10

【 0 0 4 5 】

Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元の指示に従って用いて13C4 L鎖PCR生成物(約350bp)を精製し、その後EcoRVおよびBstBI(New England Biolabs)で消化した。消化したPCR生成物は、Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元の手順に従って使用して精製し、(上述したように)EcoRV/BstBIで消化かつゲル精製されたtKMC180C2にライゲートし、プラスミドtKMC231Dを得た(図4を参照)。この構築物において、L鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列、および制限部位の適切なスプライシングを確認した。

20

【 0 0 4 6 】

実施例3．組換えキメラマウス/ヒト13C4抗体の安定した作製

A．NSO細胞のトランスフェクション

プラスミドtKMC249Aを、PvuI(New England Biolabs)で直線化した後に、エレクトロポレーションを用いて、NSO細胞(Baxter International, Inc., Durante, CA)にトランスフェクトした。40 µgの消化されたプラスミドを、0.4cmのキュベット中の 1×10^7 細胞と総容量800 µlとして混合し、250mA、960 µFのパルスにかけた。24時間後、細胞を、96ウエル組織培養プレートにプレートアウトし(200 µl/ウエルで6プレート)、37 にて、10% CO₂下でインキュベートした。コロニーが現れたら、「ヒト化」抗体の産生、および発現抗体がStx1と結合する能力について上清をアッセイした。

30

【 0 0 4 7 】

B．抗体産生についてのアッセイ

安定したトランスフェクト体についての抗体産生および活性アッセイを、以下に記載するように行った。これらのアッセイは、上記プラスミド構築物を用いた細胞のトランスフェクションにより、ヒト化キメラバージョンの13C4マウスハイブリドーマ抗体(H13C4と名称)を産生する安定な細胞系が生成されることを示す。

【 0 0 4 8 】

Tris-HCl被覆バッファー(pH8.5)を用いたヤギ抗ヒトIgG抗体(Pierce or Biodesign International)の1:500希釈液で被覆された96ウエルマイクロタイタープレート(Maxisorp F8; Nunc, Inc.)から得た8ウエルストリップ(strips)において、抗体産生ELISAアッセイを行った。プレートを覆い、4 にて一晩インキュベートした。次いで、プレートを、洗浄貯蔵バッファー(wash storage buffer)(Tris-HCl/NaCl/0.1% NaN₃)で一度洗浄した。次に、50 µlの培養上清を、50 µlのサンプル/コンジュゲート希釈液(Tris-HCl/NaCl/ゼラチン/Tween-20)をあらかじめ充填した各ウエルにアプライした。プレートを、回転装置上で、30～60分間室温にてインキュベートした。次いで、これらを洗浄溶液(イミダゾール/NaCl/Tween-20)で3回洗浄した。ヤギ抗ヒト -HRP(Southern Biotechnologies)コンジュゲートを、サンプル/コンジュゲート希釈液で1:250に希釈し、100 µlをウエルに加えた。プレートを、回転装置上で、30～60分間室温にてインキュベートした。洗浄バッファーを用いて6回洗浄し、100 µL/ウエルのABTS発色基質(Kirkgaard and Perry Laboratories)で8分間室温にてインキュベートした。100 µL/ウエルの希釈消光(Quench)バッファー(Kirkgaard

40

50

d and Perry Laboratories)で反応を停止した。自動マイクロタイタープレートELISAリーダー(Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermont)を使用して、405nmでの吸光度を測定した。ELISAアッセイにおける対照は、ヒトIgG1K骨髓腫タンパク質(Biodesign International)、およびトランスフェクトされていないNS0細胞から回収した上清を用いた。上記アッセイ(図8を参照)は、上記プラスミド構築物を用いた細胞のトランスフェクションにより、細胞が、ヒトH鎖(IgG)およびL鎖()ドメインの両方を含む分子を生成することを示す。

【0049】

次に、発現された抗体がStx1タンパク質に結合する能力について、上清をELISAによりアッセイした。活性アッセイは、Alison O'Brienから入手した(または実施例7に記載のようにして得た)約0.1 µg/ウエルの精製Stx1で被覆された96ウエルマイクロタイタープレート(Maxisorp F8; Nunc, Inc.)から得た8ウエルストリップにおいて行った。プレートの被覆、およびELISA法は、発色基質のABTSをTMB(Kirkgaard and Perry Laboratories)に置換えた以外は、上記抗体アッセイと同じように行った。450nmにおける吸光度を、自動マイクロタイタープレートELISAリーダー(Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermont)を使用して測定した。陽性対照として元のマウスモノクローナル抗体13C4を使用し、1:2000で希釈したヤギ抗マウスIgGコンジュゲート(Jackson Laboratories)を用いてアッセイした。このアッセイ(図9を参照)は、上記プラスミド構築物を用いて細胞をトランスフェクションすると、細胞が、Stx1に結合する免疫グロブリンを産生することを示す。抗Stx可変領域を欠くマウスIgG1KおよびヒトIgG1Kの両方とも、毒素を結合しなかった。

【0050】

EHEC抗Stx2抗体：11E10のヒト化

以下の実施例4～7は、抗Stx2および-Stx2変異抗体11E10、ならびにそのヒト化カウンター構造H11E10に関する。

【0051】

実施例4：11E10可変領域cDNAのクローニング

「11E10」抗体(抗Stx2)を産生するハイブリドーマ細胞系は、1990年8月1日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, MD)に、受託番号CRL 1907として寄託され、ATCCから、または本発明者らのようにAlison O'Brien博士から入手可能である(ハイブリドーマ作製の詳細については、Perera, L.P.ら, J. Clinical Microbiol., 26:2127-2131 (1988)を参照のこと)。バイアル中の細胞系を融解し、血清を含まない培地で洗浄し、10% FBS(Irvine)を添加したIMDM(Mediatech)完全培地に再懸濁した。

【0052】

RNeasy RNA単離キット(Qiagen)を製造元の手順に従い用いて、 1×10^7 の「11E10」細胞から全RNAを単離した。このRNAを、0.03 U/µgプライマーRNA分解酵素インヒビター(5'-3')を含む10 mM Tris、0.1 mM EDTA(pH 8.4)に、最終濃度0.63 µg/µlまで溶解した。

【0053】

図1は、可変領域遺伝子断片をクローニングする概略を示し、図5は、使用するオリゴヌクレオチドプライマーを挙げている。Superscript II-MMLV逆転写酵素(Life Technologies)を製造元の手順に従い用いて、「11E10」全RNA(2.5 µg)をcDNAに変換した。マウスL鎖(JS153、JS154、配列番号11および12)ならびにマウスH鎖(JS300、配列番号6)を特異的プライマーとして使用した。次に、第1鎖cDNA合成生成物を、Centricon-30濃縮器(Amicon)を用いて精製した。回収した70 µlのcDNAのうち、3.5 µlをPCR用の鋳型DNAとして使用した。典型的なPCR増幅反応液(100 µl)は、鋳型DNA、50 pモルの適切なプライマー(L鎖のためには、JS153、JS154およびJS009、JS010、JS011、JS012、配列番号7～12; H鎖のためには、JS160、JS161、JS162およびJS001、JS002 JS003 JS004 JS008、配列番号28～30、配列番号2～5)、2.5単位のExTaqポリメラーゼ(Pan Vera)、1 × ExTaq反応バッファー、200 µM dNTP、ならびに2 mM MgCl₂を含む。初めにインキュベーションを96 °Cにて5分間行って、鋳型を変性させた。生成物を、35回の熱サイクル(96 °Cにて1分、55 °Cにて30秒、72 °Cにて30秒)、その後72 °Cにて5分処理することにより増幅した。WizardPCR精製システム

(Promega)を製造元の手順に従って使用して、好結果の反応液から得たPCR産物を精製した。

【 0 0 5 4 】

次いで、H鎖PCR産物(約400bp)およびL鎖PCR産物(約350bp)を、細菌ベクターにクローニングして、DNA配列決定した。製造元の手順に従い、3:1のインサート対ベクターモル比にて、PCR断片を、pCR2.1 T/A型クローニングベクター(Invitrogen)にライゲートした。2 μ lのライゲーション反応液を使用して、製造元の手順に従いINV⁻ F⁺ コンピテント細胞(Invitrogen)を形質転換した。EcoRI(New England Biolabs)を用いた診断制限酵素消化物を用いて、DNAインサートを含むプラスミドクローンを同定した。その後、適切な大きさ(400 bp)のH鎖インサートを含むプラスミドのDNA配列を決定した。11E10のH鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列は図6に示す。CDRは下線を引いて示す。

10

【 0 0 5 5 】

「11E10」抗体を発現するハイブリドーマ細胞系はマウス脾細胞をSP20骨髓腫細胞と融合して作製されるため、L鎖プラスミドクローンはさらに特徴づけする必要がある。SP20細胞系は、L鎖の偽遺伝子を転写する。偽遺伝子転写産物は、RT-PCRによりcDNAに変換すると、AflIII制限部位を含む。これにより、L鎖可変領域のためのプラスミドクローンをAflIIIで消化し、切断されなかった産物をその後DNA配列決定に供した。L鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列は図6に示し、CDRは下線を引いて示す。

【 0 0 5 6 】

発現ベクターにクローニングする断片に適合したプライマーを用いるPCRにより、可変領域遺伝子断片を再度増幅した(図5および7を参照)。H鎖順方向プライマー(11E10HF、配列番号37)は、H鎖リーダーのC末端をコードする5'端、およびクローニングのためのNruI制限部位を含む。一方、H鎖逆方向プライマー(11E10HB、配列番号38)はクローニングのための3' EcoRI制限部位を加える。L鎖順方向プライマー(11E10LF、配列番号39)は、L鎖リーダーのC末端をコードする5'端、およびクローニングのために、L鎖可変領域のN末端においてEcoRV制限部位を含む。一方、L鎖逆方向プライマー(11E10LB、配列番号40)は、連結する領域-エキソンスプライス結合部位のための3' DNA配列、そして続いてクローニングのためのBstBI制限部位を加える。96 にて5分間のインキュベーションの後、PCRパラメータが30回の熱サイクル(96 にて1分、62 にて30秒、および70 にて30秒)ならびに72 にて5分の処理であったこと以外は、PCRを上述したように行った。

20

30

【 0 0 5 7 】

その後、H鎖可変領域PCR産物を、哺乳動物発現プラスミドベクター(pJRS315、以下の実施例5に記載するように作製)にサブクローニングして、組換えキメラマウス/ヒト抗体分子を作製した。得られたベクタークローンはpACE1と称した。L鎖可変領域は、哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする前に、上述したようにpCR2.1T/A型クローニングベクターにサブクローニングした。得られたプラスミドはpACELCと称し、BstBI/EcoRVで消化して、L鎖可変領域を切り出した。その後、可変領域を、「11E10」H鎖可変領域(pACE1)を含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。最終的な発現ベクタークローンをpACE4と称した。このベクターは、CMV転写プロモーターの制御下で組換え抗体分子を産生する。H鎖分子は、可変領域配列をヒトIgG1定常ドメインに直接融合する直接cDNA構築物である。一方、L鎖分子は、可変領域をコードするフラグメントの3'側にマウスイントロン領域を有する。スプライシングの後、可変領域は、ヒト定常領域エキソンに融合される(図7を参照)。哺乳動物細胞におけるベクターのための選択マーカーは、ネオマイシン(G418)である。

40

【 0 0 5 8 】

pACE1の生成のために、「11E10」H鎖PCR産物(約400bp)をNruIおよびEcoRI(New England Biolabs)で消化し、Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元が指示するように使用して精製し、そしてNruI/EcoRIで消化かつゲル精製されたpJRS315にライゲートし、プラスミドpACE1を得た(図7を参照)。

【 0 0 5 9 】

50

「11E10」L鎖PCR産物(約350bp)を、製造元の指示に従ってT/Aクローニングベクターにクローニングした。得られたクローンであるpACELCを、EcoRVおよびBstBI(New England Bio labs)で消化し、L鎖フラグメントをゲル精製した。次に、このフラグメントを、EcoRV/BstBIで消化かつゲル精製されたpACE1にライゲートして、プラスミドpACE4を得た(図7を参照)。H鎖およびL鎖可変領域の配列を、哺乳動物細胞トランスフェクションの前に確認した。

【0060】

実施例5 . 発現ベクターpJR315の構築

プラスミドpJR315は、その中に11E10抗体の可変部がクローニングされた発現プラスミドである。このプラスミドは、抗体可変領域コード情報を含有しない基本発現ベクターであるプラスミドpSUN15の誘導体であり、pJRS315は、DNA断片ライゲーションおよび部位特異的変異誘発工程を使って作製される。その結果、CMVプロモーターが駆動する転写により両方の抗体鎖を発現するベクターが得られる(図17参照)。ネオマイシン耐性は、哺乳類動物細胞のトランスフェクションに対する優性選択マーカーとしての役目を果たす。さらに、EcoRV/BstBIフラグメントとして任意のL鎖可変領域、NruI/EcoRIフラグメントとしてH鎖可変領域、およびEcoRI/NotIフラグメントとしてH鎖定常ドメインの好都合なクローニングを可能にするように設計されている。これらの制限酵素切断部位を選んだのは、これらがヒトおよびマウスの可変領域に(たとえあるにしても)稀にしか生じないからである。転写後スプライシングの後にマウス/ヒト-キメラ L鎖が作られるように、ヒトエキソンに融合したマウスJ領域/イントロン断片がある。

【0061】

ベクターの主鎖はプラスミドpCDNA3(Invitrogen)であった。このプラスミドをHindIII/XhoIで切断し、「L鎖ポリリンカー」DNA断片を挿入して出発「L鎖ベクター」を作製した。このリンカーは、その後のクローニング工程を容易にするための制限部位HindIII、KpnI、ClaI、PmlI、EcoRV、XmaI、BamHIおよびXhoIを含有して、プラスミドpCDNA3.LCPLを作製した。L鎖リーダー、抗CKMB L鎖ゲノム断片、および3'UTRを含有するSmaI/BclI-DNA断片を、pCDNA3.LCPLのEcoRV/BamHI部位中にクローニングした。この断片中のマウスイントロン、エキソンおよび3'UTRは、リチャード・ニア博士(Dr.Richard Near)(Near, R.I.ら, Mol. Immunol. 27:901-909, (1990))から受領したLCPXK2から誘導した。その後、変異誘発を実施してNruI(209)、MluI(229)、およびBstBI(2962)を排除し、NheI(1229)およびBamHI(1214)部位を導入してpcDNA3mut.LCPL.LCVKを作製した(図12参照)。

【0062】

第2の「H鎖ベクター」は、pcDNA3mut.LCPL.LCVKプラスミドから、L鎖発現領域(HindIII/XhoI)を制限部位HpaI、BspEI、EcoRV、KpnI、およびXhoIからなる「H鎖ポリリンカー」により置換することによって構築した。このプラスミドをEcoRVおよびKpnIで消化した。その後、H鎖リーダーおよび抗CKMB IgG2bマウスH鎖ゲノム断片を含有するSmaI/KpnI消化DNA断片を、EcoRV/KpnI消化プラスミド中にライゲートした。続いて、SalI部位の上流に3'UTRおよびNotIを含有するKpnI/SalIオリゴヌクレオチド断片を、KpnI/XhoI消化プラスミド中に(XhoI部位をロックアウトして)クローニングしてプラスミドpCDNA3mut.HCPL.HCV2bを作製した(図13参照)。

【0063】

この時点から、抗CKMB可変または定常ドメインDNA配列を全く有さない2つのベクターを作製した。これは、プラスミドpcDNA3mut.LCPL.LCVKをEcoRV/XhoIにより切断し、EcoRV、BstBI、およびXhoI部位を含有するリンカーオリゴヌクレオチド断片を挿入することによって行い、pSUN9を作製した(図14参照)。同様な方法で、pcDNA3mut.HCPL.HCV2b中の抗CKMBフラグメント(NruI/NotI)をNruI、EcoRIおよびNotI部位を含有するリンカーオリゴヌクレオチド断片によって置換して、pSUN10を作製した(図15参照)。その後、ヒトL鎖定常ドメインをpSUN9中にBstBI/XhoI断片としてクローニングし、ヒトIgG1定常ドメインをpSUN10中にEcoRI/NotI断片としてクローニングした。

【0064】

10

20

30

40

50

その後、ヒトH鎖ベクターからのBglII/NheI断片を、BamHI/NheIで切断したヒトL鎖ベクター中にクローニングしてpSUN15を作製した（図16参照）。

【0065】

その後、プラスミドpJRS315をpSUN15を使って、次のプロセスを通して構築した。他の、無関係な、ハイブリドーマ細胞系からのH鎖可変領域（ほぼ400bp）をNruIおよびEcoRI（New England Biolabs）で消化し、Qiaquick PCR精製カラム（Qiagen）を使って製造者の記載のとおり精製し、そして、NruI/EcoRIで消化しゲル精製したpSUN15中にライゲートして、プラスミドpJRS311を得た（図16参照）。

【0066】

この時点で、ヒトエキソン断片に融合したマウスJ-イントロン断片を含有するBstBI/NotI（New England Biolabs）DNA断片を、消化し、ベクターtKMC180C2からゲル精製した。この断片を、BstBI/NotIで消化したpJRS311の主鎖中に連結反応し、ゲル精製してプラスミドpJRS315を得た（図17参照）。

【0067】

実施例6．組換えキメラマウス/ヒト「11E10」抗体の安定な産生

A．NSO細胞のトランスフェクション

プラスミドpACE4を、NSO細胞中にエレクトロポレーションを使ってトランスフェクトした。該プラスミドをPvuI制限酵素消化により線状化した。全容積400μL中で、消化したプラスミドDNAの40μgを 7×10^6 細胞と混合し、室温で1分間、静かに攪拌してインキュベートした。10μLのDMSO（Sigma）を添加して最終濃度1.25%とした。細胞/DNA/DMSO混合物を、冷0.4cmキュベットに移し、250ボルト、960μFの1パルスをかけた。該細胞を、5mLのDMSO（最終濃度1.25%）を補給した非選択培地を含有する6ウェルプレートの1つのウェルに移した。37℃および10%CO₂下で24時間後、該細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート中にまいた。コロニーが現れると、上清を「ヒト化」抗体の産生についておよび発現した抗体のStx2毒素との結合能力についてアッセイした。

【0068】

B．抗体産生のアッセイ

安定なトランスフェクタントについての抗体産生および活性アッセイは、ヤギ抗ヒトF(ab')₂抗IgG抗体（Southern Biotechnology）の1:500希釈物でコートした96ウェルマイクロタイタープレート（Maxisorp F8: Nunc, Inc.）からの8ウェルストリップ中で、重炭酸塩コーティングバッファー、pH 8.5を使って実施した。該プレートは、感圧フィルム（Falcon, Becton Dickinson）で覆い、一夜、4℃でインキュベートした。その後、プレートを1回、洗浄溶液（イミダゾール/NaCl/0.4% Tween-20）で洗浄した。その後、培養上清の100μLを添加し、プレート回転器上で、30分間、室温でインキュベートさせた。該プレートを5回、洗浄溶液（イミダゾール/NaCl/0.4% Tween-20）で洗浄した。ヤギ抗ヒトHRP（Southern Biotechnology）コンジュゲートを、サンプル/コンジュゲート希釈物中に1:800で希釈し、100μLをサンプルに加え、その後、プレート回転器上で30分間、室温でインキュベートした。サンプルを上記のように洗浄し、その後、ABTS現像基質（Kirkgaard & Perry Laboratories）をウェル当たり100μL用いてインキュベートし、405nmでの吸光度値を自動マイクロタイタープレートELISAリーダー（Ceres UV900HI, Bio Tek Instruments, Winooski, Vermont）を使って測定した。このアッセイ（図10参照）は、細胞のこのプラスミド構築物によるトランスフェクションによって、ヒトIgGおよびドメインの両方を含有する分子を産生する細胞をもたらすことを実証する。

【0069】

その後、上清を、発現した抗体のEHEC Stx2毒素と結合する能力についてアッセイした。活性アッセイは、上記のように、重炭酸塩コーティングバッファー、pH 8.5中のStx2毒素（実施例7のように、Dr. O'Brien's labから得た）を用いて1μg/mlでコートしたプレートを使って実施した。このアッセイは、このプラスミド構築物による細胞のトランスフェクションによって、効果的に志賀毒素2型に結合する11E10マウスモノクローナル抗体のヒト化キメラ形態の産生が可能であることを実証する（図11）。

10

20

30

40

50

【0070】

これらのアッセイは同時に、このプラスミド構築物による細胞のトランスフェクションによって、11E10マウスハイブリドーマ抗体のヒト化キメラ形態を産生する安定細胞を作ることが可能であることを実証する。

【0071】

実施例7. ヒト化抗体の志賀毒素に対する生物学的および免疫学的有効性の実証

A. ペロ細胞の細胞傷害性アッセイ

実施例1～6に記載したように得られたヒト化抗体の志賀毒素に対する有効性を、ペロ細胞を毒素から保護する能力をアッセイして確認した。細胞傷害性アッセイは、本質的にGentryおよびDalrymple, J. Clin. Microbiol., 12:361-366 (1980)が記載したように実施した。簡単に説明すると、毒素は、プラスミドpLPSH3 (Stxをコードする; J. Infect. Disease 164:344-352 (1991)) またはpMJ100 (Stx2をコードする; Inf. and Immunity, 57:3743-3750 (1989)) のどちらかを含有する大腸菌 (E.coli) K-12株の培養から得た。細菌は、超音波溶解により破壊し、遠心分離により清澄化した。抽出物は、組織培養培地 (10%ウシ胎児血清、0.8mMグルタミン、ペニシリンGの500U/ml、およびストレプトマイシンの500mg/mlを含有するダルベッコ変法イーグル培地) 中に段階的に希釈した。溶解物の10倍希釈物の100 μ lを、培地100 μ l中に約 10^4 個のペロ細胞を含有するマイクロタイタープレートウェルに添加した。該組織培養細胞を、37、5%CO₂中で48時間インキュベートし、その後、固定し、クリスタルバイオレットで染色した。固定し染色した細胞の色の強度を、Titertekリーダーを用いて620nmで測定した。抗体なしのインキュベーションは、Stxに対する標準毒性曲線を与える。

【0072】

B. 抗血清中和アッセイ

実施例1～6に記載した方法によって得たヒト化マウス抗体を、毒素中和について試験した。細胞傷害性活性の中和は、Schmittら, Infect. and Immun., 59:1065-1073 (1991)に非常に詳しく記載されている。簡単に説明すると、溶解物を、ヒト化マウス抗体の段階希釈物とともに37で2時間インキュベートした。その後、上に記載のとおり、サンプルの100 μ lをペロ細胞に添加した。

【0073】

【表1】

表1: ペロ細胞中和アッセイ

抗体	1 CD ₅₀ *を中和するのに必要なng
マウス13C4	25
ヒト化13C4	26
マウス11E10	2.7
ヒト化11E10	82.8

* (1 CD₅₀=1 pg純毒素)

【0074】

実施例8. ヒト化抗体による受動免疫

A. 粗Stx1毒素による注入に対する保護

第0日に、5匹のCD-1マウスの群に、抗体H13C4 (ヒト化 -Stx1B)、13C4 (マウス -Stx1B)、H11E10 (ヒト化 -Stx2A)、またはリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を腹腔内注入 (0.1ml) した。第1日に、これらの注入を繰り返した。その後、粗Stx1毒素 (実施例7に記載されたように得た) を用いて用量 1.7×10^5 または 1.7×10^6 CD₅₀で静脈注入してマウスをチャレンジした。毒素のこの用量は、毒素の様々な量を用いた予備実験によって選定した。マウスを21日間モニターした。

【0075】

結果 (表2) は、明らかに、注入した抗体は、通常の致死毒素用量の少なくとも10倍に対

して、マウスを保護することを示す。陰性対照として、Stx2に対する抗体はStx1毒素チャレンジに対して保護せず、該保護は毒素 / 抗体のペアに特異的であったことを示し、抗体調製プロセスの人工産物でなかったことを示した。

【 0 0 7 6 】

【表 2】

表 2：粗Stx1を静脈注入したCD-1マウス

抗体（用量／マウス）	保護された#LD ₅₀	1 LD ₅₀ *から保護するための抗体μg/kg
マウス13C4 (1.4μg)	10	6.1
ヒト化13C4 (4.1μg)	20	8.9
ヒト化11E10 (232μg)	0	保護なし

10

* (1 LD₅₀=30 ng 粗Stx1)

【 0 0 7 7 】

B. Stx-2産生EHEC株による経口感染に対する保護

マウスおよび細菌の 2 つの異なる株をこの研究に使用して、Stx2およびStx2変異体の両方に対する有効性を試験した。DBA/2JマウスをEHEC株86-24(O157:H7、Stx2⁺)により、また、CD-1マウスを株B2FI(O91:H21、Stx2変異体⁺)によりチャレンジした。大腸菌 (E.coli) 株B2FIは通常、両方のマウスに対して致命的であり、大腸菌 (E.coli) 株86-24はDBA/2Jマウスに対して致命的であるが、CD-1マウスは86-24感染で生存するであろう。

20

【 0 0 7 8 】

第 0 日に、抗体H11E10 (ヒト化 -Stx2A) または11E10 (マウス -Stx2A) を、4 匹または 5 匹のマウスの群に腹腔内注入 (0.1ml) した。対照群は、抗体13C4 (マウス -Stx1B) を受けたマウス、11E10腹水 (マウス -Stx2A) を受けたマウス、または抗体の代わりにPBSを受けたマウスを含んでいた。マウスには、飲用水中にストレプトマイシン (5g/L) を与えて通常の腸内細菌叢を減少させ、かつ食餌を除去した。株86-24(O157:H7、Stx2⁺) およびB2FI(O91:H21、Stx2変異体⁺) のストレプトマイシン耐性誘導株を一夜、L培養液中で増殖させた。

30

【 0 0 7 9 】

翌日 (第 1 日)、マウスは試験抗体、対照抗体、またはPBSの第 2 回目の注入を受けた。マウスに、ペレット化して20%スクロース中に再懸濁した86-24の10¹⁰CFU、または20%スクロース中に段階的に希釈したB2FIの10³CFUを、直ぐ与えた。食餌をケージに戻し、マウスを21日間モニターした (CFU=コロニー形成単位)。

【 0 0 8 0 】

表 3 に示すように、マウスまたはヒト化抗Stx2抗体のどちらかを用いたマウスの免疫感作は、EHECの致死経口用量からの完全な保護をもたらした。Stx2毒素の代わりにStx1毒素に免疫反応性のあることを除いて同じ方法で調製したマウス13C4抗体による免疫感作は、86-24によるチャレンジから保護せず、結果は該応答の免疫特異性を示す。

40

【 0 0 8 1 】

【表 3】

表3： 10¹⁰CFU 0157(Stx2)を与えたDBA/2Jマウス

抗体（用量／マウス）	生存数
マウス13C4 (1.4 μ g)	0/5
マウス11E10 (1.0 μ g)	5/5
ヒト化11E10 (1.0 μ g)	5/5

【0082】

より耐性のあるCD-1マウスにStx2変異体毒素を産生するB2F1大腸菌（E.coli）株を与えた場合の、同様な結果を表4に示した。抗体による処理がなければ、全て致死であるが、マウスおよびヒト化抗体の双方はStx2変異体に対し用量に依存して保護した。

10

【0083】

【表4】

表4： 10³CFU 091:H21(Stx2変異体)を与えたCD-1マウス

抗体（用量／マウス）	生存数
PBS	0/5
マウス11E10 (8.7 μ g)	1/4*
マウス11E10 (6.45mg)	5/5
ヒト化11E10 (23.2 μ g)	0/5
ヒト化11E10 (232 μ g)	5/5

20

10.1および1.0mg/kgの間の保護的用量

*死までの遅延平均時間、3.4日

【0084】

実施例9．志賀毒素を産生する細菌により起こる疾患の治療

本発明はまた、志賀毒素への曝露に関連する疾患および影響を治療し、軽減し、または予防する様々な方法を提供する。ヒトにおける陽性臨床応答がモノクローナル抗体を用いて得られており、当業者であれば、ヒトにおいて抗Stxヒト化モノクローナル抗体を使用する方法がわかるであろう（Fagerbergら，Cancer Research，55:1824-27（1995）；Eur. J. Cancer，2:261-267（1995）を参照）。これらの疾患の治療のために患者に投与されるヒト化抗志賀毒素抗体の正確な用量は、典型的な臨床医により評価される因子によって変わるであろう。これらの因子は、（限定されるものでないが）、サイズ、年齢、全体の健康、感染の程度、および該患者に投与されている他の医薬を含む。正確な治療体制の開発には、医療業界の当事者に周知の日常的治療方法を通しての最適化が必要であろう。潜在的な患者群の例は、（限定されるものでないが）血液性下痢であるが便中に白血球のない幼児、HUSの徴候をもつ患者、志賀毒素に対して陽性の便サンプル試験を示す患者、ある事例に（受動の予防的処置として）関わりのある同胞または保育集団、および確認された事例に関わりのあった下痢（必ずしも血液性でない）を示す患者を含む。ヒト化13C4の約5mg/kg体重をヒト化11E10の約10mg/kg体重に組合わせた典型的な用量が意図されるであろう。この組合わせ製剤を患者に2回投与して、有効性を確保することができるであろう。ヒト化抗体の両方の型を含むことにより、患者は全ての型の志賀毒素に対して保護されるという保証を与える。

30

40

【0085】

当業者であれば、以上の開示に基づいて、本発明の使用および実施の方法を理解するであろう。本明細書に開示された本発明の明細と実施を考察すれば、当業者には、本発明の他の実施形態は明らかであろう。本明細および実施例は例とみなされるだけであり、本発明の真の範囲と精神は特許請求の範囲によって示されることを意図している。

【図面の簡単な説明】

50

【図 1】 図 1 は、11E10および13C4抗体の双方の可変領域の遺伝子断片をクローニングするために用いられた一般的なクローニング戦略を示す。

【図 2】 図 2 は、13C4抗体の可変領域のPCR増幅に用いられたオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図 3】 図 3 は、13C4抗体のH鎖およびL鎖の双方の可変領域のDNAおよびアミノ酸共通配列を示す。該DNA共通配列は、ABI373配列決定装置により分析された増幅cDNAの自動化蛍光色素 - ターミネーター配列反応を用いて決定された。CDRは、KabatおよびWu(Kabatら、(1991)、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Vol. I、第5版、U.S. Department of Health and Human Services)による命名法に従い同定され、下記に位置する：

H鎖CDR (配列番号 1 9) : CDR1-aa31 - 35

CDR2-aa50 - 66

CDR3-aa99 - 111

L鎖CDR (配列番号 2 1) : CDR1-aa24 - 34

CDR2-aa50 - 56

CDR3-aa89 - 97

【図 4】 図 4 は、13C4抗体の可変領域を含む、哺乳動物発現ベクターtKMC249Aを構築するための戦略を示す。

【図 5】 図 5 は、11E10抗体の可変領域のPCR増幅に用いられたオリゴヌクレオチドを示す。

【図 6】 図 6 は、11E10抗体のH鎖およびL鎖の双方の可変領域のDNAおよびアミノ酸共通配列を示す。該DNA共通配列は、ABI373配列決定装置により分析された増幅cDNAの自動化蛍光色素 - ターミネーター配列反応を用いて決定された。CDRは、KabatおよびWu(KabatおよびWu、上記)による命名法に従い同定され、下記に位置する：

H鎖CDR (配列番号 4 4) : CDR1-aa31 - 35

CDR2-aa50 - 66

CDR3-aa99 - 108

L鎖CDR (配列番号 4 2) : CDR1-aa24 - 40

CDR2-aa56 - 62

CDR3-aa95 - 103

【図 7】 11E10抗体の可変領域を含む、哺乳動物発現ベクターpACE4を構築するための戦略を示す。

【図 8】 図 8 は、抗Stx1 13C4抗体産生のELISAを示し、H13C4細胞系が、ヒトIgGおよび定常ドメインからなる抗体を産生することを実証する。

【図 9】 図 9 は、抗Stx1 13C4毒素結合活性のELISAを示し、H13C4細胞系により産生された該抗体がStx1毒素に結合することを実証する。

【図 10】 図 10 は、抗Stx2 11E10抗体産生のELISAを示し、H11E10細胞系が、ヒトIgGおよび定常ドメインからなる抗体を産生することを実証する。

【図 11】 図 11 は、抗Stx2 11E10毒素結合活性のELISAを示し、H11E10細胞系により産生された該抗体がStx2毒素に結合することを実証する。

【図 12】 図 12 は、プラスミドpCDNA3mut.LCPL.LCVKを構築するための戦略を示す。

【図 13】 図 13 は、プラスミドpCDNA3mut.HCPL.HCV2bを構築するための戦略を示す。

【図 14】 図 14 は、プラスミドpSUN9およびpSUN9:kappaを構築するための戦略を示す。

【図 15】 図 15 は、プラスミドpSUN10およびpSUN10:IgG1を構築するための戦略を示す。

【図 16】 図 16 は、プラスミドpJRS311を構築するための戦略を示す。

【図 17】 図 17 は、プラスミドpJRS315を構築するための戦略を示す。

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<110> HENRY JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY
MEDICINE

<120> HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES THAT PROTECT AGAINST
SHIGA TOXIN INDUCED DISEASE

<130> 04995.0032-00304

<140>

<141>

10

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Oligonucleotide

20

<400> 1

att tca ggc cca gcc ggc cat ggc cga rgt rma gct ksa kga gwc 45

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Oligonucleotide

30

<400> 2

atttcaggcc cagccggcca tggccgargt ycarctkcar caryc 45

<210> 3		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Oligonucleotide		
<400> 3		
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagctksts gartc	45	
<210> 4		
<211> 45		
<212> DNA		10
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Oligonucleotide		
<400> 4		
atttcaggcc cagccggcca tggccgargt rmagctksak gagwc	45	
<210> 5		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Oligonucleotide		
<400> 5		
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt bcarctkmar sartc	45	
<210> 6		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Oligonucleotide		
<400> 6		
gaartavccc ttgaccaggc	20	

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 7

ggaggcggcg gttctgacat tgtgmtgwcw cartc

35

10

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 8

ggaggcggcg gttctgatrt tkygatgacb carrc

35

20

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 9

ggaggcggcg gttctgayat ymagatgacm cagwc

35

30

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 10

ggaggcggcg gttctsaaat tgwkctsacy cagtc

35

<210> 11
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 11
 ttcataaggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc 40

<210> 12 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 12
 ttcataaggcg gccgcactag tagcmcgttt katytccarc 40

<210> 13 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 13
 gcacctccag atgttaactg ctc 23

<210> 14 30
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 14
 cttgatcgcg acagctacag gtgtccactc ccaggtgcag ctgcaggag 49

<210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 15
 ggtatggaat tctgaggaga ctgtgagagt ggtgcc 36

<210> 16 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 16
 ggttctgata tcgtgatgtc ccagtctcac aaattc 36

<210> 17 20
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 17
 gacatattcg aaaagtgtac ttacgtttca gtcacagact gg 42

<210> 18 30
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Shigella dysenteriae

<400> 18
 caggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaggatg 60
 tcttgcagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaaacagaca 120

cctggacagg gcttgggaatg gattggatat atttatcctg gaaatgggtgg tactaactac 180
 attcagaaat ttaagggcaa ggccatattg actgcagaca catcctccag cacagcctac 240
 atgcagatca gcagtctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtac aagaagtccc 300
 tctcactaca gtagtgaccc ctactttgac tactggggcc agggcaccac tctcacagtc 360
 tcctca 366

<210> 19
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Shigella dysenteriae

10

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Met Ser Cys Asp Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Pro Ser His Tyr Ser Ser Asp Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

20

30

<210> 20
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 20
 gatatacgtga tgtcccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtcggaga cagggtcagc 60
 atcacctgta aggccagcca ggatgtgggt actgctgttg cctggtatca gcagaatcca 120
 ggacaatctc ctaaatttct gatttactgg gcattccacac ggcacactgg agtcocctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccattaccaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagtt atcctctcac gtccggtgct 300
 gggaccagtc tggagctgaa acgt 324

10

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 21
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly 20
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln Ser Pro Lys Phe Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Ser Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

20

30

<210> 22
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 22
 atttcaggcc cagccggcca tggccgargt rmagctksak gagwc 45

10

<210> 23
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 23
 atttcaggcc cagccggcca tggccgargt ycarotkcar caryc 45

20

<210> 24
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 24
 atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagctksts gartc 45

30

<210> 25
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 25
 atttcaggcc cagccggcca tggccgavgt gmwgctkgtg gagwc 45

<210> 26
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Oligonucleotide

<400> 26
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt bcarctkmar sartc 45

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Oligonucleotide

<400> 27
gaartavccc ttgaccaggc 20

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Oligonucleotide

<400> 28
gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas tgarg 35

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Oligonucleotide

<400> 29
gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas mgtrg 35

<210> 30
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 30
 gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas cagrg 35

<210> 31 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 31
 ggaggcggcg gttctgacat tgtgmtgwcw cartc 35

<210> 32 20
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 32
 ggaggcggcg gttctgatrt tkygatgacb carrc 35

<210> 33 30
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 33
 ggaggcggcg gttctgayat ymagatgacm cagwc 35

<210> 34
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 34
 ggaggcggcg gttctsaat tgwktsacy cagtc 35

<210> 35 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 35
 ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc 40

<210> 36 20
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 36
 ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt katytccarc 40

<210> 37 30
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 37
 atatactcgc gacagctaca ggtgtccact ccgaagtcca actgcaacag cc 52

<210> 38
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 38
 attaatgaat tctgcggaga cggtagagagtg ggtagc 34

<210> 39 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 39
 ttaaatagata tcgtgctgtc acaatctcc 29

<210> 40 20
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Oligonucleotide

<400> 40
 taatcggttcg aaaagtgtagc ttacgtttca gttccagctt ggtcc 45

<210> 41 30
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Shigella dysenteriae

<400> 41
 gacattgtgc tgcacaatc tccatcctcc ctagttgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtctagtca gagcctttta tatagtagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagaccagc agaaaccagg gcagttctct aaagtgtgta ttacttgggc atctactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cctcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagttat 300
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 42
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 42
 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Leu Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys

10

20

<210> 43
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 43
 gaagtccaac tgcaacagcc tggacctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaaacta 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctctttcact gactacaaca tgaactgggt gaagcagaac 120

30

aatggagaga gccttgagtg gattggaaaa attgatcctt actatggtgg tcctagctac 180

aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca agtcttccag cacagcctac 240

atgcagttca agagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtac aagaggggga 300

aatagggact ggtacttcga tgtgtggggc gcagggacca cgctcacctg ctccgca 357

<210> 44
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Shigella dysenteriae

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Lys Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Phe Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110

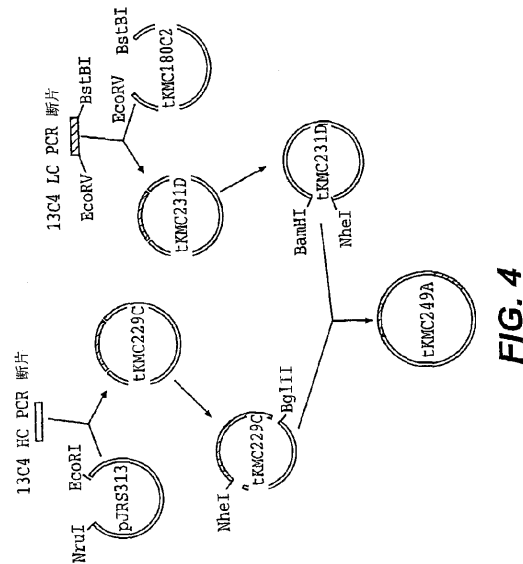
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala
 115

10

20

30

【図 4】



【図 5】

マウス H 鎖「フロント」プライマー

JS001 5'-ATTTGAGGCCCCGCGCCATGGCCGAGTGMAGCTKSAGCAGWC-3' 配列番号 22
 JS002 5'-ATTTGAGGCCCCGCGCCATGGCCGAGTGMAGCTKSAGCAGWC-3' 配列番号 23
 JS003 5'-ATTTGAGGCCCCGCGCCATGGCCGAGTGMAGCTKSAGCAGWC-3' 配列番号 24
 JS004 5'-ATTTGAGGCCCCGCGCCATGGCCGAGTGMAGCTKSAGCAGWC-3' 配列番号 25
 JA008 5'-ATTTGAGGCCCCGCGCCATGGCCGAGTGMAGCTKSAGCAGWC-3' 配列番号 26

マウス H 鎖「バック」プライマー

JS300 5'-GAATATVCCCTTGACACGC-3' 配列番号 27
 JS160 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARG-3' 配列番号 28
 JS161 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARG-3' 配列番号 29
 JS162 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARG-3' 配列番号 30

マウス L 鎖リーダー「フロント」プライマー

JS009 5'-GGAGGCGCGGTTCTGACATTTGTGTCGACATC-3' 配列番号 31
 JS010 5'-GGAGGCGCGGTTCTGACATTTGTGTCGACATC-3' 配列番号 32
 JS011 5'-GGAGGCGCGGTTCTGACATTTGTGTCGACATC-3' 配列番号 33
 JS012 5'-GGAGGCGCGGTTCTGACATTTGTGTCGACATC-3' 配列番号 34

FIG. 5A

マウス L 鎖「バック」プライマー

JS153 5'-TTCATAGGCGCGCCGACTAGTAGCMCGTTTCAGYTCCARC-3' 配列番号 35
 JS154 5'-TTCATAGGCGCGCCGACTAGTAGCMCGTTTCAGYTCCARC-3' 配列番号 36

「11E10」特異的プライマー

11E10HF 5'-ATATATCTCGGACAGCTACAGGTGTCCACTCGAAGTCCAACTGCAACAGCC-3' 配列番号 37
 11E10HB 5'-ATTAATGAATCTCGGACAGCGGTGAGAGTGGTC-3' 配列番号 38
 11E10LF 5'-TTAATGATATCTGCTGTCACAATCTCC-3' 配列番号 39
 11E10LB 5'-TAATCGTTTCGAAAGTGTACTTACGTTTCAGTTCACAGCTTGGTCC-3' 配列番号 40

FIG. 5B

【図 6】

11E10	L 鎖	7/23/97 12:38 PM	二重下線 = CDS	配列番号 41-42
21 11E10	27	10 20 30 40 50 60 70 80	GAATGTC ATCTACATC TCATCTTC CATTTGCT CATTTGGA GAGTACT ATGACTCA AGTACTCA D I V L S Q S P S L V V S V G E K V T M S C K S S Q	80
21 11E10	27	90 100 110 120 130 140 150 160	GAATGTC ATCTACATC TCATCTTC CATTTGCT CATTTGGA GAGTACT ATGACTCA AGTACTCA S L L Y S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S R K V L	160
21 11E10	27	170 180 190 200 210 220 230 240	GAATGTC ATCTACATC TCATCTTC CATTTGCT CATTTGGA GAGTACT ATGACTCA AGTACTCA L Y W A S Y R E S G V P D R L T G S G S G T D P T L T	240
21 11E10	27	250 260 270 280 290 300 310 320	GAATGTC ATCTACATC TCATCTTC CATTTGCT CATTTGGA GAGTACT ATGACTCA AGTACTCA I S S V K A E D L A V Y C Q Y I S Y P L T P G A G	320
21 11E10	27	330 340 350 360 370 380 390 400	GAATGTC ATCTACATC TCATCTTC CATTTGCT CATTTGGA GAGTACT ATGACTCA AGTACTCA T K L E L K	400

FIG. 6A

二重下線 = CDRs
配列番号 43-44

11E10 H 鎖	7/23/97 12:35 FM	10	20	30	40	50	60	70	80
1 11E10	GAAGTCAC TCGACGAC CCGGAGAC CTGGCTTC AGTCAGAC TCTGCTGAG CTTGCTGCTA								
11	EVQLQIQPGPELERKPGASVKLSCKASGY								
1 11E10	CTCTTCAT GATTCACCA TGAATGCT GAGGAGAC AATGGAGA GCTTGAGT GATTCGAA ATTCTCTT								
11	SFTDYNNHNNWVKQNNGBESLWIGKIDP								
1 11E10	ACTGAGTG TCTGCTAC ACCGAGAT TCGAGGCA GGCACATG ACTGAGCA AGTCTGAG CAGACCTC								
11	YVGGPSYNNQKFKDKATLTVDKSSSTAY								
1 11E10	ATGCAATCA AGGCTGAC ATCTGGAC TCTGCTCT ATTCTGCT AAGAGGGA AATGAGAT GCTACTGCA								
11	MQFKSLTSEDSAVYCTRRGGNRDMYFPD								
1 11E10	TGTGAGGC GAGGAGCA GCTGACCT CTCGCA								

FIG. 6B

【図 7】

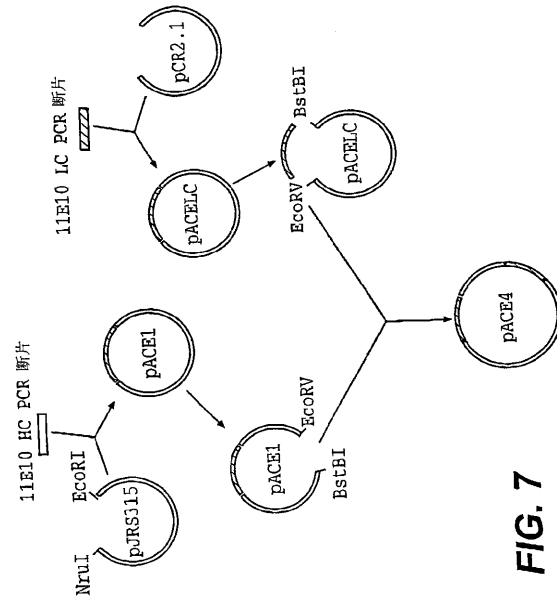


FIG. 7

【図 8】

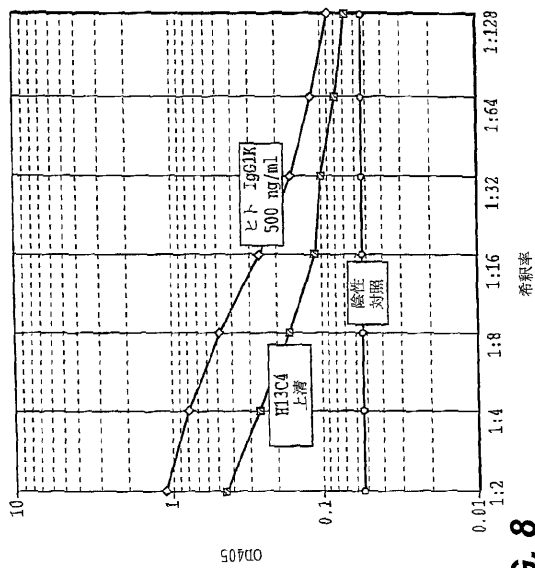


FIG. 8

【図 9】

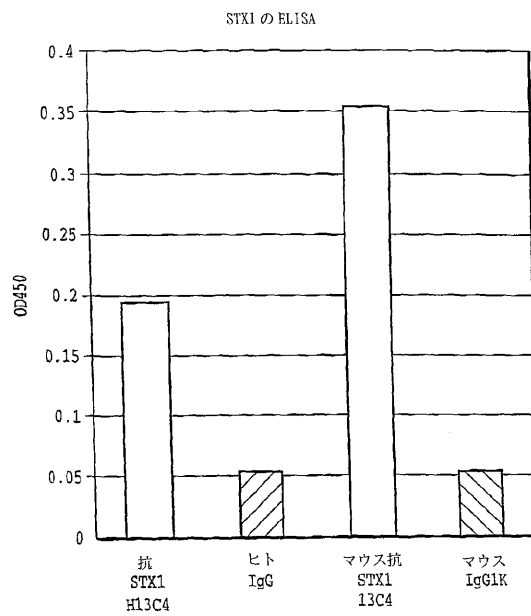
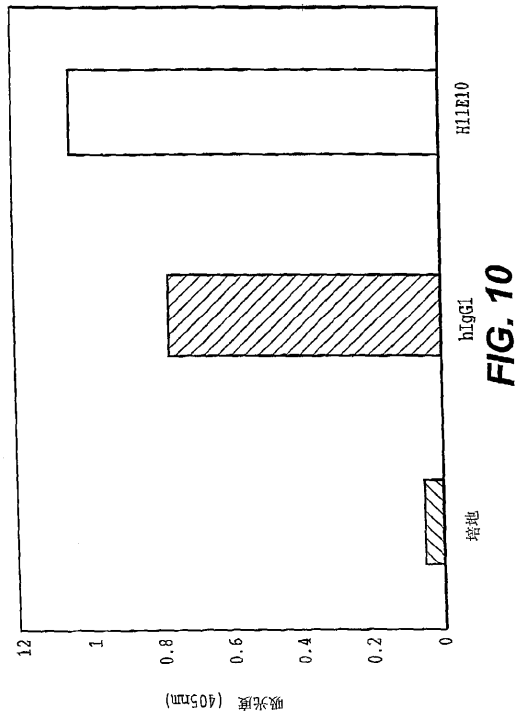
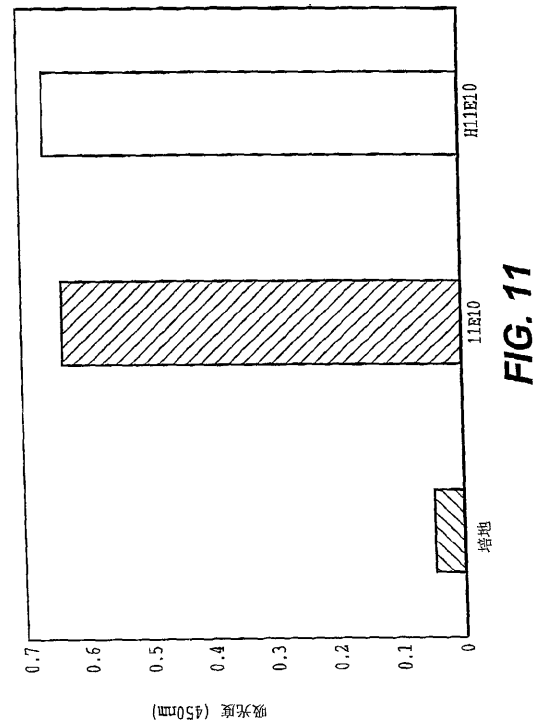


FIG. 9

【図 10】

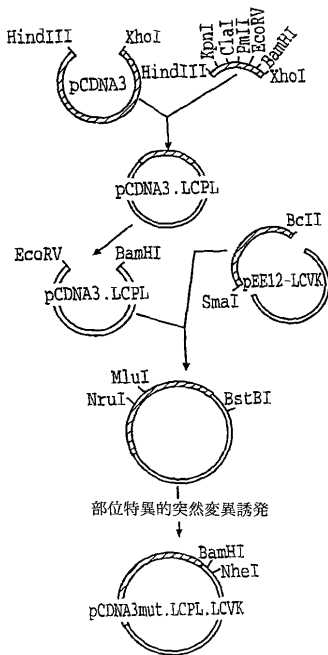


【図 11】



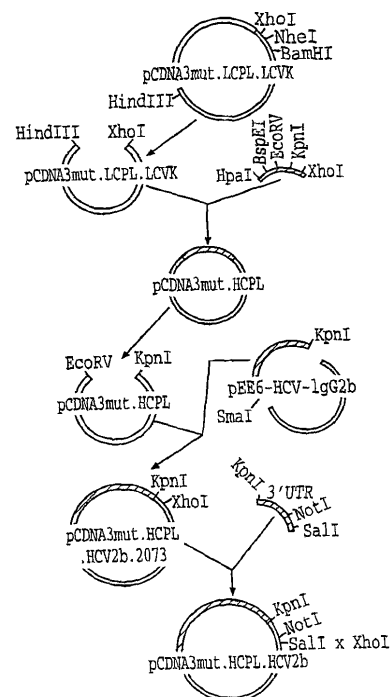
【図 12】

pCDNA3mut.LCPL.LCVK
構築:



【図 13】

pCDNA3mut.HCPL.HCV2b
構築:



【 図 1 4 】

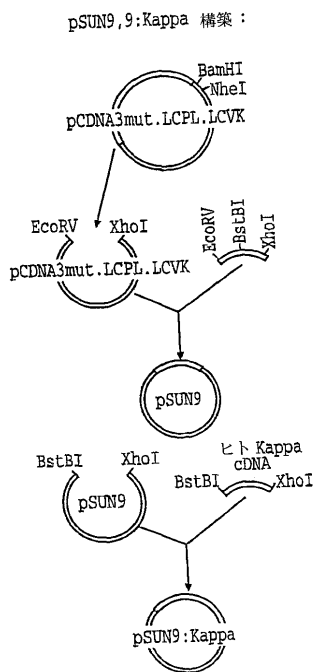


FIG. 14

【 図 1 5 】

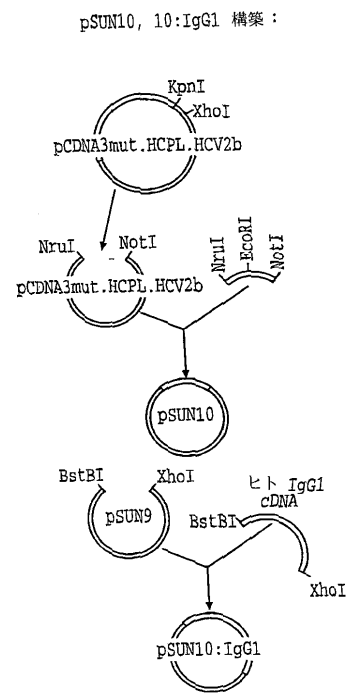


FIG. 15

【 図 1 6 】

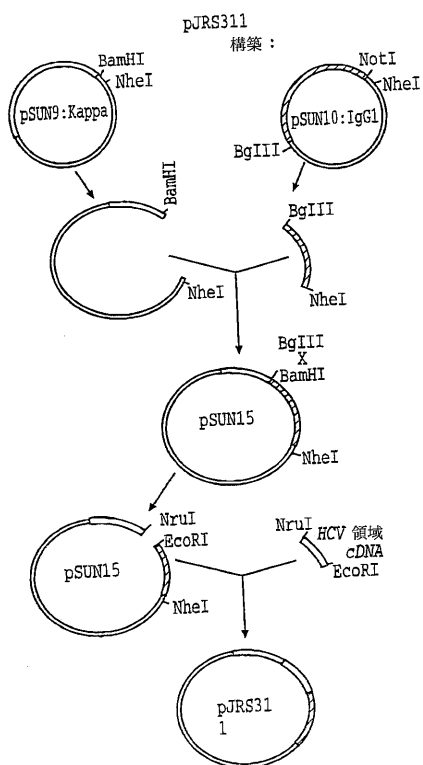


FIG. 16

【 図 1 7 】

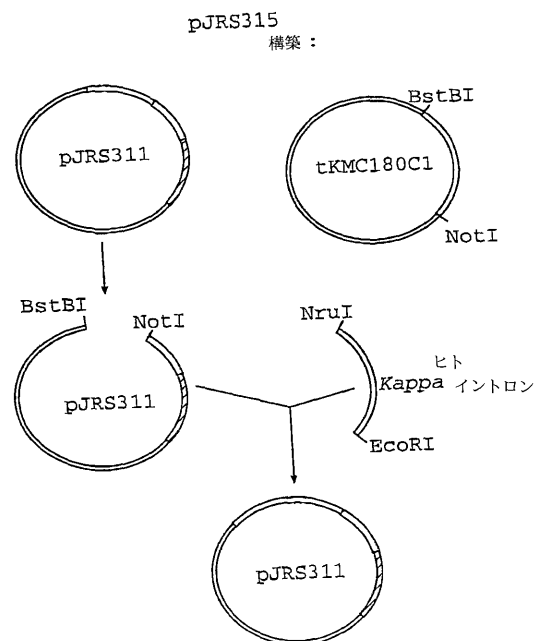


FIG. 17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		C 1 2 N 5/00	1 0 2

微生物の受託番号 ATCC CRL-1907

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(72)発明者 スティンソン, ジェフリー, アール.

アメリカ合衆国 2 0 8 3 3 メリーランド州, ブルックビル, トレッドウェイ ロード 1 9 2
5 3

(72)発明者 ウォン, ヒング

アメリカ合衆国 3 3 3 3 2 フロリダ州, ウェストン, ウェントワース 2 9 6 6

(72)発明者 オブライエン, アリソン, ディー.

アメリカ合衆国 2 0 8 1 7 メリーランド州, ベテスダ, チャールコート ロード 5 5 1 4

(72)発明者 シュミット, クレア, ケー.

アメリカ合衆国 2 0 8 5 3 メリーランド州, ロックビル, グラスゴー ドライブ 4 6 1 6

(72)発明者 メルトン - セルサ, アンジェラ

アメリカ合衆国 2 0 1 6 5 ヴァージニア州, スターリング, ブランディーウィン コート 2
0 5 1 6

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特開昭62-296890(JP, A)

特表2001-500730(JP, A)

国際公開第98/011229(WO, A1)

国際公開第98/020903(WO, A1)

J Med Microbiol., 40 (1994) p.338-343

J Clin Microbiol., 26[10] (1988) p.2127-2131

Infect Immun., 50[3] (1985) p.695-700

感染症学雑誌, 72[8] (1998 Aug) p.808-812

治療学, 31[12] (1997.12.10) p.13-16

日本小児腎臓病理学会雑誌, 10[1] (1997 Apr) p.46-49

Acta Paediatr Japo., 38 (1996) p.294-295

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)