

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512962

(P2005-512962A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C O 7 K	16/26	C O 7 K	16/26	Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	E	4 C O 8 4
A 6 1 K	45/00	A 6 1 K	39/395	T	4 C O 8 5
A 6 1 P	35/00	A 6 1 K	45/00		4 H O 4 5
A 6 1 P	43/00	A 6 1 P	35/00		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号	特願2003-528864 (P2003-528864)	(71) 出願人	503102674
(86) (22) 出願日	平成14年9月20日 (2002. 9. 20)		アレクシオン ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月18日 (2004. 5. 18)		, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/030086		アメリカ合衆国 コネチカット O 6 4 1
(87) 国際公開番号	W02003/025019		O, チェシアー, ノッター ドライブ
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003. 3. 27)		3 5 2
(31) 優先権主張番号	60/323, 537	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成13年9月20日 (2001. 9. 20)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/323, 544		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成13年9月20日 (2001. 9. 20)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/379, 994		
(32) 優先日	平成14年5月13日 (2002. 5. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PDGF抗体および設計抗体の産生方法

(57) 【要約】

設計抗体および／または設計抗体断片を作製および選択する方法は、所定の標的に対する最大化された結合親和性、およびこのような抗体が標的種に適用された場合の最小化された免疫原性を提供する。設計抗体の改変体を含むライブラリーもまた、提供される。特定の有用な実施形態においては、種々の癌の処置において有用である、抗PDGF抗体および組成物が生成される。一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域、および少なくとも片方は非ヒトである2つの異なる起源由来のCDR領域を含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片もまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

標的に対し特異性を有する抗体のパネルを提供する工程であって、該抗体のパネルは第一種由来の複数の抗体メンバーを含む、工程；

該抗体のパネルの第一メンバーの少なくとも一部の配列を決定する工程；

該パネルの該第一メンバーの配列を、標的種由来の抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程であって、該標的種は該第一種とは異なっている、工程；

該パネルの該第一メンバーの配列と高い相同性を示し、かつ F R 3 領域を含む、少なくとも一つの配列を、該参照ライブラリーの第一メンバーから選択する工程；

10

該パネルの該第一メンバーから C D R 3 領域を得る工程；および

該パネルの該第一メンバー由来の該 C D R 3 領域を、該参照ライブラリーの該第一メンバー由来の該少なくとも一つの配列の該 F R 3 領域に隣接して組み入れることで、設計抗体または設計抗体断片を形成する工程、
を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

前記パネルの前記第一メンバーの配列を、抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程；

20

少なくとも F R 4 配列を、該参照ライブラリーの第二メンバーから選択する工程；および

該 F R 4 配列を、該設計抗体または設計抗体断片に、該パネルの該第一メンバー由来の前記 C D R 3 領域に隣接して組み入れる工程、
をさらに包含する、方法。

【請求項 3】

前記パネルのメンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4】

30

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 3 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 5】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 3 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 6】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

40

【請求項 7】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上に由来する C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 8】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来であ

50

る、請求項 7 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 9】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 7 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 10】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

10

【請求項 11】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上に由来する C D R 1 領域および C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のそれぞれがかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 12】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 11 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 13】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 11 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

20

【請求項 14】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 11 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 15】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 11 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

30

【請求項 16】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域、前記 C D R 2 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルのそれぞれ異なったメンバー由来である、請求項 11 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 17】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域、前記 C D R 2 領域および前記 C D R 1 領域のすべてが、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 11 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

40

【請求項 18】

前記パネルの一つ以上のメンバー由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域を、それぞれ前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含し、組み込まれた該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のうち少なくとも一つが該パネルの第二メンバー由来である、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 19】

前記標的が P D G F である、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

50

【請求項 20】

前記抗体断片が s c F v、F a b、F (a b ') 2、F d、二重特異性抗体、抗体軽鎖、および抗体重鎖からなる群から選択される、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 21】

前記標的種がヒトである、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 22】

前記参照ライブラリーがヒト再編成抗体配列を含む、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法に従って、複数の設計抗体または設計抗体断片を調製する工程を包含する、設計抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 24】

前記ライブラリーが、設計抗体または設計抗体断片の改変体をさらに含み、該設計抗体または設計抗体断片の改変体が、前記パネルの前記メンバーの前記配列、前記参照ライブラリーの前記第一メンバーの前記配列からなる群より選択される一つ以上の配列に由来する、V H / V L 境界および / またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせを含む、請求項 23 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 25】

設計抗体または設計抗体断片を提示するファージミドライブラリーまたはファージライブラリーを生成する工程をさらに包含する、請求項 23 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 26】

前記ファージミドライブラリーまたは前記ファージライブラリーを前記標的に対する活性についてパニングし、該標的に優先的に結合するファージ粒子またはファージミド粒子を単離する工程をさらに包含する、請求項 23 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 27】

抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

請求項 1 に記載の方法に従って複数の設計抗体を調製する工程；
標的に対する複数の抗体の結合親和性を決定する工程；および
結合親和性に基づき、前記ライブラリーから抗体を選択する工程、
を包含する、方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

前記複数抗体の免疫原性を決定する工程；および
結合親和性および免疫原性に基づき、抗体を選択する工程、
をさらに包含する、方法。

【請求項 29】

設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

標的に対する特異性を有する抗体のパネルを提供する工程であって、該抗体のパネルは、第一種由来の複数の抗体メンバーを含む、工程；
該標的に関して望ましい結合特性を有する該パネルの第一メンバーを選択する工程；
該抗体のパネルの複数メンバーの少なくとも一部の配列を決定し、該複数メンバーのコンセンサス配列を決定する工程；
該コンセンサス配列を標的種由来の抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程であって、該標的種は、該第一種と異なっている、工程；
該参照ライブラリーの第一メンバーから、該コンセンサス配列と高度の相同性を示し、かつ、F R 3 領域を含む、少なくとも一つの配列を選択する工程；
該パネルの該第一メンバーから C D R 3 領域を得る工程；および

10

20

30

40

50

該パネルの該第一メンバー由来の該 C D R 3 領域を、該ライブラリーの該第一メンバー由来の該少なくとも一つの配列の該 F R 3 領域に隣接して組み入れ、設計抗体または設計抗体断片を形成する工程、
を包含する、方法。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

前記コンセンサス配列を、抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程；

該参照ライブラリーの第二メンバーから、少なくとも F R 4 配列を選択する工程；および

該 F R 4 配列を、前記設計抗体または設計抗体断片に、前記パネルの前記第一メンバー由来の前記 C D R 3 領域に隣接して組み入れる工程、
をさらに包含する、方法。

【請求項 31】

前記パネルのメンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 30 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 32】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 31 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 33】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 31 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 34】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 35】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上に由来する C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 30 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 36】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 35 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 37】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 35 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 38】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 39】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のそれぞれがかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 30 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 40】

前記パネルの一つ以上のメンバー由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のそれぞれがかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含し、組み込まれた該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のうち少なくとも一つが該パネルの第二メンバー由来である、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。 10

【請求項 41】

前記標的が P D G F である、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 42】

前記抗体断片が s c F v、F a b、F (a b ') 2、F d、二重特異性抗体、抗体軽鎖、および抗体重鎖からなる群から選択される、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 43】

前記標的種がヒトである、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。 20

【請求項 44】

前記参照ライブラリーがヒト再編成抗体配列を含む、請求項 29 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 45】

請求項 29 に記載の方法に従って、複数の設計抗体または設計抗体断片を調製する工程を包含する、設計抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 46】

前記ライブラリーが、設計抗体または設計抗体断片の改変体をさらに含み、該設計抗体または設計抗体断片の改変体が、前記パネルの前記メンバーの前記配列、前記参照ライブラリーの前記メンバーの前記配列からなる群より選択された一つ以上の配列に由来する、V H / V L 境界および／またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせを含む、請求項 45 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。 30

【請求項 47】

前記設計抗体または設計抗体断片を提示するファージミドライブラリーまたはファージライブラリーを生成する工程をさらに包含する、請求項 45 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 48】

前記ファージミドライブラリーまたは前記ファージライブラリーを前記標的に対する活性についてパニングし、該標的に優先的に結合するファージ粒子またはファージミド粒子を単離する工程を包含する、請求項 45 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。 40

【請求項 49】

抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

請求項 29 に記載の方法に従って複数の設計抗体を調製する工程；

複数の抗体の結合親和性を決定する工程；および

結合親和性に基づき、抗体を選択する工程、

を包含する、方法。

【請求項 50】

請求項 49 に記載の抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

前記複数抗体の免疫原性を決定する工程；および

結合親和性および免疫原性に基づき、抗体を選択する工程、
をさらに包含する、方法。

【請求項 5 1】

抗体または抗体断片を選択するための設計抗体または設計抗体断片の参照ライブラリーであって、該ライブラリーは、設計抗体または設計抗体断片の改変体を含み、該改変体は、標的種に対してネイティブな抗体由来のフレームワーク領域であって、該フレームワーク領域が所定の標的に対する特異性を有する第一抗体のフレームワーク領域と高度の相同性を示す、フレームワーク領域、所定の標的に対する特異性を有する該第一抗体由来の C D R 3 領域、該第一抗体または該標的種に対してネイティブな抗体のいずれかに由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域の組み合わせ、ならびに V H / V L 境界および / またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせであって、該アミノ酸の組み合わせが該標的種にネイティブな抗体に存在するアミノ酸かつ該第一抗体に存在するアミノ酸に相当する、アミノ酸の組み合わせを有する、ライブラリー。 10

【請求項 5 2】

一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域、および少なくとも片方は非ヒトである 2 つの異なる起源由来の C D R 領域を含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片。

【請求項 5 3】

生殖細胞系ヒト抗体配列および再編成ヒト抗体配列の双方の由来であるフレームワーク領域、および少なくとも片方は非ヒトである 2 つの異なる起源由来の C D R 領域を含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片。 20

【請求項 5 4】

一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域、非ヒト C D R 3、ならびに非ヒト抗体配列のコンセンサス由来である C D R 1 または C D R 2 のうち少なくとも一つを含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片。

【請求項 5 5】

ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片を提供する方法であって、一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域を、少なくとも片方は非ヒトである 2 つの異なる起源由来の C D R 領域と合わせる工程を包含し、該フレームワーク領域が、以下：

(i) 標的に結合する非ヒト抗体のパネルからの複数メンバーについて、抗体コンセンサス配列を確立する工程； 30

(i i) 該非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来の C D R 3 を、該コンセンサス配列の C D R 3 の代わりに置き換え、複合配列を形成する工程；および

(i i i) 該複合配列をヒト抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列との相同性に基づき、少なくとも一つのヒト抗体配列を選択する工程、
によって選択されるヒト抗体配列由来である、方法。

【請求項 5 6】

ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片を提供する方法であって、一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域を少なくとも片方は非ヒトである 2 つの異なる起源由来の C D R 領域と合わせる工程を包含し、該フレームワーク領域が、以下： 40

(i) 標的に結合する非ヒト抗体パネルからの複数メンバーについて、抗体コンセンサス配列を確立する工程；

(i i) 該非ヒト抗体パネルの個々のメンバー由来の C D R 3 を、該コンセンサス配列の C D R 3 の代わりに置き換え、複合配列を形成する工程；

(i i i) 該複合配列の第一部分をヒト生殖細胞系抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列の該第一部分との相同性に基づき、少なくとも一つのヒト抗体配列を選択する工程；および

(i v) 該複合配列の第二部分をヒト再編成抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列の該第二部分との相同性に基づき、少なくとも一つのヒト抗体配列を選択する工程、

によって選択される２つのヒト抗体配列由来である、方法。

【請求項５７】

標的配列に結合する非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来のＣＤＲ３を含む設計複合抗体配列であって、該設計抗体配列の残余が、該非ヒト抗体パネルからの複数メンバーの抗体コンセンサス配列由来である、設計複合抗体配列。

【請求項５８】

非ヒトドナー抗体由来のＣＤＲ領域をヒトアクセプタ抗体由来のフレームワーク領域に組み入れる工程を包含する、ヒト化抗体を作製する方法における改良点であって、該改良点は、該ヒトアクセプタ抗体配列を、以下：

（ｉ）標的に結合する非ヒト抗体のパネルからの複数メンバーについて、抗体コンセンサス配列を確立する工程；

（ｉｉ）該ヒト抗体パネルの個々のメンバー由来のＣＤＲ３を、該コンセンサス配列のＣＤＲ３の代わりに置き換え、複合配列を形成する工程；および、

（ｉｉｉ）該複合配列をヒト抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列との相同性に基づき、少なくとも一つのヒトアクセプタ抗体配列を選択する工程、によって選択する工程を包含する、改良点。

【請求項５９】

抗体Ｃ１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３からなる群より選択されるＣＤＲ由来の少なくとも一つのＣＤＲを含む抗体軽鎖。

【請求項６０】

抗体Ｃ１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３からなる群より選択されるＣＤＲ由来の少なくとも一つのＣＤＲを含む抗体重鎖。

【請求項６１】

腫瘍の処置方法であって、その必要のある被験体に有効量の抗ＰＤＧＦ抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項６２】

前記腫瘍が、神経芽腫、感覚上皮腫、髄膜腫、ユーイング肉腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、カポジ肉腫、中皮腫および中皮腫細胞株、絨毛上皮腫、膀胱癌、胃癌、骨肉腫、食道癌、線維肉腫、原発性ヒト肺癌における悪性上皮細胞、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、傍神経節腫、血管肉腫、血管周囲細胞腫、ＮＯＳ肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫、および子宮間質肉腫、乳癌、結腸直腸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性線維組織球腫、平滑筋細胞腫瘍、および前立腺癌からなる群から選択される、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

前記抗ＰＤＧＦ抗体が抗ＰＤＧＦ ＢＢ抗体である、請求項６１に記載の方法。

【請求項６４】

前記抗ＰＤＧＦ抗体が化学治療薬剤との組み合わせ治療で使用される、請求項６１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願）

本出願は、アメリカ合衆国仮特許出願第６０／３２３，５３７号（２００１年９月２０日出願）；同第６０／３２３，５４４号（２００１年９月２０日出願）；および同第６０／３７９，９９４号（２００２年５月１３日出願）に対する優先権を主張する。

【０００２】

（技術分野）

本明細書は、抗体に関し、より具体的には、標的物質に選択的に結合し、異生物種内で低減された免疫原性を有する、一生物種由来の設計された抗体および抗体断片に関連する。より具体的には、抗ＰＤＧＦ抗体および設計抗ＰＤＧＦ抗体が提供される。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0003】

(関連技術の背景)

血小板由来成長因子(PDGF)は、元々は血小板α顆粒放出生産物として発見されたが、後に多数の異なるPDGF分泌細胞型が同定された。PDGFは、少なくとも2つの4同属鎖:ジスルフィド結合で結合するA、B、CおよびDから構成された、ホモダイマーまたはヘテロダイマーのタンパク質である。PDGFシグナルは、PDGFR-αおよびPDGFR-βと呼ばれる2つの高親和性レセプター経路で仲介される。PDGF-BBおよびPDGF-ABは、両レセプターを通じてシグナル伝達し得るが、PDGF-AAおよびPDGF-CCは、αレセプターだけに結合し得、PDGF-DDは、独占的にβレセプターに結合しシグナル伝達する。PDGFは、有効な分裂促進剤、化学誘引物質および間葉細胞の生存因子として作用する。このPDGFは生理学的な修復機構にて決定的な役割を果たすが、種々の増殖性疾患の病因にも関与する。サル肉腫ウイルスのv-Sis癌遺伝子が、PDGF B鎖遺伝子のレトロウイルスホモログであるという知見(Doolittle ら, Science 1983 July 15; 221(4607): 275-277, Deuel ら, Science 1983 Sept. 30; 221(4618): 1348-1350)は、腫瘍形成におけるPDGFの役割を示唆した。

【0004】

脳腫瘍発生におけるPDGFの関連の最初の証拠は、v-Sis運搬サル肉腫ウイルスの脳内注射はサルにおける脳腫瘍形成を誘導し得るという観察(Deinhardt ら, (ed) Viral Oncology 357-398, New York, Raven Press, 1980)から結果として生じた。PDGFレセプターを発現する細胞株だけが、v-Sisのトランスフェクションによりオートクライン型にて形質転換し得た。PDGF BBおよびPDGF DDならびにこれらのレセプターの発現は、ヒトの神経芽腫、感覚上皮腫、髄膜腫、ユーイング肉腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、カポジ肉腫、中皮腫および中皮腫細胞株、絨毛上皮腫、睪臓癌、胃癌、骨肉腫、食道癌、線維肉腫、原発性ヒト肺癌における悪性上皮細胞、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、傍神経節腫、血管肉腫、血管周囲細胞腫、NOS肉腫(sarcoma NOS)、滑膜肉腫、軟骨肉腫、および子宮間質肉腫、乳癌、結腸直腸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性線維組織球腫、平滑筋細胞腫瘍、および前立腺(prostate)癌において証明され、機能するオートクラインループおよびパラクラインループの存在を示唆した。

【0005】

脳腫瘍細胞に関連する多数の研究が、PDGF阻害剤を用いて行われてきた。例えば、Chinらは、阻害剤K252aを神経膠腫細胞株U87およびT98Gと共に使用した(Clin Cancer Res 1997 May; 3(5): 771-776)。K252a処理は、PDGFに応答してレセプターの自己リン酸化を遮断し、そしてその細胞株における増殖の減少を導く。さらに、U87細胞において、アポトーシスが誘導される。

【0006】

Johnsonらは、PDGFに対する抗体を使用し、サル肉腫ウイルスによる急性形質転換を阻害した(Nature 1985 Oct. 3; 317(6036): 438-440)。線維芽細胞が、数日後に病巣が検出され得るようにSSV/SSAVによって、形質転換させられた。抗PDGF抗体は、感染後早期(8~12日後)の病巣形成を抑制する。しかし20日後には、抗PDGF抗体と対照抗体との間に、病巣の数における違いはなかった。

【0007】

Todoらは、抗PDGF血清を使用して、馴化培地によって刺激されるDNA合成を髄膜腫細胞において阻害した。このことは、髄膜腫細胞増殖におけるPDGF-B関連分子の役割を示唆した(J. Neurosurg 84(5): 852-8)。

【0008】

2つのPDGFアンタゴニスト（トラピジルおよびスラミン）は、成長因子誘導性神経膠腫細胞増殖および成長因子誘導性髄膜腫細胞増殖を阻害することが証明されている。スラミンは、非特異的プリン作動性（purinergic）レセプターアンタゴニストであり、EGF、IFG-1およびPDGF-BB誘導性の髄膜腫細胞増殖を40～70%まで阻害する（Schreierら, Neurosurg 1995 April; 82（4）：600-607）。トラピジルは、PDGF陽性細胞株を、PDGF陰性細胞株より特異的に阻害することが証明されている。しかし、両アンタゴニストはPDGFに特異的でなく、他のチロシンキナーゼレセプターにも作用する。他の種類のレセプターアンタゴニストとしては、選択的PDGFレセプターリン酸化遮断薬およびドミナントネガティブレセプターがある。これらの治療は、正常な脳細胞にも影響し得るという不便性を有している。なぜなら、そのレセプターが、正常脳細胞並びに髄膜腫細胞にも存在するからである。

10

【0009】

抗体は、脊椎動物において、B細胞として知られるリンパ球により、抗原による刺激に対する応答して産生されるタンパク質である。抗体（免疫グロブリン（Ig）としても知られる）分子の基本構造単位は、大文字の「Y」の形で集まる4つのポリペプチド鎖からなる。この4鎖のうちの2鎖は、同一の軽鎖（L鎖）であり、2鎖は同一の重鎖（H鎖）である。5つの異った種類（アイソタイプ）の重鎖が存在し、これらが抗体を、5つのクラス（すなわち、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）に分ける。さらに、軽鎖には2つの異なるアイソタイプがあり、κおよびλと呼ばれる。それぞれのクラスの重鎖が、どちらの軽鎖とも結合し得る。重鎖および軽鎖は、それぞれ、抗原との結合に関わる可変領域（各々VHおよびVL）、および定常（C）領域を含む。抗原結合部分は、6つの超可変領域（相補性決定領域（CDR）としても知られる）から構成される。重鎖の3つのCDRおよび軽鎖の3つのCDRは、4つの比較的保存されている逆並行βシート（フレームワーク領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）と呼ばれる）の間に、それぞれの鎖において、それぞれ位置している。慣習的に、番号付けの規則が、V重鎖およびV軽鎖のコンポーネント部分の位置を表すために利用されてきた。Kabatsの定義は、配列の可変性に基づき、Chothiaの定義は、構造ループ領域の位置に基づく。

20

【0010】

抗体は、種々の疾患および症状の治療処置の継続的な探索において、熱い研究開発の対象となっている。これは、抗体の持つ、インビボで特異的な標的を探し出し結合する、天然能力に起因する。抗体を操作する能力は、KohlerおよびMilstein（Kohlerら, Nature 256：495-497（1976））がマウス抗体を基に、モノクローナル抗体（mAb）を産生するハイブリドーマ技術を開発したときに、飛躍的に進歩した。この技術は、通常、マウスを抗原で免疫し、骨髓腫細胞にその免疫されたマウス由来の脾臓細胞を融合してハイブリドーマを生成する工程を包含する。標的抗原に特異的な種類の抗体すなわちいわゆる「モノクローナル抗体」を分泌する個別の細胞が、ハイブリドーマから選択される。モノクローナル抗体は、種々の標的に対して生じさせられ得、そしてヒトに投与されることでかなりの治療または診断の効果を達成し得ると考えられた。残念なことに、多くの場合において、モノクローナル抗体は、外部由来物質であって、ヒト体内に通常に生じたものではないと、ヒト免疫系によって認識される。このことは、ヒトにおける免疫原性または抗原性と呼ばれる。この理由で、非ヒト起源の抗体がヒトに投与される場合、抗非ヒト抗体が産生される。この非ヒト抗体は、体内からのその非ヒト抗体のクリアランスの増加を生じ、これにより、治療効果または診断効果は、減少するかまたは完全に遮断される。過敏性反応もまた、起こり得る。結果として、多くの研究が、抗体の配列および構造を操作してそれらをよりヒトに似せさせ、それによって、ヒトの免疫原性を回避することに関わり、「ヒト化」として知られる遺伝子工学技術の発展を導いてきた。

30

40

【0011】

最初のヒト化手法は、重鎖および軽鎖の可変ドメインは抗原との結合を担っており、そ

50

して定常ドメインはエフェクター機能を担っている、という知見に基づいていた。キメラ抗体は、例えば、げっ歯類mAbの可変ドメインの、ヒト抗体定常ドメインへの移植（例えば、Neuberger MS ら, Nature 314, 268-70, 1985, および Takeda ら, Nature 314, 452-4, 1985）により、生成された。これらのキメラ抗体は、ヒトにおいて、よりよくエフェクター機能を誘導し、かつ免疫原性の減少を示すが、げっ歯類可変領域は、なお免疫応答の誘導の危険を与える。可変ドメインが、抗原結合ループ（相補性決定領域またはCDR）を乗せたβシートフレームワークからなることが理解されたとき、ヒト化抗体は、ヒトフレームワーク上にグラフトされたげっ歯類CDRを含むように設計された。いくつかの異なった抗原結合部分が、しばしばげっ歯類配列に最も高い相同性を持つヒトフレームワークを使うことで、同一ヒトフレームワーク上に首尾よく移された（例えば、Jones PT ら, Nature 321, 522-5, 1986; Riechmann L. ら, Nature 332, 323-327, 1988; および Sato K. ら, Mol. Immunol. 31, 371-8, 1994）。あるいは、コンセンサスヒトフレームワークが、いくつかのヒト重鎖に基づいて構築された（例えば、Carter P. ら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 487-99, 1992）。しかし、単純なCDRグラフティングは、しばしば抗原親和性の低下を引き起こした。βシートフレームワークとループとの間に起こり得る他の相互作用が、抗原結合部位の改造のために考慮されるべきであった（Chothia C ら, Mol. Biol. 196, 901-917, 1987）。 10 20

【0012】

いくつかの抗体のヒト化に必要な不可欠なフレームワーク残基の比較、および抗体結晶構造に基づいたコンピューターモデリングは、「ベルニエ領域（Vernier zone）残基」（Foot J. ら, Mol Biol 224, 487-99, 1992）と呼ばれる、おそらく結合部分の完全性に寄与するであろうフレームワーク残基一式を明らかにした。さらに、VH-VL境界区域におけるいくつかの残基は、抗原への親和性の保持に重要であり得る（Santos AD ら, Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol 60, 169-94 1998）。最初、フレームワーク残基は、徐々にげっ歯類配列へと戻し変異させられた（Kettleborough CA ら, Protein Engin. 4, 773-783, 1991）。しかしこの変異による手法は、非常に時間のかかるもので、かつ、重要な残基の全てを網羅することはできない。 30

【0013】

特定任意の抗体に対し、小さな一連の改変は、結合を最適にするために十分であり得るが、ベルニエおよびVH/VL残基の組から選び出すことは難しい。選択手法と組み合わせたコンビナトリアルライブラリー手法（ファージディスプレイなど）は、全ての重要なフレームワーク残基においてげっ歯類とヒト配列との間のどちらかを示しかつ全てのヒト化型の結合作用の同時決定を促す、ヒト化分子のライブラリーの生成により、ヒト化技術の大改革を行った（例えば、Rosok MJ, J Biol Chem, 271, 22611-8, 1996 および Baca M ら, J Biol Chem 272, 10678-84, 1997）。 40

【0014】

上記の手法は、6つのげっ歯類CDRそれぞれをヒトフレームワークにグラフトし、それにより有意な数の潜在的に問題のあるげっ歯類残基を導入する。したがって、起源種由来抗体に基づき、減少した免疫原性を示す一方で至適結合プロフィールを保持する、治療目的および診断目的のために標的種に投与され得る設計抗体の提供は、有利であり得る。減少した免疫原性を示す一方で至適結合プロフィールを保持する、治療目的および診断目的のために標的種に投与され得る設計PDGF抗体の提供もまた、有利であり得る。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0015】

(要約)

高度に選択的で治療に有用な、PDGFアンタゴニストとして作用する抗PDGF-BB抗体が、提供される。マウス脾臓および骨髓由来の高親和性PDGF-BB抗体が、ファージディスプレイにより単離された。本抗体はヒトPDGF-BBを認識するが、ラットPDGF-BBは認識しない。マウスCDRまたはヒトCDRのどちらかの選択、およびマウスフレームワークと最も深く関連するヒトフレームワークにおける特定のフレームワークアミノ酸の改変により産生された、ヒト化抗PDGF-BB抗体も、提供される。ヒトCDRまたはウサギCDRのいずれかの選択およびウサギフレームワークにおける特定のフレームワークアミノ酸の改変により産生された、ヒト化抗PDGF-BB抗体も、提供される。マウス抗体(C1)、ウサギ抗体(F3)、およびヒト化抗体(E1およびB1)は、PDGF-BBに対してPDGFβレセプターと有効に競合する。マウスC1は、神経芽腫細胞株HTB11(IMR32)およびCCL127(NB41A3)、感覚上皮腫細胞株HTB10(SKNMC)、ユーイング肉腫細胞株HTB166(RDES)、星状細胞腫細胞株U87、神経膠芽腫細胞株T98G、ヒト肺癌細胞株NCIH1651、NCI1876、NCIH2228、および肺腺癌細胞株NCIH23の増殖を阻害するが、このことは本抗体が、種々の癌の処置のために、治療学的に有用であることを示している。

【0016】

抗体C1のCDR1、CDR2、およびCDR3からなる群より選択されるCDR由来の少なくとも1つのCDRを図14aに表示されるように含む抗体軽鎖も、提供される。

【0017】

さらに、抗体C1のCDR1、CDR2、およびCDR3からなる群より選択されるCDR由来の少なくとも1つのCDRを図14bに表示されるように含む抗体重鎖が、提供される。

【0018】

必要に応じて、2つ以上のCDRが前述の群より選択される；ある実施形態においては、3つのCDR全てが、前述の群より選択され得る。CDRは、アミノ酸の置換、付加、欠失によって改変され得、この改変は抗体設計についての技術分野において公知であり、本明細書中でさらに詳細に議論される方法に従って、行われる。

【0019】

好ましい重鎖および軽鎖は、図14aおよび図14bにそれぞれ表示される。

【0020】

フレームワーク領域(FR)は、ヒト化抗体B1およびE1に関して、図15aおよび図15bに表示されるFRに好ましくは由来するかまたはこれらと同一である。

【0021】

軽鎖と重鎖は、結合して完全な抗体を形成し得る。抗体は、定常ドメイン、または抗原結合免疫グロブリン断片(Fab、F(ab')₂、FvおよびscFvを含む)を含む、全長の免疫グロブリンであり得る。適当な抗体は、抗体B1およびE1であり、図15aおよび図15bに表示される。

【0022】

別の実施形態においては、以下からなる群より選択された腫瘍の治療の方法が提供されている；神経芽腫、感覚上皮腫、髄膜腫、ユーイング肉腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、カポジ肉腫、中皮腫および中皮腫細胞株、絨毛上皮腫、膵臓癌、胃癌、骨肉腫、食道癌、線維肉腫、原発性ヒト肺癌における悪性上皮細胞、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、傍神経節腫、血管肉腫、血管周囲細胞腫、NOS肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫、および子宮間質肉腫、乳癌、結腸直腸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性線維組織球腫、平滑筋細胞腫瘍、および前立腺癌。本方法は、有効量の抗PDGF抗体をその必要がある被験体へ投与する工程を包含する。この抗体は、好ましくは抗PDGF-BB抗体である。この抗体は、種々の癌治療において、他の化学治療薬剤との組み合わせ治療に使用され得る。

【0023】

別の局面では、標的に対する特異性を有する第一抗体の提供；第一抗体の少なくとも一部分の配列の決定；第一抗体の少なくとも一部分の配列と標的種由来の抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーとの比較；このライブラリーからの、第一抗体の少なくとも一部分と高い相同性を示しCDR3領域を含む、少なくとも1つの配列の選択；第一抗体からのCDR3領域の取得；および第一抗体由来のCDR3領域を、そのライブラリー由来の少なくとも1つの配列の、CDR3領域がかつて占めていた位置において組み込み、最適化された設計抗体または設計抗体断片を形成する工程を包含する、最適化された設計抗体または設計抗体断片を提供する方法が、本明細書中で記述される。上で言及した配列は、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列であり得る。言及された抗体断片は、scFV、Fab、F(ab')₂、FD、二重特異性抗体(dibody)、抗体軽鎖および抗体重鎖からなる群より選択され得る。上で言及した標的種は、ヒトであり得る。上で言及した第一抗体の少なくとも一部分の配列は、可変領域配列であり得、標的種由来である領域由来の抗体断片配列は、可変領域であり得る。

【0024】

さらに、第一抗体の可変領域はFR1、CDR1、FR2、CDR2およびFR3からなり、相同性の程度の決定のために、標的種の生殖系列配列または再編成された配列と整列され得る。さらなる局面では、上段落の方法はまた、第一抗体の少なくとも一部分とライブラリー由来の高い相同性を示す少なくとも1つの配列との間における、非相同的位置の決定、および非相同的位置におけるもとの第一抗体残基または同じ非相同的位置における元のライブラリー配列残基のどちらかを含む、最適化された設計抗体または設計抗体断片の改変体の構築も包含する。さらに、最適化された設計抗体または設計抗体断片の改変体を提示するファージミドライブラリーまたはファージライブラリーが、産生され得る。さらに、このファージミドライブラリーまたはファージライブラリーは、標的物に対する活性により選別され得、そして、優先的に標的物に結合するファージ粒子またはファージミド粒子が単離される。

【0025】

さらに、第一抗体由来のCDR1領域が、必要に応じて得られ得、ライブラリー由来の少なくとも1つの配列の少なくとも一部分の、CDR1領域がかつて占めていた位置において組み込まれ得る。同様に、第一抗体由来のCDR2領域が、必要に応じて得られ得、ライブラリー由来の少なくとも1つの配列の少なくとも一部分の、CDR2領域がかつて占めていた位置に組み込まれ得る。さらに、第一抗体のCDR1領域もしくはCDR2領域のいずれかまたはその双方と、標的種のCDR1領域もしくはCDR2領域のいずれかまたはその両方との間での選択が、なされ得る。上述の参照ライブラリーは、ヒト再編成抗体配列を含み得る。ある局面においては、標的物はPDGFである。

【0026】

最適化された抗体または抗体断片を選択するための設計抗体または設計抗体断片のライブラリーもまた提供され、このライブラリーは、改変体設計抗体または断片を含み、この改変体は、標的種に対してネイティブである抗体由来のフレームワーク領域（このフレームワーク領域は所定の標的に対して特異性を有する第一抗体のフレームワーク領域と高い相同性を示す）、所定の標的に対して特異性を有する第一抗体由来のCDR3領域、第一抗体または標的種に対してネイティブである抗体のどちらか由来のCDR1領域およびCDR2領域の組み合わせ、ならびにVH/VL境界および／またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせ（このアミノ酸の組み合わせは、標的種に対してネイティブである抗体に存在するアミノ酸の組み合わせと第一抗体に存在するアミノ酸の組み合わせとの間の選択を示す）を有する。

【0027】

さらに別の局面では、本開示に従うヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片は、1つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域および2つの異なる非ヒト供給源由来のCDR領域を含む。別の局面では、本開示に従うヒト化複合抗体またはヒト化複合抗

体の機能断片は、生殖系列抗体配列および再編成ヒト抗体配列の双方由来のフレームワーク領域および2つの異なる供給源（そのうち少なくとも片方が非ヒトである）由来のCDR領域を含む。さらに別の実施形態では、本開示に従うヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片は、1つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域、非ヒトCDR3、および非ヒト抗体コンセンサス配列由来のCDR1またはCDR2のうちの少なくとも1つを含む。

【0028】

ヒト化複合抗体のための構成物の選択は、以下の工程：（i）標的に結合する非ヒト抗体のパネルから複数メンバーについての抗体コンセンサス配列を確立する工程；（ii）そのコンセンサス配列のCDR3を非ヒト抗体の個別のメンバー由来のCDR3で置換して、複合配列を形成する工程；および（iii）その複合配列をヒト抗体配列データベースと比較し、そしてその複合配列との相同性に基づき少なくとも1つのヒト抗体配列を選択する工程、を包含する方法により達成される。

10

【0029】

この様式で選択されるヒト抗体配列は、ヒト化複合抗体のためのフレームワーク領域を提供する。ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片のための、少なくともCDR3は、抗原に結合する上記の非ヒト抗体のパネルから選択され得る。ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片のためのCDR1およびCDR2は、抗原に結合する上記の非ヒト抗体のパネル、コンセンサス配列、または複合配列との相同性に基づいて選択されたヒト配列から選択され得る。特に有効な実施形態においては、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片に使用されるCDR3は、コンセンサス配列の中に置換されて複合抗体配列を形成するCDR3であり、ヒト化複合抗体に使用されるCDR1およびCDR2は、上記のパネルの1つ以上の異なったメンバーから選択されるか、もしくはコンセンサス配列由来である。

20

【0030】

ある実施形態においては、複合配列は、再編成抗体配列のデータベース（例えば、Kababデータベースなど）と比較され、そして、1つのヒト抗体配列が、複合抗体配列との相同性に基づいて選択される。この実施形態においては、1つの抗体からのフレームワーク領域が、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片の生成に使用される。

【0031】

別の実施形態においては、複合配列の一部分が、生殖系列配列データベース（例えば、Vbaseデータベースなど）と比較され、複合配列の次の一部分が、再編成抗体配列のデータベース（例えば、Kababデータベースなど）と比較される。少なくとも1つのヒト配列が、それぞれのデータベースから複合配列の少なくとも一部分との相同性に基づいて選択される。この実施形態においては、2つの抗体配列からのフレームワーク領域が、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片の生成に使用され、1つ以上のフレームワーク領域は、生殖系列配列から選択され、1つ以上のフレームワーク領域は再編成抗体配列から選択される。

30

【0032】

さらなる相違点は、複合配列と選択されたヒト配列との間の非相同的（ベルニエまたは V_H/V_L 境界など）位置の決定、および非相同的位置における元の複合配列残基または選択されたヒト配列フレームワーク由来の元の残基のどちらかを有している最適化設計抗体または設計抗体断片の改変体の構築を包含する、上記の方法に関連して導入され得る。

40

【0033】

上で言及した配列は、scFv、Fab、F(ab')₂、Fd、二重特異性抗体、抗体軽鎖および抗体重鎖であり得る。

【0034】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本明細書中で記載されている技術は、設計抗体を、特に、PDGFに対し高度に活性であり、かつ、ヒトにおける免疫原性の危険性を減少する最適化された設計抗体を提供する

50

。本発明の開示に従って操作されてきた標的種由来の抗体の可変領域のCDR3領域の代わりに、一種由来のCDR3領域の組み込みは、標的物への高度な親和性を保持するのに十分である一方で、標的種への投与時の有害免疫応答の危険性を減少することが、驚いたことに見出された。特に有用な実施形態においては、設計抗体はヒト化される。

【0035】

本明細書中で使用される技術用語および科学用語は、他に本明細書中で定義されない限り、一般に本教示に関わる当業者によって通常理解される意味を有する。当業者によって公知の種々の方法が、本明細書中で参照される。

【0036】

刊行物および参照された公知の方法を記載する他の資料は、全てを記載したかのように、全体が本明細書中に参考として援用される。本明細書中で記載された方法の実施は、他に指示されない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用し、これらは、当業者の範囲内である。このような従来技術は、文献において完全に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch, および Maniatis, *Molecular Cloning; Laboratory Manual* 2nd ed. (1989); DNA Cloning, Volume I および Volume II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); the series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), 特に Vol. 154 および Vol. 155 (Wu および Grossman, eds); PCR-A Practical Approach (McPherson, Quirke, および Taylor, eds., 1991); Immunology, 2d Edition, 1989, Roittら, C. V. Mosby Company, および New York.; Advanced Immunology, 2d Edition, 1991, Maleら, Grower Medical Publishing, New York.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volume I および Volume II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984, (M. L. Gait ed); Transcription and Translation, 1984 (Hames および Higgins eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; and Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller および M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); WO 97/08320; 米国特許第5, 427, 908号; 同第5, 885, 793号; 同第5, 969, 108号; 同第5, 565, 332号; 同第5, 837, 500号; 同第5, 223, 409号; 同第5, 403, 484号; 同第5, 643, 756号; 同第5, 723, 287号; 同第5, 952, 474号; Knappikら, 2000, J. Mol. Biol. 296: 57-86; Barbasら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982; Schaffitzelら 1999, J. Immunol. Meth. 10: 119-135; Kitamura, 1998, Int. J. Hematol., 67: 351-359; Georgiouら, 1997, Nat. Biotechnol. 15: 29-34; Littleら, 1995, J. Biotech. 41: 187-195; Chauthaiwaleら, 1992, Microbiol. Rev., 56: 577-591; Aruffo, 1991, Curr. Opin. Biotechnol. 2: 735-741; McCafferty (Editor) ら, 1996, A

nt i b o d y E n g i n e e r i n g : A P r a c t i c a l A p p r o a c h
を参照のこと。これらの内容は、本明細書中において参考として援用される。

【0037】

当業者に公知の任意の適切な材料および／または方法は、本明細書中に記載された方法を実施する際に利用され得る；しかし、好ましい材料および／または方法が記載される。以下の記載および実施例において参照される材料、試薬などは、留意されない限り、市場で購入できる。「含んでいる」、「含んだ」および「含む」という用語は、その広範な意味において使用されることが、理解されるべきである。すなわち、これらの意味は範囲の制限がなく、そして、例えば、含んでいるが限定はされていない、含んだが限定はされなかった、および含むが限定されない、ことを意味する。

10

【0038】

設計抗体および設計抗体断片は、完全長の重鎖および軽鎖を有する完全な抗体分子、またはそれらの任意の断片、例えば、F a b、F (a b ')₂、F d、s c F v、二重特異性抗体、抗体軽鎖および抗体重鎖などを含む。

【0039】

最初の材料として、所定の標的物が選択され、これに対して抗体が惹起される。標的物に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生する技術は、当業者に周知である。標的物は、抗原性を示すことができ、かつ、通常はタンパク質またはタンパク質多糖類である、任意の物質を含む。例として、レセプター、酵素、ホルモン、成長因子、ペプチドなどが挙げられる。天然に存在する抗体で本明細書の開示に従って使用するのに適したものだけでなく、所定の物質に対する設計抗体および設計抗体断片もまた適していることが、理解されるべきである。

20

【0040】

本明細書中で表示された技術にさらされ得る抗体 (A b) として、モノクローナル A b、および F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、s c F v、二重特異性抗体、抗体軽鎖、抗体重鎖および／またはファージディスプレイ技術またはファージミッドディスプレイ技術由来の抗体断片のような抗体断片を含む。機能的抗体断片は、通常抗体全体に存在する領域の不在にも関わらず、抗原に結合し得る抗体の断片である。単鎖抗体 (s c F v) は、機能する抗体断片に含まれる。

【0041】

特定の標的に対する抗体が、一旦同定されると、それらは、望ましい特徴を有するために設計され得る。一実施形態においては、抗体は、以下で記載されるように、少なくとも非標的種由来の C D R 3 を含むために設計される。本実施形態は、本明細書中で後に最適化された設計抗体と呼ばれる。他の一実施形態においては、抗体は、以下で記載されるように、少なくとも 2 種由来の C D R を含むために設計され、これらの C D R は、定常配列を使用して選択されたヒトフレームワーク内に組み込まれる。本実施形態の設計抗体は、「ヒト化抗体」と呼ばれる。

30

【0042】

(最適化抗体)

最適化過程を始めるために、標的抗原への特異性を有している起源となる種の抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子の可変部分の D N A 配列が、必要である。起源となる種は、抗体を産生するために使用される任意の種、例えば、マウス、ウサギ、ニワトリ、サル、などである。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生するための技術は、当業者に公知である。一旦可変部分の D N A 配列が得られたら、適切な標的種フレームワークの選択が、不可欠である。一実施形態は、この第一抗体配列と標的種由来の生殖系列可変遺伝子のアラインメントを含む。例えば、もし標的種がヒトであれば、こうした遺伝子配列の起源は、ヒト抗体配列データベースである V B A S E (h t t p : / / w w w . m r c - c p e . c a m . a c . u k / i m t - d o c) またはそれらの翻訳産物のような、任意の適切なライブラリーにて見出し得る。あるいは、標的種はやはりヒトであり第一抗体が非ヒトである場合、非ヒト遺伝子と K a b a t 免疫グロブリンデータベース (h t t

40

50

p: //www.immuno.bme.nwu.edu) に見出されるようなヒト再編成抗体配列を並列できる。アラインメントがヌクレオチド配列に基づいてなされたら、選択された遺伝子はその部分集合のどの遺伝子が第一抗体と最も近いアミノ酸相同性を有しているかを決定するために、分析されるべきである。ライブラリー中の他の遺伝子と比較して高い相同性に近づく遺伝子が、利用され、かつ、本明細書に記載される手順に従って操作されることが、熟考される。さらに、より低い相同性を有する遺伝子は、本明細書に記載される手順に従って操作されかつ選択された場合に既決定の標的物に対し特異性を示す生産物を、それらがコードする場合に、利用され得る。特定の一実施形態において、受容可能なホモロジーの範囲は、50%より高かった。代わりのアプローチは、例えば、V B A S E、K a b a t データベースおよび／またはこうしたデータベースの翻訳産物から決定されるような相同なヒト遺伝子を表示すること、そしてコンセンサスアミノ酸配列をヒトフレームワークとして使用することである。フレームワーク4領域（J 遺伝子）のためのアラインメントの手法は、生殖系列か再編成抗体配列のどちらかを使用することで同様になされ得る。標的種はヒト以外であり得るということが、理解されるべきである。

【0043】

標的種のフレームワークに組み込まれたCDRは、非標的種CDR3および標的種の配列と起源となる種の配列との間のCDR2および／またはCDR1の選択物を含む。フレームワーク残基は、一般に特定の位置以外の標的種配列が割り当てられる。例えば、VH/VL境界またはベルニエ領域位置のどちらかにおける非相同アミノ酸残基は、最適化Fabライブラリーの構築において標的物と起源の種との間の選択物として保持される。残基選択が好ましくあり得るさらなるフレームワーク位置は、起源種抗体の中で高度に保存された位置を含む。一般に、表面残基を標的種から守り、起こり得る最適化抗体の免疫原性をさらに避けることが望ましい。しかし、幾らかの表面露出残基は、VH/VL境界またはベルニエ領域としても割り当てられる。この場合、起源の種または標的種のどちらかの選択は、まだ与えられる。

【0044】

最適化抗体または抗体断片のアセンブリは、当業者に公知の従来の方法を使用して完成され得る。例えば、本明細書において記載される改変された可変ドメインをコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成によって産生し得る。あるいは、本明細書において記載される改変された可変ドメインをコードする核酸は、プライマー指向されたオリゴヌクレオチド部位特異的変異誘発により構築され得る。すなわち、望ましい変異をコードするオリゴヌクレオチドを変異した領域を含む一本鎖核酸とハイブリダイズし、および一本鎖をオリゴヌクレオチド伸長のためのテンプレートとして使用し、変異を含む鎖を産生することである。部位特異的変異誘発のために使用されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成により作製され得、または標的種フレームワークをコードする核酸から適切な制限酵素の使用により単離され得る。CDR領域をコードする核酸は、起源である種の抗体から、適切な制限酵素の使用および適切な連結酵素での連結による、標的種フレームワーク中への連結により単離され得る。

【0045】

抗体断片ライブラリーのアセンブリは、合成オリゴヌクレオチドの使用により選択的に完成される。1つの例では、オリゴヌクレオチドは重複領域を有するように設計され、その結果、それらはアニールし得、かつ、ポリメラーゼによって、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で行われるように、埋められた。重複伸長の複数の工程は、VLおよびVH遺伝子挿入を生み出す目的で行われた。これらの断片は、ヒト定常ドメインと重複する領域と共に設計されたため、全長軽鎖およびFd重鎖断片を産生するための重複伸長により融合し得る。軽鎖および重鎖Fd遺伝子は、したがって重複伸長によって互いに融合され、一本鎖のFabライブラリー挿入部分を作り、ディスプレイベクターの中にクローン化される。ヒト化ライブラリー遺伝子アセンブリのための代替の方法もまた、使用され得る。例えば、ライブラリーは重複オリゴヌクレオチドから、リガーゼ連鎖反応（LCR）手法を使用して組み立てられ得る。例えば、ChalmersおよびCurnow, Biotec

techniques (2001) 30-2, p 249-252を参照のこと。このLCR技術は、一連(12個までが最適)の重複オリゴヌクレオチドが、2重鎖遺伝子を産生するような方法において、オリゴ間のニックのみと共にアニーリングすることを含む(不連続部分はない)。オリゴヌクレオチドは、耐熱リガーゼにより、サーモサイクリングレジメントを使用して、互いに連結される。遺伝子アセンブリに続いて、一回のPCRが行われることにより、オリゴヌクレオチド内に余剰が設計され、そしてPCRが純系の形質転換株の産生を確実にする。遺伝子も、多数の冒頭LCR断片から、これらをPCR重複伸長を使用して一緒に結合させることにより、集められ得る。最後に、マウスまたはヒトどちらかのCDR1およびCDR2の異なった組合わせと共にある抗体可変遺伝子ライブラリー断片を、LCRプロトコルと共に、別々の合成混合物におけるオリゴをコードする異なったCDRを組み合わせるにより、開発することが可能である。 10

【0046】

抗体断片の種々の形態は、産生され得、かつ適切なベクターの中にクローン化され得、最適化された抗体ライブラリーを作る。例えば可変遺伝子は、フレーム内に必要な定常ドメインの残りの部分を含んだベクターの中にクローン化され得る。クローン化され得る他の断片の例は、軽鎖全体、重鎖のFd部分、または軽鎖および重鎖Fdコード配列の両方を含む断片を含む。あるいは、ヒト化に使用される抗体断片は、一本鎖抗体であり得る(scFv)。

【0047】

任意の選択ディスプレイ系が、本明細書の開示に従うライブラリーとの結合に使用され得る。ラージライブラリーの好ましいメンバーを単離するための選択プロトコルは、ファージディスプレイ技術によって代表されるように、当業者に公知である。様々なペプチド配列が糸状のバクテリオファージ表面で示されるこのような系(Scott および Smith (1990) Science, 249:386)は、インビトロ選択および、標的抗原に結合する特異的抗体断片の増幅のための抗体断片(およびこれらをコードするヌクレオチド配列)のライブラリーを作るために有用であることが証明されている。V_H およびV_L 領域をコードするヌクレオチド配列は、E. coliのペリプラズム間隙に関係するリーダー信号をコードする遺伝子断片と連結し、そしてその結果、結果として生じた抗体断片が、バクテリオファージ被膜タンパク質(例えば、pIIIまたはpVII)との典型的な融合として、バクテリオファージの表面に示される。あるいは、抗体断片は、ラムダファージカプシド(ファージボディ)上に外部に示される。ファージベースディスプレイ系の有利性は、これらが生物学的系であり、選択されたライブラリーメンバーが、選択されたライブラリーメンバーを含むファージの細菌細胞における成長によって単に増幅され得るからである。さらに、ポリペプチドライブラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列がファージベクターまたはファージミドベクター上に含まれるため、配列決定、発現およびその後の遺伝子操作は、比較的まっすぐである。 20 30

【0048】

バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーおよびラムダファージ発現ライブラリーを構築するための方法は、当技術分野で周知である(McCaffertyら(1990) Nature, 348:552; Kangら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88:4363; Clacksonら(1991) Nature, 352:624; Lowmanら(1991) Biochemistry, 30:10832; Burtonら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88:10134; Hoogenboomら(1991) Nucleic Acid Res., 19:4133; Changら(1991) J. Immunol., 147:3610; Breitlingら, (1991) Gene, 104:147; Marksら, (1991) J. Mol. Biol., 222:581; Barbasら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89:4457; HawkinsおよびWinter(1992) J. Immunol., 22:867; Marksら, 1992, J. Biol. Chem., 267:16007; Ler 40 50

nerら(1992) Science, 258:1313, これらは本明細書中に参考として援用される)。

【0049】

特に有利なアプローチの1つは、scFvファージライブラリーの使用であった(Hustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:5879-5883; Chaudharyら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:1066-1070; MacCaffertyら(1990) 前出; Clacksonら(1991) 前出; Marksら(1991) 前出; Chiswellら(1992) Trends Biotech., 10:80; Marksら(1992) J. Biol. Chem., 267:16007)。バクテリオファージ被膜タンパク質において示されたscFvライブラリーの種々の実施形態は、記載される。ファージディスプレイ手法の改良も、公知である。例えば、WO96/06213 およびWO92/01047 (Medical Research Council) およびWO97/08320 (Morphosys) これらは本明細書中で参考として援用される。Fabライブラリーも公知である。例として、WO92/01047 (CAT/MRC) およびWO91/17271 (Affymax) において記載されている。

10

【0050】

抗体ライブラリーまたはポリヌクレオチドライブラリーを産生する他の系は、ライブラリーメンバーのインビトロ合成のための無細胞酵素的装置の使用を含む。1つの方法において、RNA分子は、標的リガンドに対する選択の交互の繰り返しおよびPCR増幅により選択される(TuerkおよびGold(1990) Science, 249:505; EllingtonおよびSzostak(1990) Nature, 346:818)。類似の技術が、既決定のヒト転写因子に結合するDNA配列を同定するために使用され得る(ThiesenおよびBach(1990) Nucleic Acids Res., 18:3203; BeaudryおよびJoyce(1992) Science, 257:635; WO92/05258 およびWO92/14843)。類似の方法において、インビトロ翻訳が、抗体分子を合成するためにラージライブラリー産生のための方法として使用され得る。一般に安定化ポリソーム複合体含むこれらの方法は、さらに以下において記載されている; WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058, およびWO92/02536。ファージベースでない代替のディスプレイ系は、WO95/22625 およびWO95/11922 (Affymax) のように、選択のための抗体分子を示すためにポリソームを使用する。これらおよび全ての前述の文献は、本明細書中に参考として援用される。

20

30

【0051】

(ヒト化抗体)

他の局面において、本明細書中に記載された技術は、既決定の標的に対し高度に活性であり、かつ、ヒトにおける免疫抗性の危険を減少させた、作用するヒト化混成設計抗体を、提供する。下でさらに十分に記載されるように、ヒト化抗体は、非ヒト抗体のパネルからの2つ以上の抗体の配列の第一決定によってもたらされる。これらの抗体は、例えば選別技術で決定されたように、特定の標的への高い結合親和性を示す。非ヒト抗体のパネルからの2つ以上のメンバーの抗体のコンセンサス配列は、配列の比較によって確立される。非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来のCDR3が、コンセンサス配列のCDR3に代わって置換され、複合配列が形成される。この複合配列は、複合配列とヒト抗体配列データベースとの比較(通常はコンピューターによってなされる)において、「質問」として使用される。少なくとも1つのヒト抗体配列が、複合配列との相同性に基づいて選択される。選択されたこのヒト抗体配列は、本開示に従って作製される混成設計ヒト化抗体のためのフレームワーク領域を提供する。本開示に従って作製される混成設計ヒト化抗体のためのCDRは、少なくとも2つの起源から選択された。特に、CDR3は、非ヒト抗体のパネルの個々のメンバーより選択され、かつ、CDR1およびCDR2もしくはその両方は、このパネルの他のメンバー、コンセンサス配列、または複合配列との相同性に基

40

50

づいて同定されたヒト配列を含む、1つ以上の異なった起源から選択される。結果として生じる混成ヒト化抗体は、したがって、標的に対する高い結合親和性およびヒトにおける減少された免疫原性を有するように設計される。

【0052】

始めに、複数の最初の抗体は、1つ以上の非ヒト起源の種から得られる。より具体的には、標的抗原に対する特異性を有する少なくとも2つの抗体の軽鎖、重鎖またはその両方の可変部分の核酸配列またはアミノ酸配列が、必要とされる。起源となる種は、抗体または抗体ライブラリーを産生に使用される任意の種である。例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、サル、ヒト、など。モノクローナル抗体を産生およびクローン化する技術は、当業者に周知である。望ましい2つ以上の抗体が得られた後、それぞれの抗体の配列が決定される。すなわち、可変領域（VHおよびVL）は、構成部分（すなわち、フレームワーク（FR）、CDR、ベルニエ領域およびVH/VL境界領域）によって、CDRの任意の可能な定義（例えば、Kabatt単独、Chothia単独、KabattおよびChothiaの組み合わせ、および当業者に公知の任意の他のもの）を使用して、同定され得、このようにして同定された。

10

【0053】

本ハイブリダイゼーション法に従い、1つ以上の起源の種由来である、少なくとも2つのおよび望ましくはそれ以上の抗体が、高い親和性、特異性および／または標的に対する活性および高い発現を含む多数の判断基準に基づいて選択される。集合的に、望ましい特性を有する選択された抗体は、本明細書中に抗体のパネルとして参照される。標的に対する高いおよびより高い親和性の抗体を単離するためのスクリーニング方法は、当技術分野において周知である。例えば、糸状バクテリオファージの表面に融合するポリペプチドの発現は、大きな集合のクローンから特定の配列を回収するための強力な方法を提供する（Smithら, Science, 228:1315-1517, 1985）。ペプチドまたはタンパク質に結合する抗体は、例えば以下のような、比較的単純な選別方法により、ライブラリーから選択されてきた；Scottら, Science, 249:386-290, 1990；Devlinら, Science, 249:404-406, 1990；Cwirllaら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:6378-6382, 1990；McCaffertyら, Nature, 348:552-554, 1990；Lowmanら, Biochemistry, 30:10832-10838, 1992；およびKangら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88:4363-4366, 1991。抗体ライブラリーのディスプレイとして公知である種々の技術は、以下を含む；ファージディスプレイ、ファージミドディスプレイ、リボゾーマルディスプレイおよび細胞表面ディスプレイ。抗体をスクリーニングするのに有効な選別方法では、標的リガンドは、例えばプレート上、磁気ビーズ、セファロースなど、カラムに使われるようなビーズ上に固定化され得る。特定の実施形態においては、標的リガンドは、例えば、ビオチン、FACS選別のための2-蛍光色素などの使用により、「タグ標識」される。

20

30

【0054】

抗体を発現しているファージ発現抗体またはファージミド発現抗体のライブラリーは、ファージベクターおよびファージミドベクターを利用する。ここで抗体は、ファージ被膜タンパク質をコードする遺伝子と融合される。標的リガンドは、製造業者の指示書に従って、磁気ビーズに結合体化される。ビーズおよび任意の未反応基への非特異的結合をブロックするため、ビーズは、過剰なBSAと共にインキュベートされ得る。次いで、ビーズはPBS-0.05% Tween 20中の懸濁液で多数回洗浄され、プラスチック管の側に沿った強力磁石により、回収される。次いで、ビーズは、それから必要時まで冷蔵される。スクリーニング実験において、ライブラリーのアリコートは、再懸濁ビーズのサンプルと混合され得る。チューブの内容物は、低温（例えば、4~5℃）で、十分な時間（例えば、1~2時間）振とうされる。次いで、磁気ビーズは、強力磁石で回収され、液体はアスピレーションによって除かれる。次いで、PBS-0.05% Tween 20

40

50

を添加し、チューブを数回逆さにすることでビーズを再懸濁し、磁石によってチューブの壁に引き付けるにことよって、ビーズは洗浄される。次いで、内容物は、除去され、そして洗浄はさらに5～10回繰り返される。50 mM グリシン-HCl (pH 2.2)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 溶液が洗浄後のビーズに加えられ、タンパク質を熱変性させて結合したファージを遊離する。短いインキュベーション時間の後、ビーズは強力磁石でチューブの横に押しやられ、次いで、液体内容物は、清潔なチューブへ移される。1 M Tris-HCl (pH 7.5) または 1 M NaH_2PO_4 (pH 7) がチューブに加えられ、ファージサンプルの pH を中和する。ファージは例えば、 10^{-3} から 10^{-6} くらいに希釈され、アリコートはサンプルのプラーク形成単位の数を決めるために、E. coli 細胞と共にプレート上で培養される。ある場合では、プラークの色識別（すなわち、lacZ+プラークは青色で、lacZ-プラークは白色である。）のために X-Gal および IPTG 存在下でプレート培養がなされた。投入サンプルの滴定濃度も、比較のために決定される（希釈は一般に 10^{-6} から 10^{-9} である）。

【0055】

あるいは、抗体を発現するファージのライブラリーのスクリーニングは、例えば、後述のようにマイクロタイタープレートを使用して、達成され得る。標的リガンドは、例えば、100 mM NaHCO_3 (pH 8.5) 中で希釈されており、そして、少量のリガンド溶液のアリコートは、マイクロタイタープレートのウェルに吸着される（例えば、4℃で一晩のインキュベーションによって）。BSA 溶液のアリコート（1 mg/ml、100 mM NaHCO_3 中、pH 8.5）を加え、このプレートを室温で1時間インキュベーションする。マイクロタイタープレートの内容物を除去し、ウェルをPBS-0.05% Tween 20 で丁寧に洗浄する。プレートは、非結合標的を繰り返し洗い落とされる。ファージ溶液の少量のアリコートをそれぞれのウェルに導入し、このウェルを、室温で1～2時間インキュベートする。マイクロタイタープレートの内容物は除去し、繰り返し洗浄する。このプレートをそれぞれのウェルに洗浄液を入れて室温で20分インキュベートし、結合したファージを急速な解離定数で放出させる。全ての未結合のファージを除去するためにウェルをそれから複数回（例えば5回）洗浄する。ウェルに結合したファージを回収するため、pH 変化を利用し得る。50 mM グリシン-HCl (pH 2.2)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 溶液のアリコートを洗浄後のウェルに加えて、タンパク質を変性させ、そして結合したファージを解放する。次いで、5～10分後、内容物を清潔なチューブに移し、そして1 M Tris-HCl (pH 7.5) または 1 M NaH_2PO_4 (pH 7) の少量のアリコートを加えて、ファージサンプルの pH を中和する。次いで、ファージを、例えば 10^{-3} から 10^{-6} に希釈し、そしてアリコートを、E. coli 細胞と共にプレーティングして、このサンプルのプラーク形成単位の数を決める。ある場合では、プラークの色識別（すなわち、lacZ+プラークは青色で、lacZ-プラークは白色である）のために、X-Gal および IPTG 存在下でこのプレーティングがなされる。投入サンプルの力価も、比較のために決定される（希釈は一般に 10^{-6} から 10^{-9} ）。

【0056】

他の代替の方法に従うと、抗体のライブラリーのスクリーニングは、以下のように第一「富化」工程および第二フィルターリフト工程を包含する方法を使用して、達成され得る。発現コンビナトリアルライブラリー（例えばファージにおいて）由来の、所定のリガンドに結合し得る抗体（「ポジティブ」）は、最初に一回または二回のアフィニティクロマトグラフィにより、富化される。マイクロタイターウェルは、えり抜きのリガンドにより不動態化コーティングされる（例えば、100 μl 中に約10 μg ）。次いでこのウェルを、BSA 溶液によりブロックして、抗体のプラスチック表面への非特異接着を防ぐ。次いで、抗体を発現する約 10^{11} 個の粒子がウェルに加えられ、数時間インキュベーションされる。非結合抗体は、プレートの繰り返し洗浄によって除去され、そして特異的に結合した抗体が、酸性グリシン-HCl 溶液または他の溶出緩衝液の使用により溶出される。溶出された抗体ファージ溶液は、アルカリで中和され、例えば、E. coli の感染お

よび寒天中に培地を含んだ大きなシャーレ上でのプレート培養により増幅される。抗体を発現する増幅された培養物は、滴定濃度分析され、そしてこのプロセスは繰り返される。あるいは、リガンドは、共有結合的にアガロースまたは市販の活性化ビーズ試薬を使用して、アクリルアミドビーズに結合し得る。次いで、抗体溶液は、単純に結合したビーズ基質を含む小さなカラムを通過され、それからカラムはしっかり洗浄され、そして抗体は酸または他の溶出液で溶出される。どちらの場合においても、目的は、約 $1/10^5$ の頻度までポジティブを富化することである。富化の後には、フィルターリフトアッセイが行われる。例えば、ファージにおいて抗体が発現するとき、およそ $1 \sim 2 \times 10^5$ ファージを、 $500 \mu\text{l}$ の対数増殖期の *E. coli* に加え、そして培地中に 0.7% アガロースを含む大きな LB アガロースプレート上でプレート培養する。アガロースを固めて、そしてニトロセルロースフィルター（例えば、 0.45μ ）をアガロース表面に置く。一連の記録印が滅菌針でつけられ、下で記載されるように、後の現像で、フィルターとプレートの再配列ができるようにする。ファージプラークは、 37°C 一晚のインキュベーションで現像される（フィルターの存在はこの過程を妨げない）。それからフィルターは、それぞれ個々のプラークからインサイチュで接着しているファージと共にプレートから取り除く。それからフィルターを、BSA 溶液または他のブロッキング剤に $1 \sim 2$ 時間晒し、リガンド（または「プローブ」）の非特異結合を防ぐ。プローブ自体が、例えばビオチン標識（市販の NHS-ビオチン使用）または直接酵素標識（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のどちらかによって標識される。この方法により標識されたプローブは、半永久的に安定であり、かつ、数回再利用し得る。ブロックされたフィルターを、プローブ溶液に数時間晒し、プローブを任意のフィルター上でプローブに有意の親和性を有するペプチドを示すファージにインサイチュで結合させる。それからフィルターを洗浄し、非結合プローブを除去し、そして酵素基質溶液（直接標識プローブの場合）への露出、またはさらに酵素標識アビジン溶液（ビオチン標識プローブ）に晒すことにより現像される。陽性のファージプラークは、フィルター上における着色酵素開裂産物の局在化した付着物により同定され、これらの付着物は元のプレート上のプラークに対応している。現像されたフィルターを、記録印を使用してプレートと共に単純に再配列し、「陽性の」プラークを、アガロースからくり抜き、ファージを回収する。元のプレート上のプラークの高密度ゆえに、通常、第一段階で 1 つのプラークをプレートから単離するのは不可能である。従って、一回目のくり抜きから回収されたファージは、低密度において再びプレート培養され、このプロセスは繰り返され、個々のプラークの単離をでき、従って、1 つのファージクローンが単離できる。

【0057】

細菌細胞の外表面に抗体を発現するプラスミドベクターのライブラリーのスクリーニングは、磁気ビーズを以下のように使用することで達成され得る。標的リガンドは、ファージベクターのスクリーニングについて本質的に上で記載したように、磁気ビーズと共役させられる。細菌細胞表面に発現する複数の抗体を発現する組換え型プラスミドベクターを含んでいる細菌細胞のサンプルを、再懸濁ビーズの少量のアリコートと混合する。チューブの内容物を、 4°C で $1 \sim 2$ 時間振とうする。次いで磁気ビーズを、強力磁石で回収し、液体を吸引によって除く。それから、例えば、 1 ml の PBS- 0.05% Tween 20 を添加し、数回逆さにすることでビーズを再懸濁し、磁石によってビーズをチューブの壁に引き付けて液体内容物を除くことによって、ビーズを洗浄する。ビーズを、さらに $5 \sim 10$ 回繰り返し洗浄する。それからビーズを、培養液のサンプル（例えば、LB+アンピシリン）を含んだ培養フラスコに移す。結合した細胞は、高栄養培養液の中で細胞分裂を受け、娘細胞が、固定化された標的から切り離される。細胞が対数増殖期にあるとき、誘導物質を培養液に再び加え、より多くの抗体を産生させる。次いで、これらの細胞を、遠心によって集菌し、再スクリーニングする。成功するスクリーニング実験は、複数回使用（例えば、連続のスクリーニング）して、最適に行われる。次いで、回収された細胞を、低密度においてプレート培養し、個々の分析のために単離されたコロニーを得る。個々のコロニーは、選択され、アンピシリン含有の LB 培養液への植菌に使用される。3

7℃における一晚の培養後、培養液を遠心機で遠心する。次いで、個々の細胞アリコートは、ビーズに接着した標的リガンドへの結合の再試をされる。他のビーズへ結合する、そのビーズに接着している非関連のリガンドは、ネガティブコントロールとして使用し得る。

【0058】

あるいは、細菌細胞の表面上に抗体を発現するプラスミドベクターのライブラリーのスクリーニングは、以下のように達成し得る。標的リガンドは、上で記載されたように、ファージベクターのスクリーニングのため、マイクロタイタープレートへ吸着される。ウェルの未結合標的リガンドを洗い流した後、細菌細胞のサンプルを、少量の培養液に加え、そして、マイクロタイターウェル中に入れる。十分なインキュベーションの後、未結合の細菌を含まないようにくり返し洗浄する。大量の、約100mlのLB+アンピシリンを、それぞれのウェルに加え、このプレートを、37℃で2時間インキュベートする。結合した細胞は、高栄養培養液中で細胞分裂を受け、娘細胞が、固定化された標的から分離される。次いで、ウェルの内容物を、約10mlのLB+アンピシリンを含む培養フラスコに移す。細胞が対数増殖期にある場合、誘導物質が培養液に再び加えられ、より多くの抗体を産生させる。次いで、これらの細胞は、遠心によって集菌され、再スクリーニングされる。スクリーニングは、磁気ビーズを使用したスクリーニングに関して上で記載されたように、連続スクリーニングを使用して行われ得る。

10

【0059】

他の実施形態に従うと、ベクターまたは宿主細胞（例えばファージまたは細菌細胞）のいずれかの表面タンパク質として抗体を発現するライブラリーは、ライブラリーの溶液をセファロース、シリカなどのような固体基質に固定化させたリガンドのカラムに通させ、そして、カラムに結合したファージを徹底的な洗浄および溶出の後に回収することにより、スクリーニングされ得る。

20

【0060】

ライブラリースクリーニングのある重要な局面は、溶出である。説明を明白にするため、後の文章は、ファージによる抗体発現の点から、記載される。しかしこのような論議は、抗体が表面融合分子において発現する任意の系に適用し得ることが、容易に理解される。ファージ回収中におけるペプチド-標的相互作用の分断の条件は、ファージにおいて発現する複数のタンパク質由来の全ての与えられたペプチド配列それぞれに、特異的であると考えられる。例えば、特定の相互作用は酸性pHにより分断され得るが塩基性pHによっては分断され得ず、逆もまたあり得る。従って、種々の溶出条件（以下を含むが、これらに限定されない：pH2～3、pH12～13、競合における過剰な標的、洗浄剤、穏やかなタンパク質変性剤、尿素、温度変化、光、金属イオンの存在または非存在、キレート剤、など）は、回収されたファージにおいて発現する抗体の一次構造をそれぞれ一式の条件について比較して、それぞれのリガンド/抗体の組み合わせに適切な溶出条件を決定するために調べられるべきである。こうした溶出条件の幾つかは、ファージ感染と不適合性であり得る。なぜなら、それらは殺菌性であり、かつ、透析による除去を必要とするからである。異なった発現タンパク質の異なった条件下で溶出される能力には、標的への結合に参与する特定のペプチド領域の変性によるものだけではなく、隣接領域におけるコンホメーション変化によるものもある。これらの隣接配列も、実際の結合配列との組み合わせにおいて変性され得る；これらの隣接領域は、に溶出条件（すなわち、pH2～3、pH12～13、競合における過剰な標的、洗浄剤、穏やかなタンパク質変性剤、尿素、熱、冷却、光、金属イオン、キレート剤、など）への露出に反応して、その二次構造または三次構造を変化し得、これが今度は標的への結合の原因となるペプチドのコンホメーション変形をもたらす。

30

40

【0061】

標的分子に高い親和性を示す抗体の回収に適切な任意の選別方法が、適切であることが、理解されるべきである。回収およびどの抗体が望ましい親和性、活性、特異性および発現を有するかの決定の後、これらの抗体は、抗体のパネルを構成する。次いで、抗体のパ

50

ネルの複数のメンバーの配列が、当業者に公知の任意の技術を使用して決定される。パネルのメンバーの配列の比較により、抗体は、それらの配列に基づいて、抗体ファミリーに有利に分類され得る。抗体ファミリーは、抗体の公開データベースに描写され、当業者に周知である。

【0062】

標的に対する最も高い親和性を有するパネルメンバーを含むファミリー内のパネルメンバーについてコンセンサス配列が、確立される。与えられた一群の抗体配列のコンセンサス配列に到達することは、当業者の範囲内である。一般に、ファミリー内の個々のパネルメンバーの配列は、比較され、そして、配列に沿ったそれぞれの位置においてもっとも頻繁に現れるアミノ酸は、コンセンサス配列内のその位置を割り当てられる。複数の配列を比較し、自動的にコンセンサス配列を提供するコンピュータープログラム（例えば、DNASTAR Inc., Madison, Wisconsinより）は、市販されている。

10

【0063】

コンセンサス配列は、複合配列を提供するために改変される。コンセンサス配列を改変するために、特定のパネルメンバー由来のCDR3が、コンセンサス配列のCDR3に代わって置換される。CDR3が選択される特定のパネルメンバーは、発現効率、標的への親和性、標的への特異性および活性を含むがこれらに限定されない多数の因子に基づいて、選ばれ得る。これらそれぞれの因子を評価する技術は、当業者の範囲内である。

【0064】

複合配列が決定された後、複合配列と1つ以上の公知のヒト抗体配列データベース（例えば、生殖系列、再編成、またはその双方）との比較がなされる。比較は、複合配列をデータベースの配列と整列し、比較される配列間の相同性の度合いを決定することによって、なされる。アラインメントを検索するためのコンピュータープログラムは、当技術分野で周知である（例えば、BLASTなど）。例えば、ヒトアミノ酸配列または遺伝子配列の供給源は、以下のような任意の適切な参照データベースにおいて見出され得る；Genbank、NCBIタンパク質データバンク（<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>）、VBASE、ヒト抗体遺伝子のデータベース（<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/immt-doc>）、（生殖系列配列）、およびKabat免疫グロブリンデータベース（<http://www.immunobme.nwu.edu>）（再編成配列）またはそれらの翻訳産物。アラインメントがスクレオチド配列に基づいてなされる場合、選択された遺伝子は、分析され、その部分集合のどの遺伝子が、起源の種の抗体に対し最も近いアミノ酸相同性を有するかを、本明細書に記載されたように、決定されるべきである。データベースの他の配列と比較してより高い相同性に近づくアミノ酸配列または遺伝子配列が、本明細書に記載される手順に従って、利用され、操作され得ることが、企図される。ある特定の実施形態において、受容可能な相同性の範囲は、約50%より高い。パネルの供給源によっては、より高い相同性が求められ得る。具体的には、例えば、マウス抗体のパネルが、複合配列を形成するのに使用される場合、60%またはより高い相同性が有利に求められ得る。とにかく、複合配列それぞれと比較して最高度の相同性を持つヒト配列が、同定される。選ばれたヒト配列は、少なくともフレームワーク領域を、本開示に従って生成された設計複合ヒト化抗体に提供する。少なくとも1つの非ヒトCDR（望ましくは非ヒトCDR3）が、これらのヒトフレームワーク領域間に置かれ、本開示による設計複合ヒト化抗体を産生する。

20

30

40

【0065】

1つより多くのヒト配列が、本開示に従う設計複合ヒト化抗体の異なった部分を提供するように選択され得ることもまた、企図される。ある特に有用な実施形態において、本発明の設計複合ヒト化抗体のある部分がヒト生殖系列配列由来であり、かつ、本発明の設計複合ヒト化抗体の別の部分は再編成ヒト抗体配列由来である。例えば、FR1、CDR1、FR2、CDR2、およびFR3を含む複合配列の部分は、ヒト生殖系列配列データベースと比較し得る。複合配列のこの部分を、生殖系列データベースの配列と整列すること

50

により、複合配列のこの部分と高い相同性を持つ生殖系列配列が、同定され得る。この方法で同定された生殖系列配列は、F R 1、F R 2、F R 3（および下でより詳細に記載されるように、C D R 1および／またはC D R 2）を、構築中の設計複合ヒト化抗体のために提供し得る。それとは別に、F R 3、C D R 3、F R 4を含む複合配列の部分は、再編成ヒト抗体配列のデータベースと比較し得る。複合配列のこの部分を、データベースの配列と整列することにより、複合配列のこの部分と高い相同性を持つ配列を、同定し得る。この方法で同定された配列は、F R 3およびF R 4を、構築中の設計複合ヒト化抗体のために提供し得る。

【0066】

ヒト化複合抗体または機能抗体断片の構築における次の工程は、以前に選択したヒト配列のフレームワーク領域に組み込まれるC D Rを選択する工程を包含する。選ばれるC D Rは、少なくとも2つの供給源由来である。C D R 3に関しては、特定のパネルメンバー由来のC D R 3が、選択される。好ましくは、コンセンサス配列の中に置き換えられたものと同じC D R 3が、設計複合ヒト抗体への組み込みに選ばれる。上で示されたように、C D R 3が選択された特定のパネルメンバーは、発現効率、標的への親和性、標的への特異性および活性を含むがこれらに限定されない多数の因子に基づいて、有利に選ばれ得る。これらそれぞれの因子を評価する技術は、当業者の範囲である。

【0067】

C D R 1およびC D R 2に関しては、選択は1つ以上の後述の供給源よりなされる。C D R 1および／またはC D R 2は、別々のパネルメンバーから選択され得るが、ただしC D R 1またはC D R 2の少なくとも1つはC D R 3が選ばれたパネルメンバーとは別のパネルメンバーに由来する。あるいは、C D R 1および／またはC D R 2は、複数のパネルメンバーの配列由来のコンセンサス配列から選択され得る。さらに別の代替として、C D R 1および／またはC D R 2は、複合配列との比較により同定されたヒト配列から選択され得る。

【0068】

フレームワーク残基は、一般に、特定位置を除くアクセプタ種配列として割り当てられる。例えば、V H／V L境界またはベルニエ領域位置のどちらかにおける非相同アミノ酸残基は、複合ドナー配列とアクセプタ配列の間の選択として保持される。一般に、表面残基をヒト抗体由来のアクセプタフレームワークから離しておき、ヒト化複合抗体の起こり得る免疫原性をさらに避けることが望ましい。しかし、ある表面に露出した残基も、V H／V L境界またはベルニエ領域と呼ばれる。この場合、複合ドナーまたはアクセプタフレームワーク配列のどちらかの選択は、まだ与えられる。

【0069】

C D Rの選択およびアクセプタフレームワーク領域への割り当ての後、ヒト化複合抗体または機能抗体断片のアセンブリは、当業者に公知の従来の方法を使用することで達成し得る。例えば、本明細書中に記載された、改変された可変ドメインをコードするD N A配列は、オリゴヌクレオチド合成によって産生され得る。それに続き、本明細書中に記載された、改変された可変ドメインをコードする核酸は、プライマー指向性オリゴヌクレオチド部位特異的変異誘発、すなわち、変異される領域を含む一本鎖核酸に望ましい変異をコードするオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、そしてオリゴヌクレオチドの伸長のための鋳型としての一本鎖の使用して変異を含んだ鎖を生産することによって構築され得る。部位特異的変異誘発に使用されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成によって作製され得るか、または標的種フレームワークをコードする核酸から、適切な制限酵素の使用により単離され得る。

【0070】

ディスプレイベクターの中にクローン化された設計（上述のように最適化されるかまたはヒト化のどちらか）抗体または抗体断片は、適切な抗原に対し、良好な結合親和性を維持していた改変体を同定する目的で、選択され得る。なぜなら、抗体は、ファージまたはファージミド粒子の表面に存在するからである。例えば、B a r b a s I I Iら（20 50

01) Phage Display, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (この内容は本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。任意のファージまたはファージミドディスプレイベクターが機能するが、本方法論には以下のようなベクターが有用である; fd t e t D O G、p H E N 1、p C A N T A B 5 E、p R L 4 (図1を参照のこと)またはp R L 5 (図2を参照のこと)。例えば、F a b断片の場合、F d産物の軽鎖および重鎖は、l a cプロモーターの制御下にあり、それぞれの鎖は、細菌宿主のペリプラズム部分に指向させるために、その鎖に融合するリーダー信号を有する。この間隙において、抗体断片を正確にアセンブルすることができる。重鎖断片は、ファージ被膜タンパク質ドメインとの融合体として発現し、これは、アセンブルした抗体断片を、新たに作られたファージ粒子またはファージミド粒子の被膜に組み込ませる。新しいファージミド粒子の産生は、必要なファージ遺伝子全てを含むヘルパーファージの付加を必要とする。一旦、抗体断片のライブラリーがファージまたはファージミド表面に提示されると、選別と呼ばれる過程が続く。これは、i) ファージ粒子またはファージミド粒子の表面上に提示される抗体が望ましい抗原に結合し、i i) 非結合抗原は洗い流され、i i i) 結合した粒子は抗原から溶出され、そしてi v) 溶出された粒子はさらなる選択のために富化されたプールを増幅するために、新鮮な細菌宿主に晒される、方法である。代表的に、特異的な結合について抗体クローンをスクリーニングする前に、三回または四回の選別が行われる。この方法において、ファージ/ファージミド粒子は、結合表現型(抗体)を遺伝子型(D N A)と連結させ、抗体ディスプレイ技術の使用を非常に成功させている。しかし、他のベクター形式が、ハイブリダイゼーション過程に使用され得る; 選択および/またはスクリーニングのための、抗体断片ライブラリーの、溶解ファージベクター(改変T 7系またはL a m b d a Z a p系)へのクローニングなど。

【0071】

望ましい設計抗体および/または設計抗体断片の選択の後、これらが当業者に公知の任意の技術(例えば、インビトロ合成、組換えD N A産生などの技術)により、大量に産生されることが企図される。例えば、抗体または断片は、抗体重鎖をコードするオペロンを含む発現ベクターを構築するための、従来の技術を使用することで産生され得る。この抗体重鎖において、C D R、およびドナー抗体結合特異性を保持するために必要とされる可変領域フレームワークの最小部分(本明細書中で記載された技術に従って設計される)は、起源の種の抗体由来であり、かつ抗体の残りの部分は標的種免疫グロブリン由来である。この標的種免疫グロブリンは、本明細書中に記載されたとおりに操作し得、それにより抗体重鎖発現のためのベクターを産生する。

【0072】

さらに、抗体軽鎖をコードするオペロンを含む発現ベクターが、構築され得る。この抗体軽鎖において、1つ以上のC D R、およびドナー抗体結合特異性を保持するために必要とされる可変領域フレームワークの最小部分(本明細書中で記載されたように設計される)は、起源の種の抗体由来であり、かつ抗体の残りの部分は標的種免疫グロブリン由来である。この標的種免疫グロブリンは、本明細書中に提供されたとおりに操作され得、それにより抗体軽鎖の発現のためのベクターを産生する。

【0073】

次いで、発現ベクターは、従来の技術によって適切な宿主細胞へ移入されて、設計抗体または抗体断片の発現のためのトランスフェクションされた宿主細胞を産生し得、移植され得る。次いで、トランスフェクションされた宿主細胞は、当業者に公知の任意の適切な技術を使用して培養されて、抗体または抗体断片を産生する。

【0074】

特定の実施形態において、宿主細胞は、2つの発現ベクターを共トランスフェクションされ得る。第一ベクターは、重鎖由来ポリペプチドをコードするオペロンを含み、第二ベクターは、軽鎖由来ポリペプチドをコードするオペロンを含む。この2つのベクターは、

異なる選択マーカールを含み得るが、重鎖および軽鎖をコードする配列は除いて、好ましくは同一である。この手順は、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの等しい発現を提供する。あるいは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターが使用され得る。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAもしくはゲノムDNAまたはその両方を含み得る。

【0075】

特定の実施形態において、抗体または抗体断片の発現に使用される宿主細胞は、Escherichia coliのような細菌細胞、または好ましくは真核細胞のどちらかでもよい。好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞または293EBNAのような哺乳動物細胞が、使用され得る。発現ベクターの選択は、宿主細胞の選択に左右され、選択された細胞において望ましい発現および調節特性を有するように選択され得る。 10

【0076】

一旦産生されると、設計抗体または設計抗体断片は、以下を含む当該技術分野の標準的な手順により精製され得る；交差フロー過(cross-flow filtration)、アンモニウムスルフェート沈殿、アフィニティカラムクロマトグラフィ、ゲル電気泳動など。

【0077】

本明細書において言及される場合、「抗PDGF抗体」は、PDGFに特異的に結合する免疫グロブリン分子である。好ましくは、ある実施形態において、この分子はPDGFのBB形態に結合する。別の実施形態においては、この分子はPDGFのDD形態に結合する。本発明の抗PDGF抗体は、好ましくはマウスまたはヒトのモノクローナル抗体のような、モノクローナル抗PDGF抗体である。好ましい実施形態においては、この抗体はヒト化マウス抗体である。抗体は、軽鎖-重鎖免疫グロブリン四量体または抗原結合活性を保有するその断片を指すと、理解され得る。ある実施形態において、この用語はまたT細胞レセプターなどを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバーをいい、これらは選択的にPDGFに結合するように選択され、設計されまたは取得され得る。ヒト化抗PDGF抗体は、本明細書中に記載された新規な方法、または、一旦明らかにされた後は、従来の技術によって、調製され得る。 20

【0078】

モノクローナル抗PDGF抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株の調製プロセスは、例えば、以下の工程を包含する；1つ以上のPDGFポリペプチドもしくはその抗原断片、またはPDGFポリペプチドを含む抗原性キャリアを用いて適切な哺乳動物（例えばBalb/cマウス）を免疫する工程；免疫化哺乳動物の抗体産生細胞を、適切な骨髓腫細胞株と融合させる工程、融合によって得られたハイブリッド細胞をクローニングする工程、および望ましい抗体を分泌する細胞クローンを選択する工程。例えば、PDGFで免疫されたBalb/cマウスの脾臓細胞を、骨髓腫細胞株PA1または骨髓腫細胞Sp2/O-Ag14の細胞と融合させて、得られたハイブリッド細胞を、望ましい抗体の分泌についてスクリーニングし、ポジティブなハイブリドーマ細胞をクローン化する。 30

【0079】

1つの実施例において、Balb/cマウスを、1μgと100μgとの間のPDGFおよび（フロイントアジュバントのような）適切なアジュバントの、数回（例えば4〜6回）、数ヶ月にわたる（例えば二ヶ月と四ヶ月との間）皮下および／または腹膜への注射により免疫し、そして、免疫したマウスの脾臓細胞は最後の注射より二日から四日後に摘出し、融合プロモーター（好ましくはポリエチレングリコール）存在下で骨髓腫細胞株PA1細胞と融合させる。好ましくは、骨髓腫細胞は、3から20倍過剰な免疫マウス由来脾臓細胞と、約30%から約50%のポリエチレングリコール（分子量約4000）含有溶液中で融合させる。融合の後、これらの細胞は、本明細書中で前に記載されたような選択培地によって補充された適切な培養培地（例えば、HAT培地）に、定期的な間期において、通常の骨髓腫細胞を望ましいハイブリドーマ細胞の過成長から防ぐために、広げられる。 40

【0080】

本発明に従う抗体の産生のために好ましい技術としては、PDGFで免疫した動物から抗体ドメインまたはその抗原性断片をインビトロで単離する技術、およびこのようなドメインを使用して、構築された合成ライブラリーから抗体を選択する技術が挙げられる。

【0081】

RNAは、免疫したマウスの脾臓細胞および骨髄細胞から、例えば、Tri試薬 (Molecular research center, Cincinnati, Ohio, USA) の使用によって、得られ得る。代替の方法も、当該分野で公知であり、使用され得る。これらの方法の例としては、以下が挙げられる：グアニジンチオシアネート処理後の単離およびセシウムクロライド密度勾配遠心分離 (Chirgwin, J. M. ら, Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979) ならびにベルニエジウム化合物のようなリボヌクレアーゼ阻害剤の存在下での界面活性剤処理、それに続くフェノール処理 (Berger, S. L. ら, Biochemistry, 18, 5143-5149, 1979)。

【0082】

RNAから一本鎖DNAを得る目的で、RNAに相補的な一本鎖DNA (cDNA) が、鋳型としてRNAを使用し、そして、3'末端のポリA鎖に相補的なおよびオリゴ (dT) をプライマーとして使用する逆転写酵素処理により、合成され得る (Larrick, J. W. ら, Bio/Technology, 7, 934-938, 1989)。さらに、ランダムプライマーも、この際に使用し得る。cDNA合成のためのキットは、当該分野において広く利用可能である。

【0083】

マウス抗体V領域遺伝子の特異的増幅は、上述のcDNAから、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような増幅技術を使用して行われ得る。Barbas III ら (2001) Phage Display, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, またはJones, S. T. ら, Bio/Technology, 9, 88-89, 1991において記載されているようなプライマーは、マウス抗体V領域遺伝子の増幅に使用され得る。PCRはまた、遺伝子特異的プライマーによって行われ得る。V領域遺伝子を増幅する代替の方法は、「Engineered Templates And Their Use In Single Primer Amplification」および「Nested Oligonucleotides Containing A Hairpin For Nucleic Acid Amplification」と題された、共有に係る出願において記載される。これらは両方とも、2001年9月19日に出願され、本明細書中に参考として援用される。

【0084】

V領域遺伝子は、ファージもしくはファージミド、または別の適切な選択系の中にクローン化され、PDGF抗原に対する選択のためのライブラリーとして提示され得る。ライブラリー構築およびパニング技術は、当該分野において周知である。

【0085】

PDGFに特異的な抗体の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインをコードする核酸はまた、酵素的または化学的に合成された、原物に忠実な核酸配列を有する核酸 (例えば、重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメイン、あるいはその変異体をコードするDNAまたはRNA) であり得る。原物に忠実な核酸の変異体は、上述の抗体の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインをコードする核酸であり、ここで1つ以上のアミノ酸が、欠失されるか、または1つ以上の他のアミノ酸と置換されている。好ましくは、上述の改変は、抗体の重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインのCDRの外側にある。こうした変異核酸はまた、サイレント突然変異体も意図する。この場合、1つ以上のヌクレオチドが他のヌクレオチドと置換して、新しいコドンは同じアミノ

酸をコードする。このような変異体配列には、縮重配列もある。縮重の配列は、元々コードされていたアミノ酸配列の変化をもたらさずに、ヌクレオチドが数に限りなく他のヌクレオチドと置換されるという、遺伝コードの意味の範囲内で縮重される。このような縮重配列は、その異なった制限部位および／または特定コドンの頻度に起因して、重鎖マウス可変ドメインおよび／または軽鎖マウス可変ドメインの最適の発現を得るために有用であり得、これらは特異的な宿主（特に E. coli）に好まれる。

【0086】

用語変異体は、当該分野に公知の方法に従って、原物に忠実な核酸配列のインビトロでの突然変異誘発によって得られる核酸変異体を含むことを意図する。完全な四量体免疫グロブリン分子のアセンブリおよびキメラ抗体の発現のために、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインをコードする組換えヌクレオチド挿入物は、重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインをコードする、対応する核酸と融合され、次いで例えばハイブリッドベクターに組み込まれた後に、適切な宿主に転移される。

【0087】

ヒト定常ドメイン

【0088】

【化1】

y

(y)（例えば、y1、y2、y3またはy4、好ましくは、y1またはy4）と融合された抗PDGF抗体の重鎖マウス可変ドメインをコードする挿入物を含む組換え核酸は、当業者によって本開示に従って構築され得る。同様に、ヒト定常ドメインκまたはλ、好ましくはκと融合されたPDGFに特異的な抗PDGF抗体の軽鎖マウス可変ドメインをコードする挿入物を含む組換え核酸もまた、構築される。さらに、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインがスパーサー群を介して連結される、組換えポリペプチドをコードする組換え核酸が、構築され得る。この核酸は、宿主細胞において抗体のプロセッシングを促進するシグナル配列、ならびに／あるいは抗体の精製を容易にするペプチドをコードする核酸、および／または切断部位をコードする核酸および／またはペプチドスパーサーおよび／またはエフェクター分子をコードする核酸を、必要に応じて含み得る。エフェクター分子をコードする核酸は、診断的適用および治療的適用に有用であり得る。従って、毒素または酵素（特に、プロドラッグの活性化を触媒し得る酵素）であるエフェクター分子が、特に示される。このようなエフェクター分子をコードする核酸は、天然に存在する酵素または毒素の配列、あるいはそれらの変異体の配列を有し、そしてこれは、当該分野に周知の方法で調製され得る。

【0089】

一旦、マウス抗体、ウサギ抗体またはヒト抗体が同定されると、キメラまたは再形成された抗体が調製され得る。キメラ抗PDGF抗体は、マウスまたはウサギのV領域の連結によって得られ得、ヒト抗体定常領域をコードするDNAをパニングし、次いでそれらを発現させることによって同定される。

【0090】

キメラ抗体を産生する基本的な方法は、クローン化されたcDNAにおけるマウスまたはウサギのリーダー配列および可変領域配列と、哺乳類細胞発現ベクターに既に存在するヒト抗体定常領域をコードする配列を連結させる工程を包含する。ヒト抗体定常領域は、任意のヒト軽鎖定常領域またはヒト重鎖定常領域であり得、これらの例としては、ヒト軽鎖Ckまたはヒト重鎖yC1またはyCr4が挙げられる。可変領域遺伝子および定常領域遺伝子は、さらに重複PCRによって結合し得、そして、このように産生された遺伝子は、選択のためのファージディスプレイベクターにクローニングされる。

【0091】

キメラ抗体を産生するため、マウスまたはウサギの軽鎖可変領域およびヒト軽鎖定常領域を、適切なエンハンサー／プロモーターのような発現制御領域の制御下にコードするD

10

20

30

40

50

N Aを含む発現ベクター、ならびにマウスまたはウサギの重鎖可変領域およびヒト重鎖定常領域をまた、発現制御領域の制御下にコードするD N Aを含む発現ベクターが、使用され得る。哺乳動物細胞のような宿主細胞は、これらの発現ベクターを同時に形質転換され、形質転換された宿主はキメラ抗体を産生させるために、培養される（例えば、W O 9 1 / 1 6 9 2 8を参照のこと）。

【0092】

あるいは、マウスまたはウサギの軽鎖可変領域およびヒト軽鎖定常領域をコードするD N A、ならびにマウスまたはウサギの重鎖可変領域およびヒト重鎖定常領域をコードするD N Aは、1つの発現ベクター中に導入され得、宿主細胞はこのベクターを使用して形質転換され、この形質転換された宿主は望ましいキメラ抗体を産生するために培養される。

10

【0093】

マウス抗体またはウサギ抗体由来のC D Rは、選ばれたヒトフレームワーク、例えば、適切なオリゴヌクレオチドを使用したP C Rによりヒト配列を変異させたフレームワークのようなフレームワークの中に、移植される。同時に、バリエーションがフレームワークおよび／またはC D R配列へ導入され得る。例えば、結合部位のコンフォメーションに影響を与えることが公知であるF R残基またはC D R残基が、変えられ得る。露出されることが公知の残基は、好ましくは、より公知の配列またはコンセンサスヒト配列へ変異される。こうした変異は、それぞれ個々に作用され、または1つ以上の他のものと一緒に作用して、抗P D G FマウスV領域遺伝子およびヒト抗体フレームワーク（しかしこれらに導入された変異を含む）から選択されたC D Rに基づく、さらなる抗体ライブラリーの産生を導く。特に有利な特徴を有する抗体が、例えば上で示された選択手順を使用して、このようなライブラリーから選択され得る。

20

【0094】

極めて好ましい、C 1（マウス）、E 1およびB 1（ヒト化）と呼ばれるマウスモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、図に示される。C 1は、ヒトP D G FーB Bで免疫されたマウス由来のV H領域およびV L領域の増幅によって作製されたマウス抗体ライブラリーからの選択によって同定される。ヒト化を上に記載されたように行った。従って、ある実施形態においては、本明細書におけるP D G F抗体は、本明細書中に示されたマウスC 1抗体由来の少なくとも1つのC D Rを含む。好ましくは、少なくともC D R 3は、C 1抗体由来である。C D R 1およびC D R 2は、ヒト抗体の優先に従って変えられ得、そして、例えばその結果により生じたライブラリーをパニングすることにより、適切な抗体が、選択される。同様に、結合部位のコンフォメーションに影響することが公知であるフレームワーク残基は変えられ得、成功した抗体は選択される。

30

【0095】

本明細書中に記載される抗体は、本明細書中に示したように、B 1抗体またはE 1抗体由来の少なくとも1つのC D Rを含み得る。必要に応じて、2つもしくは三つのC D Rが、前述の抗体に由来され得る。C D Rは全て同一の抗体由来であり得るか、また異なる抗体由来であり得る。無論、C D Rは、上で記載したように導入される1つ以上の変異を含み得ることが理解される；このような変異C D Rは、本明細書で 사용되는ように、用語「由来する」に含まれる。

40

【0096】

抗P D G F抗体または抗P D G F抗体断片は、ヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体のような、他の抗体（またはそれらの部分）との結合または接着に使用され得る。これら他の抗体は、触媒抗体であり得、そして／または抗体に対する疾患について特徴的な他のマーカー（エピトープ）に反応し得る。この疾患は、抗体に関連する疾患、または抗体が、例えば、標的種の分子または細胞（例えば、レセプター、標的タンパク質、疾患細胞など）を補充するために選ばれた異なった特異性を有し得る疾患である。抗体（またはその部分）は、このような抗体（またはその部分）を、別々に投与される組成物としてか、あるいは、定型的な化学的方法または分子生物学的方法により結合される2つの薬剤を含む単一の組成物として、投与され得る。さらに、この抗体の診断上の価値

50

および治療学的な価値が、検出可能なシグナル（インビトロまたはインビボのどちらか）を産生する標識、または治療特性を有する標識で抗体を標識することによって増強され得る。いくつかの標識、例えば、放射性ヌクレオチド（radio nucleotide）は、検出可能なシグナルを産生し得、また治療特性を有し得る。放射性ヌクレオチド標識の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C が挙げられる。他の検出可能な標識の例としては、蛍光顕微鏡検査のための緑色蛍光タンパク質、フルオレセイン、フィコビリプロテイン（phycobiliprotein）またはテトラエチルローダミンのような蛍光クロモスフィア（chromosphere）、蛍光、吸光度、可視色によって検出するための蛍光もしくは有色産物を生成する酵素、または電子顕微鏡検査の実証のための電子密集産物を生成する凝集；あるいは直接または間接の電子顕微鏡検査可視化のためのフェリチン、ペルオキシダーゼまたは金ビーズのような電子密集分子が挙げられる。 10

【0097】

本明細書中における抗PDGF抗体または抗PDGF抗体断片は、代表的に、薬学的キャリアを含む組成物において患者に投与され得る。薬学的キャリアは、モノクローナル抗体を患者に送達するのに適した、適合性の、非毒性の任意の物質であり得る。滅菌水、アルコール、脂肪、ワックス、不活性固体が、キャリアの中に含まれ得る。薬学的に受容されたアジュバント（緩衝剤、分散剤）も、薬学的組成物に組み込まれ得る。組成物は完全な抗体および抗体断片の両方を含み得ることが、理解されるべきである。

【0098】

本開示に従って設計（操作）された抗体および／または断片組成物は、種々の方法で患者に投与され得る。好ましくは、薬学的組成物は、非経口（例えば、皮下、筋肉内、硬膜外または静脈内）で投与され得る。従って、非経口（parental）投与のための組成物は、抗体、抗体断片、またはその混合物を受容可能なキャリア（好ましくは、水溶性キャリア）に溶かした溶液を含み得る。種々の水溶性キャリア（例えば、水、緩衝液、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなど）が使用され得る。これらの溶液は、滅菌され、通常は粒状物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術により滅菌され得る。組成物は、生理学的状態に近づけるのに必要とされる薬学的に受容可能な補助物質（例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤など（例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど）を、含み得る。これらの処方物における抗体および抗体断片の濃度は、例えば、約0.5重量%未満、通常は少なくとも約1重量%または少なくとも約1重量%から15重量%もしくは20重量%程度まで非常に広く変動し得、そして主として流体の体積、粘性などに基づいて、選択された特定の投与様式に従って、選択可能である。 20 30

【0099】

脳の癌の場合においては、本明細書で記載されたような薬学的組成物は、好ましくは血液脳関門を越え得る。例えば、組成物は、以下のような脳標的化部分を含み得る：抗インスリンレセプター抗体（Colomaら（2000）Pharm Res 17:266-74）、抗トランスフェリンレセプター抗体（ZhangおよびPardridge, (2001) Brain res 889:49-56）または活性化T細胞（Westlandら, (1999) Brain 122:1283-91）。あるいは、ブラジキニンのような血管作用性ペプチドの使用、または浸透圧性ショックのような他の技術による脈管構造の改変を生じる技術（以下において論評されている：Begley, (1996) J Pharm Pharmacol 48:136-46；Neuweltら, (1987) Neurosurgery 20:885-95；Krollら, (1998) Neurosurgery 43:879-86；Temsamaniら, (2000) Pharm Sci Technol Today 3:155-162）が、使用され得る。 40

【0100】

さらなる局面において、本明細書中で前に規定されるような、疾患の処置における使用のための抗体および／または抗体断片が提供される。その結果、神経細胞増殖または本明 50

細書中に言及される任意の他の状態に関連する疾患の処置用の、医薬の製造のための、本発明の抗体の使用が提供される。本明細書中で記載されるような抗体または抗体断片で処置され得る癌としては、以下が挙げられる：神経芽腫、感覚上皮腫、髄膜腫、ユーイング肉腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、カポジ肉腫、中皮腫および中皮腫細胞株、絨毛上皮腫、膵臓癌、胃癌、骨肉腫、食道癌、線維肉腫、原発性ヒト肺癌における悪性上皮細胞、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、傍神経節腫、血管肉腫、血管周囲細胞腫、NOS肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫、および子宮間質肉腫、乳癌、結腸直腸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性線維組織球腫、平滑筋細胞腫瘍、前立腺癌。本明細書中に記載される抗体または抗体断片は、他の治療剤との組み合わせにおいて使用され得ることが、企図される。PDGF-βレセプターを介するシグナル伝達の遮断は、腫瘍における間質性の高血圧 (interstitial hypertension) を軽減させ、薬物の取り入れを増加させる (例えば、Pietrasら, Cancer Research 61, 2929-34 (2001) を、参照のこと)。

10

【0101】

非経口投与可能な組成物を調製する実際の方法および被験体への投与に必要な調節は、当業者に公知または明らかであり、より詳細には、例えば、以下に記載されている：Remington's Pharmaceutical Science, 第17版、Mack Publishing Company, Easton, Pa (1985) (これは本明細書中に参考として援用される)。

【0102】

後述の実施例は、例示の目的で提供され、本明細書中に記載される任意の発明の特定事項を限定するように判断されるべきではない。

20

【実施例1】

【0103】

(ウサギF3抗体のヒト化)

(I. ウサギF3抗PDGF抗体の産生)

(ウサギの免疫)

一匹のNZWウサギを、組換えヒト血小板由来成長因子 (PDGF-BB) (R&D Systems, MN) で免疫した。フロイント完全アジュバント (Sigma, St. Louis, MO) 中の15mg PDGF-BBを、ウサギ後肢の5から6箇所にかけて皮下投与した。最初の注射から3週間後および6週間後に、フロイント不完全アジュバント (Sigma, St. Louis, MO) 中の同じ用量のPDGF-BBを使用して、注射を繰り返した。ウサギは、1回目および3回目の注射に先立って採血した。その血清をELISAにおいて使用し、ウサギの抗PDGF抗体反応をモニタリングした。3回目の注射の5日後、ウサギを屠殺し、脾臓、骨髄、および末梢血リンパ球を採取した。RNAを、Tri試薬 (Molecular Research Center, Cincinnati) を使用して、製造業者の指示に従って単離した。第一鎖cDNAを、「Superscript Preamplification System for first strand cDNA synthesis kit」をオリゴ(dT)プライミング (GibcoBRL, Rockville, MD) と共に使用して、製造業者の指示に従って、合成した。

30

40

【0104】

(抗体ライブラリーの構築および選択)

ウサギVL領域およびVH領域を、第一鎖cDNAから、重鎖および軽鎖の以下に記載されるプライマーを使用する20サイクルのPCRにより、増幅した：Barbas, C Fら, Phage Display, A Laboratory Manual (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York。続けて、融合PCR反応を行い、単一Fv (scFv) 断片を作製した。これにより、VLおよびVHは、以下の配列5' ggtgggttcctctagatcttcc3' (配列番号1) を有する21b

50

p のリンカーで結合された。s c F v 断片は、ファージミドベクター p R L 4 中に、制限酵素 S f i I を使用してクローン化した。E R 2 5 3 7 細胞 (New England Biolabs, Beverly, MA) 中への形質転換が、 6×10^7 個の独立したクロノンのライブラリーを生じた。ライブラリーは固定化組換えヒト P D G F - B B 抗原 (R & D Systems, MN) に対し、4 回選別した。マイクロタイターウェルを、1 ラウンドおよび 2 ラウンドにおいて 5 0 0 n g 抗原 / ウェルで、そして 3 ラウンドおよび 4 ラウンドにおいては 2 5 0 n g 抗原 / ウェルでコートした。ウェルを、0.5 % T w e e n 含有の T B S で、1 ラウンドには 3 回、2 ラウンドには 5 回、後の 2 ラウンドでは 1 0 回、洗浄した。残留した抗体-ディスプレイ粒子を、1 m g / m l B S A 含有の 0.1 M H C l (pH 2.2) を用いて溶出し、続けて 2 M T r i s で中和した。ラウンド 4 の後で得られたクローンを、P D G F - B B に対する結合について、固相 E L I S A において試験した。 10

【0105】

(P D G F E L I S A)

高度タンパク質結合 9 6 ウェルプレート (C o s t a r, NY) を、1 0 0 n g の組換え P D G F - B B (R + D Systems, MN) で、0.1 M N a H C O 3 (pH 8.6) 中、4 °C で一晩コートした。プレートを、1 % B S A で 3 7 °C にて 1 時間ブロックし、続けて P B S / 0.05 % T w e e n 溶液で 3 回洗浄した。E. C o l i 培養上清または精製した抗体を、P B S / 1 % B S A 中種々の濃度で加え、2 時間、3 7 °C で振とう機に置いた。P B S / 0.05 % T w e e n で 3 回の洗浄の後、P B S / 1 % B S A 中 1 : 1 0, 0 0 0 の希釈で抗 H A 一次抗体 (1 2 C A 5 腹水) を加え、2 時間インキュベートした。プレートを、P B S / 0.05 % T w e e n で 3 回洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合抗マウス I g G (S i g m a, S t. L o u i s, M O) と共に 2 時間インキュベーションした。インキュベーションの後、これらのプレートを、P B S / 0.05 % T w e e n で 3 回、P B S で 3 回洗浄した。P N P P 緩衝液 (1 0 m M ジエタノールアミン、0.5 m M M g C L 2 (pH 9.5)) 中 S i g m a 1 0 4 基質の添加後の発色を、マイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s) を使用して、O D 4 0 5 で決定した。強い E L I S A シグナルを実証する抗 P D G F 抗体を、P D G F - B B サイトカインとの結合についてそのうちどれが P D G F - β レセプターと競争し得るかを決定するため、下に記載するようにさらなる分析について同定した。 20 30

【0106】

(抗体精製)

H i s 6 精製タグを含む候補 s c F v を、トランスフェクトした細胞培養物のペリプラズム調製物から、N i - カラムクロマトグラフィーを使用して精製した。ペリプラズム画分は、2 0 % ショ糖含有 3 0 m M T r i s (pH 8) の細菌ペレットへの 2 0 分間の添加により得た。上清を 9 0 0 0 g で 1 0 分間、4 °C にて遠心分離した。上清を氷上に置き、そしてペレットを滅菌冷水に再懸濁し、1 0 分間氷上に置いた。1 0, 0 0 0 g での遠心分離後、上清をショ糖上清と合わせ、1 2, 0 0 0 g にて 2 0 分間遠心分離した。0.2 M N a C l および 1 0 m M イミダゾール中、E D T A f r e e M i n i p r o t e a s e i n h i b i t o r c o c k t a i l (R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s, I n d i a n a p o l i s, I N) を調製し、混合物に加えた。ろ過後、ペリプラズム画分を、N i - c h a r g e d 5 m l H i T r a p c h e l a t i n g c o l u m n (A m e r s h a m P h a r m a c i a, P i s c a t a w a y, N J) にロードした。この精製工程に使用した洗浄緩衝液には、2 0 m M N a H 2 P O 4 / N a 2 H P O 4, 0.5 M N a C l および 1 0 m M イミダゾールを含め、pH 7.4 に調整した。溶出緩衝液には、2 0 m M N a H 2 P O 4 / N a 2 H P O 4, 0.5 M N a C l および 5 0 0 m M イミダゾールを含め、pH 7.4 に調整した。1 m l の画分を回収し、高められた O D 2 8 0 値を持つこの画分をプールし、そして P B S 緩衝液で透析した。 40

【0107】

(競合 E L I S A)

ウサギ s c F v の P D G F - B B サイトカインへの結合をめぐって P D G F - β レセプターと競争する能力を、競合アッセイにおいて決定した。s c F v s の、P D G F - B B サイトカイン上の標的エピトープへの結合は、プレート上にコートされた P D G F レセプターへの P D G F - B B 結合を防ぐ。高タンパク質結合 96 ウェルプレートを、10 ng / ウェルの組換えヒト P D G F レセプター β / F c キメラ (R & D S y s t e m s , M N) 含有 P B S で、一晚 4 °C でコートした。これらのプレートを、5 % ショ糖 / 1 % B S A / P B S で一時間 37 °C でブロックした。精製した抗 P D G F - B B 抗体の一連の希釈物を、ブロックして洗浄したプレートに添加する前に、10 ng / ml の組換えヒト P D G F - B B と一緒に室温で 30 分間インキュベートした。室温で 2 時間後、プレートを P B S / 0.05 % T w e e n で洗浄し、続けてビオチン化抗 P D G F - B B 抗体 (R & D S y s t e m s , M N) と共に室温でさらに 2 時間インキュベーションした。次に、ストレプトアビジナルカリホスファターゼ (P i e r c e , R o c k f o r d , I L) をプレートに加え、室温で 30 分間インキュベーションした。プレートを、P B S / 0.05 % T w e e n で 3 回、P B S で 3 回洗浄した。P N P P 緩衝液に懸濁した S i g m a 104 基質を、最後の洗浄工程後に加え、そして O D 405 でシグナルを決定した。競合アッセイの結果は、F 3 クローンが P D G F - B B 標的レセプターへの P D G F - B B の結合を阻害したことを示した。次いで、F 3 を、ヒト化のために選択した。

【0108】

(I I . F 3 抗体のヒト化)

(相同ヒト配列の選択)

F 3 の変異遺伝子 (F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、および F R 3) を、V B a s e ヒト生殖系列配列データバンク (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) に対して並列した。F 3 変異配列に対し最高のヌクレオチド相同性を有する一組のヒト生殖系列遺伝子が、同定された。図 3 a ~ 図 3 b を参照のこと。これらの配列を、ウサギ遺伝子とヒト遺伝子との間のアミノ酸相同性の決定により、さらに分析し、重鎖配列 D P - 77 / W H G 16 + および軽鎖配列 D P K 4 / A 20 + を、F 3 のヒト化において使用される生殖系列 V 遺伝子として、同定した。

【0109】

ヒト化に使用されるヒト F R 4 配列を、K a b a t 免疫グロブリンデータベース (<http://www.immuno.bme.nwu.edu> に在り) を用いた、F 3 配列のアミノ酸相同性に基づいて同定した。同定された配列は、K a b a t I D : 004927 および I D : 00784 であった。

【0110】

(重要フレームワーク残基の同定)

V H / V L 境界または C D R ループコンフォメーション (ベルニエ領域) に含まれることが報告されているフレームワーク残基位置を、同定した。下の表 1 の特定の重要残基のリストを参照のこと。これらの位置のうち、4 つはヒト配列とウサギ配列との間で非相同なアミノ酸を、軽鎖において有し、8 つは重鎖において非相同であった。これらのフレームワーク残基を多様化のための標的とし、ヒト化抗体遺伝子の構築の際に、これらの位置において、ウサギとヒトとの間で選択を行った。図 3 a および図 3 b の下線で示されたフレームワーク残基を参照のこと。しかしながら時々、これらの 2 つのアミノ酸のコードにおいて、縮重したコードが原因で、さらなる選択が、結果として生じた。軽鎖におけるさらなる位置 (残基 63) を、多様化の標的とした。なぜなら、この位置は、K a b a t データベース由来の、近縁に関連するウサギ配列において、高度に保存的であったからである。表面露出残基について、いくらかにおいて考慮したが、割り当ては、使用した参照に依存して変わる (S t u d n i c k a ら (1994) P r o t e i n E n g i n e e r i n g , 7 , p p 805-814. P e d e r s e n ら (1994) J . M o l . B i o l . , 235 , p p 959-973.)。一般に、ヒトの表面残基は、ヒト化抗体の起こり得る免疫原性を避けるために維持することが望ましい。しかし、ある表面に露出してい

る残基は、VH/VL境界またはベルニエ領域とも呼ばれる（例えば、HC残基91）。
この場合、ウサギまたはヒトの選択は、まだ与えられる。

【0111】

【表1】

Table 1: 重要なフレームワーク位置 (Kabat 番号)

軽鎖

ベルニエ領域	VH/VL 境界
2	36
4	38
35	43
36	44
46	46
47	49
48	80
49	83
64	87
66	98
68	
69	
71	
98	

10

20

30

40

重鎖

ベルニエ領域	VH/VL 境界
2	37
27	39
28	45
29	47
30	91
47	93
48	103
49	
67	
69	
71	
73	
78	
93	
94	
103	

10

20

30

40

(オリゴヌクレオチド設計)

V LまたはV H遺伝子をコードする一連のオリゴヌクレオチドを、P C R遺伝子アセンブリに使用するための、重複領域を含むように設計した(図4 a、4 b)。オリゴヌクレオチドは、長さにして80から100塩基対であり、アミノ酸選択ができるように、設計位置に縮重を含んだ。さらに、オリゴヌクレオチドの対を、ヒトまたはウサギのC D R 1の選択を提供するように設計した。例えば、「オリゴヌクレオチド2 H C」は、ヒトC D R 1を提供し、「オリゴヌクレオチド2 b H C」はウサギC D R 1を生じる。C D R 2およびC D R 3におけるアミノ酸残基は、ウサギのアミノ酸残基のみで維持した。完全なオ

50

リゴヌクレオチドアセンブリの生成物は、重要なフレームワーク位置において縮重アミノ酸残基を含み、CDR1にCDR選択を含むヒト化F3可変ドメイン（VHまたはVL）ライブラリーをコードする。この実施例において、ヒトCDRと非ヒトCDRとの間の選択は、CDR1についてのみしか与えなかったが、他の場合のヒト化には、CDR1およびCDR2の双方において選択を有し得ることが望ましい。

【0112】

（ヒト化F3抗体ライブラリーの合成アセンブリ）

ヒト化F3ライブラリーのVHおよびVLドメインを、連続PCR反応により、構築した。PCRにより組み立てられたVHおよびVL配列を、それぞれの完全ヒト定常領域と融合させ、そして、軽鎖および重鎖を、ヒト化F3 Fab挿入部分への重複伸長PCRにより、結合させた（図6a-6g）。

10

【0113】

工程1：

オリゴヌクレオチド（それぞれ60 pmol）を、下の表で示されたように、PCR重複伸長のためにExpand High Fidelity PCR System（Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN）を使用して、結合させた。

【0114】

【表 2】

生成された軽鎖産物	軽鎖 オリゴヌクレオチド
I	1+2
II	1+2B
III	3+4
IV	3+4B
V	5+6

10

生成された重鎖産物	重鎖 オリゴヌクレオチド
I	1+2
II	1+2B
III	3+4
IV	3+4B
V	5+6

20

30

反応混合物を94℃で加熱し、15回の熱サイクル（94℃を15秒、48℃を30秒および72℃を45秒）をかけ、続けて72℃で2分、そして4℃で保温した。反応生成物は、QIAquick PCR Purification Kit spin column（Qiagen, Valencia, CA）を使用して、回収した。DNA生成物を、OD260により定量した。

40

【0115】

工程2：

工程1のPCR生成物を、下の表に従い、Expand High Fidelity PCR system（Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN）を用いたPCRによって、さらなるアセンブリのために結合した。それぞれのPCR生成物の対は、アニーリングおよびポリメラーゼによる重複伸長に必要な重複領域を有していた。伸長生成物は、下の表で詳述されるように加えられたフランキングプライマーオリゴヌクレオチドにより、増幅させ得た。工程2におけるPCR生成物#5は、工程1におけるPCR生成物Vと同じであり、さらなるPCR増幅は必要ないことに留意されたい。反応混合物を、94℃で加熱し、15回の熱サイク

50

ル（94℃を15秒、48℃を30秒および72℃を45秒）をかけ、続けて72℃で2分、そして4℃で保温した。反応生成物を、エタノール沈殿により回収し、1% LMPゲル上を泳動した。望ましい増幅生成物を示すバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。

【0116】

【表3】

F3: 軽鎖

生成された軽鎖産物	F3 工程1 軽鎖産物	F3 軽鎖プライマー
1	I + III	オリゴ1、オリゴ4
2	I + IV	オリゴ1、オリゴ4B
3	II + III	オリゴ1、オリゴ4
4	II + IV	オリゴ1、オリゴ4B
5	V	(残余のみ)

10

20

【0117】

【表4】

F3: 重鎖

生成された重鎖産物	F3 工程1 軽鎖産物	F3 軽鎖プライマー
1	I + III	オリゴ1、オリゴ4
2	I + IV	オリゴ1、オリゴ4
3	II + III	オリゴ1、オリゴ4
4	II + IV	オリゴ1、オリゴ4
5	V	(残余のみ)

30

40

工程3:

工程2からのPCR生成物を、下の表に従い、Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を用いたPCRによって、工程2において記載されたように、さらなるアセンブリのために結合させた。これらのPCR生成物は、構築されたVLおよびVH遺伝子である。

50

【0118】

【表5】

F3: 軽鎖

生成された軽鎖産物	工程2 軽鎖産物	F3 軽鎖プライマー
VL a	1 + 5	オリゴ1、オリゴ6
VL b	2 + 5	オリゴ1、オリゴ6
VL c	3 + 5	オリゴ1、オリゴ6
VL d	4 + 5	オリゴ1、オリゴ6

10

【0119】

【表6】

F3 重鎖

20

生成された重鎖産物	F3 工程1 軽鎖産物	F3 軽鎖プライマー
VH a	1 + 5	オリゴ1、オリゴ6
VH b	2 + 5	オリゴ1、オリゴ6
VH c	3 + 5	オリゴ1、オリゴ6
VH d	4 + 5	オリゴ1、オリゴ6

30

工程4:

κ 定常領域または重鎖CH1ドメインをコードする断片を、抗破傷風毒素κ軽鎖遺伝子およびFd重鎖遺伝子を含むベクター、pRL-TTのPCR増幅により産生した。軽鎖定常領域増幅のために使用されたプライマーにより、LC定常領域の3'末端に、重鎖遺伝子のベクター由来の調節領域を組み込んだ。LC定常領域増幅に使用されたプライマーは、HkC-F 5' CGGACTGTGGCTGCACCATCTGTC3' (配列番号2) およびLead B 5' GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC3' (配列番号3) である。重鎖CH1増幅に使用したプライマーにより、CH1ドメインの3'末端に、後のクローニングに必要な制限酵素切断部位のような、ベクター由来の要素を、組み込んだ。HC-CH1定常領域増幅に使用されたプライマーは、HlgGCH1-F 5' GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC3' (配列番号4) およびN-dp 5' AGCGTAGTCCGGAACGTCTGTCGG3' (配列番号5) であった。定常領域配列は、Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を使用して、増幅した。pRL4TT、dNTP、反応緩衝

40

50

10

20

30

40

50

50

ヒト化 F3Fab を提示するファージミドライブラリーを、固定化ヒト PDGF-BB 抗原 (R+D Systems, MN) に対する 4 回の選別 (パニング) により選択した。1 回目および 2 回目において 500 ng PDGF-BB / ウェルを、マイクロタイターウェルをコートするために使用し、そして続けて 3 回目および 4 回目においては 250 ng 抗原を、使用した。ライブラリーを、PDGF-BB コートされたウェルに適用し、37 °C 2 時間で結合させた。非特異結合は、0.5 % TBS / Tween で、1 回目には 3

回、2回目には5回、後の2回では10回、洗い落とした。抗原コートされたウェルに残留した提示Fabは、1mg/ml BSA含有の0.1M HCl pH2.2で溶出し、続けて2M Trisで中和した。数回の選別の後、溶出されたFabを担うファージミド粒子を、次の選別のためにファージミド粒子の富化プールを増幅する目的で、新鮮なER2537細菌細胞と混合させた。

【0125】

4回目選別の後、ヒト化F3抗体のPDGF-BB抗原に結合する能力を、ELISAにおいて査定した。高度タンパク質結合96ウェルプレート(Costar, NY)を、100ngの組換えPDGF-BB(R+D Systems, MN)で、0.1M NaHCO₃ pH8.6中で4℃で一晩コートした。プレートは1%BSAで37℃1時間ブロックし、続けてPBS/0.05% Tweenで3回洗浄した。E. Coli培養上清または精製抗体を、種々の濃度で加え、PBS/1%BSA中で2時間、37℃で振とう機に置いた。PBS/0.05% Tweenで3回の洗浄の後、PBS/1%中1:10, 000の希釈の抗HA一次抗体(12CA5腹水)を加え、2時間インキュベートした。ウェルは、PBS/0.05% Tweenで3回洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG(Sigma, St. Louis, MO)と共に2時間インキュベーションした。インキュベーションの後、プレートをPBS/0.05% Tween水溶液で3回、PBS水溶液で3回洗浄した。Sigma104基質を含有するPNPP緩衝液(10mMジエタノールアミン、0.5mM MgCl₂, pH9.5)の添加後の発色は、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して、OD405において決定した。図7を参照のこと。BSAと比較し、有意に高いPDGF-BBへの結合を示した3つのヒト化Fab(C11、C12、およびA12)を、さらに分析した。クローンの配列分析は、CDR1の多様化の達成に成功したことを明らかにした。クローンC11は、軽鎖および重鎖の両方において、ヒトCDR1を保持していた。クローンA12およびC12は、両方とも軽鎖CDR1位置においてヒトCDRを選択し、一方で重鎖CDR1位置においてはウサギCDRが両方のクローンによって選択された(図8aおよび図8b)。

【0126】

(III. PDGFレセプター競合アッセイ)

(抗体精製)

scFv F3精製のために上述されたように、His6精製タグを含むヒト化F3Fab(C11、C12、およびA12)を、トランスフェクションした細菌培養液のペリプラズム調整物から、ニールカラムクロマトグラフィーを使用して精製した。精製されたFabを、PBS緩衝液で透析した。

【0127】

(競合ELISA)

ヒト化F3Fab(C11、C12、およびA12)のPDGF-BBサイトカインとの結合をめぐってPDGF-bbレセプターと競合する能力を、上述のように、競合ELISAアッセイにおいて決定した。競合アッセイの結果は、3つ全てのヒト化F3Fab(C11、C12、およびA12)が、親抗体scFv F3と同じく、PDGF-BBが標的レセプターに結合するのを阻害していたことを明らかにした(図9)。これらの結果は、ヒト化Fabは、ウサギF3 scFvと同様の親和性を有することを示す。

【0128】

(ルシフェラーゼアッセイ)

ヒト化Fab C11、C12、およびA12の、細胞ベースのアッセイにおいて、PDGF-BBとそのレセプターとの間の相互作用を機能的に遮断する能力を、ルシフェラーゼアッセイを使用して決定する。NIH3T3細胞は、ヒトPDGF-BBサイトカインに結合し得るマウスPDGFレセプターを発現する。PDGF-bbレセプター活性化の程度を決定する目的で、NIH3T3細胞を、fosプロモーター/ルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクトでトランスフェクションする。サイトカインへの結合におい

て、レセプターは活性化され、そして最終的にルシフェラーゼレポーター遺伝子と連結している F o s プロモーターを活性化させるシグナルカスケードを誘導する。ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼ発現量と相関しており、ルミノメーターの使用により定量される。

【0129】

N I H 3 T 3 細胞を、6 c m シャーレにつき 3×10^5 細胞に撒き、後日トランスフェクションする。トランスフェクションは、E f f e c t i n e l i p o f e c t i o n r e a g e n t (Q i a g e n, V a l e n c i a, C A) により、 $0.1 \mu\text{g}$ の p E G F P (トランスフェクション効率定量トレーサ) およびプレートにつき $0.2 \mu\text{g}$ の F o s プロモーター／ルシフェラーゼコンストラクトを使用して行う。トランスフェクシ

10

。

【実施例 2】

【0130】

(マウス抗 P D G F 抗体の調製)

(マウスの免疫化)

2 匹の B a l b / c マウスを、組換え P D G F - B B で免疫した。まず、フロイント完全アジュバント (S i g m a) 中の 15 mg P D G F を、腹腔内に投与した。2 週間後、マウスにフロイント不完全アジュバント中の同じ量の P D G F を腹腔内注射し、同様の注射を 3 週間後に続いて行った。さらに 3 週間後、マウスに P B S 水溶液中の 15 mg P D G F - B B を皮下注射をし、追加免疫を行った。3 日後、血清の抗 P D G F 抗体の力価が 1 : 20, 000 に達したことを、固相 E L I S A により決定した。マウスを殺し、脾臓および骨髓を摘出し、RNA を T r i 試薬 (M o l e c u l a r R e s e a r c h C e n t e r, C i n c i n n a t i, O H) によって抽出した。第一鎖 c D N A を、「S u p e r s c r i p t P r e a m p l i f i c a t i o n S y s t e m f o r f i r s t s t r a n d c D N A s y n t h e s i s k i t」をオリゴ (d T) プライミング (G i b c o B R L) と共に使用した。

20

30

【0131】

(マウス抗体ライブラリー)

マウス軽鎖および重鎖の f d 領域を、第一鎖 c D N A から、重鎖および軽鎖の以下に記載されるプライマーを使用した 20 サイクルの P C R により、増幅した; B a r b a s I I I ら (2001) P h a g e D i s p l a y, A L a b o r a t o r y M a n u a l, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, C o l d S p r i n g H a r b o r, N e w Y o r k, p p. 9. 54-9. 57。さらなるプライマーは、以下; M C K a p p a B : 5' G A G G A G G A G G A G G A G G A G T C T A G A A T T A A C A C T C A T T C C T G T T G A A 3' (配列番号 8) および M I G G I B : 5' G A G G A G G A G G A G G A G G A G A C T A G T A C A A C T C C T G G G C A C A A T 3' (配列番号 9)。軽鎖 DNA を、ファージミドベクター p R L 4 内に、S a c I および X b a I を使用してクローン化し、そして、重鎖 DNA は、S p e I および X h o I を使用してクローン化した。E R 細胞を形質転換した結果、 6×10^7 個の独立したクローンのライブラリーを生じた。ライブラリーは、固定化組換えヒト P D G F - B B に対し、4 回パニングした。パニングは、1 回目および 2 回目において 500 n g タンパク質／ウェルで始め、3 回目および 4 回目においては 250 n g タンパク質／ウェルで行った。結合ファージは、0.5 % T w e e n 含有 T B S で、1 回目には 3 回、2 回目には 5 回、後の 2 回では 10 回、洗浄した。ファージを、1 m g / m l B S A 含有の 0.1 M H C l p H 2.2 で溶出し、続けて 2 M T r i s で中和した。4 回目の後で得られたクローンについては、P D G F - B B に対する結合を、固相 E L I S

40

50

Aにおいて試験した。高度タンパク質結合96ウェルプレート(Costar, NY)を、100ngの組換えPDGF-BB(R+D Systems, MN)で、0.1M NaHCO₃ pH8.6において4℃で一晩コートした。プレートは1%BSAで37℃1時間ブロックし、続けてPBS/0.05% Tweenで3回洗浄した。E.coli培養上清または精製抗体を、PBS/1%BSA水溶液中の種々の濃度で加え、2時間、37℃で振とう機に置いた。PBS/0.05% Tweenで3回の洗浄の後、PBS/1%中1:10,000の希釈の抗HACA5(腹水)を2時間の間加えた。プレートは、アルカリホスファターゼ結合体化抗マウスIgG(Sigma)と共に2時間インキュベーションし、続けてPBS/0.05% Tweenで3回、PBSで3回洗浄した。PNPP緩衝液(10mMジエタノールアミン、0.5mM MgCl₂, pH9.5)中におけるSigma104基質の添加後の発色は、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して、OD405において決定した。

10

【0132】

PDGFにおけるマウスPDGFライブラリーのパニングは、多数の非常に類似したクローンを結果として生じた。軽鎖CDR1およびCDR2および重鎖CDR2における差に基づいて、クローンを2つのファミリーに分類した。ファミリー間を見分ける幾つかの残基を、同定した。その残基を以下の表に示す。

【0133】

【表7】

鎖	Kabat 位置 #	一般的位置	C1型 ファミリー	AK型 ファミリー
軽鎖	31	CDR1	セリン	アルギニン
軽鎖	51	CDR2	アラニン	トレオニン
重鎖	57	CDR2	トレオニン	アラニン

20

(新脈管形成アッセイ)

抗PDGF抗体C1が血管形成に影響するか否かを決定するため、HUVECアッセイを行った。24ウェルプレートのウェルを、500μlのマトリゲル(matrigel)で、それぞれ37℃で30分コートした。ウェルにつき四千細胞のHUVEC細胞を、抗PDGF抗体C1または対照抗体TTの添加または非添加で、加えた。細胞を、5時間後および24時間後に撮影し、管形成が観察された。5時間後の結果を図11に示す。

30

【0134】

クローンC1(C1型ファミリークローン)を、ライブラリーから選択し、以下のヒト化手順において使用した。C1マウス抗PDGF Fab軽鎖および重鎖の配列を、それぞれ図14aおよび図14bに示す。AK型ファミリーからの抗体も、ヒト化設計に貢献した。軽鎖の#31および#51、重鎖の#57の位置におけるAK型ファミリーのアミノ酸は、ヒト化過程の間の選択に含めた(図15aおよび図15bにおける「合成C1」配列のXを意味する)。

【実施例3】

【0135】

(ヒト化)

対応するマウス配列と最高の相同性を有するヒト生殖系列VLおよびVH配列を、ヒトV遺伝子配列のVbase directory(<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>)に基づいて、ヌクレオチド配列アラインメントにより、同定した。ヒト化に使用されたヒトFR4配列は、C1配列のKabat免疫グロブリンデータベース(<http://www.immuno.bme.nwu.edu>に在る)とのアミノ酸相同性に基づいて同定した。エピトープのコンフォメーションの維持に重要であることが公知である残基(Foote J, Winter G. J Mol Biol 1992 Mar 20; 224(2): 487-499)は、多様化されて、表面露出であることが公知の位置におけるマウス残基(Pedersenら, J

40

50

. Mol. Biol. 1994, 235, 959-973 ならびに Santos および Padlan, Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biology 60, 169-194) を避けつつ、マウスまたはヒト配列のどちらかの使用を許容した。また、CDR1 および CDR2 は、マウスまたはヒトの使用において多様化される一方、マウス CDR3 はグラフトイングされた。重複オリゴヌクレオチドを、図16a および 16b に示されるように合成し、15 サイクルのそれぞれ Expand High Fidelity PCR system (Roche Molecular Systems) を使用した 連続性重複 PCR (sequential overlapping PCR) 反応において集めた。図15a および 図15b を参照のこと。合成 VL および VH コード配列を、pRL4 にクローン化された破傷風毒素抗体の PCR によって得られた ヒト Ck および CH1 コード配列と融合させた。最終構築物は、カルベシリン耐性遺伝子の代わりにクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有する pRL4 内に、SacI/XbaI を軽鎖に XhoI/SpeI を重鎖に使用して、クローン化した。結果として得られた 1×10^6 個の独立クローンのライブラリーは、PDGF-BB において、マウスライブラリーに関して記載されたように、パニングした。

【0136】

(抗体精製)

抗体は、トランスフェクションした細胞培養液のペリプラズム調整物から精製し、続いて Ni-カラムクロマトグラフィーを通した。ペリプラズム分画は、20% ショ糖含有 30mM Tris pH8 の菌体ペレットへの 20 分間の添加により得られた。上清は 9000g で 10 分、4℃ にて遠心した。上清を氷上に置き、そしてペレットは滅菌冷水に再懸濁し、10 分氷上に置いた。10,000g での遠心の後、上清をショ糖上清と合わせ、12,000g にて 20 分遠心した。1 錠の EDTA 非含有 Roche Mini protease inhibitor cocktail および NaCl を 0.2M まで および イミダゾールを 10mM まで、混合物に加えた。ろ過の後、ペリプラズム分画を、superloop に載せ、それから Ni-charged 5ml HiTrap chelating column (Pharmacia) に、2ml/分の流速で、Aktaf PLC マシン (Pharmacia) を用いて流した。洗浄緩衝液は、20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0.5M NaCl および 10mM イミダゾール、pH7.4 から構成され、および溶出緩衝液は、pH7.4 において 20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0.5M NaCl および 500mM イミダゾールから作製した。1ml の分画を回収し、上昇した OD280 値を持つこの分画を溜め、そして PBS に対して透析した。細胞に基づいたアッセイのために、内毒素を、精製抗体の透析分画から、発熱因子非含有 4ml Affi-Prep Polymyxin Matrix (BioRad) 液滴カラムを、1ml/分の流速で、PBS を平衡緩衝液として使用して通すことにより、除去した。内毒素のレベルは、LAL 法 (Bio Whittaker QCL-1000) を使用して定量され、そして、さらなる内毒素の除去が必要だった場合、サンプルは、再びポリミキシン樹脂に通した。別の方法は、サンプルを Q15 Strongly Ionic Anion Exchanger (Sartorius) に、1ml/分の流速で、50ml の 20mM リン酸、150mM NaCl、pH7.2 を平衡緩衝液として使用して通すことであった。

【実施例 4】

【0137】

(抗 PDGF 抗体の反応性)

C1 抗 PDGF 抗体の結合を、固相 ELISA により、上述のように、種々の起源の PDGF に対し、試験した。結果は図17に示す。

【0138】

C1 抗 PDGF 抗体は、ヒトおよびブタ PDGF-BB に強く反応したが、ラット PDGF-BB には反応しなかった。ヒト PDGF-AA に対する反応は、弱かった。

【実施例 5】

【0139】

(PDGFβレセプター競合アッセイ)

高度タンパク質結合96ウェルプレート、10 ng/ウェルの組換えヒトPDGFレセプターβ/Fcキメラ(R+D Systems)で、PBS中において4℃で一晩コートした。プレートは5%ショ糖1%BSA/PBSで37℃1時間ブロックした。精製抗PDGF-BB抗体の連続の希釈物は、ブロックおよび洗浄済みプレートに添加する前に、10 ng/mlの組換えヒトPDGF-BBと共に室温で30分インキュベートした。室温で2時間後、プレートをPBS/0.05% Tweenで洗浄し、続けてビオチン化抗PDGF-BB抗体(R+D Systems)と共に、2時間室温でインキュベーションした。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ(Pierce)を、30分室温で添加した。PBS/0.05% Tween水溶液で3回、PBSで3回の洗浄の後、PNPP緩衝液中のSigma 104基質を添加し、OD405におけるシグナルを決定した。

【0140】

図18は、マウス抗体C1について得られた結果を、ウサギ抗PDGF抗体(A8)との比較において示す。

【実施例6】

【0141】

(PDGF-BBとの競合)

抗体C1を、シグナル伝達経路においてPDGF-BBと競合する能力について、試験した。ルシフェラーゼアッセイを、読み出しとして使用した。

【0142】

競合性の測定のため、PDGF-BBと混合された細菌上清含有Fab(2 ml)を、Fosプロモーター/ルシフェラーゼレセプター構築物と共にトランスフェクションされたNIH3T3細胞に、適用した。3T3細胞の共トランスフェクションは、NIH3T3細胞を6 cmディッシュあたり 3×10^5 細胞でプレートし、翌日トランスフェクションすることによって行った。NIH3T3細胞は、Efffectine lipofect ion reagent (Qiagen)を使用し、各プレートに0.1 μm pEGFP(トランスフェクション効率を測定するトレーサー)および0.9 μgのFosプロモーター/ルシフェラーゼレセプター構築物と共に、トランスフェクションした。3T3細胞は、トランスフェクション後0.5%血清中に24時間置き、Fosプロモーターのバックグラウンド活性を下げるため、さらに24時間この低血清培地において、インキュベートした。それから、抗体上清を、これらの細胞に、6時間適用した。細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイを、50 μgの細胞溶解産物を使用して行った。

【0143】

結果は、図19に示す。C1は、PDGF-BBによるシグナル伝達を阻害し得るが、tPAは阻害しない。

【実施例7】

【0144】

(BIAcore親和性測定)

本来のおよびヒト化抗PDGFクロンのBIAcore分析を、標準的手順に従って行った。サイトカインは、一級アミンを介する化学結合によりBIAchip上に固定化され、そして抗体の結合挙動を、30分にわたって分析した。結果は、表2に示す。

【0145】

10

20

30

40

【表 8】

表 2

PDGFへのB1結合

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	kt (RU/(M*s))	RI (RU)
	1.91e4	2.05e-4	118	1.43e7	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 2					-2.77
B1E1C1 結合 Fc=2 - 3					-1.93
B1E1C1 結合 Fc=2 - 4					-2.07
B1E1C1 結合 Fc=2 - 5					1.45
B1E1C1 結合 Fc=2 - 6					3.66
B1E1C1 結合 Fc=2 - 7					5.26

	分析物の 濃度	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	χ^2
		9.29e7	1.08e-8			0.784
B1E1C1 結合 Fc=2 - 2	.06125u			100	1.37e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 3	.125u			108	2.59e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 4	.25u			113	4.97e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 5	.5u			115	9.74e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 6	1u			116	0.0193	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 7	2u			117	0.0384	

PDGFへのC1結合

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	kt (RU/(M*s))	RI (RU)
	1.07e5	4.62e-5	153	5.69e7	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 16					-0.172
B1E1C1 結合 Fc=2 - 17					-0.559
B1E1C1 結合 Fc=2 - 18					-0.284
B1E1C1 結合 Fc=2 - 19					-0.524
B1E1C1 結合 Fc=2 - 20					4.76
B1E1C1 結合 Fc=2 - 21					4.69

10

20

	分析物の 濃度	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	χ^2
		2.31e9	4.33e-10			0.456
B1E1C1 結合 Fc=2 - 16	15.6n			149	1.71e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 17	31.25n			151	3.38e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 18	62.5n			152	6.71e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 19	125n			153	0.0134	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 20	250n			153	0.0267	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 21	500n			153	0.0534	

30

40

PDGFへのE1結合

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	kt (RU/(M*s))	RI (RU)
	2.57e4	1.17e-4	159	5.75e7	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 9					0.897
B1E1C1 結合 Fc=2 - 10					1.16
B1E1C1 結合 Fc=2 - 11					3.72
B1E1C1 結合 Fc=2 - 12					3.05
B1E1C1 結合 Fc=2 - 13					7.02
B1E1C1 結合 Fc=2 - 14					2.56

10

20

	分析物の 濃度	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	χ²
		2.19e8	4.56e-9			0.73
B1E1C1 結合 Fc=2 - 9	.06125u			148	1.69e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 10	.125u			154	3.33e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 11	.25u			157	6.53e-3	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 12	.5u			158	0.013	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 13	1u			159	0.0258	
B1E1C1 結合 Fc=2 - 14	2u			159	0.0515	

30

40

【実施例 8】

【0146】

(細胞増殖の阻害)

(細胞株)

全ての細胞株は、American Tissue Culture Collectionから購入した。細胞株は、10%熱非活性化FBS、5mMグルタミン、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシン含有EMEM(Gibco BRL, NY)中で維持した。

【0147】

(細胞増殖アッセイ)

50

細胞は、2000～8000細胞／ウェルで96ウェルプレートに播種した。1%ウシ胎児血清（FBS）および5mMグルタミンを補充されたEMEM中で一晚増殖させた後、培地交換し、抗体を、EMEM 1%FBS中で種々の濃度において加えた。内毒素は、Affi-Prep Polymyxin matrix（Bio-Rad）を使用して、抗体調製物から除去した。3日後、上清を除去し、そして細胞を1.5% Triton X-100で溶解した。細胞数の測定として、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）を、製造業者の指示に従いCytotox 96ae非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, WI）を使用して、溶出産物において検出した。抗体非添加サンプル由来の値は、0%の阻害を決定するのに使用し、そしてポジティブコントロールとしてのスタウロスポリンを含有するサンプル由来の値は、100%の阻害を決定するのに使用した。抗体による増殖の阻害の比率は、線形回帰に基づいて算出した。

10

【0148】

細胞増殖アッセイの結果を、図12から図28および表3に示す。試験された脳癌細胞型7つのうちの中の6つが、抗PDGF抗体処理した場合に増殖の阻害を示したが、コントロール抗体処理した場合には示さなかった。

【0149】

【表9】

表 3

抗PDGF抗体(マウスC1)によるヒト脳腫瘍細胞増殖の阻害

20

	% 最大 阻害値	最小有効濃度 (p<0.01)
HTB 11, 神経芽腫、骨転移	71	21 ng/ウェル
CCL127, 神経芽腫	51	100 ng/ウェル
HTB 10, 感覚上皮腫、転移	66	7.8 ng/ウェル
HTB 166, ユーイング肉腫	97	500 ng/ウェル
U87, 星状細胞腫、Ⅲ度	100	8 mg/ウェル
A172, 神経膠芽細胞腫	0	N/A
T98 G, 神経膠芽細胞腫	36	8 mg/ウェル

30

【実施例9】

【0150】

（増殖細胞核抗原（PCNA）アッセイ）

細胞を、10,000細胞／ウェルで、Lab Tec 16ウェルチャンバースライドに、1%FBS補充EMEM中で播種した。翌日、培地を除去し、抗体を、EMEM 1%FBS中で種々の濃度において加えた。3日後、スライドをPBS中で洗浄し、70%エタノールで20分4℃で固定した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、メタノール中3%NaN₃を用いて、10分間ブロックした。細胞増殖のマーカーとしてのPCNA発現は、製造業者の指示に従ってZymed PCMA staining kit（Zymed, CA）を使用し、決定した。所定のサイズの5つの異なった領域を、それぞれのウェルにおいて数え、数値を平均した。抗体非添加サンプル由来の値は、0%の阻害を決定するのに使用し、そしてポジティブコントロールとしてのスタウロスポリンを含有するサンプル由来の値は、100%の阻害を決定するのに使用した。抗体による増殖の阻害の比率は、線形回帰に基づいて算出した。

50

【0151】

結果は、表4、5および6において示す。

【0152】

【表10】

表 4

HTB10細胞PCNAアッセイ

	計測 1	計測 2	計測 3	計測 4	計測 5	平均値	S.D.	% 阻害
C1, 5 mg	4	5	7	10	9	7	2.3	97.5
C1, 5 mg	7	9	11	10	9	9.2	1.3	95.5
	29	31	22	19	21	24.4	4.7	81.6
	21	39	18	20	17	23	8.1	82.9
	98	87	91	95	101	94.4	5.0	17.4
	92	89	91	97	92	92.2	2.6	19.4
コントロール抗体、 0. 5mg	102	95	97	92	92	95.6	3.7	16.3
コントロール抗体、 0. 5mg	121	101	102	111	105	108	7.4	4.9
培地	111	105	121	119	116	114.4	5.8	0
培地	101	131	115	122	127	119.2	10.6	0
培地	121	101	99	111	106	107.6	7.9	0
培地	105	111	102	123	121	112.4	8.4	0
スタウロsporin	5	2	3	4	3	3.4	1.0	100
スタウロsporin	7	2	5	5	4	4.6	1.6	100
スタウロsporin	5	6	2	4	4	4.2	1.3	100
スタウロsporin	7	5	6	3	4	5	1.4	100

【0153】

【表 1 1】

表 5

HTB10細胞PCNAアッセイ

	計測 1	計測 2	計測 3	計測 4	計測 5	平均値	S.D .	% 阻害
C1, 5 mg	22	9	10	13	9	12.6	4.9	98.9
C1, 5 mg	11	8	7	14	16	11.2	3.4	99.9
	102	42	111	120	101	95.2	27. 5	39.7
	82	101	96	112	102	98.6	9.8	37.3
	124	135	141	126	131	131.4	6.2	13.8
	150	61	142	139	156	129.6	34. 8	15.1
コントロール抗体、 0. 5mg	161	149	137	152	128	145.4	11. 6	3.8
コントロール抗体、 0. 5mg	141	152	147	139	158	147.4	7.0	2.4
培地	168	139	141	143	145	147.2	10. 6	0
培地	139	157	154	138	142	146	7.9	0
培地	151	148	161	158	153	154.2	4.7	0
培地	155	171	139	152	161	155.6	10. 5	0
スタウロsporin	5	11	4	10	7	7.4	2.7	100
スタウロsporin	17	11	13	11	11	12.6	2.3	100
スタウロsporin	8	16	12	11	12	11.8	2.6	100
スタウロsporin	15	9	17	10	10	12.2	3.2	100

【0 1 5 4】

【表 1 2】

表 6

HTB116細胞PCNAアッセイ

	計測 1	計測 2	計測 3	計測 4	計測 5	平均値	S.D.	% 阻害
C1, 5 mg	13	8	1	3	3	5.6	4.4	98.9
C1, 5 mg	1	5	3	4	2	3	1.4	100.2
C1, 0.5 mg	12	6	5	7	6	7.2	2.5	98.2
C1, 0.5 mg	4	10	7	8	5	6.8	2.1	98.4
コントロール抗体、 0. 5mg	201	198	192	221	225	207.4	13.1	2.8
コントロール抗体、 0. 5mg	199	220	199	215	201	206.8	8.9	3.1
コントロール抗体、 0. 5mg	211	226	198	211	202	209.6	9.6	1.8
コントロール抗体、 0. 5mg	191	229	195	222	211	209.6	14.8	1.8
培地	240	201	199	222	212	214.8	15.1	0
培地	233	211	221	205	221	218.2	9.6	0
培地	199	212	201	236	201	209.8	13.9	0
培地	197	205	213	222	215	210.4	8.6	0
スタウロスピリン	5	2	0	2	3	2.4	1.6	100
スタウロスピリン	6	1	3	3	4	3.4	1.6	100
スタウロスピリン	7	5	4	2	3	4.2	1.7	100
スタウロスピリン	6	2	3	4	2	3.4	1.5	100

【実施例 1 0】

【0 1 5 5】

(³ Hチミジン増殖アッセイ)

細胞は、96ウェルプレートにおいて20,000~40,000/mlで、10% FBS含有の適切な培地中でプレートした。4時間の接着の後、培地をFBS非含有培地に交換し、一晚インキュベートした。翌日、抗PDGF抗体またはコントロール抗体含有または非含有の1% FBS含有の新鮮な培地を、加えた。48時間後、ウェルあたり1 μCi ³ Hチミジンを加え、そして細胞は翌日 cell harvester (Packard Instruments) を使用して回収した。組み込まれたトリチウム化チミジン

は、Topcount (Packard Instruments) を使用して評価した。半最大値の阻害が、線形回帰に基づいて算出された。結果は、図10に示す。

【実施例11】

【0156】

(アポトーシスアッセイ)

細胞の抗PDGF抗体処理が細胞死を誘導するか否か決定するため、アポトーシスアッセイを使用した。アポトーシスは、Roche (Roche Diagnostics, Germany) の「細胞死検出ELISA」キットを使用して測定した。このアッセイは、細胞質内のヒストン結合DNA断片 (アポトーシス誘導後にしか存在しない) を決定する。細胞は、96ウェルプレートにおいて20,000細胞/mlで、10% FBS含有の適切な培地中でプレートした。4時間の接着の後、培地をFBS非含有培地に交換し、一晩インキュベートした。翌日、抗PDGF抗体またはコントロール抗体含有または非含有の1% FBS含有の新鮮な培地を、加えた。製造業者の指示に従い、アポトーシスを種々のタイムポイントで決定した。そして、2細胞株の結果を、図12に示す。ODにおける増加は、アポトーシスを示す。

【0157】

抗PDGFはカスパーゼ依存経路においてアポトーシスを誘導するか否か試験するため、全カスパーゼ阻害剤 (pan-caspase inhibitor) z-vadを加えた。結果は、カンプトテシン誘導アポトーシスと比較し、図13に示す。ここで示すように、z-vadの存在は、本抗体によって達成されたアポトーシスの程度に、さほど大きく影響しなかった。従って、本抗PDGF抗体は、主としてカスパーゼ非依存性様式においてアポトーシスを引き起こし得、これは特に種々の癌の処置に通常使用される化学療法薬剤との組み合わせにおいて、特に有用であり得る。

【0158】

上記明細書記載の全ての刊行物は、本明細書中に参考として援用される。記載された実施形態の種々の改変および変更、局面および実施例は、当業者に明らかであり、本明細書における開示の範囲および精神から逸脱しない。好ましい特定の実施形態に関連して記載されたが、主題はこのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実に、当業者は、特に述べられはしないが、本開示に含まれる、種々の改変を想到する。

【図面の簡単な説明】

【0159】

【図1】図1は、ファージミドpRL4を描いた説明図である。

【図2】図2は、ファージミドpRL5を描いた説明図である。

【図3a】図3aは、ウサギ抗体F3軽鎖可変配列に対して高い程度の相同性を有するヒト生殖系列遺伝子配列一式を描く。F3軽鎖配列とヒト生殖系列配列との間のVBASSEヌクレオチド配列アラインメントが、示される。ダッシュは、F3と同一のヌクレオチドを表す。多様性について選択されたフレームワーク位置は、下線で示される。

【図3b】図3bは、ウサギ抗体F3重鎖可変配列に対して高い程度の相同性を有するヒト生殖系列遺伝子配列一式を描く。F3重鎖配列とヒト生殖系列配列との間のVBASSEヌクレオチド配列アラインメントが、示される。ダッシュは、F3と同一のヌクレオチドを表す。多様性について選択されたフレームワーク位置は、下線で示される。

【図4a】図4aは、ヒト化F3軽鎖アセンブリのための重複する領域を有するオリゴヌクレオチドを描く。

【図4b】図4bは、ヒト化F3重鎖アセンブリのための重複する領域を有するオリゴヌクレオチドを描く。

【図5】図5は、F3抗体のヒト化において多様な鍵となるフレームワーク残基を描く。アスタリスクは、連結位置 (VH: 48-49およびVL: 80-83) を認識し、かつ、選択を他のヒト配列または両ウサギ配列に限定する、連携した多様性を示す。¥は、その位置における多様性のために使用された縮重コードの結果生じた、ヒトでもマウスでも

ないアミノ酸の選択を示す。

【図 6 a】図 6 a は、重複縮重ヌクレオチドを使用した PCR による、ヒト化 F 3 ライブラリー合成アセンブリの略図を描く。図 6 a は、F 3 軽鎖のアセンブリを表す。

【図 6 b】図 6 b は、重複縮重ヌクレオチドを使用した PCR による、ヒト化 F 3 ライブラリー合成アセンブリの略図を描く。図 6 b は、F 3 重鎖のアセンブリを表す。

【図 6 c】図 6 c は、重複縮重ヌクレオチドを使用した PCR による、ヒト化 F 3 ライブラリー合成アセンブリの略図を描く。図 6 c は、完全ヒト化 F 3 ライブラリーのアセンブリを表す。

【図 6 d】図 6 d は、重複縮重ヌクレオチドを使用した PCR による、ヒト化 F 3 ライブラリー合成アセンブリの略図を描く。図 6 d は、縮重重複オリゴヌクレオチドの配列を示す。 10

【図 6 e】図 6 e は、重複縮重ヌクレオチドを使用した PCR による、ヒト化 F 3 ライブラリー合成アセンブリの略図を描く。図 6 e は、縮重重複オリゴヌクレオチドの配列を示す。

【図 6 f】図 6 f は、組み立てられた縮重重複オリゴヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を示す。

【図 6 g】図 6 g は、組み立てられた縮重重複オリゴヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を示す。

【図 7】図 7 は、固相 PDGF ELISA における 4 回の選別後のヒト化 F 3 クローンのスクリーニングの結果を描く。クローン C 1 1、C 1 2 および A 1 2 は、配列決定および結合アッセイのために選択された。 20

【図 8 a】図 8 a は、ウサギおよび望ましいヒトの配列を含むヒト化軽鎖の図式比較を描く。ヒト CDR は、下線で示される。全ての CDR は、太字である。

【図 8 b】図 8 b は、ウサギおよび望ましいヒトの配列を含むヒト化重鎖の図式比較を描く。ヒト CDR は、下線で示される。全ての CDR は、太字である。

【図 9】図 9 は、ヒト化 F 3 抗体がサイトカイン PDGF-BB について PDGF- β レセプターと競合する能力を描くグラフである。この能力は競合アッセイにおいて決定された。ヒト化抗 PDGF F 3 抗体改変体 (C 1 1、C 1 2、A 1 2) の、PDGF-BB サイトカインにおけるそれらの標的エピトープへの結合は、PDGF-BB がプレート上にコートされた PDGF レセプターへ結合することを阻害する。3 つの全てのヒト化 F 3 改変体が、本来の非ヒト化 F 3 抗体のプロフィールと同様の結合プロフィールを示した。 30

【図 10】図 10 は、トリチウム化チミジン増殖アッセイの要約を示す。

【図 11】図 11 は、新脈管形成アッセイの結果を示す。

【図 12】図 12 は、A 1 7 2 細胞および T 9 8 G 細胞における抗 PDGF 抗体による 3 日後のアポトーシス誘導を示す。

【図 13】図 13 は、全カスパーゼ阻害剤 z-vad 存在下におけるアポトーシス誘導を示す。

【図 14 a】図 14 a は、C 1 マウス抗 PDGF Fab 軽鎖の配列を示し、フレームワークと CDR を表す。

【図 14 b】図 14 b は、C 1 マウス抗 PDGF Fab 重鎖の配列を示し、フレームワークと CDR を表す。 40

【図 15 a】図 15 a は、ヒト化クローン E 1 および B 1 の配列を図解し、選択のあるヒトまたはマウスのフレームワーク位置および CDR を示す。配列の重複領域は、同系色で示される。マウス残基は紫で示され、ヒト残基は青で示される。

【図 15 b】図 15 b は、ヒト化クローン E 1 および B 1 の配列を図解し、選択のあるヒトおよびマウスのフレームワーク位置および CDR を示す。配列の重複領域は、同系色で示される。マウス残基は紫で示され、ヒト残基は青で示される。

【図 16 a】図 16 a は、軽鎖ヒト化のためのオリゴヌクレオチドのアセンブリを図解する。

【図 16 b】図 16 b は、重鎖ヒト化のためのオリゴヌクレオチドのアセンブリを図解す 50

る。

【図16c】図16cは、ヒト化軽鎖領域のアセンブリのために使用された、オリゴヌクレオチドプライマーのリストであり、ヒトおよびマウスのCDR領域に一致するオリゴヌクレオチドを記す。BまたはDで示されたオリゴヌクレオチドは、ヒトCDRである他は、マウスCDRである。

【図16d】図16dは、ヒト化重鎖領域のアセンブリのために使用された、オリゴヌクレオチドプライマーのリストであり、ヒトおよびマウスのCDR領域に一致するオリゴヌクレオチドを記す。Bで示されたオリゴヌクレオチドは、ヒトCDRであり、他は、マウスCDRである。

【図17】図17は、マウスC1の、種々のPDGF供給源への反応性を図解するグラフである。C1の、種々の型のPDGFへの結合は、固相ELISAにおいて決定された。

【図18】図18は、競合ELISAの結果を図解するグラフである。マウスC1抗PDGF抗体およびウサギA8抗PDGF抗体は、PDGF-BBとの結合をについてPDGF-βレセプターと競合する。

【図19】図19は、ルシフェラーゼアッセイの結果を図解する棒グラフである。C1は、PDGF-BBとの結合についてPDGF-βレセプターと競合し、ルシフェラーゼ活性により測定された場合、それによりPDGF-BBによるシグナル誘導を阻害する。

【図20】図20は、競合ELISAの結果を図解するグラフである。マウスC1抗PDGF抗体およびヒト化E1抗PDGF抗体およびヒト化B1抗PDGF抗体は、PDGF-BBとの結合についてPDGF-βレセプターと競合する。

【図21】図21は、HTB11細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。結果は、C1抗PDGF抗体による細胞増殖の阻害を示すが、コントロール57-38.1抗Fタンパク質抗体による阻害は示さない。実験は、2連で行われ、3回繰り返された。P値は、両側スチューデントt検定を使用して決定された。

【図22】図22は、CCL127細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

【図23】図23は、HTB10細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

【図24】図24は、HTB166細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

【図25】図25は、U87細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

【図26】図26は、A172細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

【図27】図27は、T98G細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

【図28】図28は、CCL147細胞を使用するLDHに基づく増殖アッセイの結果を図解するグラフである。

10

20

30

【図 1】

pRL4

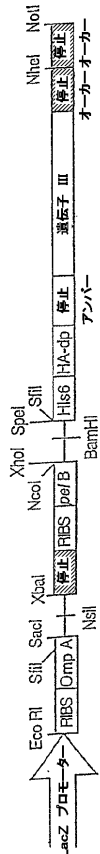


Fig. 1

【図 2】

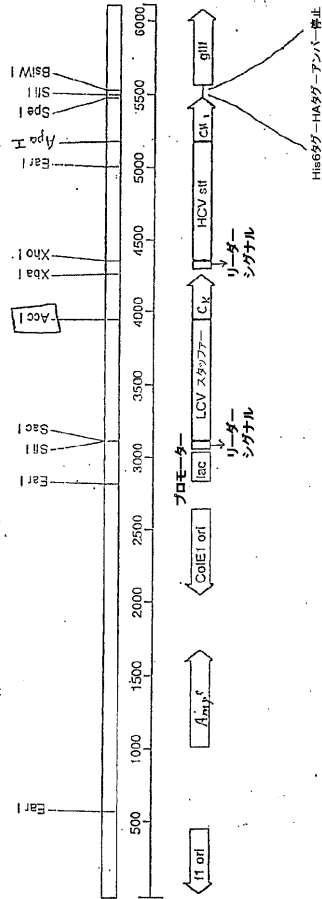


Fig. 2

【図 3 a】

最も近いヒト生体組織配列とのF3連続VBASEアライメント

配列番号	遺伝子名	遺伝子座
21	DNBL	21073
22	DNBL	21073
23	DNBL	21073
24	DNBL	21073
25	DNBL	21073
26	DNBL	21073
27	DNBL	21073
28	DNBL	21073
29	DNBL	21073
30	DNBL	21073
31	DNBL	21073
32	DNBL	21073
33	DNBL	21073
34	DNBL	21073
35	DNBL	21073
36	DNBL	21073
37	DNBL	21073
38	DNBL	21073
39	DNBL	21073
40	DNBL	21073
41	DNBL	21073
42	DNBL	21073
43	DNBL	21073
44	DNBL	21073
45	DNBL	21073
46	DNBL	21073
47	DNBL	21073
48	DNBL	21073
49	DNBL	21073
50	DNBL	21073
51	DNBL	21073
52	DNBL	21073
53	DNBL	21073
54	DNBL	21073
55	DNBL	21073
56	DNBL	21073
57	DNBL	21073
58	DNBL	21073
59	DNBL	21073
60	DNBL	21073
61	DNBL	21073
62	DNBL	21073
63	DNBL	21073
64	DNBL	21073
65	DNBL	21073
66	DNBL	21073
67	DNBL	21073
68	DNBL	21073
69	DNBL	21073
70	DNBL	21073
71	DNBL	21073
72	DNBL	21073
73	DNBL	21073
74	DNBL	21073
75	DNBL	21073
76	DNBL	21073
77	DNBL	21073
78	DNBL	21073
79	DNBL	21073
80	DNBL	21073
81	DNBL	21073
82	DNBL	21073
83	DNBL	21073
84	DNBL	21073
85	DNBL	21073
86	DNBL	21073
87	DNBL	21073
88	DNBL	21073
89	DNBL	21073
90	DNBL	21073
91	DNBL	21073
92	DNBL	21073
93	DNBL	21073
94	DNBL	21073
95	DNBL	21073
96	DNBL	21073
97	DNBL	21073
98	DNBL	21073
99	DNBL	21073
100	DNBL	21073

Fig. 3a

【図 3 b】

最も近いヒト生体組織配列とのF3連続VBASEアライメント

配列番号	遺伝子名	遺伝子座
21	DNBL	21073
22	DNBL	21073
23	DNBL	21073
24	DNBL	21073
25	DNBL	21073
26	DNBL	21073
27	DNBL	21073
28	DNBL	21073
29	DNBL	21073
30	DNBL	21073
31	DNBL	21073
32	DNBL	21073
33	DNBL	21073
34	DNBL	21073
35	DNBL	21073
36	DNBL	21073
37	DNBL	21073
38	DNBL	21073
39	DNBL	21073
40	DNBL	21073
41	DNBL	21073
42	DNBL	21073
43	DNBL	21073
44	DNBL	21073
45	DNBL	21073
46	DNBL	21073
47	DNBL	21073
48	DNBL	21073
49	DNBL	21073
50	DNBL	21073
51	DNBL	21073
52	DNBL	21073
53	DNBL	21073
54	DNBL	21073
55	DNBL	21073
56	DNBL	21073
57	DNBL	21073
58	DNBL	21073
59	DNBL	21073
60	DNBL	21073
61	DNBL	21073
62	DNBL	21073
63	DNBL	21073
64	DNBL	21073
65	DNBL	21073
66	DNBL	21073
67	DNBL	21073
68	DNBL	21073
69	DNBL	21073
70	DNBL	21073
71	DNBL	21073
72	DNBL	21073
73	DNBL	21073
74	DNBL	21073
75	DNBL	21073
76	DNBL	21073
77	DNBL	21073
78	DNBL	21073
79	DNBL	21073
80	DNBL	21073
81	DNBL	21073
82	DNBL	21073
83	DNBL	21073
84	DNBL	21073
85	DNBL	21073
86	DNBL	21073
87	DNBL	21073
88	DNBL	21073
89	DNBL	21073
90	DNBL	21073
91	DNBL	21073
92	DNBL	21073
93	DNBL	21073
94	DNBL	21073
95	DNBL	21073
96	DNBL	21073
97	DNBL	21073
98	DNBL	21073
99	DNBL	21073
100	DNBL	21073

Fig. 3b

【図 4 a】

オリゴヌクレオチド 1 軽鎖 (配列番号22)
GAGGAGGAGGAGGAGGCGGAGATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGT
AGGAGACAGAGTCACCATCATTG

オリゴヌクレオチド 2 軽鎖 (配列番号23)
GAGCTTAGGARSTTTCCCTGGTTTCTGCTGATACAGGCTAAGTAATTACTAATGCCCTGACTC
GCCCGCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCTA

オリゴヌクレオチド 2B 軽鎖 (配列番号24)
GAGCTTAGGARSTTTCCCTGGTTTCTGCTGATACAGGCTAAGTAAGCTACTAATGCTCTGACTG
GCCTGGCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCTA

オリゴヌクレオチド 3 軽鎖 (配列番号25)
ACCAGGGAASVTCTAAGCTCTGATCTATGATGCATCCGATCTGGCATCTGGGGTCCCATC
TCGGTTCARTGGCAGTGGATCTGGACAGATTWCACTCTCACCATCA

オリゴヌクレオチド 4 軽鎖 (配列番号26)
GAAAGTATTATCAACATTACTACTATAACCTGTGTGACAGTAATAAGTTGCAACATCTTC
AGGCTGCAGGCTCTGATGGTGAGAGTGWAACTCTGTCC

オリゴヌクレオチド 4B 軽鎖 (配列番号27)
GAAAGTATTATCAACATTACTACTATAACCTGTGTGACAGTAATAAGTTGCAACATCTTC
ACACTGCAGGCTCTGATGGTGAGAGTGWAACTCTGTCC

オリゴヌクレオチド 5 軽鎖 (配列番号28)
GGGTATAGTAGTAGTAATGTTGATAATCTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCTGTC

オリゴヌクレオチド 6 軽鎖 (配列番号29)
GACAGATGGTGACAGCACAGTCTGTTTGACGACCACTCGGTCC

縮重コード : R = A + G, Y = C + T, M = A + C, W = A + T, S = C + G, K = T + G

Fig. 4a

【図 4 b】

オリゴヌクレオチド 1 重鎖 (配列番号30)
GCTGCCCAACCCAGCCATGGCCGAGGTGCAGTGTGGAGTCTGGGGAGGCGCTGGTCAAGCC
TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTWCCTTCA

オリゴヌクレオチド 2 重鎖 (配列番号31)
CAGCCCCCTCCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGTTCATGCTATAGCTACTGRRGGWGAATCCAG
AGGCTGC

オリゴヌクレオチド 2B 重鎖 (配列番号32)
CAGCCCTCCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGTTCATGCTATGCTACTGRRGGWGAATCCAG
GGCTG

オリゴヌクレオチド 3 重鎖 (配列番号33)
GGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGGATTCATTAACTGGTAGTAGCGCATACTACG
CGAGCTGGGCGGAAAGCCGATYACCATCTCCAGAGACAMCGCCAGAA

オリゴヌクレオチド 3B 重鎖 (配列番号34)
GGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGGATTCATTAACTGGTAGTAGCGCATACTACG
GAGCTGGGCGGAAAGCCGATYACCATCTCCAGAGACAMCGCCAGAA

オリゴヌクレオチド 4 重鎖 (配列番号35)
CCTCTCGCACAGWAATACACAGCCGTCTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCATTTCAGATACAST
GAGTCTTGGCGKTGTCTCTGGA

オリゴヌクレオチド 5 重鎖 (配列番号36)
GGCTGTGTATTWCTGTGCGAGAGGTATGCTCTGTTACAGTGAGGACTTAACATCTGGGGCCA
GGGACCCCTGGTCAACGCTCTCTCA

オリゴヌクレオチド 6 重鎖 (配列番号37)
GACCGATGGGCCCTTGTGGAGGCTGAGGAGCGGTGACCAAGG

縮重コード : R = A + G, Y = C + T, M = A + C, W = A + T, S = C + G, K = T + G

Fig. 4b

【図 5】

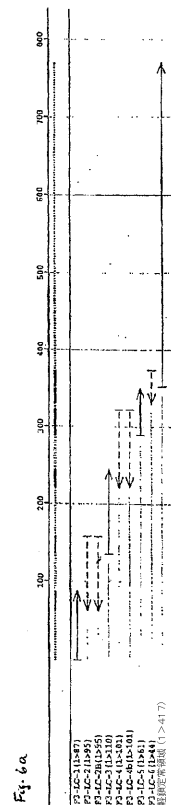
ウサギF3抗体のヒト化において多様化された重要なフレームワーク残基

多様化のために標的とされたフレームワーク位置。* 連続された位置 (VH: 48~49およびVL: 80~83) は、選択を両方ヒト配列または両方ウサギ配列のいずれかに限定する組合わせた多様化を示す。*は、その位置での多様化に使用された縮重コードの結果生じた、ヒトでもウサギでもないアミノ酸選択を示す。

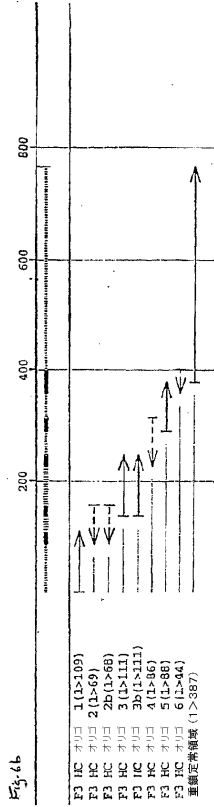
位置	ヒト	ウサギ	多様化
VL			
43	V	P	V, P, A [*] , L [*]
63	S	K	S, N [*]
71	F	Y	F, Y
80*	P	C	P, C, R [*] , S [*]
83*	V	A	V, A
VH			
28	T	S	T, S
29	F	P	F, P, L [*] , S [*]
48*	V	I	V, I
49*	S	G	S, G, A [*] , 停止 [*]
67	F	S	F, S
73	N	T	N, T
78	L	V	L, V
91	Y	F	Y, F

Fig. 5

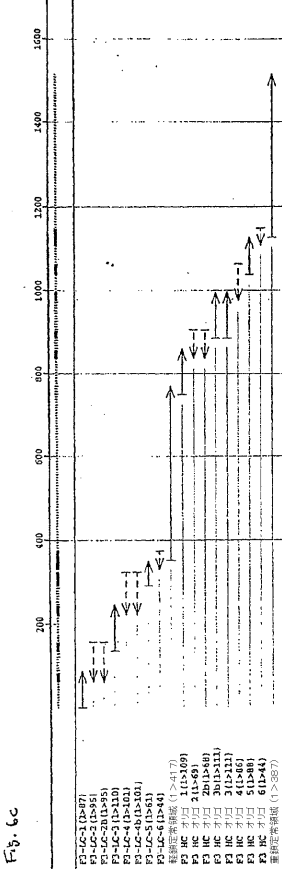
【図 6 a】



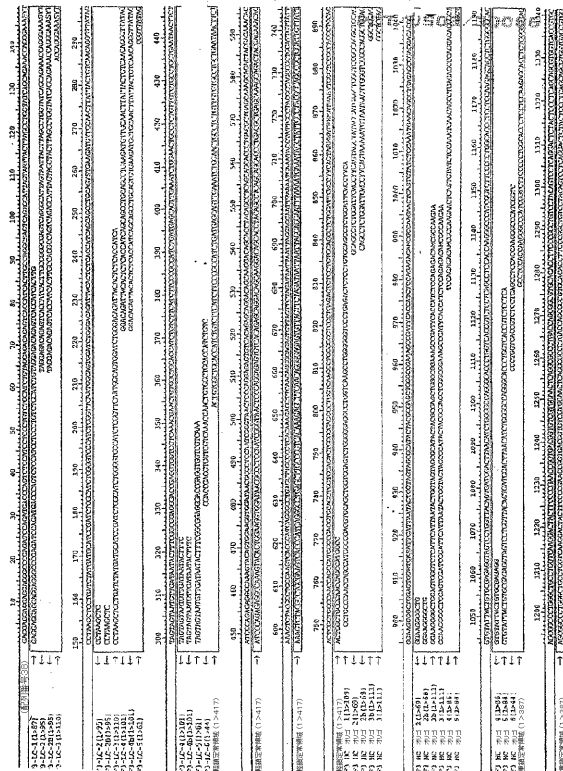
【 ㉮ 6 b 】



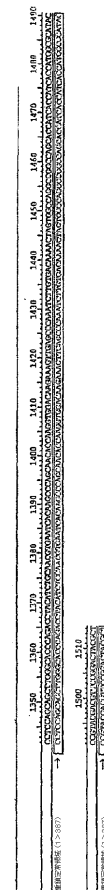
【図 6 c】



【 図 6 d 】



【 図 6 e 】



【 図 6 g 】

CTGTCGACCGCTCTGGATTCWCYYCCAGTARHWATRKHMATRYTGGGTGGCCACGACCGGAGGAGGAGGCGGTGGAGTGGRTCKS
C T A A S S G F ? ? ? S ? ? ? ? ? ? W V R Q A P G K G L E W ? ? ?
VHヒトヒタイブラリー

ATTTCATTAACTGCTAGTAGCGCATACTACGCGACCTGGSGGGAAAGCGATYCATCATCTCCAGAGACAMCGCCAGGAATCT
F I N T G S S A Y Y A S W A E S R ? ? ? I S R D ? A K N S
VHヒトヒタイブラリー

ASTGTATCTGCCAAATGAACAGCTTGAGAGCCSAGGACACGGCTGTGTATWCTGTGCGAGAGGTAGTCTCGTTACACATGATGG
? Y L D M N S L R A E D T A Y V ? C A R G S P C Y S D Q
VHヒトヒタイブラリー

ACTTAACATCTGGGCGCAGGGCACCTGGTCAACGCTCTCTCAGCTCCACCAAGGCCCATCGGTCTCCCCGTGGCACCTCC
L N I W S D G T L T Y T V S S A S T K G P S V F P L A P S
ヒトCH1ドメイン

CTCCAAGACACCTCTGSGGGCAGACGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
S K S T S G G T A A L C C L L V K D Y F F E P V T V S W N
ヒトCH1ドメイン

CTCAGGCGCCCTGACCAAGCGGCTGCACACTTCCCGGCTGTCTTCAGACTCTCAGGACTCTACTCTCCACAGACGGTGGTAC
S C A L T S G V H T F P A V L O S S G L Y S L S S V Y T
ヒトCH1ドメイン

CTGTGCTCTCAGACAGCTTGGGACCCAGACTCATCTTGCACGTGGAATACCAAGCCAGCAGACACCAAGBTGGACAGAGAT
V P S S S L G T G T Y I C N V N H K P S N T K Y D K K V
ヒトCH1ドメイン

Spel Sfi

TGAGCCCCAAATCTGTGCAAAAACATGTGCCAGGCGCGCGACACCATCACCATCACCATGGGCATACCCGTCAGACGCTCC

E P K S C N K
部分的IgG1ヒンジ

GGACTACGCT
1522

Fig. 69

【図 8 a】

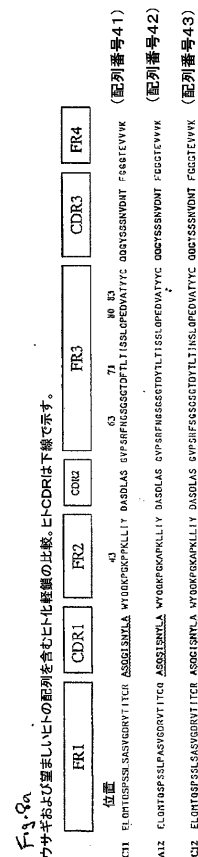


Fig. 8a

ウサギおよび望ましいヒトの配列を含むヒト化軽鎖の比較。ヒトCDRは下線で示す。

Fig. 8b

ウサギおよび望ましいヒトの配列を含むヒト化重鎖の比較。ヒトCDRは下線で示す。

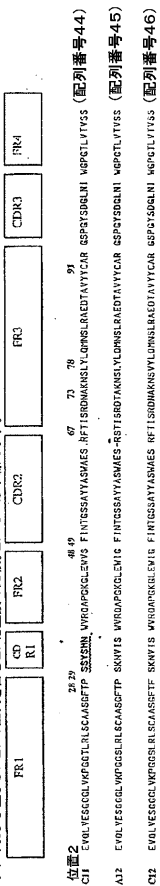
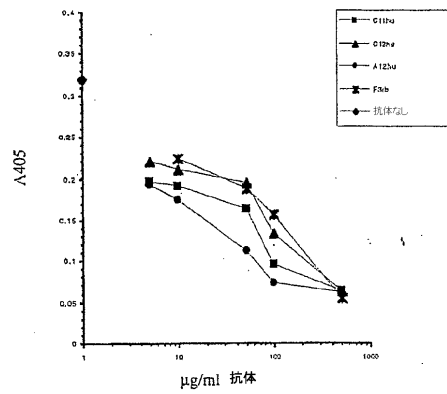


Fig. 9



増殖アッセイのまとめ

細胞株	癌のタイプ	IC50[μg/ml] (平均+/-標準偏差)	C1	Em2
NCI-H1651	ヒト肺癌	30.0+/-9	74.1 +/- 6.6	
NCI-1876	ヒト肺癌	27.1+/-7.5	57.9+/-21.9	
NCI-H2228	ヒト肺癌	34.0+/-19.5	74.1+/-6.6	
NCI-H23	ヒト肺癌癌	48.2>40	N/A	
Calu-6	ヒト未分化肺癌	80.0	N/A	
A549	ヒト肺癌	>80	N/A	
NCI-1688	ヒト小細胞肺癌	N/A	N/A	
Capan-1	ヒト膵臓腺癌	N/A	N/A	
Capan-11	ヒト膵臓腺癌	N/A	N/A	
SK-N-SH	ヒト神経芽腫、 脊転移	13.75 +/-5.3	18.75+/-12.4	
JMR-32	ヒト神経芽腫	27.3+/-17.9	31.2>40	
NB41A3	マウス神経芽腫	N/A	N/A	
SK-N-MC	ヒト感覚上皮腫	29+/-15.5	29.>40	
U87	ヒト星状細胞腫 Ⅲ度	13+/-4.2	30.>40	
T98G	ヒト神経膠芽細胞腫	28.45+/-5	36.9>40	
A172	ヒト神経膠芽細胞腫	20.3 >40	55.4	
A375	ヒト悪性メラノーマ	N/A	N/A	
BeWo	ヒト嚢毛上皮腫	N/A	N/A	
JEG-3	ヒト嚢毛上皮腫	N/A	N/A	
Hs 63	ヒト皮膚線維肉腫	N/A	N/A	
Hs 295	ヒト皮膚線維肉腫	N/A	N/A	
NCI-N87	ヒト胃癌 (gastric carcinoma)	N/A	N/A	
Snu-16	ヒト胃癌 (gastric carcinoma)	N/A	N/A	
Hs 746T	ヒト胃癌 (stomach carcinoma)	N/A	N/A	
NCI-H28	ヒト中皮腫	N/A	N/A	
NCI-H2052	ヒト中皮腫	N/A	N/A	
RD-ES	ヒトユーイング肉腫	9.75+/-0.35	21.2+/-5.37	

N/Aは、 $40 \mu\text{g/ml}$ において阻害がなかったことを示す。
 $>40 \mu\text{g/ml}$ は、 $40 \mu\text{g/ml}$ において幾らかの阻害があったが、IC50について良好な推測を得るには十分でなかったことを意味する。

Figure 11

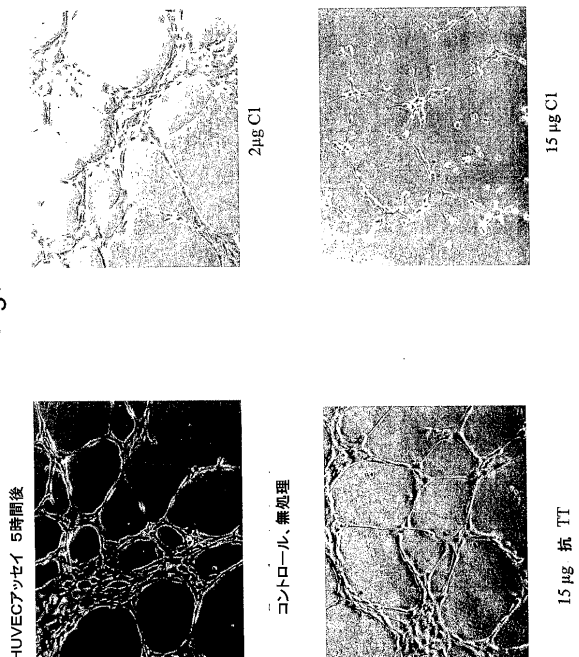


Fig. 10

3日後のA172細胞およびT98G細胞における、抗PDGF抗体によるアポトーシス誘導

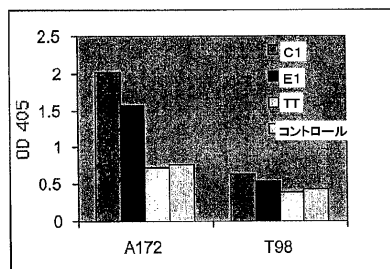


Fig. 12

全カスパーゼ阻害剤であるz-vad存在下のアポトーシス誘導

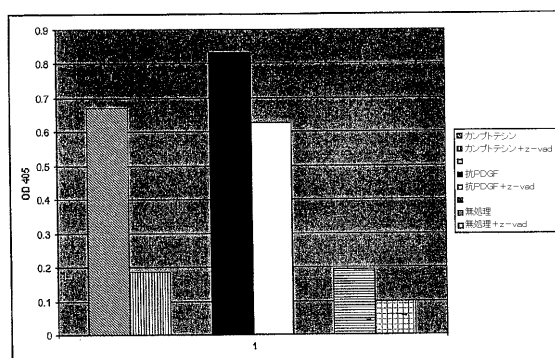


Fig. 13

[illegible]

Fig. 14a

XbaI

CAGGTGCTGCTCGAGCAGTCTGGKCTGACCTGGTGAAGGCTGAGGCTCTAGTGAAGCTGCTGCAAGGCTCTGGCTACAGTTC 87

FR1

ACCAGCACCTGGATGAAGCTGGTAAAGAAGAGCCCTGACCAAGSCCTTGATGGATTTGGAAGATTGATCCTTACGATAGTAART 174

CDR1 FR2 CDR2

CACCTACATCAAAAGTTCAGGACAAGSCATATTGACTGTGAGACAATCCTCCAGCAGACGCTACATGCAACTCAGCAGGCTGACA 261

CDR2 FR3

TCTGAGGACTCTCGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGGGCATATGATTACGCCCTGCTATGAGACTACTGAGGCTCAAGGAACCTCAGTC 348

FR3 CDR3 FR4

ACCGTCTCTCGAGGCAAAAGCAGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGATCTGCTGCCCAAACCTCACTCATGTTACCGTCT 435

FR4

定常領域 (CH1)

GGATGCCATGGTCAAGGCTATTTCCTTGAGCCAGTGACAGTGACCTGAGCACTCTGGATCCCTGTCCAGGCTGACACCTCTCCA 522

定常領域 (CH1)

GCTGTCTCTGAGCTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTGAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCAGAGAGACCTGACCTGCAAC 609

定常領域 (CH1)

SpeI SfiI

GTGGCCCAACCGCCGAGCAGCACCAAGGTGGACAGAAGAAATTTGTGCCAGGGAATGTACTAGTGSCCAAGCGGCGACCACTCAG 696

定常領域 (CH1)

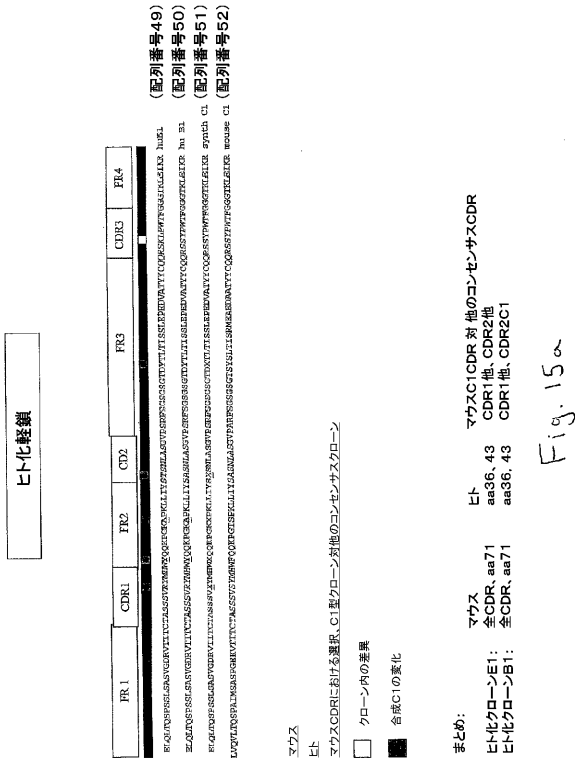
HISタグ

CATCACCATTGGCCATACCCGTACGAGTCTCCGAGTACGCTTCT 741 (配列番号48)

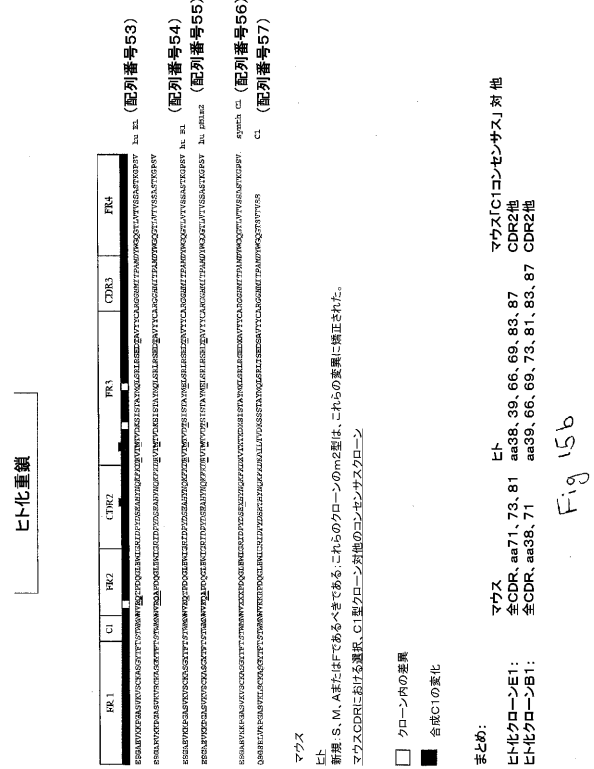
HISタグ HAタグ

Fig. 14b

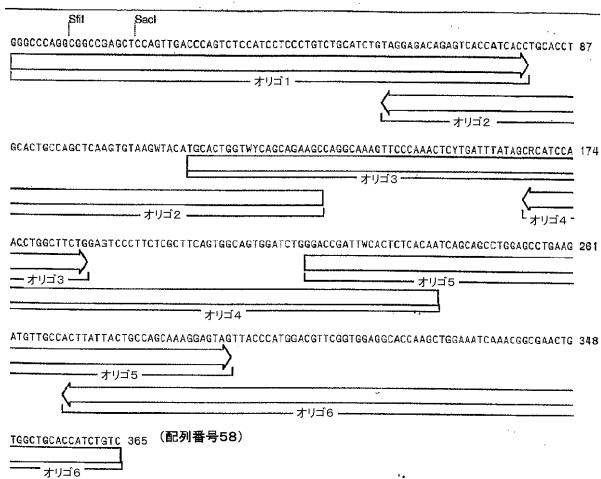
【図 15 a】



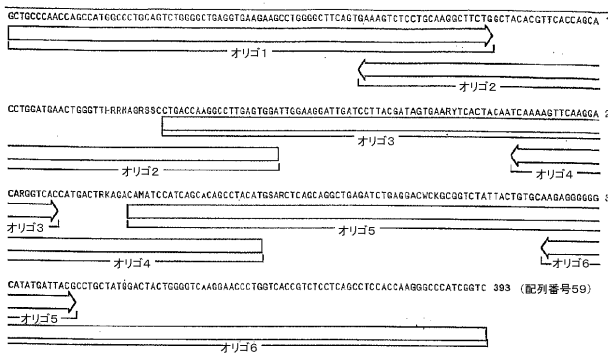
【図 15 b】



【図 16 a】



【図 16 b】



【図 16 c】

軽鎖アセンブリのための全オリゴヌクレオチドのリスト

オリゴ1 (配列番号60)

GGGCCAGGCGGCCGAGCTCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGATCACCATCACC

オリゴ2 (配列番号61)

GCTTCTGCTGRWACCAGTGCACTGTACTTACACTTGAGCTGGCAGTGCAGGTGCAGGTGA
TGGTGACTCTGTCTCCTA

オリゴ2B (配列番号62)

GCTTCTGCTGRWACCAGTTTAAATAACTGCTTATGCCGCTCTGACTGCAGGTGCAGGTGA
TGGTGACTCTGTCTCCTA

オリゴ3 (配列番号63)

TGCACCTGGTWCAGCAGAGCCAGGCAAAKYTCCCAAACCTCYTGATTATAGRCATCCA
CCTGGCTTCTG

オリゴ3B (配列番号64)

TAAATTGGTWCAGCAGAGCCAGGCAAAAGTCCCAAACCTCYTGATTATAGRCATCCA
ACCTGGCTTCTG

オリゴ3C (配列番号65)

TGCACCTGGTWCAGCAGAGCCAGGCAAAAGTCCCAAACCTCYTGATTATAGRCATCCA
ACTTGCAATCTG

オリゴ3D (配列番号66)

TAAATTGGTWCAGCAGAGCCAGGCAAAAGTCCCAAACCTCYTGATTATAGRCATCCA
ACTTGCAATCTG

オリゴ4 (配列番号67)

TTGTGAGAGTGWAATCGGTCGCCAGATCCACTGCCACTGAAGCGAGAAGGGACTCCAGAAG
CAGGTTGGAATGYG

オリゴ4B (配列番号68)

TTGTGAGAGTGWAATCGGTCGCCAGATCCACTGCCACTGAAGCGAGAAGGGACTCCAGATT
GCAAGTTGGATGYG

オリゴ5 220~295 (配列番号69)

GGACCGATTWCACCTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATGTGCCACTTATTACT
GCCAGCAAAGGAGTAG

オリゴ6 270~365 (配列番号70)

GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCCGCCGTTTGAATTCACAGCTTGGTGCCTCCACCGAAGCT
CCATGGGTAACACTCCTTGTGCTGGCAGTAATAAGT

Fig. 16c

【図 16 d】

重鎖オリゴ

H1 (配列番号71)

GCTGCCCAACCCAGCCATGGCCCTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCA
GTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTG

H2 (配列番号72)

TCCACTCAAGGCCTTGGTCAGGSSYCTKYDAACCCAGTTCATCCAGGTGCTGGTGAACG
TGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGAGACTTTC

H2B (配列番号73)

TCCACTCAAGGCCTTGGTCAGGSSYCTKYDAACCCAGTTCATATAGTAGGCGGTGAACG
TGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGAGACTTTC

H3 (配列番号74)

CTGACCAAGGCCTTGAAGGATTGATCCTTACGATAGTGAARYTCACTACA
ATCAAAGTTCAGGACARGGTAC

H3B (配列番号75)

CTGACCAAGGCCTTGAAGGATTGATGATTAAACCTTACAATGGTGGCRYTAACTACG
CACAAAAGTTCACGGGCARGGTAC

H4 (配列番号76)

ATGTAGGCTGTGCTGATGRWTKTGTCTMYAGTCCATGTGACCTGTGCTTGAACCTTTGA

H4B (配列番号77)

ATGTAGGCTGTGCTGATGRWTKTGTCTMYAGTCCATGTGACCTGTGCTTGAACCTTTGA

H5 (配列番号78)

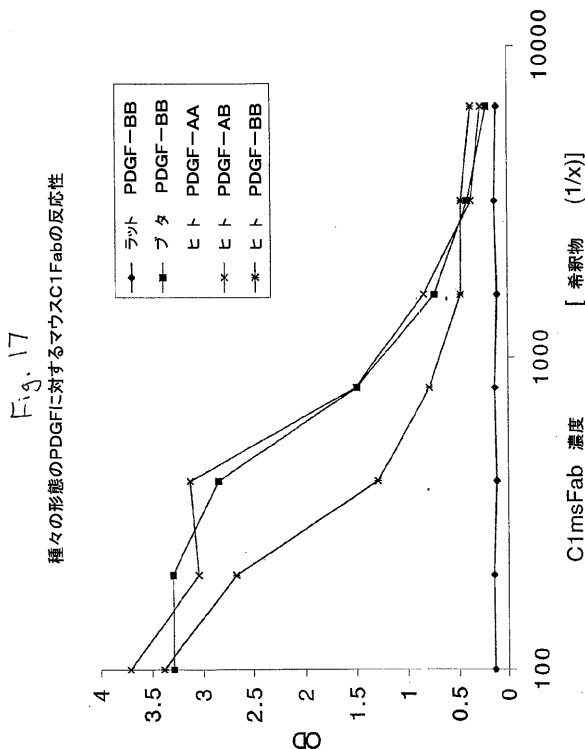
CAMAWYCATCAGCACGCCTACATGSARCTCAGCAGGCIAGATCTGAGGACWCKGCGGT
CTATTACTGTGCAAGAGGGGGCATATGATTACG

H6 (配列番号79)

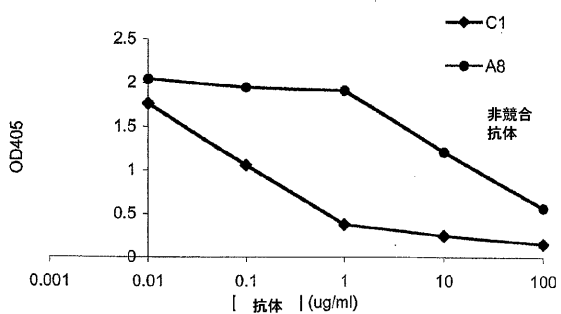
GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGACCCAGTA
GTCCATAGCAGCGCTAATCATATGCCCCCTCTT

Fig. 16d

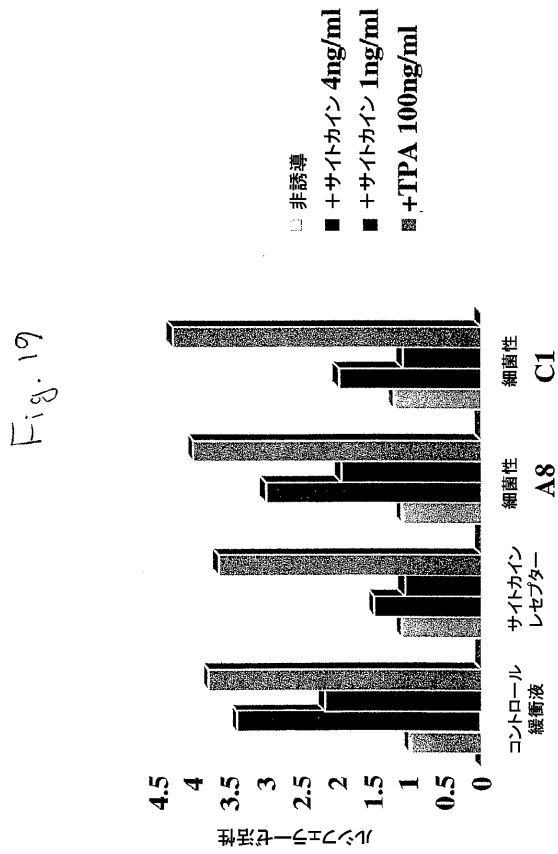
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【図 20】

レセプターとの結合についての元の抗PDGFクローンおよびヒト化抗PDGFクローンのPDGF-BBとの競合

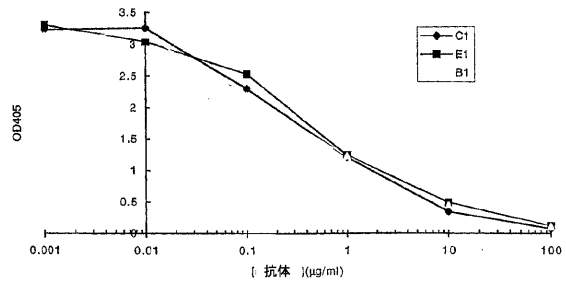


Fig. 20

【図 21】

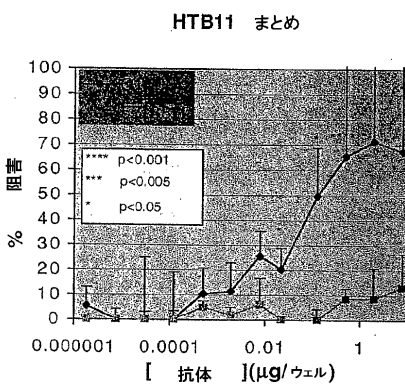


Fig. 21

【図 22】

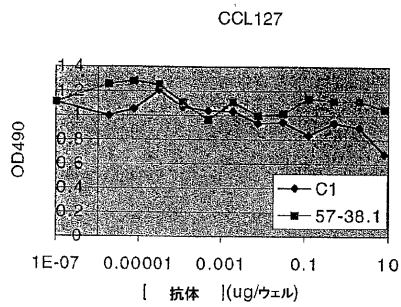


Fig. 22

【図 2 3】

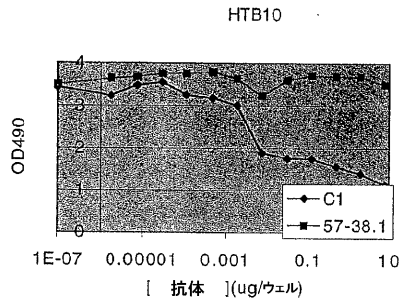


Fig. 23

【図 2 4】

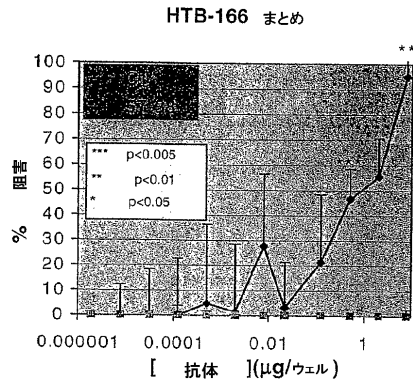


Fig. 24

【図 2 5】

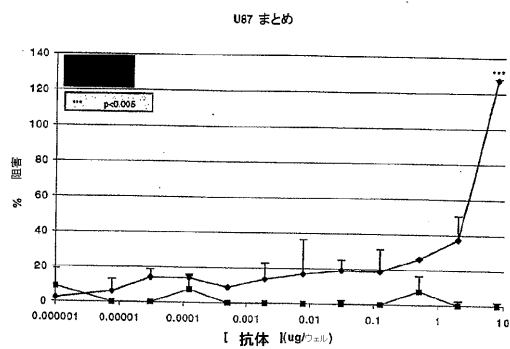


Fig. 25

【図 2 6】

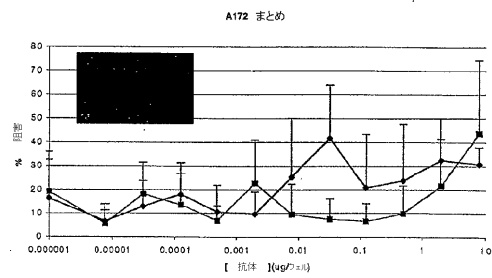


Fig. 26

【図 27】

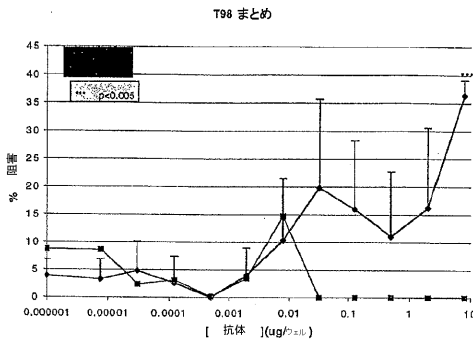


Fig. 27

【図 28】

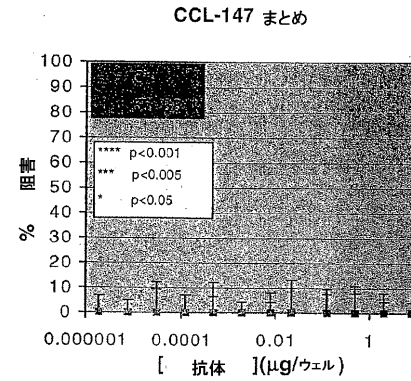


Fig. 28

【手続補正書】

【提出日】平成16年6月3日(2004.6.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

標的に対し特異性を有する抗体のパネルを提供する工程であって、該抗体のパネルは第一種由来の複数の抗体メンバーを含む、工程；

該抗体のパネルの第一メンバーの少なくとも一部の配列を決定する工程；

該パネルの該第一メンバーの配列を、標的種由来の抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程であって、該標的種は該第一種とは異なっている、工程；

該パネルの該第一メンバーの配列と高い相同性を示し、かつFR3領域を含む、少なくとも一つの配列を、該参照ライブラリーの第一メンバーから選択する工程；

該パネルの該第一メンバーからCDR3領域を得る工程；および

該パネルの該第一メンバー由来の該CDR3領域を、該参照ライブラリーの該第一メンバー由来の該少なくとも一つの配列の該FR3領域に隣接して組み入れることで、設計抗体または設計抗体断片を形成する工程、

を包含する、方法。

【請求項2】

請求項1に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

前記パネルの前記第一メンバーの配列を、抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程；

少なくとも F R 4 配列を、該参照ライブラリーの第二メンバーから選択する工程；および

該 F R 4 配列を、該設計抗体または設計抗体断片に、該パネルの該第一メンバー由来の前記 C D R 3 領域に隣接して組み入れる工程、
をさらに包含する、方法。

【請求項 3】

前記パネルのメンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 3 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 5】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 3 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 6】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 7】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上に由来する C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 8】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 7 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 9】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 7 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 10】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 11】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上に由来する C D R 1 領域および C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のそれぞれがかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 12】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来であ

る、請求項 1 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 3】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 1 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 4】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 1 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 5】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 1 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 6】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域、前記 C D R 2 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルのそれぞれ異なったメンバー由来である、請求項 1 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 7】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域、前記 C D R 2 領域および前記 C D R 1 領域のすべてが、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 1 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 8】

前記パネルの一つ以上のメンバー由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域を、それぞれ前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含し、組み込まれた該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のうち少なくとも一つが該パネルの第二メンバー由来である、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 1 9】

前記標的が P D G F である、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 2 0】

前記抗体断片が s c F v、F a b、F (a b ') 2、F d、二重特異性抗体、抗体軽鎖、および抗体重鎖からなる群から選択される、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 2 1】

前記標的種がヒトである、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 2 2】

前記参照ライブラリーがヒト再編成抗体配列を含む、請求項 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 に記載の方法に従って、複数の設計抗体または設計抗体断片を調製する工程を包含する、設計抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 2 4】

前記ライブラリーが、設計抗体または設計抗体断片の改変体をさらに含み、該設計抗体または設計抗体断片の改変体が、前記パネルの前記メンバーの前記配列、前記参照ライブラリーの前記第一メンバーの前記配列からなる群より選択される一つ以上の配列に由来する、V H / V L 境界および / またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせを含む、請

求項 2 3 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 2 5】

設計抗体または設計抗体断片を提示するファージミドライブラリーまたはファージライブラリーを生成する工程をさらに包含する、請求項 2 3 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 2 6】

前記ファージミドライブラリーまたは前記ファージライブラリーを前記標的に対する活性についてパニングし、該標的に優先的に結合するファージ粒子またはファージミド粒子を単離する工程をさらに包含する、請求項 2 3 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 2 7】

抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

請求項 1 に記載の方法に従って複数の設計抗体を調製する工程；

標的に対する複数の抗体の結合親和性を決定する工程；および

結合親和性に基づき、前記ライブラリーから抗体を選択する工程、を包含する、方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

前記複数抗体の免疫原性を決定する工程；および

結合親和性および免疫原性に基づき、抗体を選択する工程、をさらに包含する、方法。

【請求項 2 9】

設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

標的に対する特異性を有する抗体のパネルを提供する工程であって、該抗体のパネルは、第一種由来の複数の抗体メンバーを含む、工程；

該標的に関して望ましい結合特性を有する該パネルの第一メンバーを選択する工程；

該抗体のパネルの複数メンバーの少なくとも一部の配列を決定し、該複数メンバーのコンセンサス配列を決定する工程；

該コンセンサス配列を標的種由来の抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程であって、該標的種は、該第一種と異なっている、工程；

該参照ライブラリーの第一メンバーから、該コンセンサス配列と高度の相同性を示し、かつ、F R 3 領域を含む、少なくとも一つの配列を選択する工程；

該パネルの該第一メンバーから C D R 3 領域を得る工程；および

該パネルの該第一メンバー由来の該 C D R 3 領域を、該ライブラリーの該第一メンバー由来の該少なくとも一つの配列の該 F R 3 領域に隣接して組み入れ、設計抗体または設計抗体断片を形成する工程、を包含する、方法。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法であって、該方法は、以下：

前記コンセンサス配列を、抗体配列または抗体断片配列の参照ライブラリーと比較する工程；

該参照ライブラリーの第二メンバーから、少なくとも F R 4 配列を選択する工程；および

該 F R 4 配列を、前記設計抗体または設計抗体断片に、前記パネルの前記第一メンバー由来の前記 C D R 3 領域に隣接して組み入れる工程、をさらに包含する、方法。

【請求項 3 1】

前記パネルのメンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 3 0 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するため

の方法。

【請求項 3 2】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 3 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 3 3】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 1 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 3 1 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 3 4】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 1 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 3 5】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上に由来する C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 3 0 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 3 6】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの異なったメンバー由来である、請求項 3 5 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 3 7】

前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列に組み込まれている前記 C D R 3 領域および前記 C D R 2 領域が、前記パネルの同じメンバー由来である、請求項 3 5 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 3 8】

前記パネルの第二メンバー由来の C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 2 領域がかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供するための方法。

【請求項 3 9】

前記パネルの前記メンバーの一つ以上由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のそれぞれがかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含する、請求項 3 0 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4 0】

前記パネルの一つ以上のメンバー由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域を、前記ライブラリーの前記第一メンバー由来の前記少なくとも一つの配列の、該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のそれぞれがかつて占めていた位置に、組み入れる工程をさらに包含し、組み込まれた該 C D R 1 領域および該 C D R 2 領域のうち少なくとも一つが該パネルの第二メンバー由来である、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4 1】

前記標的が P D G F である、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4 2】

前記抗体断片が s c F v、F a b、F (a b ') 2、F d、二重特異性抗体、抗体軽鎖、および抗体重鎖からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4 3】

前記標的種がヒトである、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4 4】

前記参照ライブラリーがヒト再編成抗体配列を含む、請求項 2 9 に記載の設計抗体または設計抗体断片を提供する方法。

【請求項 4 5】

請求項 2 9 に記載の方法に従って、複数の設計抗体または設計抗体断片を調製する工程を包含する、設計抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 4 6】

前記ライブラリーが、設計抗体または設計抗体断片の改変体をさらに含み、該設計抗体または設計抗体断片の改変体が、前記パネルの前記メンバーの前記配列、前記参照ライブラリーの前記第一メンバーの前記配列からなる群より選択された一つ以上の配列に由来する、VH/VL 境界および／またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせを含む、請求項 4 5 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 4 7】

前記設計抗体または設計抗体断片を提示するファージミドライブラリーまたはファージライブラリーを生成する工程をさらに包含する、請求項 4 5 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 4 8】

前記ファージミドライブラリーまたは前記ファージライブラリーを前記標的に対する活性についてパニングし、該標的に優先的に結合するファージ粒子またはファージミド粒子を単離する工程をさらに包含する、請求項 4 5 に記載の抗体ライブラリーを提供する方法。

【請求項 4 9】

抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

請求項 2 9 に記載の方法に従って複数の設計抗体を調製する工程；

複数の抗体の結合親和性を決定する工程；および

結合親和性に基づき、抗体を選択する工程、

を包含する、方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の抗体または抗体断片を選ぶための方法であって、該方法は、以下：

前記複数抗体の免疫原性を決定する工程；および

結合親和性および免疫原性に基づき、抗体を選択する工程、

をさらに包含する、方法。

【請求項 5 1】

抗体または抗体断片を選択するための設計抗体または設計抗体断片の参照ライブラリーであって、該ライブラリーは、設計抗体または設計抗体断片の改変体を含み、該改変体は、標的種に対してネイティブな抗体由来のフレームワーク領域であって、該フレームワーク領域が所定の標的に対する特異性を有する第一抗体のフレームワーク領域と高度の相同性を示す、フレームワーク領域、所定の標的に対する特異性を有する該第一抗体由来の C D R 3 領域、該第一抗体または該標的種に対してネイティブな抗体のいずれかに由来の C D R 1 領域および C D R 2 領域の組み合わせ、ならびに VH/VL 境界および／またはベルニエ領域におけるアミノ酸の組み合わせであって、該アミノ酸の組み合わせが該標的種にネイティブな抗体に存在するアミノ酸および該第一抗体に存在するアミノ酸に相当する、アミノ酸の組み合わせを有する、ライブラリー。

【請求項 5 2】

一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域、および少なくとも片方は非ヒトである 2 つの異なる起源由来の C D R 領域を含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片。

【請求項 5 3】

生殖細胞系ヒト抗体配列および再編成ヒト抗体配列の双方の由来であるフレームワーク領域、および少なくとも片方は非ヒトである2つの異なる起源由来のCDR領域を含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片。

【請求項54】

一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域、非ヒトCDR3、ならびに非ヒト抗体配列のコンセンサス由来であるCDR1またはCDR2のうち少なくとも一つを含む、ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片。

【請求項55】

ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片を提供する方法であって、一つ以上のヒト抗体配列由来のフレームワーク領域を、少なくとも片方は非ヒトである2つの異なる起源由来のCDR領域と合わせる工程を包含し、該フレームワーク領域が、以下：

(i) 標的に結合する非ヒト抗体のパネルからの複数メンバーについて、抗体コンセンサス配列を確立する工程；

(ii) 該非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来のCDR3を、該コンセンサス配列のCDR3の代わりに置き換え、複合配列を形成する工程；および

(iii) 該複合配列をヒト抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列との相同性に基づき、少なくとも一つのヒト抗体配列を選択する工程、
によって選択されるヒト抗体配列由来である、方法。

【請求項56】

ヒト化複合抗体またはヒト化複合抗体の機能断片を提供する方法であって、2つの異なるヒト抗体配列由来のフレームワーク領域を少なくとも片方は非ヒトである2つの異なる起源由来のCDR領域と合わせる工程を包含し、該フレームワーク領域が、以下：

(i) 標的に結合する非ヒト抗体のパネルからの複数のメンバーについて、抗体コンセンサス配列を確立する工程；

(ii) 該非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来のCDR3を、該コンセンサス配列のCDR3の代わりに置き換え、複合配列を形成する工程；

(iii) 該複合配列の第一部分をヒト生殖細胞系抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列の該第一部分との相同性に基づき、少なくとも一つのヒト抗体配列を選択する工程；および

(iv) 該複合配列の第二部分をヒト再編成抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列の該第二部分との相同性に基づき、少なくとも一つのヒト抗体配列を選択する工程、

によって選択される2つのヒト抗体配列由来である、方法。

【請求項57】

標的配列に結合する非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来のCDR3を含む設計複合抗体配列であって、該設計抗体配列の残余が、該非ヒト抗体のパネルからの複数メンバーの抗体コンセンサス配列由来である、設計複合抗体配列。

【請求項58】

非ヒトドナー抗体由来のCDR領域をヒトアクセプタ抗体由来のフレームワーク領域に組み入れる工程を包含する、ヒト化抗体を作製する方法であって、該ヒトアクセプタ抗体配列を、以下：

(i) 標的に結合する非ヒト抗体のパネルからの複数のメンバーについて、抗体コンセンサス配列を確立する工程；

(ii) 該非ヒト抗体のパネルの個々のメンバー由来のCDR3を、該コンセンサス配列のCDR3の代わりに置き換え、複合配列を形成する工程；および、

(iii) 該複合配列をヒト抗体配列データベースと比較し、そして、該複合配列との相同性に基づき、少なくとも一つのヒトアクセプタ抗体配列を選択する工程、
によって選択する工程を包含する、方法。

【請求項59】

抗体C1のCDR1、CDR2およびCDR3からなる群より選択されるCDR由来の少

なくとも一つのCDRを含む抗体軽鎖。

【請求項60】

抗体C1のCDR1、CDR2およびCDR3からなる群より選択されるCDR由来の少なくとも一つのCDRを含む抗体重鎖。

【請求項61】

有効量の抗PDGF抗体を含む、腫瘍を処置するための薬学的組成物。

【請求項62】

前記腫瘍が、神経芽腫、感覚上皮腫、髄膜腫、ユーイング肉腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、カポジ肉腫、中皮腫および中皮腫細胞株、絨毛上皮腫、膀胱癌、胃癌、骨肉腫、食道癌、線維肉腫、原発性ヒト肺癌における悪性上皮細胞、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、傍神経節腫、血管肉腫、血管周囲細胞腫、NOS肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫、および子宮間質肉腫、乳癌、結腸直腸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性線維組織球腫、平滑筋細胞腫瘍、および前立腺癌からなる群から選択される、請求項61に記載の薬学的組成物。

【請求項63】

前記抗PDGF抗体が抗PDGF BB抗体である、請求項61に記載の薬学的組成物。

【請求項64】

前記抗PDGF抗体が化学治療薬剤との組み合わせ治療で使用される、請求項61に記載の薬学的組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/30086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 16/00, 16/28; C12N 15/00; A61K 39/395		
US CL : 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.23, 388.24, 388.85; 435/69.6, 70.2, 71.1; 424/130.1, 156.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 530387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.23, 388.24, 388.85; 435/69.6, 70.2, 71.1; 424/130.1, 156.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RADER et al. The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. The Journal of Biological Chemistry. 05 May 2000, Vol. 275, No. 18, pages 13668-13676, especially pages 13670, 13671, 13672.	1-58
Y	RADER et al. A phage display approach for rapid antibody humanization: Designed combinatorial V gene libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. July 1998, Vol. 95, pages 8910-8915, especially pages 8912, 8913.	1-58
Y	US 5,976,534 A (HART et al.) 02 November 1999 (02.11.99), see entire document, especially column 7-8.	19
X	US 5,817,310 A (RAMAKRISHNAN et al.) 06 October 1998 (06.10.98), see entire document, especially figure 1 and column 3, lines 23-57.	61, 63
Y	SHIMIZU et al. In vivo and in vitro interactions between human colon carcinoma cells and hepatic stellate cells. Jpn. J. Cancer Res. December 2000, Vol. 91, No. 12, pages 1285-95, abstract only.	62
Y	US 5,990,141 A (HIRTH et al.) 23 November 1999 (23.11.99), see entire document, especially column 15-18.	64
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 December 2002 (17.12.2002)		05 MAR 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer Larry R. Helms
Facsimile No. (703)305-3230		Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/30086

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☒

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/30086

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1

Group I, claim(s) 1-58, drawn to a method of providing an engineered antibody and the antibody.

Group II, claim(s) 59-60, drawn to an antibody composite of C1.

Group III, claim(s) 61-64, drawn to a method of treating a tumor.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Pursuant to 37 C.F.R. 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention of Group I, comprises a method of preparing an engineered antibody. Further pursuant to 37 C.F.R. 1.475 (d), the ISA/US considers that any features which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, WEST, USPATFULL

search terms: inventors names, CDR grafting, phage display, antibody library, humanized antibody, CDR3, affinity matured

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 P 43/00 1 2 1 C 1 2 N 15/00 A	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ボウディッシュ, キャサリン エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 1 4, デル マーク, ボキータ ドライブ 1 3 7
5 4

(72)発明者 フレデリックソン, シャナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 7 5, ソラナ ビーチ, サンタ カーネリア 7 0
5

(72)発明者 クレズーロメル, アンキ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 1 6, サン ディエゴ, ケンジントン ドライブ
4 5 3 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA01 GA11 HA01
4C084 AA17 NA05 NA06 ZB261 ZC751
4C085 AA13 AA14 CC12 DD62 EE01 EE03
4H045 AA11 AA20 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA71