

(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2013-518606

(P2013-518606A)

(43) 公表日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 1 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-552935 (P2012-552935)	(71) 出願人	591002957 グラクソsmithKline LLC アメリカ合衆国 19102 ベンシルベニア 州 フィラデルフィア、ノース・シックスティ ーンズ・ストリート 200番、ワン・フ ランクリン・プラザ
(86) (22) 出願日	平成23年2月9日 (2011.2.9)	(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(85) 翻訳文提出日	平成24年10月2日 (2012.10.2)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/024123	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 國際公開番号	W02011/100271		
(87) 國際公開日	平成23年8月18日 (2011.8.18)		
(31) 優先権主張番号	61/302,636		
(32) 優先日	平成22年2月9日 (2010.2.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規使用

(57) 【要約】

本発明は、多重抗原特異性を有する抗体、及びヒトの疾患の治療におけるその使用に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる抗体：

(a) それぞれ、配列番号 23、24、及び 25、並びに配列番号 26、27、及び 28 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 23、24、25、26、27、及び 28 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(b) それぞれ、配列番号 29、30、及び 31、並びに配列番号 32、33、及び 34 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 29、30、31、32、33、及び 34 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(c) それぞれ、配列番号 35、36、及び 37、並びに配列番号 38、39、及び 40 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 35、36、37、38、39、及び 40 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(d) それぞれ、配列番号 41、42、及び 43、並びに配列番号 44、45、及び 46 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 41、42、43、44、45、及び 46 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(e) それぞれ、配列番号 47、48、及び 49、並びに配列番号 50、51、及び 52 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 47、48、49、50、51、及び 52 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(f) それぞれ、配列番号 53、54、及び 55、並びに配列番号 56、57、及び 58 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 53、54、55、56、57、及び 58 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(g) それぞれ、配列番号 59、60、及び 61、並びに配列番号 62、63、及び 64 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 59、60、61、62、63、及び 64 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(h) それぞれ、配列番号 65、66、及び 67、並びに配列番号 68、69、及び 70 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 65、66、67、68、69、及び 70 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(i) それぞれ、配列番号 71、72、及び 73、並びに配列番号 74、75、及び 76 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 71、72、73、74、75、及び 76 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(j) それぞれ、配列番号 77、78、及び 79、並びに配列番号 80、81、及び 82 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 77、78、79、80、81、及び 82 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上、あるいは

(k) それぞれ、配列番号 83、84、及び 85、並びに配列番号 86、87、及び 88 の CDR アミノ酸配列、又は配列番号 83、84、85、86、87、及び 88 に列挙する配列の保存的配列修飾であり得る前記 CDR 配列のうちの 1 以上。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の可変重鎖または軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体を產生する、組換え宿主細胞。

【請求項 4】

治療上有効な量の請求項 1 に記載の抗体を用いて、ヒト患者における COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及び COPD の増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、又は子宮内膜症を治療又は予防する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、多重特異性を有する抗体に関する。具体的には、本発明の抗体は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78からなる群より選択される4以下の抗原に結合（すなわち、交差反応）する能力を有する。また、本発明は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78のうちの1以上の量の増加又は不均衡を特徴とする疾患又は障害、特に、COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、及び/又は子宮内膜症を処置する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

公開されているデータ及び報告書は、多くの疾患においてCXCLケモカインのELRCXCサブファミリーのメンバーが増加することを示している。CXCLファミリーには合計16のメンバーが存在する。ケモカインは、COPDを含む多くの炎症性疾患でアップレギュレートされることが報告されており、CXCL1~3、5、及び8は、それぞれ、Gro-、（Haskill, S.ら. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990: 87, 7732-7736）、ENA-78（Wang, D.及びRichmond, A. Cytokine Reference. Oppenheim, J. J. 及びFeldman, M. 編, Academic Press, London, 1023-1027及びPowerm C. A. ら Gene., 1994: 151, 333-334）、及びIL-8（Iizasa, H. 及びMatsushima, K. Cytokine Reference. Oppenheim, J. J. 及びFeldman, M. 編, Academic Press, London, 1061-1067及びMatsushima, K. ら, J. Exp. Med. 1988: 167, 1883-1893）としても知られている（Am. J. Respir. Crit. Care Med., 163: 349-355, 2001; Am. J. Respir. Crit. Care Med., 168: 968-975, 2003; Thorax, 57: 590-595, 2002）。これらケモカインの長期及び高度発現は、COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、及び/又は子宮内膜症等の疾患の発現に関与している可能性があると推測されている。これらCXCケモカインは、CXCR1及び/又はCXCR2受容体と結合し、活性化することにより好中球走化性を刺激することが知られている。したがって、これらケモカインを阻害すると、炎症細胞が肺組織に浸潤するのを防ぎ、ひいては組織損傷を防ぐことができた。

20

30

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0003】

本発明は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78からなる群より選択される4以下の抗原に結合（すなわち、交差反応）する能力を有する抗体を用いることによるCXCR1及びCXCR2受容体の活性化を阻害することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、1つの免疫グロブリン内に含有される多重特異性を有する抗体（免疫グロブリン）に関する。具体的には、本発明の抗体は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78からなる群より選

50

択される4以下の抗原に結合（すなわち、交差反応）する能力を有する。また、本発明は、前記抗体を用いて、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78のうちの1以上の量の増加又は不均衡を特徴とする疾患又は障害、特に、COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、又は子宮内膜症を治療する方法に関する。

【0005】

1つの態様では、本発明は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78からなる群より選択される4以下の抗原に結合（すなわち、交差反応）する能力を有する単離抗体に関する。抗体の定義は、抗原結合部分（又は断片）がヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78からなる群より選択される4以下の抗原に結合（すなわち、交差反応）するような抗体の抗原結合部分（又は断片）を含む。本発明の抗体は、好ましくはマウスモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体である。

【0006】

1つの実施形態では、本発明は、本発明の抗体を用いて、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP2、NAP2及びENA-78からなる群より選択される4以下の抗原を中和することにより、CXCR1及びCXCR2受容体の活性化を阻害することを通して好中球走化性を減少させる方法を含んでなる。

【0007】

1つの実施形態では、本発明は、本発明の抗体を投与することにより、それを必要としている患者における好中球走化性を減少させる方法に関する。

【0008】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、各MAPユニットが配列番号89～93のポリペプチドに由来する1つの個別の配列を有する5つの多重抗原性ペプチド(MAP)のセットと共に、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の混合物(カクテル)を用いるRIMM(Kilpatrick, K. E. ,ら. Hybridoma. 1997; 16, 381.)型プロトコールを用いる工程を含んでなる方法により作製することができる。

LATELRSQSLQTLQG 配列番号89

SAKELRSQSIKTYSK 配列番号90

LRELRSVSLQTTQG 配列番号91

SPGPHSAQTEVIAT 配列番号92

ESGPHSANTEIIVK 配列番号93

【0009】

理論に縛られるものではないが、MAPは、免疫化プロトコールにおいて2つの機能を発揮する。第1に、MAPにより、公知の標的アミノ酸配列を宿主免疫系に対して選択的に複数提示することができる。第2に、リシン等が挙げられるがこれらに限定されないコアを介して複数コピーの配列が連結されることにより質量が増加するので、個々のペプチドの免疫原性よりも前記配列の免疫原性が高くなる(Francis, J. P. ,ら. , Immunology, 1991; 73; 249, Schott, M. E. ,ら. , Cell. Immuno. 1996; 174: 199-209, Tam, J. P. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988; 85; 5409-5413)。

【0010】

本発明を作製するために用いられるMAPは、標的ケモカインのELRCXC及びGPHCA領域に又は前記領域の周囲にみられる複数コピーの保存標的配列（例えば、配列番号89～93）から構成される。例示的なMAPセットを図1に示す。

10

20

30

40

50

【0011】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、以下の工程を含んでなる方法により作製することができる：

a. 完全フロイントアジュvant (cFA) 中におけるヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の混合物をマウスに注射する工程と、

b. 不完全フロイントアジュvant (iFA) 中におけるヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の混合物を前記マウスに注射する工程と、

c. 不完全フロイントアジュvant 中におけるヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の混合物並びに各MAPユニットが配列番号89～93のポリペプチドに由来する1つの個別の配列を有する5つの多重抗原性ペプチド(MAP)のセットを前記マウスに注射する工程と、

d. 前記マウスからB細胞を単離する工程と、

e. 前記B細胞を骨髄細胞と融合させて、望ましい抗体を分泌する不死ハイブリドーマ細胞を形成する工程と、

f. 前記ハイブリドーマの培養上清から抗体を単離する工程。

10

【0012】

必要に応じて、工程cと工程dとの間に、PBS中におけるヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の混合物並びに各MAPユニットが配列番号89～93のアミノ酸配列を含むMAPのセットを任意でマウスに注射してもよい。

20

【0013】

別の実施形態では、本発明の抗体は、以下の工程を含んでなる方法により作製することができる：

a. 完全フロイントアジュvant 中における各MAPユニットが配列番号89～93のポリペプチドに由来する1つの個別の配列を有する5つの多重抗原性ペプチド(MAP)のセット(以下MAPセットとも称する)をマウスに注射する工程と、

b. 不完全フロイントアジュvant 中における前記MAPセットを前記マウスに注射する工程と、

30

c. 不完全フロイントアジュvant 中におけるヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の全ての混合物、並びに前記MAPセットを前記マウスに注射する工程と、

d. 前記マウスからB細胞を単離する工程と、

e. 前記B細胞を骨髄細胞と融合させて、望ましい抗体を分泌する不死ハイブリドーマ細胞を形成する工程と、

f. 前記ハイブリドーマの培養上清から抗体を単離する工程。

30

【0014】

必要に応じて、工程cと工程dとの間に、PBS中におけるヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78の混合物、並びに配列番号89～93を有するMAPのセットを任意でマウスに注射してもよい。

40

【0015】

別の実施形態では、本発明の抗体は、以下の工程を含んでなる方法により作製することができる：

a. 完全フロイントアジュvant 中におけるヒト組換え精製ケモカイン(ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、及びENA-78)のカクテルをマウスに注射する工程と、

b. 不完全フロイントアジュvant 中における前記ケモカインのカクテルを前記マウスに注射する工程と、

c. 前記マウスからB細胞を単離する工程と、

50

d. 前記B細胞を骨髄細胞と融合させて、望ましい抗体を分泌する不死ハイブリドーマ細胞を形成する工程と、

e. 前記ハイブリドーマの培養上清から抗体を単離する工程。

【0016】

別の実施形態では、本発明は、前述の方法によって作製される抗体に関する。

【0017】

1つの実施形態では、抗体は、(i)アミノ酸配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21若しくは22、又は(ii)上記(i)のアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも90%、95%、98%若しくは99%同一であるアミノ酸配列から選択される少なくとも1つの可変領域を含んでなる。

10

【0018】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19又は21、及び配列番号2、4、6、10、12、14、16、18、20又は22のアミノ酸配列、並びにこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマに関する。

20

【0019】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19若しくは21、又は配列番号2、4、6、10、12、14、16、18、20若しくは22のアミノ酸配列、及びこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖又は軽鎖の可変領域を含んでなるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマに関する。

20

【0020】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19若しくは21、又は配列番号2、4、6、10、12、14、16、18、20若しくは22のアミノ酸配列、及びこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖又は軽鎖の可変領域を含んでなる抗体に関する。

【0021】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19又は21、及び配列番号2、4、6、10、12、14、16、18、20又は22のアミノ酸配列、並びにこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる抗体に関する。

30

【0022】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0023】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

40

【0024】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号23、24、25、26、27、及び28のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号23、24、25、26、27及び28の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0025】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号23、24、25、26、27及び28のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0026】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号23、24、25、26、27及び28のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

50

【0027】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号23、24、25、26、27、若しくは28、又は(ii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0028】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号25のポリペプチドを含んでなる。

【0029】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号23、24、25、26、27、及び28からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号23、24、25、26、27、及び28に列挙した配列の保存的置換であってもよい。

10

【0030】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号23、24、及び25、並びに配列番号26、27、及び28のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなるか、又は前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号23、24、25、26、27、及び28に列挙した配列の保存的置換であってもよい。

【0031】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はGly33が、Tyr、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はMet34が、Ile、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はSer35が、His、Glu、Asn、Gln、Try若しくはThrに置換されている配列番号23記載のCDRH1又は配列番号23の変異体、

ii) Trp50が、Arg、Glu、Tyr、Gly、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はAsn52が、Asp、Leu、Ser若しくはTyrに置換されている及び/又はTyr53が、Ala、Gly、Ser、Lys、Thr若しくはAsnに置換されている及び/又はSer54が、Asn、Thr、Lys、Asp若しくはGlyに置換されている及び/又はVal56が、Tyr、Arg、Glu、Asp、Gly、Ser若しくはAlaに置換されている及び/又是Thr58が、Lys、Asn、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号24記載のCDRH2又は配列番号24の変異体、

iii) Val102が、Tyr、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号25記載のCDRH3又は配列番号25の変異体、

iv) Asn28が、Ser、Asp、Thr若しくはGluに置換されている及び/又是Ile29が、Valに置換されている及び/又是Tyr30が、Asp、Leu、Val、Ile、Ser、Asn、Phe、His、Gly若しくはThrに置換されている及び/又是Ser31が、Asn、Thr、Lys若しくはGlyに置換されている及び/又是Asn32が、Phe、Tyr、Ala、His、Ser若しくはArgに置換されている及び/又是Leu33が、Met、Val、Ile若しくはPheに置換されている及び/又是Ala34が、Gly、Asn、Ser、His、Val若しく是Pheに置換されている配列番号26記載のCDRL1又は配列番号26の変異体、

v) Ala51が、Thr、Gly又是Valに置換されている配列番号27記載のCDRL2又は配列番号27の変異体、並びに

vi) Gln89が、Ser、Gly、Phe若しくはLeuに置換されている及び/又是His90が、Gln若しくはAsnに置換されており、Phe91が、Asn、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Tyr又是Valに置換されている及び/又是Trp92が、Asn、Tyr、Thr、Ser、Arg、Gln、His、Ala若しく是Aspに置換されている及び/又是Thr93が、Glu、Asn、Gly、His、Ser、Arg若しく是Alaに置換されている及び/又是Thr94が、A

20

30

40

50

s p、T y r、V a l、L e u、H i s、A s n、I l e、T r p、P r o若しくはS e rに置換されている及び／又はT r p 9 6が、P r o、L e u、T y r、A r g、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号2 8記載のC D R L 3又は配列番号2 8の変異体。

【0 0 3 2】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号2 3記載のC D R H 1、

i i) 配列番号2 4記載のC D R H 2、

i i i) 配列番号2 5記載のC D R H 3、

i v) 配列番号2 6記載のC D R L 1、

v) 配列番号2 7記載のC D R L 2、

v i) 配列番号2 8記載のC D R L 3、

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置2 V a l、I l e又はG l y

位置4 L e u又はV a l

位置2 0 L e u、I l e、M e t又はV a l

位置2 2 C y s

位置2 4 T h r、A l a、V a l、G l y又はS e r

位置2 6 G l y

位置2 9 I l e、P h e、L e u又はS e r

位置3 6 T r p

位置4 7 T r p又はT y r

位置4 8 I l e、M e t、V a l又はL e u

位置6 9 I l e、L e u、P h e、M e t又はV a l

位置7 1 V a l、A l a又はL e u

位置7 8 A l a、L e u、V a l、T y r又はP h e

位置8 0 L e u又はM e t、

位置9 0 T y r又はP h e

位置9 2 C y s

位置9 4 A r g、L y s、G l y、S e r、H i s又はA s n、及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置2 I l e、L e u又はV a l

位置3 V a l、G l n、L e u又はG l u

位置4 M e t又はL e u

位置2 3 C y s

位置3 5 T r p

位置3 6 T y r、L e u又はP h e

位置4 6 L e u、A r g又はV a l

位置4 9 T y r、H i s、P h e又はL y s

位置7 1 T y r又はP h e

位置8 8 C y s

位置9 8 P h e。

【0 0 3 3】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号2 5記載のC D R H 3、

i i) 配列番号2 3記載のC D R H 1、

i i i) 配列番号2 4記載のC D R H 2、

i v) 配列番号2 6記載のC D R L 1、

v) 配列番号2 7記載のC D R L 2、

v i) 配列番号2 8記載のC D R L 3、

10

20

30

40

50

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク :

位置 2 I l e
 位置 4 L e u
 位置 2 0 I l e
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 P h e
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 M e t
 位置 6 9 P h e
 位置 7 1 L e u
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 L e u
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g 、及び

10

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク :

位置 2 I l e
 位置 3 G l n
 位置 4 M e t
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r
 位置 4 6 L e u
 位置 4 9 T y r
 位置 7 1 T y r
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

20

30

【0034】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号23、24、及び25、又は配列番号23、24、及び25のCDR配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0035】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号23、24、25、26、27又は28から選択される抗体のCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0036】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号23、24、25、26、27及び28からなる群より選択される抗体の少なくとも4つのCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

40

【0037】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号23、24、及び25のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第1のDNA配列と、配列番号26、27、及び28のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第2のDNA配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(i i) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖

50

が別々の分子として產生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を發現させる工程と、
を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、单一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【0038】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号3及び配列番号4のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0039】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号3及び配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0040】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号29、30、31、32、33、及び34のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号29、30、31、32、33及び34の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0041】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号29、30、31、32、33及び34のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0042】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号29、30、31、32、33及び34のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0043】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号29、30、31、32、33、若しくは34、又は(ii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0044】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号31のポリペプチドを含んでなる。

【0045】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号29、30、31、32、33、及び34からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号29、30、31、32、33及び34に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0046】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号29、30、及び31、並びに配列番号32、33、及び34のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号29、30、31、32、33及び34に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0047】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はTrp33が、Gly、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はMet34が、Ile、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はAsn35が、His、Glu、Ser、Gln、Trp若しくはThrに置換されている配列番号29記載のCDRH1又は配列番号29の変異体、

ii) Asp50が、Arg、Glu、Trp、Tyr、Gly、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はVal51が、Leu、Ile、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はAsn52が、A

10

20

30

40

50

s p、L e u、S e r若しくはT y rに置換されている及び／又はA s p 5 3が、A l a、G l y、T r y、S e r、L y s、T h r若しくはA s nに置換されている及び／又はA s p 5 4が、A s n、T h r、L y s、S e r若しくはG l yに置換されている及び／又はA s p 5 6が、T y r、A r g、G l u、V a l、G l y、S e r若しくはA l aに置換されている及び／又はT h r 5 8が、L y s、A s n、S e r、A s p、A r g、G l y、P h e若しくはT y rに置換されている配列番号3 0記載のC D R H 2又は配列番号3 0の変異体、

i i i) V a l 1 0 2が、T y r、H i s、I l e、S e r、A s p又はG l yに置換されている配列番号3 1記載のC D R H 3又は配列番号3 2の変異体、

i v) A s p 2 8が、S e r、A s n、T h r若しくはG l uに置換されている及び／又はI l e 2 9が、V a lに置換されている及び／又はA r g 3 0が、T r y、A s p、L e u、V a l、I l e、S e r、A s n、P h e、H i s、G l y若しくはT h rに置換されている及び／又はA s n 3 1が、S e r、T h r、L y s若しくはG l yに置換されている及び／又是T r y 3 2が、P h e、A s n、A l a、H i s、S e r若しくはA r gに置換されている及び／又是L e u 3 3が、M e t、V a l、I l e若しくはP h eに置換されている及び／又是A s n 3 4が、A l a、A s n、S e r、H i s、V a l若しくはP h eに置換されている配列番号3 2記載のC D R L 1又は配列番号3 2の変異体、

v) T h r 5 1が、A l a、G l y又はV a lに置換されている配列番号3 3記載のC D R L 2又は配列番号3 3の変異体、並びに

v i) G l n 8 9が、S e r、G l y、P h e若しくはL e uに置換されている及び／又是G l n 9 0が、H i s若しくはA s nに置換されており、A l a 9 1が、A s n、P h e、G l y、S e r、A r g、A s p、H i s、T h r、T y r又はV a lに置換されている及び／又是A s n 9 2が、T r p、T y r、T h r、S e r、A r g、G l n、H i s、A l a若しくはA s pに置換されている及び／又是T h r 9 3が、G l u、A s n、G l y、H i s、S e r、A r g若しくはA l aに置換されている及び／又是L e u 9 4が、A s p、T y r、V a l、T h r、H i s、A s n、I l e、T r p、P r o若しくはS e rに置換されている及び／又是T r p 9 6が、P r o、L e u、T y r、A r g、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号3 4記載のC D R L 3又は配列番号3 4の変異体。

【0 0 4 8】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号2 9記載のC D R H 1、

i i) 配列番号3 0記載のC D R H 2、

i i i) 配列番号3 1記載のC D R H 3、

i v) 配列番号3 2記載のC D R L 1、

v) 配列番号3 3記載のC D R L 2、

v i) 配列番号3 4記載のC D R L 3、

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置2 V a l、I l e又はG l y

位置4 L e u又はV a l

位置2 0 L e u、I l e、M e t又はV a l

位置2 2 C y s

位置2 4 T h r、A l a、V a l、G l y又はS e r

位置2 6 G l y

位置2 9 I l e、P h e、L e u又はS e r

位置3 6 T r p

位置4 7 T r p又はT y r

位置4 8 I l e、M e t、V a l又はL e u

位置6 9 I l e、L e u、P h e、M e t又はV a l

10

20

30

40

50

位置 7 1 V a l、A l a 又は L e u
 位置 7 8 A l a、L e u、V a l、T y r 又は P h e
 位置 8 0 L e u 又は M e t、
 位置 9 0 T y r 又は P h e
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g、L y s、G l y、S e r、H i s 又は A s n、及び
 v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：
 位置 2 I l e、L e u 又は V a l
 位置 3 V a l、G l n、L e u 又は G l u
 位置 4 M e t 又は L e u
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r、L e u 又は P h e
 位置 4 6 L e u、A r g 又は V a l
 位置 4 9 T y r、H i s、P h e 又は L y s
 位置 7 1 T y r 又は P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e。
 10

【 0 0 4 9 】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：
 20

i) 配列番号 3 1 記載の C D R H 3、
 i i) 配列番号 2 9 記載の C D R H 1、
 i i i) 配列番号 3 0 記載の C D R H 2、
 i v) 配列番号 3 2 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 3 3 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 3 4 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 V a l
 位置 4 L e u
 位置 2 0 I l e
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 P h e
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 I l e
 位置 6 9 L e u
 位置 7 1 V a l
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 M e t
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g、及び
 v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：
 30
 位置 2 I l e
 位置 3 G l n
 位置 4 M e t
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 40
 50

位置 3 6 P h e
 位置 4 6 L e u
 位置 4 9 T y r
 位置 7 1 T y r
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e。

【0050】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号29、30、及び31、又は配列番号32、33、及び34のCDR配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。 10

【0051】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号29、30、31、32、33又は34から選択される抗体のCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0052】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号29、30、31、32、33及び34からなる群より選択される抗体の少なくとも4つのCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0053】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、 20

(i) 配列番号29、30、及び31のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第1のDNA配列と、配列番号32、33、及び34のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第2のDNA配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(ii) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。 30

【0054】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号5及び配列番号6のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0055】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号5及び配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0056】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号35、36、37、38、39、及び40のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号35、36、37、38、39及び40の配列の保存的配列修飾であってもよい。 40

【0057】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号35、36、37、38、39及び40のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0058】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号35、36、37、38、39及び40のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0059】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号35、36、37、38、39、若しくは40、又は(ii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0060】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号37のポリペプチドを含んでなる。

【0061】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号35、36、37、38、39、及び40からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号35、36、37、38、39及び40に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

10

【0062】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号35、36、及び37、並びに配列番号38、39、及び40のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号35、36、37、38、39及び40に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0063】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Asn32が、Ile、His、Phe、Thr、Tyr、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はAsp33が、Trp、Ala、Trp、Gly、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はIle34が、Met、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はAsn35が、His、Glu、Ser、Gln、Tyr若しくはThrに置換されている配列番号35記載のCDRH1又は配列番号35の変異体、

ii) Trp50が、Arg、Glu、Tyr、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はPhe52が、Asp、Leu、Asn、Ser若しくはTyrに置換されている及び/又はGly53が、Ala、Tyr、Ser、Lys、Thr若しくはAsnに置換されている及び/又はAsp54が、Asn、Thr、Lys、Ser若しくはGlyに置換されている及び/又是Ser56が、Tyr、Arg、Glu、Asp、Val、Ser若しくはAlaに置換されている及び/又是Lys58が、Thr、Asn、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号36記載のCDRH2又は配列番号36の変異体、

iii) Try102が、Val、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号37記載のCDRH3又は配列番号37の変異体、

iv) Asp28が、Ser、Asn、Thr若しくはGluに置換されている及び/又是Val29が、Ileに置換されている及び/又是Gly30が、Asp、Leu、Val、Ile、Ser、Asn、Phe、His、Tyr若しくはThrに置換されている及び/又是Thr31が、Asn、Ser、Lys若しくはGlyに置換されている及び/又是Ala32が、Phe、Tyr、Asn、His、Ser若しくはArgに置換されている及び/又是Val33が、Met、Leu、Ile若しくはPheに置換されている及び/又是Ala34が、Gly、Asn、Ser、His、Val若しく是Pheに置換されている配列番号38記載のCDRL1又は配列番号38の変異体、

v) Thr51が、Ala、Gly又是Valに置換されている配列番号39記載のCDRL2又は配列番号39の変異体、並びに

vi) His89が、Gln、Ser、Gly、Phe若しくはLeuに置換されている及び/又是Gln90が、His若しくはAsnに置換されており、Tyr91が、Asn、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Phe又是Valに置換されている及び/又是Asn92が、Trp、Tyr、Thr、Ser、Arg、Gln、His、Ala若しくはAspに置換されている及び/又是Asn93が、Glu、Thr

20

30

40

50

、 G l y 、 H i s 、 S e r 、 A r g 若しくは A l a に置換されている及び / 又は T y r 9 4 が、 A s p 、 T h r 、 V a l 、 L e u 、 H i s 、 A s n 、 I l e 、 T r p 、 P r o 若しくは S e r に置換されている及び / 又は L e u 9 6 が、 P r o 、 T r p 、 T y r 、 A r g 、 I l e 若しくは P h e に置換されている配列番号 4 0 記載の C D R L 3 又は配列番号 4 0 の変異体。

【 0 0 6 4 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号 3 5 記載の C D R H 1 、

i i) 配列番号 3 6 記載の C D R H 2 、

i i i) 配列番号 3 7 記載の C D R H 3 、

i v) 配列番号 3 8 記載の C D R L 1 、

v) 配列番号 3 9 記載の C D R L 2 、

v i) 配列番号 4 0 記載の C D R L 3 、及び

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 V a l 、 I l e 又は G l y

位置 4 L e u 又は V a l

位置 2 0 L e u 、 I l e 、 M e t 又は V a l

位置 2 2 C y s

位置 2 4 T h r 、 A l a 、 V a l 、 G l y 又は S e r

位置 2 6 G l y

位置 2 9 I l e 、 P h e 、 L e u 又は S e r

位置 3 6 T r p

位置 4 7 T r p 又は T y r

位置 4 8 I l e 、 M e t 、 V a l 又は L e u

位置 6 9 I l e 、 L e u 、 P h e 、 M e t 又は V a l

位置 7 1 T h r 、 V a l 、 A l a 又は L e u

位置 7 8 A l a 、 L e u 、 V a l 、 T y r 又は P h e

位置 8 0 L e u 又は M e t 、

位置 9 0 T y r 又は P h e

位置 9 2 C y s

位置 9 4 T h r 、 A r g 、 L y s 、 G l y 、 S e r 、 H i s 又は A s n 、

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置 2 I l e 、 L e u 又は V a l

位置 3 V a l 、 G l n 、 L e u 又は G l u

位置 4 M e t 又は L e u

位置 2 3 C y s

位置 3 5 T r p

位置 3 6 T y r 、 L e u 又は P h e

位置 4 6 L e u 、 A r g 又は V a l

位置 4 9 T y r 、 H i s 、 P h e 又は L y s

位置 7 1 T y r 又は P h e

位置 8 8 C y s

位置 9 8 P h e 。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号 3 7 記載の C D R H 3 、

i i) 配列番号 3 5 記載の C D R H 1 、

i i i) 配列番号 3 6 記載の C D R H 2 、

i v) 配列番号 3 8 記載の C D R L 1 、

v) 配列番号 3 9 記載の C D R L 2 、

v i) 配列番号 4 0 記載の C D R L 3 、

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク :

位置 2 V a l

位置 4 L e u

位置 2 0 L e u

位置 2 2 C y s

位置 2 4 A l a

位置 2 6 G l y

位置 2 9 P h e

位置 3 6 T r p

位置 4 7 T r p

位置 4 8 I l e

位置 6 9 L e u

位置 7 1 T h r

位置 7 8 A l a

位置 8 0 M e t

位置 9 0 T y r

位置 9 2 C y s

位置 9 4 T h r 、 及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク :

位置 2 I l e

位置 3 V a l

位置 4 M e t

位置 2 3 C y s

位置 3 5 T r p

位置 3 6 T y r

位置 4 6 L e u

位置 4 9 T y r

位置 7 1 P h e

位置 8 8 C y s

位置 9 8 P h e 。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

1 つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 3 5 、 3 6 、 及び 3 7 、 又は配列番号 3 8 、 3 9 、 及び 4 0 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 0 6 7 】

1 つの実施形態では、本発明は、配列番号 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 又は 4 0 から選択される抗体の C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 0 6 8 】

1 つの実施形態では、本発明は、配列番号 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 及び 4 0 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 0 6 9 】

1 つの実施形態では、本発明は、单一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号 3 5 、 3 6 、 及び 3 7 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 1 の D N A 配列と、配列番号 3 8 、 3 9 、 及び 4 0 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 2 の D N A 配列とにより前記单一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(i i) 前記形質転換された单一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として産生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、单一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【0070】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号7及び配列番号8のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

10

【0071】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号7及び配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0072】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号41、42、43、44、45、及び46のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号41、42、43、44、45及び46の配列の保存的配列修飾であってもよい。

20

【0073】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号41、42、43、44、45及び46のCDR配列を含んでなる抗体を産生するハイブリドーマに関する。

【0074】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号41、42、43、44、45及び46のCDR配列を含んでなる抗体を産生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0075】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号41、42、43、44、45、若しくは46、又は(i i)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0076】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号43のポリペプチドを含んでなる。

30

【0077】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号41、42、43、44、45、及び46からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号41、42、43、44、45及び46に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0078】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号41、42、及び43、並びに配列番号44、45、及び46のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号41、42、43、44、45及び46に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

40

【0079】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はAsn33が、Gly、Tyr、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はIle34が、Met、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はHis35が、Ser、Glu、Asn、Gln、Try若しくはThrに置換されている配列番号41記載のCDRH1又は配列番号41の変異体、

i i) Try50が、Arg、Glu、Trp、Gly、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val

50

、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び／又はAsn52が、Asp、Leu、Ser若しくはTyrに置換されている及び／又はAsn53が、Ala、Gly、Ser、Lys、Thr若しくはTyrに置換されている及び／又はSer54が、Asn、Thr、Lys、Asp若しくはGlyに置換されている及び／又はGly56が、Tyr、Arg、Glu、Asp、Val、Ser若しくはAlaに置換されている及び／又是Gly58が、Lys、Asn、Ser、Asp、Arg、Thr、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号42記載のCDRH2又は配列番号42の変異体、
i i i) Phe102が、Val、Tyr、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号43記載のCDRH3又は配列番号43の変異体、

i v) Ser25が、Proに置換されている及び／又はThr26が、Ser若しくはAsnに置換されている及び／又是Ser27Aが、SNDTE Asn、Asp、Thr若しくはGluに置換されている及び／又是Ile27Bが、Leuに置換されている及び／又是Val27Cが、Asp、Leu、Tyr、Ile、Ser、Asn、Phe、His、Gly若しくはThrに置換されている及び／又是Pro27Dが、His若しく是Leuに置換されている及び／又是Asn28が、Asp若しく是Serに置換されている及び／又是Thr31が、Ser、Asn、Lys若しく是Glyに置換されている及び／又是His32が、Phe、Tyr、Asn、Ala、Ser若しく是Argに置換されている及び／又是Leu33が、Met、Val、Ile若しく是Pheに置換されている及び／又是Glu34が、His若しく是Asnに置換されている配列番号44記載のCDRL1又は配列番号44の変異体、並びに

v) Phe89が、Ser、Gly、Gln若しく是Leuに置換されている及び／又是Gln90が、His若しく是Asnに置換されており、Ala91が、Phe、Asn、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Tyr又是Valに置換されている及び／又是Ser92が、Asn、Tyr、Thr、Trp、Arg、Gln、His、Ala若しく是Aspに置換されている及び／又是His93が、Glu、Asn、Gly、Thr、Ser、Arg若しく是Alaに置換されている及び／又是Val94が、Asp、Tyr、Thr、Leu、His、Asn、Ile、Trp、Pro若しく是Serに置換されている及び／又是Trp96が、Pro、Leu、Tyr、Arg、Ile若しく是Pheに置換されている配列番号46記載のCDRL3又は配列番号46の変異体。

【0080】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

- i) 配列番号41記載のCDRH1、
- i i) 配列番号42記載のCDRH2、
- i i i) 配列番号43記載のCDRH3、
- i v) 配列番号44記載のCDRL1、
- v) 配列番号45記載のCDRL2、
- v i) 配列番号46記載のCDRL3、
- v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置2 Val、Ile又はGly

位置4 Leu又はVal

位置20 Leu、Ile、Met又はVal

位置22 Cys

位置24 Thr、Ala、Val、Gly又はSer

位置26 Gly

位置29 Val、Ile、Phe、Leu又はSer

位置36 Trp

位置47 Trp又はTyr

位置48 Ile、Met、Val又はLeu

位置69 Ile、Leu、Phe、Met又はVal

10

20

30

40

50

位置 7 1 I l e 、 V a l 、 A l a 又は L e u
 位置 7 8 A l a 、 L e u 、 V a l 、 T y r 又は P h e
 位置 8 0 L e u 又は M e t
 位置 9 0 T y r 又は P h e
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g 、 L y s 、 G l y 、 S e r 、 H i s 又は A s n 、 及び
 v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：
 位置 2 I l e 、 L e u 又は V a l
 位置 3 V a l 、 G l n 、 L e u 又は G l u
 位置 4 M e t 又は L e u
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 7 1 P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号 4 3 記載の C D R H 3 、
 i i) 配列番号 4 1 記載の C D R H 1 、
 i i i) 配列番号 4 2 記載の C D R H 2 、
 i v) 配列番号 4 4 記載の C D R L 1 、
 v) 配列番号 4 5 記載の C D R L 2 、
 v i) 配列番号 4 6 記載の C D R L 3 、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 V a l
 位置 4 L e u
 位置 2 0 M e t
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 V a l
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 I l e
 位置 6 9 L e u
 位置 7 1 I l e
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 M e t
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g 、 及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置 2 V a l
 位置 3 L e u
 位置 4 M e t
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 7 1 P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

【0082】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号41、42、及び43、又は配列番号44、45、及び46のCDR配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0083】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号41、42、43、44、45又は46から選択される抗体のCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0084】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号41、42、43、44、45及び46からなる群より選択される抗体の少なくとも4つのCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

10

【0085】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号41、42、及び43のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第1のDNA配列と、配列番号44、45、及び46のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第2のDNA配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

20

(ii) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【0086】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号9及び配列番号10のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

30

【0087】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号9及び配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0088】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号47、48、49、50、51、及び52のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号47、48、49、50、51及び52の配列の保存的配列修飾であってもよい。

40

【0089】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号47、48、49、50、51及び52のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0090】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号47、48、49、50、51及び52のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

40

【0091】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号47、48、49、50、51、若しくは52、又は(iii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0092】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号49のポリペプチドを含んでなる。

50

【0093】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号47、48、49、50、51、及び52からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号47、48、49、50、51及び52に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0094】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号47、48、及び49、並びに配列番号50、51、及び52のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号47、48、49、50、51及び52に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0095】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はTrp33が、Gly、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はMet34が、Ile、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はAsn35が、His、Glu、Ser、Gln、Trp若しくはThrに置換されている配列番号47記載のCDRH1又は配列番号47の変異体、

ii) Asp50が、Trp、Arg、Glu、Tyr、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はAsn52が、Asp、Leu、Ser若しくはTyrに置換されている及び/又はAsn53が、Ala、Gly、Ser、Lys、Thr若しくはTyrに置換されている及び/又はAsn54が、Ser、Thr、Lys、Asp若しくはGlyに置換されている及び/又はAsn56が、Val、Tyr、Arg、Glu、Asp、Gly、Ser若しくはAlaに置換されている及び/又はAsn58が、Lys、Thr、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号48記載のCDRH2又は配列番号48の変異体、

iii) Try102が、Val、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号49記載のCDRH3又は配列番号49の変異体、

iv) Ser27Aが、Asn、Asp、Thr若しくはGluに置換されている及び/又是Ser29が、Asp、Leu、Val、Ile、Tyr、Asn、Phe、His、Gly若しくはThrに置換されている及び/又是Thr31が、Asn、Ser、Lys若しくはGlyに置換されている及び/又是Phe32が、Asn、Tyr、Ala、His、Ser若しくはArgに置換されている及び/又是Leu33が、Met、Val、Ile若しくはPheに置換されている配列番号50記載のCDRL1又は配列番号50の変異体、並びに

v) Gln89が、Ser、Gly、Phe若しくはLeuに置換されている及び/又是Gln90が、His若しくはAsnに置換されており、Tyr91が、Asn、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Phe又是Valに置換されている及び/又是Ser92が、Asn、Tyr、Thr、Trp、Arg、Gln、His、Ala若しくはAspに置換されている及び/又是Gly93が、Glu、Asn、Thr、His、Ser、Arg若しくはAlaに置換されている及び/又是Tyr94が、Asp、Thr、Val、Leu、His、Asn、Ile、Trp、Pro若しく是Serに置換されている及び/又是Trp96が、Pro、Leu、Tyr、Arg、Ile若しく是Pheに置換されている配列番号52記載のCDRL3又は配列番号52の変異体。

【0096】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号47記載のCDRH1、

ii) 配列番号48記載のCDRH2、

10

20

30

40

50

i i i) 配列番号 4 9 記載の C D R H 3、
 i v) 配列番号 5 0 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 5 1 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 5 2 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：
 位置 2 V a l、I l e 又は G l y
 位置 4 L e u 又は V a l
 位置 2 0 L e u、I l e、M e t 又は V a l
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 T h r、A l a、V a l、G l y 又は S e r
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 I l e、P h e、L e u 又は S e r
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p 又は T y r
 位置 4 8 I l e、M e t、V a l 又は L e u
 位置 6 9 I l e、L e u、P h e、M e t 又は V a l
 位置 7 1 V a l、A l a 又は L e u
 位置 7 8 A l a、L e u、V a l、T y r 又は P h e
 位置 8 0 L e u 又は M e t、
 位置 9 0 T y r 又は P h e
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g、L y s、G l y、S e r、H i s 又は A s n、及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：
 位置 2 A s n I l e、L e u 又は V a l
 位置 3 V a l、G l n、L e u 又は G l u
 位置 4 M e t 又は L e u
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 7 1 T y r
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：
 i) 配列番号 4 9 記載の C D R H 3、
 i i) 配列番号 4 7 記載の C D R H 1、
 i i i) 配列番号 4 8 記載の C D R H 2、
 i v) 配列番号 5 0 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 5 1 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 5 2 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 V a l
 位置 4 L e u
 位置 2 0 I l e
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 P h e
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 I l e

位置 6 9 L e u
 位置 7 1 V a l
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 M e t
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 G l y 、 及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク :

位置 2 A s n
 位置 3 V a l
 位置 4 L e u
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 7 1 T y r
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 8 】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 4 7、4 8、及び 4 9、又は配列番号 5 0、5 1、及び 5 2 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 0 9 9 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 4 7、4 8、4 9、5 0、5 1 又は 5 2 から選択される抗体の C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 0 0 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 4 7、4 8、4 9、5 0、5 1 及び 5 2 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 0 1 】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号 4 7、4 8、及び 4 9 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 1 の D N A 配列と、配列番号 5 0、5 1、及び 5 2 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 2 の D N A 配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(i i) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第 1 の D N A 配列及び第 2 の D N A 配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第 1 及び第 2 の D N A 配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第 1 及び第 2 の D N A 配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【 0 1 0 2 】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【 0 1 0 3 】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 8 % 又は 9 9 % 同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【 0 1 0 4 】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号53、54、55、56、57、及び58のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号53、54、55、56、57及び58の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0105】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号53、54、55、56、57及び58のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0106】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号53、54、55、56、57及び58のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0107】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号53、54、55、56、57、若しくは58、又は(ii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0108】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号55のポリペプチドを含んでなる。

【0109】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号53、54、55、56、57、及び58からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号53、54、55、56、57及び58に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

10

20

20

【0110】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号53、54、及び55、並びに配列番号56、57、及び58のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号53、54、55、56、57及び58に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0111】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はTrp33が、Gly、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はMet34が、Ile、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はAsn35が、His、Glu、Ser、Gln、Trp若しくはThrに置換されている配列番号53記載のCDRH1又は配列番号53の変異体、

ii) Asp50が、Trp、Arg、Glu、Tyr、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はAsn52が、Asp、Leu、Ser若しくはTyrに置換されている及び/又はAsn53が、Ala、Gly、Ser、Lys、Thr若しくはTyrに置換されている及び/又はAsn54が、Ser、Thr、Lys、Asp若しくはGlyに置換されている及び/又是Gly56が、Tyr、Arg、Glu、Asp、Val、Ser若しくはAlaに置換されている及び/又是Asn58が、Lys、Thr、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号54記載のCDRH2又は配列番号54の変異体、

iii) Try102が、Val、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号55記載のCDRH3又は配列番号55の変異体、

iv) Ser27Aが、Asn、Asp、Thr若しくはGluに置換されている及び/又是Ser29が、Asp、Leu、Val、Ile、Tyr、Asn、Phe、His、Gly若しくはThrに置換されている及び/又是Thr31が、Asn、Ser、Lys若しくはGlyに置換されている及び/又是Tyr32が、Phe、Asn、Ala、His、Ser若しくはArgに置換されている及び/又是Leu33が、Met、

30

40

40

50

V a l、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号5 6記載のC D R L 1又は配列番号5 6の変異体、並びに

v) G l n 8 9が、S e r、G l y、P h e若しくはL e uに置換されている及び／又はG l n 9 0が、H i s若しくはA s nに置換されており、P h e 9 1が、A s n、G l y、S e r、A r g、A s p、H i s、T h r、T y r又はV a lに置換されている及び／又はS e r 9 2が、A s n、T y r、T h r、T r p、A r g、G l n、H i s、A l a若しくはA s pに置換されている及び／又はG l y 9 3が、G l u、A s n、T h r、H i s、S e r、A r g若しくはA l aに置換されている及び／又はT y r 9 4が、A s p、T h r、V a l、L e u、H i s、A s n、I l e、T r p、P r o若しくはS e rに置換されている及び／又はT r p 9 6が、P r o、L e u、T y r、A r g、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号5 8記載のC D R L 3又は配列番号5 8の変異体。

10

【0 1 1 2】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

- i) 配列番号5 3記載のC D R H 1、
- i i) 配列番号5 4記載のC D R H 2、
- i i i) 配列番号5 5記載のC D R H 3、
- i v) 配列番号5 6記載のC D R L 1、
- v) 配列番号5 7記載のC D R L 2、
- v i) 配列番号5 8記載のC D R L 3、

20

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

- 位置2 V a l、I l e又はG l y
- 位置4 L e u又はV a l
- 位置2 0 L e u、I l e、M e t又はV a l
- 位置2 2 C y s
- 位置2 4 T h r、A l a、V a l、G l y又はS e r
- 位置2 6 G l y
- 位置2 9 I l e、P h e、L e u又はS e r
- 位置3 6 T r p
- 位置4 7 T r p又はT y r
- 位置4 8 I l e、M e t、V a l又はL e u
- 位置6 9 I l e、L e u、P h e、M e t又はV a l
- 位置7 1 V a l、A l a又はL e u
- 位置7 8 A l a、L e u、V a l、T y r又はP h e
- 位置8 0 L e u又はM e t、
- 位置9 0 T y r又はP h e
- 位置9 2 C y s
- 位置9 4 A r g、L y s、G l y、S e r、H i s又はA s n、及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

- 位置2 A s n I l e、L e u又はV a l
- 位置3 V a l、G l n、L e u又はG l u
- 位置4 M e t又はL e u
- 位置2 3 C y s
- 位置3 5 T r p
- 位置7 1 T y r
- 位置8 8 C y s
- 位置9 8 P h e。

30

【0 1 1 3】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

- i) 配列番号5 5記載のC D R H 3、

50

i i) 配列番号 5 3 記載の C D R H 1、
 i i i) 配列番号 5 4 記載の C D R H 2、
 i v) 配列番号 5 6 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 5 7 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 5 8 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 V a l

位置 4 L e u

位置 2 0 I l e

位置 2 2 C y s

位置 2 4 A l a

位置 2 6 G l y

位置 2 9 P h e

位置 3 6 T r p

位置 4 7 T r p

位置 4 8 I l e

位置 6 9 L e u

位置 7 1 V a l

位置 7 8 A l a

位置 8 0 M e t

位置 9 0 P h e

位置 9 2 C y s

位置 9 4 G l y

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置 2 A s n

位置 3 V a l

位置 4 L e u

位置 2 3 C y s

位置 3 5 T r p

位置 7 1 T y r

位置 8 8 C y s

位置 9 8 P h e。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 4 】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 5 3、5 4、及び 5 5、又は配列番号 5 6、5 7、及び 5 8 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 1 5 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 5 3、5 4、5 5、5 6、5 7 又は 5 8 から選択される抗体の C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 1 6 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 5 3、5 4、5 5、5 6、5 7 及び 5 8 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 1 7 】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

（ i ）配列番号 5 3、5 4、及び 5 5 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 1 の D N A 配列と、配列番号 5 6、5 7、及び 5 8 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコ

ードする第2のDNA配列とにより前記单一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(i i) 前記形質転換された单一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として産生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、单一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【0118】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号13及び配列番号14のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を有する。

【0119】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号13及び配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを有する重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0120】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号59、60、61、62、63、及び64のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号59、60、61、62、63及び64の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0121】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号59、60、61、62、63及び64のCDR配列を含んでなる抗体を産生するハイブリドーマに関する。

【0122】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号59、60、61、62、63及び64のCDR配列を含んでなる抗体を産生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0123】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号59、60、61、62、63、若しくは64、又は(i i)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0124】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号61のポリペプチドを含んでなる。

【0125】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号59、60、61、62、63、及び64からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号59、60、61、62、63及び64に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0126】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号59、60、及び61、並びに配列番号62、63、及び64のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号59、60、61、62、63及び64に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0127】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はTrp33が、Tyr、Ala、Gly、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はMet34が、Ile、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はHis35が、Ser、Glu、Asn、Gln、Try若しくはThrに置換されている配列番号59記載のCDRH1又は配列番号59の変異体、

i i) Arg50が、Trp、Glu、Tyr、Gly、Gln、Val、Leu、A

10

20

30

40

50

s n、L y s若しくはA l aに置換されている及び／又はI l e 5 1が、L e u、V a l、T h r、S e r若しくはA s nに置換されている及び／又はH i s 5 2が、A s n、A s p、L e u、S e r若しくはT y rに置換されている及び／又はS e r 5 3が、A l a、G l y、T r y、L y s、T h r若しくはA s nに置換されている及び／又はA s p 5 4が、A s n、T h r、L y s、S e r若しくはG l yに置換されている及び／又はA s p 5 6が、T y r、A r g、G l u、V a l、G l y、S e r若しくはA l aに置換されている及び／又はA s n 5 8が、L y s、T h r、S e r、A s p、A r g、G l y、P h e若しくはT y rに置換されている配列番号6 0記載のC D R H 2又は配列番号6 0の変異体。

i i i) L e u 1 0 2が、V a l、T y r、H i s、I l e、S e r、A s p又はG l yに置換されている配列番号6 1記載のC D R H 3又は配列番号6 1の変異体。 10

i v) T h r 2 8が、S e r、A s p、A s n若しくはG l uに置換されている及び／又はI l e 2 9が、V a lに置換されている及び／又はG l y 3 0が、A s p、L e u、V a l、I l e、S e r、A s n、P h e、H i s、T y r若しくはT h rに置換されている及び／又はT h r 3 1が、A s n、S e r、L y s若しくはG l yに置換されている及び／又はT r p 3 2が、A s n、P h e、T y r、A l a、H i s、S e r若しくはA r gに置換されている及び／又はL e u 3 3が、M e t、V a l、I l e若しくはP h eに置換されている及び／又はA l a 3 4が、G l y、A s n、S e r、H i s、V a l若しくはP h eに置換されている配列番号6 2記載のC D R L 1又は配列番号6 2の変異体。 20

v) A l a 5 1が、T h r、G l y又はV a lに置換されている配列番号6 3記載のC D R L 2又は配列番号6 3の変異体、並びに

v i) G l n 8 9が、S e r、G l y、P h e若しくはL e uに置換されている及び／又はG l n 9 0が、H i s若しくはA s nに置換されており、L e u 9 1が、P h e、A s n、G l y、S e r、A r g、A s p、H i s、T h r、T y r又はV a lに置換されている及び／又はS e r 9 2が、A s n、T y r、T h r、T r p、A r g、G l n、H i s、A l a若しくはA s pに置換されている及び／又はS e r 9 3が、G l u、A s n、G l y、H i s、T h r、A r g若しくはA l aに置換されている及び／又はT h r 9 4が、A s p、T y r、V a l、L e u、H i s、A s n、I l e、T r p、P r o若しくはS e rに置換されている及び／又はT r p 9 6が、P r o、L e u、T y r、A r g、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号6 4記載のC D R L 3又は配列番号6 4の変異体。 30

【0 1 2 8】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号5 9記載のC D R H 1、

i i) 配列番号6 0記載のC D R H 2、

i i i) 配列番号6 1記載のC D R H 3、

i v) 配列番号6 2記載のC D R L 1、

v) 配列番号6 3記載のC D R L 2、

v i) 配列番号6 4記載のC D R L 3、

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置2 V a l、I l e又はG l y

位置4 L e u又はV a l

位置2 0 L e u、I l e、M e t又はV a l

位置2 2 C y s

位置2 4 T h r、A l a、V a l、G l y又はS e r

位置2 6 G l y

位置2 9 I l e、P h e、L e u又はS e r

位置3 6 T r p

位置4 7 T r p又はT y r

40

50

位置 4 8 I l e、M e t、V a l 又はL e u
 位置 6 9 I l e、L e u、P h e、M e t 又はV a l
 位置 7 1 V a l、A l a 又はL e u
 位置 7 8 A l a、L e u、V a l、T y r 又はP h e
 位置 8 0 L e u 又はM e t、
 位置 9 0 T y r 又はP h e
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 I l e、A r g、L y s、G l y、S e r、H i s 又はA s n、及び
 v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク : 10
 位置 2 I l e、L e u 又はV a l
 位置 3 V a l、G l n、L e u 又はG l u
 位置 4 M e t 又はL e u
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r、L e u 又はP h e
 位置 4 6 L e u、A r g 又はV a l
 位置 4 9 T y r、H i s、P h e 又はL y s
 位置 7 1 T y r 又はP h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e。 20

【 0 1 2 9 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる :
 i) 配列番号 6 1 記載の C D R H 3、
 i i) 配列番号 5 9 記載の C D R H 1、
 i i i) 配列番号 6 0 記載の C D R H 2、
 i v) 配列番号 6 2 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 6 3 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 6 4 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク : 30

位置 2 V a l
 位置 4 L e u
 位置 2 0 V a l
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 P h e
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 I l e
 位置 6 9 L e u
 位置 7 1 V a l
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 M e t
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 I l e、及び 40
 v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク :
 位置 2 I l e
 位置 3 G l n
 位置 4 M e t 50

位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r
 位置 4 6 L e u
 位置 4 9 T y r
 位置 7 1 P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e。

【0130】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 59、60、及び 61、又は配列番号 62、63、及び 64 の CDR 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。 10

【0131】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 59、60、61、62、63 又は 64 から選択される抗体の CDR 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。 20

【0132】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 59、60、61、62、63 及び 64 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの CDR 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。 20

【0133】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号 59、60、及び 61 の CDR ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 1 の DNA 配列と、配列番号 62、63、及び 64 の CDR ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 2 の DNA 配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(ii) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第 1 の DNA 配列及び第 2 の DNA 配列を発現させる工程と、 30

を含み、

更に、前記第 1 及び第 2 の DNA 配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第 1 及び第 2 の DNA 配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【0134】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 15 及び配列番号 16 のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0135】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 15 及び配列番号 16 のアミノ酸配列と少なくとも 90%、95%、98% 又は 99% 同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。 40

【0136】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号 65、66、67、68、69、及び 70 の CDR 配列を含んでなるか、又は、前記 CDR 配列のうちの 1 以上は、配列番号 65、66、67、68、69 及び 70 の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0137】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 65、66、67、68、69 又は 70 の CDR 配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0138】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 65、66、67、68、69 及び 70 の C

50

D R 配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【 0 1 3 9 】

1つの実施形態では、抗体は、(i) 配列番号 6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、若しくは 7 0、又は(i i) (i) に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも 1 つの C D R 配列を含んでなる。

【 0 1 4 0 】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号 6 7 のポリペプチドを含んでなる。

【 0 1 4 1 】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号 6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、及び 7 0 からなる群より選択される少なくとも 4 つの C D R 配列を含んでなるか、又は、前記 C D R 配列のうちの 1 以上は、配列番号 6 5、6 6、6 7、6 8、6 9 及び 7 0 に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

10

【 0 1 4 2 】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 6 5、6 6、及び 6 7、並びに配列番号 6 8、6 9、及び 7 0 の C D R アミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記 C D R 配列のうちの 1 以上は、配列番号 6 5、6 6、6 7、6 8、6 9 及び 7 0 に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【 0 1 4 3 】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) T y r 3 2 が、I l e、H i s、P h e、T h r、A s n、C y s、G l u 若しくは A s p に置換されている及び／又は A s n 3 3 が、G l y、T y r、A l a、T r p、T h r、L e u 若しくは V a l に置換されている及び／又は M e t 3 4 が、I l e、V a l、若しくは T r p に置換されている及び／又は H i s 3 5 が、S e r、G l u、A s n、G l n、T r y 若しくは T h r に置換されている配列番号 6 5 記載の C D R H 1 又は配列番号 6 5 の変異体、

20

i i) A l a 5 0 が、A r g、G l u、T y r、G l y、G l n、V a l、L e u、A s n、L y s 若しくは T r p に置換されている及び／又は I l e 5 1 が、L e u、V a l、T h r、S e r 若しくは A s n に置換されている及び／又は T y r 5 2 が、A s p、L e u、S e r 若しくは A s n に置換されている及び／又は G l y 5 3 が、A l a、T y r、S e r、L y s、T h r 若しくは A s n に置換されている及び／又は A s n 5 4 が、S e r、T h r、L y s、A s p 若しくは G l y に置換されている及び／又は A s p 5 6 が、T y r、A r g、G l u、V a l、G l y、S e r 若しくは A l a に置換されている及び／又は S e r 5 8 が、L y s、A s n、T h r、A s p、A r g、G l y、P h e 若しくは T y r に置換されている配列番号 6 6 記載の C D R H 2 又は配列番号 6 6 の変異体、

30

i i i) T r y 1 0 2 が、V a l、H i s、I l e、S e r、A s p 又は G l y に置換されている配列番号 6 7 記載の C D R H 3 又は配列番号 6 7 の変異体、

i v) S e r 2 7 A が、A s n、A s p、T h r 若しくは G l u に置換されている及び／又は S e r 3 0 が、A s p、L e u、V a l、I l e、T y r、A s n、P h e、H i s、G l y 若しくは T h r に置換されている及び／又は T h r 3 1 が、A s n、S e r、L y s 若しくは G l y に置換されている及び／又は T y r 3 2 が、P h e、A s n、A l a、H i s、S e r 若しくは A r g に置換されている及び／又は L e u 3 3 が、M e t、V a l、I l e 若しくは P h e に置換されている配列番号 6 8 記載の C D R L 1 又は配列番号 6 8 の変異体、並びに

40

v) G l n 8 9 が、S e r、G l y、P h e 若しくは L e u に置換されている及び／又は G l n 9 0 が、H i s 若しくは A s n に置換されており、P h e 9 1 が、A s n、G l y、S e r、A r g、A s p、H i s、T h r、T y r 又は V a l に置換されている及び／又は S e r 9 2 が、A s n、T y r、T h r、T r p、A r g、G l n、H i s、A l a 若しくは A s p に置換されている及び／又は G l y 9 3 が、G l u、A s n、T h r、H i s、S e r、A r g 若しくは A l a に置換されている及び／又は T y r 9 4 が、A s p、T h r、V a l、L e u、H i s、A s n、I l e、T r p、P r o 若しくは S e r

50

に置換されている及び／又は T r p 9 6 が、 P r o 、 L e u 、 T y r 、 A r g 、 I l e 若しくは P h e に置換されている配列番号 7 0 記載の C D R L 3 又は配列番号 7 0 の変異体。

【 0 1 4 4 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

- i) 配列番号 6 5 記載の C D R H 1 、
- i i) 配列番号 6 6 記載の C D R H 2 、
- i i i) 配列番号 6 7 記載の C D R H 3 、
- i v) 配列番号 6 8 記載の C D R L 1 、
- v) 配列番号 6 9 記載の C D R L 2 、
- v i) 配列番号 7 0 記載の C D R L 3 、
- v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 A l a V a l 、 I l e 又は G l y

位置 4 L e u 又は V a l

位置 2 0 L e u 、 I l e 、 M e t 又は V a l

位置 2 2 C y s

位置 2 4 T h r 、 A l a 、 V a l 、 G l y 又は S e r

位置 2 6 G l y

位置 2 9 I l e 、 P h e 、 L e u 又は S e r

位置 3 6 T r p

位置 4 7 T r p 又は T y r

位置 4 8 I l e 、 M e t 、 V a l 又は L e u

位置 6 9 I l e 、 L e u 、 P h e 、 M e t 又は V a l

位置 7 1 V a l 、 A l a 又は L e u

位置 7 8 A l a 、 L e u 、 V a l 、 T y r 又は P h e

位置 8 0 L e u 又は M e t 、

位置 9 0 T y r 又は P h e

位置 9 2 C y s

位置 9 4 A r g 、 L y s 、 G l y 、 S e r 、 H i s 又は A s n 、及び

- v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置 2 A s n I l e 、 L e u 又は V a l

位置 3 V a l 、 G l n 、 L e u 又は G l u

位置 4 M e t 又は L e u

位置 2 3 C y s

位置 3 5 T r p

位置 7 1 T y r

位置 8 8 C y s

位置 9 8 P h e 。

【 0 1 4 5 】

1 つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

- i) 配列番号 6 7 記載の C D R H 3 、
- i i) 配列番号 6 5 記載の C D R H 1 、
- i i i) 配列番号 6 6 記載の C D R H 2 、
- i v) 配列番号 6 8 記載の C D R L 1 、
- v) 配列番号 6 9 記載の C D R L 2 、
- v i) 配列番号 7 0 記載の C D R L 3 、
- v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 A l a

位置 4 L e u

位置 2 0 M e t

10

20

30

40

50

位置 2 2	C y s	
位置 2 4	A l a	
位置 2 6	G l y	
位置 2 9	P h e	
位置 3 6	T r p	
位置 4 7	T r p	
位置 4 8	I l e	
位置 6 9	L e u	
位置 7 1	V a l	
位置 7 8	A l a	10
位置 8 0	M e t	
位置 9 0	T y r	
位置 9 2	C y s	
位置 9 4	A r g、及び	
v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク :		
位置 2	A s n	
位置 3	V a l	
位置 4	L e u	
位置 2 3	C y s	
位置 3 5	T r p	20
位置 7 1	T y r	
位置 8 8	C y s	
位置 9 8	P h e。	

【 0 1 4 6 】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 6 5、6 6、及び 6 7、又は配列番号 6 8、6 9、及び 7 0 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 4 7 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、及び 7 0 から選択される抗体の C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 4 8 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 6 5、6 6、6 7、6 8、6 9 及び 7 0 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 4 9 】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号 6 5、6 6、及び 6 7 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 1 の D N A 配列と、配列番号 6 8、6 9、及び 7 0 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 2 の D N A 配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(i i) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第 1 の D N A 配列及び第 2 の D N A 配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第 1 及び第 2 の D N A 配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第 1 及び第 2 の D N A 配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【 0 1 5 0 】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号17及び配列番号18のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0151】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号17及び配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0152】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号71、72、73、74、75、及び76のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号71、72、73、74、75及び76の配列の保存的配列修飾であってもよい。

10

【0153】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号71、72、73、74、75及び76のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0154】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号71、72、73、74、75及び76のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0155】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号71、72、73、74、75、若しくは76、又は(ii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

20

【0156】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号73のポリペプチドを含んでなる。

【0157】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号71、72、73、74、75、及び76からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号71、72、73、74、75及び76に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

20

【0158】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号71、72、及び73、並びに配列番号74、75、及び76のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号71、72、73、74、75及び76に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

30

【0159】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はGly33が、Tyr、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はIle34が、Met、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はHis35が、Ser、Glu、Asn、Gln、Try若しくはThrに置換されている配列番号71記載のCDRH1又は配列番号71の変異体、

40

ii) Trp50が、Arg、Glu、Tyr、Gly、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はAsn52が、Asp、Leu、Ser若しくはTyrに置換されている及び/又はAsn53が、Ala、Gly、Ser、Lys、Thr若しくはTyrに置換されている及び/又是Thr54が、Asn、Ser、Lys、Asp若しくはGlyに置換されている及び/又是Glu56が、Tyr、Arg、Val、Asp、Gly、Ser若しくはAlaに置換されている及び/又是Thr58が、Lys、Asn、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号72記載のCDRH2又は配列番号72の変異体、

iii) Try102が、Val、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換

50

されている配列番号73記載のCDRH3又は配列番号73の変異体、

i v) Asn28が、Ser、Asp、Thr若しくはGluに置換されている及び/又はIle29が、Valに置換されている及び/又はTyr30が、Asp、Leu、Val、Ile、Ser、Asn、Phe、His、Gly若しくはThrに置換されている及び/又はSer31が、Asn、Thr、Lys若しくはGlyに置換されている及び/又はAsn32が、Phe、Tyr、Ala、His、Ser若しくはArgに置換されている及び/又はLeu33が、Met、Val、Ile若しくはPheに置換されている及び/又はAla34が、Gly、Asn、Ser、His、Val若しくはPheに置換されている配列番号74記載のCDRL1又は配列番号74の変異体、

v) Ala51が、Thr、Gly又はValに置換されている配列番号75記載のCDRL2又は配列番号75の変異体、

vi) Glu89が、Ser、Gly、Phe若しくはLeuに置換されている及び/又是His90が、Gln若しくはAsnに置換されており、Phe91が、Asn、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Tyr又はValに置換されている及び/又是Trp92が、Asn、Tyr、Thr、Ser、Arg、Gln、His、Ala若しくはAspに置換されている及び/又是Gly93が、Glu、Asn、Thr、His、Ser、Arg若しくはAlaに置換されている及び/又是Thr94が、Asp、Tyr、Val、Leu、His、Asn、Ile、Trp、Pro若しくはSerに置換されている及び/又是Leu96が、Pro、Trp、Tyr、Arg、Ile若しくはPheに置換されている配列番号76記載のCDRL3又は配列番号76の変異体。

【0160】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号71記載のCDRH1、

ii) 配列番号72記載のCDRH2、

iii) 配列番号73記載のCDRH3、

iv) 配列番号74記載のCDRL1、

v) 配列番号75記載のCDRL2、

vi) 配列番号76記載のCDRL3、及び

vii) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置2 Val、Ile又はGly

位置4 Leu又はVal

位置20 Leu、Ile、Met又はVal

位置22 Cys

位置24 Thr、Ala、Val、Gly又はSer

位置26 Gly

位置29 Ile、Phe、Leu又はSer

位置36 Trp

位置47 Trp又はTyr

位置48 Ile、Met、Val又はLeu

位置69 Ile、Leu、Phe、Met又はVal

位置71 Val、Ala又はLeu

位置78 Ala、Leu、Val、Tyr又はPhe

位置80 Leu又はMet、

位置90 Tyr又はPhe

位置92 Cys

位置94 Arg、Lys、Gly、Ser、His又はAsn、及び

viii) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置2 Ile、Leu又はVal

位置3 Val、Gln、Leu又はGlu

10

20

30

40

50

位置 4 M e t 又は L e u
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r 、 L e u 又は P h e
 位置 4 6 L e u 、 A r g 又は V a l
 位置 4 9 T y r 、 H i s 、 P h e 又は L y s
 位置 7 1 T y r 又は P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

【 0 1 6 1 】

10

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号 7 3 記載の C D R H 3 、
 i i) 配列番号 7 1 記載の C D R H 1 、
 i i i) 配列番号 7 2 記載の C D R H 2 、
 i v) 配列番号 7 4 記載の C D R L 1 、
 v) 配列番号 7 5 記載の C D R L 2 、
 v i) 配列番号 7 6 記載の C D R L 3 、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 I l e
 位置 4 L e u
 位置 2 0 I l e
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 L e u
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 M e t
 位置 6 9 P h e
 位置 7 1 L e u
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 L e u
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 L y s 、 及び

20

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置 2 I l e
 位置 3 G l n
 位置 4 M e t
 位置 2 3 C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r
 位置 4 6 L e u
 位置 4 9 T y r
 位置 7 1 P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

30

【 0 1 6 2 】

40

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 7 1 、 7 2 、 及び 7 3 、 又は配列番号 7 4 、 7 5 、 及び 7 6 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードす

50

るヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0163】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号71、72、73、74、75又は76から選択される抗体のCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0164】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号71、72、73、74、75及び76からなる群より選択される抗体の少なくとも4つのCDR配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【0165】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号71、72、及び73のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第1のDNA配列と、配列番号74、75、及び76のCDRドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第2のDNA配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(ii) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【0166】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号19及び配列番号20のアミノ酸配列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0167】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号19及び配列番号20のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0168】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号77、78、79、80、81、及び82のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号77、78、79、80、81及び82の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0169】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号77、78、79、80、81及び82のCDR配列を含んでなる抗体を產生するハイブリドーマに関する。

【0170】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号77、78、79、80、81及び82のCDR配列を含んでなる抗体を產生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0171】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号77、78、79、80、81、若しくは82、又は(ii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0172】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号79のポリペプチドを含んでなる。

【0173】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号77、78、79、80、81、及び82からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号77、78、79、80、81及び82に列挙した配列の

10

20

30

40

50

保存的配列修飾であってもよい。

【0174】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号77、78、及び79、並びに配列番号80、81、及び82のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号77、78、79、80、81及び82に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0175】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Asn32が、Ile、His、Phe、Thr、Tyr、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はTyr33が、Gly、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はIle34が、Met、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はAsp35が、Ser、His、Glu、Asn、Gln、Try若しくはThrに置換されている配列番号77記載のCDRH1又は配列番号77の変異体、

ii) Trp50が、Arg、Glu、Tyr、Gln、Val、Leu、Asn、Lys若しくはAlaに置換されている及び/又はIle51が、Leu、Val、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はPhe52が、Asn、Asp、Leu、Ser若しくはTyrに置換されている及び/又はGly53が、Ala、Tyr、Ser、Lys、Thr若しくはAsnに置換されている及び/又はSer54が、Asn、Thr、Lys、Asp若しくはGlyに置換されている及び/又是Asn56が、Val、Tyr、Arg、Glu、Asp、Gly、Ser若しくはAlaに置換されている及び/又是Lys58が、Thr、Asn、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号78記載のCDRH2又は配列番号78の変異体、

iii) Val102が、Tyr、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号79記載のCDRH3又は配列番号79の変異体、

iv) Asp28が、Ser、Asn、Thr若しくはGluに置換されている及び/又是Val29が、Ileに置換されている及び/又是Gly30が、Asp、Leu、Val、Ile、Ser、Asn、Phe、His、Try若しくはThrに置換されている及び/又是Ser31が、Asn、Thr、Lys若しくはGlyに置換されている及び/又是Ala32が、Phe、Tyr、Asn、His、Ser若しくはArgに置換されている及び/又是Val33が、Met、Leu、Ile若しくはPheに置換されている及び/又是Ala34が、Gly、Asn、Ser、His、Val若しく是Pheに置換されている配列番号80記載のCDRL1又は配列番号80の変異体、

v) Ala51が、Thr、Gly又是Valに置換されている配列番号81記載のCDRL2又は配列番号81の変異体、並びに

vi) Gln89が、Ser、Gly、Phe若しくはLeuに置換されている及び/又是Gln90が、His若しくはAsnに置換されており、Tyr91が、Asn、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Phe若しくはValに置換されている及び/又是Ser92が、Asn、Tyr、Thr、Trp、Arg、Gln、His、Ala若しくはAspに置換されている及び/又是Thr93が、Glu、Asn、Gly、His、Ser、Arg若しくはAlaに置換されている及び/又是Tyr94が、Asp、Thr、Val、Leu、His、Asn、Ile、Trp、Pro若しく是Serに置換されている及び/又是Leu96が、Pro、Trp、Tyr、Arg、Ile若しく是Pheに置換されている配列番号82記載のCDRL3又は配列番号82の変異体。

【0176】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号77記載のCDRH1、

ii) 配列番号78記載のCDRH2、

10

20

30

40

50

i i i) 配列番号 7 9 記載の C D R H 3、
 i v) 配列番号 8 0 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 8 1 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 8 2 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：
 位置 2 V a l、I l e 又は G l y
 位置 4 L e u 又は V a l
 位置 2 0 L e u、I l e、M e t 又は V a l
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 T h r、A l a、V a l、G l y 又は S e r 10
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 I l e、P h e、L e u 又は S e r
 位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p 又は T y r
 位置 4 8 I l e、M e t、V a l 又は L e u
 位置 6 9 I l e、L e u、P h e、M e t 又は V a l
 位置 7 1 V a l、A l a 又は L e u
 位置 7 8 A l a、L e u、V a l、T y r 又は P h e
 位置 8 0 L e u 又は M e t、
 位置 9 0 T y r 又は P h e 20
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g、L y s、G l y、S e r、H i s 又は A s n、及び
 v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：
 位置 2 I l e、L e u 又は V a l
 位置 3 V a l、G l n、L e u 又は G l u
 位置 4 M e t 又は L e u
 位置 2 3 S e r 又は C y s
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r、L e u 又は P h e
 位置 4 6 L e u、A r g 又は V a l 30
 位置 4 9 T y r、H i s、P h e 又は L y s
 位置 7 1 T y r 又は P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e。

【0177】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号 7 9 記載の C D R H 3、
 i i) 配列番号 7 7 記載の C D R H 1、
 i i i) 配列番号 7 8 記載の C D R H 2、
 i v) 配列番号 8 0 記載の C D R L 1、
 v) 配列番号 8 1 記載の C D R L 2、
 v i) 配列番号 8 2 記載の C D R L 3、
 v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：
 位置 2 I l e
 位置 4 L e u
 位置 2 0 I l e
 位置 2 2 C y s
 位置 2 4 A l a
 位置 2 6 G l y
 位置 2 9 P h e 40
 位置 2 1 0 C y s
 位置 2 1 2 P h e
 位置 2 1 4 I l e
 位置 2 1 6 L e u
 位置 2 1 8 C y s
 位置 2 2 0 A l a
 位置 2 2 2 G l y
 位置 2 2 4 P h e 50

位置 3 6 T r p
 位置 4 7 T r p
 位置 4 8 I l e
 位置 6 9 L e u
 位置 7 1 V a l
 位置 7 8 A l a
 位置 8 0 M e t
 位置 9 0 T y r
 位置 9 2 C y s
 位置 9 4 A r g 、 及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク :

位置 2 I l e
 位置 3 V a l
 位置 4 M e t
 位置 2 3 S e r
 位置 3 5 T r p
 位置 3 6 T y r
 位置 4 6 L e u
 位置 4 9 T y r
 位置 7 1 P h e
 位置 8 8 C y s
 位置 9 8 P h e 。

10

20

30

40

【 0 1 7 8 】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 7 7、7 8、及び 7 9、又は配列番号 8 0、8 1、及び 8 2 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 7 9 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 7 7、7 8、7 9、8 0、8 1 又は 8 2 から選択される抗体の C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 8 0 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 7 7、7 8、7 9、8 0、8 1 及び 8 2 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 8 1 】

1つの実施形態では、本発明は、単一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を產生する方法であって、

(i) 配列番号 7 7、7 8、及び 7 9 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 1 の D N A 配列と、配列番号 8 0、8 1、及び 8 2 の C D R ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第 2 の D N A 配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(i i) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として產生されるように、前記第 1 の D N A 配列及び第 2 の D N A 配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第 1 及び第 2 の D N A 配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第 1 及び第 2 の D N A 配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。

【 0 1 8 2 】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 のアミノ酸配

50

列、又はこれらの保存的配列修飾を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0183】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号21及び配列番号22のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、98%又は99%同一であるポリペプチドを含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでなる。

【0184】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号83、84、85、86、87、及び88のCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号83、84、85、86、87及び88の配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0185】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号83、84、85、86、87及び88のCDR配列を含んでなる抗体を産生するハイブリドーマに関する。

【0186】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号83、84、85、86、87及び88のCDR配列を含んでなる抗体を産生する組換え真核細胞又は原核細胞に関する。

【0187】

1つの実施形態では、抗体は、(i)配列番号83、84、85、86、87、若しくは88、又は(iii)(i)に列挙した配列の保存的配列修飾から選択される少なくとも1つのCDR配列を含んでなる。

【0188】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号85のポリペプチドを含んでなる。

【0189】

1つの実施形態では、抗体は、配列番号83、84、85、86、87、及び88からなる群より選択される少なくとも4つのCDR配列を含んでなるか、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号83、84、85、86、87及び88に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0190】

1つの実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号83、84、及び85、並びに配列番号86、87、及び88のCDRアミノ酸配列を含んでなる重鎖及び軽鎖の可変領域を含んでもよく、又は、前記CDR配列のうちの1以上は、配列番号83、84、85、86、87及び88に列挙した配列の保存的配列修飾であってもよい。

【0191】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) Tyr32が、Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu若しくはAspに置換されている及び/又はTrp33が、Gly、Ala、Trp、Thr、Leu若しくはValに置換されている及び/又はMet34が、Ile、Val、若しくはTrpに置換されている及び/又はTyr35が、His、Glu、Asn、Gln、Ser若しくはThrに置換されている配列番号83記載のCDRH1又は配列番号83の変異体、

ii) Thr50が、Gly、Tyr、Phe、Ile、Glu若しくはValに置換されている及び/又はVal51が、Leu、Ile、Thr、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はSer52が、Phe、Trp若しくはHisに置換されている及び/又はVal53が、Asp、Gly、Ser若しくはAsnに置換されている及び/又はGly54が、Serに置換されている及び/又はTyr56が、Ser、Thr、Asn、Asp若しくはArgに置換されている及び/又はLys58が、Asn、Thr、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe若しくはTyrに置換されている配列番号84記載のCDRH2又は配列番号84の変異体、

iii) Try102が、Val、His、Ile、Ser、Asp又はGlyに置換されている配列番号85記載のCDRH3又は配列番号85の変異体、

iv) Ser29が、Val、Asn、Asp、Thr若しくはGluに置換されてい

10

20

30

40

50

る及び／又はV a l 3 0が、A s p、L e u、T y r、I l e、S e r、A s n、P h e、H i s、G l y若しくはT h rに置換されている及び／又はS e r 3 1が、A s n、T h r、L y s若しくはG l yに置換されている及び／又はT y r 3 2が、P h e、A s n、A l a、H i s、S e r若しくはA r gに置換されている及び／又はM e t 3 3が、L e u、V a l、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号8 6記載のC D R L 1又は配列番号8 6の変異体、並びに

v) H i s 8 9が、G l n、S e r、G l y、P h e若しくはL e uに置換されている及び／又はG l n 9 0が、H i s若しくはA s nに置換されており、A r g 9 1が、A s n、G l y、S e r、P h e、A s p、H i s、T h r、T y r若しくはV a lに置換されている及び／又はS e r 9 2が、A s n、T y r、T h r、T r p、A r g、G l n、H i s、A l a若しくはA s pに置換されている及び／又はS e r 9 3が、T y r、G l u、A s n、G l y、H i s、T h r、A r g若しくはA l aに置換されている及び／又はP h e 9 4が、T h r、A s p、T y r、V a l、L e u、H i s、A s n、I l e、T r p、P r o若しくはS e rに置換されている及び／又はP r o 9 6が、T r p、L e u、T y r、A r g、I l e若しくはP h eに置換されている配列番号8 8記載のC D R L 3又は配列番号8 8の変異体。

【0 1 9 2】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

i) 配列番号8 3記載のC D R H 1、

i i) 配列番号8 4記載のC D R H 2、

i i i) 配列番号8 5記載のC D R H 3、

i v) 配列番号8 6記載のC D R L 1、

v) 配列番号8 7記載のC D R L 2、

v i) 配列番号8 8記載のC D R L 3、

v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置2 V a l、I l e又はG l y

位置4 L e u又はV a l

位置2 0 L e u、I l e、M e t又はV a l

位置2 2 C y s

位置2 4 T h r、A l a、V a l、G l y又はS e r

位置2 6 G l y

位置2 9 I l e、P h e、L e u又はS e r

位置3 6 T r p

位置4 7 T r p

位置4 8 I l e、M e t、V a l又はL e u

位置6 9 I l e、L e u、P h e、M e t又はV a l

位置7 1 A r g

位置7 8 A l a、L e u、V a l、T y r又はP h e

位置8 0 L e u又はM e t、

位置9 0 T y r又はP h e

位置9 2 C y s

位置9 4 A r g、L y s、G l y、S e r、H i s又はA s n、及び

v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置2 I l e、L e u又はV a l

位置3 V a l、G l n、L e u又はG l u

位置4 M e t又はL e u

位置2 3 C y s

位置3 5 T r p

位置7 1 T y r

位置8 8 C y s

10

20

30

40

50

位置 9 8 P h e 。

【 0 1 9 3 】

1つの実施形態では、本発明の抗体は以下を含んでなる：

- i) 配列番号 8 5 記載の C D R H 3 、
- i i) 配列番号 8 3 記載の C D R H 1 、
- i i i) 配列番号 8 4 記載の C D R H 2 、
- i v) 配列番号 8 6 記載の C D R L 1 、
- v) 配列番号 8 7 記載の C D R L 2 、
- v i) 配列番号 8 8 記載の C D R L 3 、
- v i i) 以下の残基を含んでなる重鎖フレームワーク：

位置 2 V a l

位置 4 L e u

位置 2 0 L e u

位置 2 2 C y s

位置 2 4 A l a

位置 2 6 G l y

位置 2 9 P h e

位置 3 6 T r p

位置 4 7 T r p

位置 4 8 V a l

位置 6 9 I l e

位置 7 1 A r g

位置 7 8 L e u

位置 8 0 L e u

位置 9 0 T y r

位置 9 2 C y s

位置 9 4 A r g 、 及び

- v i i i) 以下の残基を含んでなる軽鎖フレームワーク：

位置 2 I l e

位置 3 V a l

位置 4 L e u

位置 2 3 C y s

位置 3 5 T r p

位置 7 1 T y r

位置 8 8 C y s

位置 9 8 P h e 。

【 0 1 9 4 】

1つの実施形態では、本発明は、それぞれ、配列番号 8 3 、 8 4 、 及び 8 5 、 又は配列番号 8 6 、 8 7 、 及び 8 8 の C D R 配列を含んでなる抗体の可変重鎖又は軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 9 5 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 8 3 、 8 4 、 8 5 、 8 6 、 8 7 又は 8 8 から選択される抗体の C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 9 6 】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号 8 3 、 8 4 、 8 5 、 8 6 、 8 7 及び 8 8 からなる群より選択される抗体の少なくとも 4 つの C D R 配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。

【 0 1 9 7 】

1つの実施形態では、本発明は、单一の宿主細胞において抗体（免疫グロブリン）を産

10

20

30

40

50

生する方法であって、

(i) 配列番号 83、84、及び 85 の CDR ドメインを含んでなる免疫グロブリン重鎖の可変ドメインを少なくともコードする第1のDNA配列と、配列番号 86、87、及び 88 の CDR ドメインを含んでなる免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインを少なくともコードする第2のDNA配列とにより前記単一の宿主細胞を形質転換する工程と、

(ii) 前記形質転換された単一の宿主細胞において前記免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が別々の分子として産生されるように、前記第1のDNA配列及び第2のDNA配列を発現させる工程と、

を含み、

更に、前記第1及び第2のDNA配列が、異なるベクター中に存在するように実施してもよく、前記第1及び第2のDNA配列が、単一のベクター中に存在するように実施してもよい方法に関する。 10

【0198】

1つの実施形態では、本発明は、ELISA アッセイ等のイムノアッセイにおいて、4以下のヒトの IL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、ENA-78、NAP2、及び GCP-2 からなる群より選択される抗原に対する前述の抗体のいずれか1つの結合を完全に又は部分的にブロックする抗体に関する。1つの実施形態では、抗体が抗体の結合を 10%、20%、40% 又は 50% 超ブロックする場合、部分的なブロックが生じる。

【0199】

1つの実施形態では、本発明は、4以下のヒトの IL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、ENA-78、NAP2、及び GCP-2 からなる群より選択される抗原に対する前述の抗体のいずれかの結合と競合する抗体に関する。 20

【0200】

1つの実施形態では、本発明は、前述の抗体と薬学的に許容しうる担体とを含んでなる組成物に関する。

【0201】

1つの実施形態では、本発明は、哺乳類の COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及び COPD の増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害及び / 又は子宮内膜症を治療又は予防する方法であって、有効な量の前述の抗体を前記哺乳類に投与することを含んでなる方法に関する。 30

【0202】

1つの実施形態では、本発明は、ヒトの IL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP-2、及び ENA-78 のうちの 1 以上の量の増加又は不均衡を特徴とする疾患又は障害、特に、COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及び COPD の増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害又は子宮内膜症等の治療において使用するための前述の抗体に関する。 40

【0203】

1つの態様では、本発明は、哺乳類における COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応痛風癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及び COPD の増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、及び / 又は子宮内膜症の予防及び / 又は治療において使用するための前述の抗体に関する。

【0204】

10

20

30

40

50

1つの態様では、本発明は、哺乳類におけるCOPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、及び／又は子宮内膜症の予防及び／又は治療において使用するための薬剤の製造における前述の抗体の使用に関する。

【0205】

1つの態様では、本発明は、哺乳類におけるCOPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎を含む）、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、及び／又は子宮内膜症の予防及び／又は治療するための薬剤の製造における前述の抗体の使用に関する。

10

【0206】

1つの実施形態では、上記哺乳類はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1】図1は、抗体を作製するための例示的なMAPセットを示す。疑念を避けるために、5つのMAPペプチドユニットを示す。各ユニットは、配列番号89～93の直鎖状ペプチドから選択される1つの同一のアミノ酸配列を含有する。

20

【発明を実施するための形態】

【0208】

本発明で使用する「抗体」は、「免疫グロブリン」とも称される。本発明の抗体は、単離されている。本発明で使用する用語「抗体」は、最も広い意味で、免疫グロブリン様ドメインを有する分子を指し、例えば、モノクローナル抗体、組換え抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体及びヘテロコンジュゲート抗体、单一可変ドメイン、ドメイン抗体、抗原結合断片、免疫学的に有効な断片（Fab、F(ab')2等）、単鎖Fv、ダイアボディ、Tandabs（商標）等が挙げられる（別の「抗体」フォーマットの概要については、Holliger及びHudson, Nature Biotechnology, 2005年, 23巻, 9号, 1126-1136を参照されたい）。1つの実施形態では、本発明の抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、及び免疫学的に有効な断片（Fab、F(ab')2等）である。

30

【0209】

語句「单一可変ドメイン」とは、異なる可変領域又はドメインとは独立に、抗原又はエピトープに特異的に結合する抗原結合タンパク質の可変ドメイン（例えば、V_H、V_{HH}、V_L）を指す。

【0210】

「ドメイン抗体」又は「dAb」は、抗原に結合することができる「单一可変ドメイン」と同一であると考えてよい。单一可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインであってもよいが、げっ歯類（例えば、国際公開第00/29004号パンフレットに開示されている）、テンジクザメ及びラクダ科のV_{HH}dAb等の他の種に由来する单一抗体可変ドメインも含む。ラクダ科のV_{HH}は、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ及びグアナコを含む種に由来する免疫グロブリン单一可変ドメインポリペプチドであり、天然に軽鎖が欠けている重鎖抗体を產生する。このようなV_{HH}ドメインは、当技術分野において利用可能な標準技術に従ってヒト化することができ、このようなドメインは、「ドメイン抗体」であると考えられる。本発明で使用するV_Hとしては、ラクダ科のV_{HH}ドメインが挙げられる。

40

【0211】

本発明で使用する用語「ドメイン」は、タンパク質の残りとは無関係な三次構造を有する折り畳みタンパク質構造を指す。一般的に、ドメインは、タンパク質の個別の機能特性

50

に関与しており、多くの場合、タンパク質及び／又はドメインの残りの機能を失うことなく付加、除去、又は他のタンパク質に転移することができる。「単一可変ドメイン」は、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む折り畳みポリペプチドドメインである。したがって、ドメインは、完全な抗体可変ドメイン及び、例えば、抗体可変ドメインに特徴的ではない配列によって1以上のループが置換されている改変可変ドメイン、あるいは切頭されているか又はN末端若しくはC末端に伸長を含む抗体可変ドメイン、並びに完全長ドメインの結合活性及び特異性を少なくとも保持する可変ドメインの折り畳み断片を含む。ドメインは、異なる可変領域又はドメインとは無関係に抗原又はエピトープに結合することができる。

【0212】

10

抗原結合断片は、ドメイン等の非抗体タンパク質スカフォールドに1以上のCDRを配置することにより提供することができる。非抗体タンパク質スカフォールド又はドメインは、例えば、以下から選択されるスカフォールドの誘導体であるドメイン等の天然リガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学に供されたものである：CTL A - 4（エヴィボディ）、リポカイン、プロテインAのZドメイン等のプロテインAに由来する分子（アフィボディ、SpA）、Aドメイン（アヴィマー／マキシボディ）、GroE1及びGroES等の熱ショックタンパク質、トランスフェリン（トランスボディ）、アンキリン反復タンパク質（DARPin）、ペプチドアプタマー、C-型レクチンドメイン（テトラネクチン）、ヒト - クリスタリン及びヒトユビキチン（アフィリン）、PDZドメイン、ヒトプロテアーゼ阻害剤のサソリ毒素クニッツ型ドメイン、及びフィブロネクチン（アドネクチン）、これらは、その天然リガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学に供されている。

20

【0213】

20

CTL A - 4（細胞毒性Tリンパ球関連抗原4）は、主にCD4+T細胞で発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様Igフォールドを有する。異なる結合特性を付与するために、抗体のCDRに対応するループを異種配列で置換することもできる。異なる結合特異性を有するように改変されたCTL A - 4分子は、エヴィボディとしても知られている。更なる詳細については、Journal of Immunological Methods 248 (1 - 2), 31 - 45 (2001年)を参照されたい。

30

【0214】

リポカインは、ステロイド、ビリン、レチノイド及び脂質等の小さな疎水性分子を輸送する細胞外タンパクのファミリーである。これは、異なる標的抗原に結合するように改変することができるカノニカルな構造の開放端に多くのループを有する強固なシート二次構造を有する。アンチカリンの長さは160～180アミノ酸であり、リポカリンに由来する。更なる詳細については、Biochim Biophys Acta 1482: 337 - 350 (2000年)、米国特許第7250297B1号明細書及び米国特許出願公開第20070224633号明細書を参照されたい。

【0215】

40

アフィボディは、抗原に結合するように改変することができる黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）のプロテインAに由来するスカフォールドである。ドメインは、約58アミノ酸の3つのヘリックス束からなる。表面残基のランダム化によりライプラリが作製されている。更なる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 17, 455 - 462 (2004年)及び欧州特許出願公開第1641818A1号を参照されたい。

【0216】

50

アヴィマーは、Aドメインスカフォールドファミリーに由来する複数ドメインタンパク質である。約35アミノ酸のネイティブドメインは、規定のジスルフィド結合構造を有する。Aドメインのファミリーの示す自然変動をシャッフルすることにより多様性が生じる。更なる詳細については、Nature Biotechnology 23 (12),

1556-1561(2005年)及びExpert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917(2007年7月)を参照されたい。

【0217】

トランスフェリンは、モノマー性血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、1以上のCDR等のペプチド配列を許容表面ループに挿入することにより異なる標的抗原に結合するように改変することができる。改変されたトランスフェリンスカフォールドの例としては、トランスポディが挙げられる。更なる詳細については、J. Biol. Chem. 274, 24066-24073(1999年)を参照されたい。

【0218】

設計アンキリン反復タンパク質(DARPin)は、細胞骨格に対する不可欠な膜タンパク質の結合を媒介するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。單一アンキリン反復は、2つの α -ヘリックス及び β -ターンからなる33残基のモチーフである。これらは、各反復の最初の α -ヘリックス及び β -ターンにおける残基をランダム化するか、又は1以上のCDR等のペプチド配列を挿入することにより、異なる標的抗原に結合するように改変することができる。これらの結合界面は、モジュール数を増加させることにより増加し得る(親和性成熟の方法)。更なる詳細については、J. Mol. Biol. 332, 489-503(2003年), PNAS 100(4), 1700-1705(2003年)、及びJ. Mol. Biol. 369, 1015-1028(2007年)、米国特許出願公開第20040132028A1号明細書を参照されたい。

【0219】

フィブロネクチンは、抗原に結合するように改変することができるスカフォールドである。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型(FN3)の15の反復単位のうちの10番目のドメインの天然アミノ酸配列の骨格からなる。 α -サンドイッチの一端における3つのループは、対象となる治療標的をアドネクチンが特異的に認識できるように改変することができる。更なる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444(2005年)、米国特許出願公開第20080139791号明細書、国際公開2005056764号パンフレット、及び米国特許第6818418B1号明細書を参照されたい。

【0220】

ペプチドアプタマーは、定常スカフォールドタンパク質、典型的には、活性部位に挿入された拘束可変ペプチドループを含有するチオレドキシン(TrxA)からなるコンビナトリアルな認識分子である。更なる詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797(2005年)を参照されたい。

【0221】

ミクロボディーは、3~4つのシステイン架橋を含有する長さ25~50アミノ酸の天然に存在する微小タンパク質に由来し、微小タンパク質の例としては、Kalata B1及びコノトキシン及びノッティンが挙げられる。微小タンパク質は、微小タンパク質の折り畳み全体に影響を与えることなく、最高25アミノ酸を含むように改変することができるループを有する。改変されたノッティンドメインの更なる詳細については、国際公開第2008098796号パンフレットを参照されたい。

【0222】

他の結合ドメインとしては、異なる標的抗原結合特性を改変するためにスカフォールドとして用いられているタンパク質、例えば、ヒト α -クリスタリン及びヒトユビキチン(アフィリン)、ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニツツ型ドメイン、Ras結合タンパク質AF-6のPDZドメイン、サソリ毒素(カリブドトキシン)、C-型レクチンドメイン(テトラネクチン)が挙げられ、これらは、Handbook of Therapeutic Antibodiesの第7章Non-Antibody Scaffolds(2007年, Stefan Dubel編)及びProtein Science 15:14-27(2006年)に概説されている。本発明の結合ドメインは、これら代替タ

10

20

30

40

50

ンパク質ドメインのいずれか、及び前記ドメインにグラフトされた本発明の C D R の任意の組み合わせに由来し得る。

【0223】

抗原結合断片又は免疫学的に有効な断片は、部分的に重鎖又は軽鎖の可変配列を含み得る。断片の長さは、少なくとも 5、6、8、又は 10 アミノ酸である。あるいは、断片の長さは、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 50、少なくとも 75、又は少なくとも 100 アミノ酸である。

【0224】

本明細書全体にわたって、可変ドメイン配列及び完全長抗体配列におけるアミノ酸残基は、特に明記しない限り、Kabat の番号付け規則に従って番号付けされる。更なる情報については、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987年) を参照されたい。10

【0225】

本発明で使用する「と交差反応する抗体」は、抗体が 1 つの抗原のみに結合するのではなく、他の抗原にも同様に結合することを意味する。

【0226】

本発明の抗体は、単離されている。

【0227】

「4 以下」という用語は、1、2、3、又は 4 を意味する。20

【0228】

本発明で使用する「中和」は、ヒトの IL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP-2、NAP2 及びENA-78 からなる群より選択される 4 以下の抗原の生物活性の部分的又は完全な阻害を指すことを意図する。例えば、ヒトの IL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP-2、NAP2、GCP-2、又はENA-78 の生物活性のうちの 1 つは、好中球走化性を誘導する能力である。

【0229】

抗体の結合動態を測定する 1 つの方法は、表面プラズモン共鳴による方法である。本発明で使用する用語「表面プラズモン共鳴」は、例えば BIAcore system (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用して、バイオセンサー マトリックス内のタンパク濃度の変化を検出することによりリアルタイムに生体特異的相互作用を分析することを可能にする光学現象を指す。更なる説明については、Jonsson, U.,ら. (1993年) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U.,ら. (1991年) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B.,ら. (1995年) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; 及び Johnsson, B.,ら. (1991年) Anal. Biochem. 198: 268-277 を参照されたい。30

【0230】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定因子を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖側鎖等の分子の化学的に活性のある表面分類からなり、また、通常、特有の電荷特性に加えて特有の三次元構造特性を有する。40

【0231】

本発明で使用する(ポリクローナル抗体の対語としての)「モノクローナル抗体」又は mAb は、単一の分子組成の抗体分子の調製物を指す。例えば、マウスに由来するモノクローナル抗体(マウスモノクローナル抗体)は、標準的な Kohler 及び Milstein のハイブリドーマ方法論等のハイブリドーマ技術により調製することができる。

【0232】

抗体産生細胞は、被験体から得ることができ、Kohler 及び Milstein によ50

り最初に報告されたハイブリドーマ技術等の標準技術によりモノクローナル抗体を調製するためには用いることができる (Brownら (1981年) *J. Immunol.* 127: 539-46; Brownら (1980年) *J. Biol. Chem.* 255: 4980-83; Yehら (1976年) *PNAS* 76: 2927-31; 及びYehら (1982年) *Int. J. Cancer* 29: 269-75も参照されたい)。モノクローナル抗体ハイブリドーマを産生するための技術は、周知である (一般的に、R. H. Kenneth, *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, N. Y. (1980年); E. A. Lerner (1981年) *Yale J. Biol. Med.*, 54: 387-402; M. L. Gefterら (1977年) *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-36)。
10

【0233】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列の修飾に関する「保存的配列修飾」は、前記ヌクレオチド配列によってコードされているか又は前記アミノ酸配列を含有している抗体の結合特性に対して著しい影響を与えた変化させたりしない変化を意味する。このような保存的配列修飾は、ヌクレオチド及びアミノ酸の置換、付加、及び欠失を含む。部位特異的変異誘発及びPCR介在性突然変異誘発等の当技術分野において公知である標準技術により、修飾を配列に導入することができる。保存的アミノ酸置換としては、あるアミノ酸残基が、類似する側鎖を有する別アミノ酸残基で置換されているものが挙げられる。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、無極性側鎖 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐側鎖 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン) 及び芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を有するアミノ酸が挙げられる。したがって、配列が具体的に開示されている抗体において非本質的であると予測されているアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基に置換されることが好ましい。したがって、1つの態様では、本発明の抗体は、具体的に開示するアミノ酸配列の保存的配列修飾を全て含む。
20
30

【0234】

また、本発明は、具体的に開示するアミノ酸配列の「誘導体」であって、アミノ酸残基のうちの1以上が、前記アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に著しい影響を与えた変化させたりすることなく、例えば、アシル化又はグリコシル化により誘導されている誘導体を包含する。

【0235】

核酸について、用語「実質的に同一」とは、最適に整列され比較されたとき、適切にヌクレオチドを挿入又は欠失させた状態で、2つの核酸又はその設計配列のヌクレオチドの少なくとも約80%、通常、ヌクレオチドの少なくとも約90%~95%、より好ましくは少なくとも約98%~99.5%が同一であることを示す。あるいは、選択的なハイブリダイゼーション条件下でセグメントが相補鎖にハイブリダイズするとき、実質的に同一である。
40

【0236】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列について、用語「同一性」は、最適に整列させ、適切に挿入又は欠失させた状態で比較したときの、2つの核酸配列又は2つのアミノ酸配列間の同一性の程度を示す。あるいは、選択的なハイブリダイゼーション条件下でDNAセグメントが相補鎖にハイブリダイズするとき、実質的同一性が存在する。

【0237】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列を最適に整列させるために導入する必
50

要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮して、配列が共有している同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）。以下の非限定的な例に記載の通り、数学アルゴリズムを使用して、配列を比較し、2つの配列間の同一性パーセントを求めることができる。

【0238】

2つのヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）におけるGAPプログラムを使用し、NWGapDNA.CMPマトリックス、並びにギャップ重み付け40、50、60、70、又は80、及びギャップ長重み付け1、2、3、4、5、又は6を使用して求めることができる。2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE.Meyers及びW.Miller（Comput.Appl.Biosci., 4:11-17（1988年））のアルゴリズムを使用し、PAM120重み付け残基表、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を用いて求めることもできる。更に、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）におけるGAPプログラムに組み込まれたNeedleman及びWunsch（J.Mol.Biol.48:444-453（1970年））のアルゴリズムを使用し、Blossum62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、並びにギャップ重み付け16、14、12、10、8、6又は4、及びギャップ長重み付け1、2、3、4、5、又は6を使用して、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを求めることもできる。

10

20

30

40

【0239】

別の核酸配列と機能的関係に配置されるとき、核酸は「機能的に連結されている」。例えば、配列の転写に影響を与える場合、プロモーター又はエンハンサーは、コード配列に機能的に連結している。調節配列の転写に関して、機能的に連結しているとは、連結されているDNA配列が隣接していることを意味し、2つのタンパク質コード領域を接合させが必要な場合は、隣接し且つリーディングフレーム内であることを意味する。スイッチ配列について、機能的に連結しているとは、配列がスイッチ組換えに影響を与えることを示す。

【0240】

本発明で使用する用語「ベクター」は、それに連結している別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1種は「プラスミド」であり、これは、更なるDNAセグメントをライゲーションすることができる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、更なるDNAセグメントをウイルスゲノムにライゲーションすることができるウイルスベクターである。特定のベクターは、それを導入する宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌の複製開始点及びエピソーム性の哺乳類ベクターを有する細菌ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性の哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入する際に前記宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって、前記宿主細胞のゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、機能的に連結している遺伝子の発現を導くことができる。このようなベクターは、本発明では「組換え発現ベクター」（単に「発現ベクター」）と称される。一般的に、組換DNA技術において有用な発現ベクターは、多くの場合プラスミドの形態をしている。本明細書では、「プラスミド」及び「ベクター」を互換的に使用する場合があるが、その理由は、プラスミドが最も一般に用いられるベクターの形態であるためである。しかし、本発明は、等価な機能を有するウイルスベクター（例えば、複製欠損性レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）等の発現ベクターの他のこのような形態を含むことを意図する。

【0241】

本発明で用いられる用語「組換え宿主細胞」（又は単に「宿主細胞」又は「組換え細胞」）は、組換え発現ベクターが導入されている細胞を指すことを意図する。このような用語は、特定の被験体細胞だけではなく、このような細胞の後代も指すことを意図していることを理解すべきである。突然変異又は環境の影響のいずれかにより特定の修飾が次の世

50

代で生じる可能性があるので、このような後代は、実際には親細胞と同一ではない場合もあるが、本発明で使用する用語「組換え宿主細胞」の範囲に含まれる。組換え宿主細胞としては、例えば、CHO細胞、NS/0細胞及びリンパ球細胞等のトランスフェクトーマが挙げられる。

【0242】

本発明で使用する用語「被験体」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳類、並びに非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、雌ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等の非哺乳類等を含む。

【0243】

1. 抗体の構造

インタクトな抗体

インタクトな抗体は、通常、少なくとも2本の重鎖及び軽鎖を含むヘテロ多量体の糖タンパク質である。IgMに加えて、インタクトな抗体は、2本の同一の軽(L)鎖及び2本の同一の重(H)鎖から構成される約150Kdaのヘテロ多量体の糖タンパク質である。典型的に、各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。また各重鎖及び軽鎖は、鎖内にもジスルフィド結合を有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン(V_H)を有し、続いて多数の定常領域を有する。各軽鎖は、可変ドメイン(V_L)及び他の末端に定常領域を有し、軽鎖の定常領域は、重鎖の第1の定常領域と整列し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。大部分の脊椎動物種に由来する抗体の軽鎖は、定常領域のアミノ酸配列に基いてカッパ及びラムダと呼ばれる2種類のうちの1つに帰属し得る。その重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、ヒト抗体は、5つの異なるクラス、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMに帰属し得る。IgG及びIgAは、サブクラス、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、並びにIgA1及びIgA2に更に細分化することができる。種による変異体が存在し、マウス及びラットは少なくともIgG2a、IgG2bを有する。抗体の可変ドメインは、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる特に変動性の高い特定の領域により抗体に結合特異性を付与する。可変領域により保存されている部分をフレームワーク領域(FR)と呼ぶ。インタクトな重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、3つのCDRによって連結されている4つのFRを含む。各鎖のCDRは、FR領域に極近接して保持され、他の鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常領域は、抗体の抗原に対する結合に直接関与する訳ではないが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、Fc受容体への結合を介する食作用、新生児Fc受容体(FcRn)を介する半減期/クリアランス速度、及び補体カスケードのC1q成分を介する補体依存性細胞傷害への関与等の様々なエフェクター機能を示す。ヒトIgG2定常領域は、古典的経路によって補体を活性化するか又は抗体依存性細胞性細胞傷害を媒介する能力を欠く。ヒトIgG4定常領域は、古典的経路によって補体を活性化する能力を欠き、且つ抗体依存性細胞性細胞傷害をほんのわずかしか媒介しない。これらエフェクター機能を本質的に欠く抗体を「非溶解性」抗体と呼ぶ場合もある。

【0244】

ヒト抗体

ヒト抗体は、当業者に公知の多数の方法によって作製することができる。ヒト抗体は、ヒト骨髓腫又はマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株を用いてハイブリドーマ法により作製することができる。Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984年)及びBrodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Mareel Dekker Inc, 1987年)を参照されたい。別の方法としては、ファージライブリ又はトランスジェニックマウスの使用が挙げられ、これらは両方ともヒトV領域レパートリーを利用する(Winter G, (1994年), Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455, Green LL (1999年), J. Immunol. Methods 231, 11-23)。

10

20

30

40

50

【0245】

マウスの免疫グロブリン遺伝子座がヒトの免疫グロブリン遺伝子セグメントに置換されている幾つかの系統のトランスジェニックマウスが現在入手可能である (Tomizuka K, (2000年) PNAS 97, 722-727; Fishwild D. M (1996年) Nature Biotechnol. 14, 845-851; Mendez MJ, 1997年, Nature Genetics, 15: 146-156を参照されたい)。抗原チャレンジの際、このようなマウスは、ヒト抗体のレパートリーを產生することができ、それから対象となる抗体を選択することができる。

【0246】

特に、ヒトリンパ球を放射線照射マウスに移植する *Trimer-a* (商標) システム (Eren Rら, (1998年) Immunology 93: 154-161を参照されたい)、ヒト(又は他の種の)リンパ球を、受動的にプールされたインビトロにおける抗体の作製手順に有效地に供し、次いで、デコンポリューション処理、限界希釈、及び選択手順に供する選択リンパ球抗体システム (SLAM、Babcockら, PNAS (1996年) 93: 7843-7848を参照されたい)、及び *Xenomouse II* (商標) (Abgenix Inc) に留意されたい。別のアプローチは、Morphotek Inc から入手可能であり、Morphodoma (商標) 技術を用いる。

10

【0247】

ファージディスプレイ技術を使用して、ヒト抗体(及びその断片)を作製することができる。McCafferty; Nature 348, 552-553 (1990年) 及び Griffiths ADら (1994年) EMBO 13: 3245-3260を参照されたい。この技術に従って、抗体のVドメイン遺伝子を、M13又はfd等の纖維状バクテリオファージのタンパク質遺伝子のメジャーコート又はマイナーコートのいずれかにインフレームでクローニングし、(通常、ヘルパーファージを用いて) ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片としてディスプレイする。抗体の機能特性に基いた選択により、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子が選択される。ファージディスプレイ技術を用いて、上記疾患又は障害に罹患している個体から、あるいは免疫されていないヒトドナーから採取されたヒトB細胞から作製されたライプラリから抗原特異的抗体を選択することができる (Marks; J. Mol. Bio. 222, 581-597, 1991を参照されたい)。Fcドメインを含むインタクトなヒト抗体が望ましい場合、望ましい定常領域を含み且つ安定な発現細胞株を確立する哺乳類の発現ベクターに、ファージディスプレイに由来する断片を再クローニングする必要がある。

20

【0248】

親和性成熟の技術 (Marks; Bio/technol 10, 779-783 (1992年)) を用いて、結合親和性を改善することができ、この場合、順次H及びL鎖のV領域を天然に存在する変異体で置換し、改善された結合親和性に基づいて選択することにより、一次ヒト抗体の親和性が改善される。「エピトープインプリンティング」等のこの技術の変形例も現在利用可能である。例えば、国際公開第93/06213号パンフレットを参照されたい。また、Waterhouse; Nucleic Acids Res. 21: 2265-2266 (1993年) も参照されたい。

30

【0249】

キメラ及びヒト化抗体

ヒトの疾患又は障害の治療におけるインタクトな非ヒト抗体の使用では、特に抗体を反復投与した際に、患者の免疫系が前記インタクトな非ヒト抗体を非自己として認識し、中和反応を開始する場合があるという潜在的な免疫原性の問題が十分に確立されている。完全なヒト抗体(上記を参照されたい)の開発に加えて、これら問題を克服するために長年にわたって様々な技術が開発されており、一般的に、免疫された動物、例えば、マウス、ラット、又はウサギからの非ヒト抗体の比較的容易な入手性を保持しながら、インタクトな治療用抗体における非ヒトアミノ酸配列の組成を減少させることを含む。概して、これを達成するために2つのアプローチが使用されている。第1は、キメラ抗体であり、これ

40

50

は、一般的に、ヒトの定常領域に融合された非ヒト（例えば、マウス等のげっ歯類）の可変ドメインを含む。抗体の抗原結合部位は可変領域内に局在するので、キメラ抗体は、抗原に対する結合親和性を保持するが、ヒトの定常領域のエフェクター機能を獲得するので、上記のようなエフェクター機能を発揮することができる。キメラ抗体は、典型的に、組換えDNA方法を使用して作製される。抗体（例えばcDNA）をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、本発明の抗体のH鎖及びL鎖の可変領域をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの典型的な起源として機能する。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに入れられ、次いで、発現ベクターが存在しなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌、COS細胞、CHO細胞又は骨髄細胞等の宿主細胞にトランスフェクトされて、抗体を合成する。ヒトのL及びH鎖のコード配列を、対応する非ヒト（例えば、マウス）のH及びL定常領域の代わりに用いることによりDNAを改変してもよい。例えば、Morrison; PNAS 81, 6851 (1984年)を参照されたい。したがって、本発明の別の実施形態は、ヒトの定常領域（IgGアイソタイプ、例えば、IgG1であってよい）に融合している、配列番号2、6、又は10の配列を有するV_Hドメインと、配列番号4、8、又は12の配列を有するV_Lとを含むキメラ抗体を提供する。

10

【0250】

第2のアプローチは、可変領域をヒト化することにより、抗体の非ヒト含有量を減少させるヒト化抗体の作製を含む。ヒト化のための2つの技術が、広く用いられている。第1は、CDRのグラフトによるヒト化である。CDRは、抗体のN末端に近接してループを構築し、フレームワーク領域により提供されるスカフォールドに備え付けられた表面を形成する。抗体の抗原結合特異性は、主にトポグラフィー、及びそのCDR表面の化学的特性によって定義される。これら特徴は、個々のCDRの高次構造、CDRの相対的な配置、及びCDRを含む残基の側鎖の性質及び配置によって決定される。非ヒト（例えば、マウス）抗体（「ドナー」抗体）のCDRのみを好適なヒトフレームワーク（「アクセプタフレームワーク」）及び定常領域にグラフトすることにより免疫原性を大きく低下させることができる（Jonesら（1986年）Nature 321, 522-525及びVerhoeven Mら（1988年）Science 239, 1534-1536）。しかし、CDRのグラフト自体は、抗原結合特性を完全に保持させることはできないので、多くの場合、有意な抗原結合親和性を回復させたい場合、ドナー抗体のうち幾つかのフレームワーク残基をヒト化分子中に保存しておく必要がある（時に「復帰突然変異」とも呼ばれる）ことが見出されている（Queen Cら（1989年）PNAS 86, 10, 029-10, 033、Co, Mら（1991年）Nature 351, 501-502）。この場合、ヒトフレームワーク（FR）を提供するために、非ヒトドナー抗体に対して最も高い配列相同性を示す（典型的に、60%以上）ヒトV領域をデータベースから選択してよい。ヒトFRの選択は、ヒトのコンセンサス又は個々のヒト抗体のいずれかから行うこともできる。必要な場合、CDRの高次構造を保存するために、ヒトアクセプタフレームワークにドナー抗体由来の重要な残基を置換して入れる。抗体のコンピュータモデリングを用いて、このような構造的に重要な残基を同定するのに役立てることができる。国際公開第99/48523号パンフレットを参照されたい。

20

【0251】

あるいは、ヒト化は、「ベニアリング」のプロセスにより行うことができる。独自のヒト及びマウスの免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域を統計分析することにより、露出残基の正確なパターンはヒト抗体とマウス抗体とで異なり、そして、大部分の個々の表面位置は少数の異なる残基に対して強い偏好性を有することが明らかになった（Padlan E. A.ら（1991年）Mol. Immunol. 28, 489-498及びPedersen J. T.ら（1994年）J. Mol. Biol. 235; 959-973を参照されたい）。したがって、ヒト抗体で通常みられるものとは異なるフレームワーク領域内の露出残基を置換することにより、非ヒトFrの免疫原性を低下させることができる。

30

40

50

可能である。タンパク質の抗原性は表面の接近可能性と相關している場合があるので、表面残基の置換は、マウス可変領域をヒト免疫系に「見えない」ようにするのに十分であり得る (Mark G. E. ら (1994年) *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp 105 - 134も参照されたい)。このヒト化の手順は、抗体の表面だけを改変し、支持残基はそのまま保つので、「ベニアリング」と呼ばれる。更なる別のアプローチは、国際公開号 04 / 006955 号パンフレットに記載されている。更なる別のアプローチとしては、国際公開号 04 / 006955 号パンフレットに記載されているもの、及び細菌の発現系を使用して配列がヒト生殖細胞系に近い抗体を產生させる Human engineering (商標) (Kalobios) の手順が挙げられる (Alfenito - M Advancing Protein Therapeutics 2007年1月, San Diego, California)。別のヒト化アプローチは、フレームワーク領域等の抗体の他の領域間の相同性ではなくドナーマウス抗体のCDR領域に対するヒトCDR領域の構造的類似性に基づいてヒトアクセプターフレームワークを選択することを含む。このプロセスは、Superhumanisation (商標) (Evogenix Inc. ; Hwang ら (2005年) Methods 36 : 35 - 42) としても知られている。

10

20

30

40

50

【0252】

用語「由来する」は、その意味における源が、物質の物理的起源であることを定義するだけでなく、物質と構造的に同一であるがレファレンス源を起源としない物質も定義することを意図することが、当業者には明らかであろう。したがって、「ドナー抗体でみられる残基」は必ずしもドナー抗体から精製されたものである必要はない。

【0253】

抗体断片

本発明の特定の実施形態では、抗原結合断片である治療抗体を提供する。このような断片は、上記抗体の Fab、Fd、Fab'、F(ab')₂、Fv、ScFv 断片等のインタクトな抗体及び/又はヒト化抗体及び/又はキメラ抗体の機能的抗原結合断片であり得る。定常領域を欠く断片は、古典的経路によって補体を活性化するか又は抗体依存性細胞性細胞傷害を媒介する能力を欠く。従来より、このような断片は、例えば、パパイン消化によりインタクトな抗体をタンパク質分解することにより作製されるが(例えば、国際公開第 94 / 29348 号パンフレットを参照されたい)、組換え技術により形質転換された宿主細胞から直接產生させてもよい。ScFv の產生については、Bird ら (1988年) *Science*, 242, 423 - 426 を参照されたい。更に、抗体断片は、下記のような様々な改変技術を使用して作製してもよい。

【0254】

Fv 断片は、2 本の鎖の相互作用エネルギーが Fab 断片よりも低いと考えられる。V_H 及び V_L ドメインの会合を安定化させるために、これらは、ペプチド (Bird ら, (1988年) *Science* 242, 423 - 426; Huston ら, *PNAS*, 85, 5879 - 5883)、ジスルフィド架橋 (Glockshuber ら, (1990 年) *Biochemistry*, 29, 1362 - 1367) 及び「knob in hole」突然変異 (Zhu ら (1997年), *Protein Sci.*, 6, 781 - 788) で連結されている。ScFv 断片は、当業者に周知の方法により作製することができる。Whitlow ら (1991年) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97 - 105 及び Huston ら (1993年) *Int. Rev. Immunol.* 10, 195 - 217 を参照されたい。ScFv は、大腸菌等の細菌細胞で產生させることもできるが、より典型的には、真核細胞で產生される。ScFv の 1 つの問題点は、生成物が一価性であるので多価結合により結合活性を高めることができないこと及び半減期が短いことである。これら問題点を克服する試みとしては、化学的カップリング (Adams ら (1993年) *Can. Res.* 53, 4026 - 4

034 及び McCartney ら (1995年) Protein Eng. 8, 301-314) により、又は不対 C 末端システィン残基を含有する ScFv の自然発生的部位特異的二量体化 (Kipriyanov ら (1995年) Cell. Biophys 26, 187-204) により、更なる C 末端システィンを含有する ScFV から二価の (ScFV')₂ を作製することが挙げられる。あるいは、ペプチドリンカーを 3~12 残基まで短くすることにより ScFv に多量体を形成させて「ダイアボディ」を形成することもできる。 Holliger ら PNAS (1993年), 90, 6444-6448 を参照されたい。リンカーを更に短くすることにより ScFV の三量体 (「トリアボディ」、Kortt ら (1997年) Protein Eng., 10, 423-433 を参照されたい) 及び四量体 (「テトラボディ」、Le Gal ら (1999年) FEBS Lett., 453, 164-168 を参照されたい) を生じさせることもできる。また、タンパク質を二量体化させるモチーフと遺伝的に融合させて、「ミニ抗体」 (Pacak ら (1992年) Biochemistry 31, 1579-1584 を参照されたい) 及び「ミニボディ」 (Hu ら (1996年), Cancer Res. 56, 3055-3061) を形成することにより二価 ScFV 分子を構築することができる。また、ScFv - Sc - Fv タンデム ((ScFV)₂) は、第3のペプチドリンカーによって2つの ScFv 単位を連結させることにより作製することができる。Kurucz ら (1995年) J. Immunol. 154, 4576-4582 を参照されたい。二重特異性ダイアボディは、短いリンカーによって別の抗体の V_L ドメインに接続されている、ある抗体に由来する V_H ドメインからなる2つの単鎖融合生成物の非共有結合を通じて作製することができる。Kipriyanov ら (1998年), Int. J. Can 77, 763-772 を参照されたい。上記のようなジスルフィド架橋若しくは「knob in hole」突然変異の導入により、又は2つのハイブリッド ScFv 断片がペプチドリンカーを通して接続されている単鎖ダイアボディ (ScDb) の形成により、このような二重特異性ダイアボディの安定性を高めることができる。Kontermann ら (1999年) J. Immunol. Methods 226 179-188 を参照されたい。四価の二重特異性分子は、例えば、ヒンジ領域を通して IgG 分子の CH3 ドメイン又は Fab 断片に ScFv 断片を融合させることにより入手可能である。Colomar ら (1997年) Nature Biotechnol. 15, 159-163 を参照されたい。あるいは、四価の二重特異性分子は、二重特異性単鎖ダイアボディの融合により作製することができる (Alt ら (1999年) FEBS Lett. 454, 90-94 を参照されたい)。また、より小さな四価の二重特異性分子は、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフを含有するリンカーを用いて ScFv - ScFv タンデムを (Dibidi ミニ抗体、Mueller ら (1998年) FEBS Lett. 432, 45-49) 又は4つの抗体可変ドメイン (V_H 及び V_L) を含む単鎖分子を、分子内の対合を防ぐ配向で二量体化させることにより形成することができる (タンデムダイアボディ、Kipriyanov ら (1999年) J. Mol. Biol. 293, 41-56 を参照されたい)。二重特異性 F(ab')₂ 断片は、Fab' 断片の化学的カップリングにより、又はロイシンジッパーを通じたヘテロ二量体化により作製することができる (Shalaby ら, (1992年) J. Exp. Med. 175, 217-225; 及び Kostelevy ら (1992年), J. Immunol. 148, 1547-1553 を参照されたい)。また、単離 V_H 及び V_L ドメインに基づくいわゆるドメイン抗体も利用可能である (Domantidis Ltd.)、米国特許第 6,248,516 号明細書; 米国特許第 6,291,158 号明細書; 米国特許第 6,172,197 号明細書を参照されたい。

【0255】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、本発明の実施形態を形成する誘導体である。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便利な架橋法を使用して形成される、2つの共有結合した抗体で構成される。米国特許第 4,676,980 号を参照されたい。

【0256】

10

20

30

40

50

他の改变

また、本発明の抗体は、定常領域に任意の他の修飾を組み込んでもよい。例えば、これらの定常領域の保存されている位置における抗体のグリコシル化は、抗体機能、特に、上記のようなエフェクター機能に対する重要な作用を有することが知られている。例えば、Boydら(1996年), Mol. Immunol. 32, 1311-1318を参照されたい。1以上の炭水化物部分が付加、置換、欠失、又は修飾されている本発明の治療用抗体のグリコシル化変異体が考えられる。アスパラギン-X-セリン又はアスパラギン-X-トレオニンモチーフを導入すると炭水化物部分が酵素的に結合する可能性のある部位が作製されるので、抗体のグリコシル化を操作するために用いることができる。Rajuら(2001年) Biochemistry 40, 8868-8876では、-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ及び/又は, 2, 3シアリルトランスフェラーゼを用いる再ガラクトシル化及び/又は再シアリル化のプロセスを通してTNFR-IgGイムノアドヘシンの末端シアリル化が増加した。末端のシアリル化を増加させると、免疫グロブリンの半減期が延長されると考えられる。ほとんどの糖タンパク質と同様に、抗体は、典型的に、グリコフォームの混合物として自然界では產生される。抗体が真核生物、特に哺乳類細胞において產生されるとき、この混合物は特に明らかである。規定のグリコフォームを製造するために様々な方法が開発されている。Zhangら Science (2004年), 303, 371, Searsら, Science, (2001年) 291, 2344, Wackerら(2002年) Science, 298 1790, Daviesら(2002年) Chem. Rev. 102, 579, Hangら(2001年) Acc. Chem. Res. 34, 727を参照されたい。したがって、本発明は、規定の数(例えば、7以下、例えば、5以下、例えば、2つ又は1つ)の前記抗体のグリコフォームを含む本明細書に記載する複数の治療用抗体(例えばIgG1等のIgGアイソタイプであり得る)に関する。

【0257】

また、本発明に係る誘導体は、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール又はポリオキシアルキルエン等の非タンパク質ポリマーにカップリングされている本発明の治療用抗体を含む。PEGに対するタンパク質のコンジュゲート化は、タンパク質の抗原性及び免疫原性を低下させることに加えて、タンパク質の半減期を延長するために確立されている技術である。Fab'断片に加えてインタクトな抗体でも、様々な分子量及び形状(直鎖又は分岐)のPEG化の使用について研究されている。Koumenis I. L. ら(2000年) Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95を参照されたい。特定の実施形態は、a)古典的経路により補体を活性化する;及び抗体依存性細胞性細胞傷害を媒介するエフェクター機能を有しない、PEGにカップリングされている本発明の抗原結合断片(Fab断片又はscFv)を含む。

【0258】

抗体のFc領域と様々なFc受容体(FcR)との間の相互作用は、抗体依存細胞性細胞傷害(ADCC)、補体の固定、食作用及び抗体の半減期/クリアランスを含む抗体のエフェクター機能を媒介すると考えられる。望ましいエフェクター特性に応じて、本発明の抗体のFc領域に様々な修飾を行ってもよい。具体的には、a)古典的経路により補体を活性化する;及びb)抗体依存性細胞性細胞傷害を媒介する機能を本質的に欠くヒトの定常領域としては、例えば、欧洲特許第0307434号明細書(国際公開第8807089号パンフレット)、欧洲特許第0629240号明細書(国際公開第9317105号パンフレット)、及び国際公開第2004/014953号パンフレットに開示されている位置234、235、236、237、297、318、320、及び/又は322における突然変異等の特定の突然変異を含有するIgG4定常領域、IgG2定常領域及びIgG1定常領域が挙げられる。重鎖定常領域のCH2ドメイン内の残基235又は237(Kabatの番号付け; EUインデックスシステム)における突然変異は、FcRI、FcRII、及びFcRIIIに対する結合を減少させて、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を低下させることが別々に報告されている(Duncanら

10

20

30

40

50

Nature 1988, 332; 563-564; Lundら J. Immunol. 1991, 147; 2657-2662; Chappelら PNAS 1991, 88; 9036-9040; Burton及びWoof, Adv. Immunol. 1992, 51; 1-84; Morganら, Immunology 1995, 86; 319-324; Hezarehら, J. Virol. 2001, 75(24); 12161-12168)。更に、幾つかの報告には、補体依存性細胞傷害(CDC)の動員又は媒介にこれら残基の一部が関与していることが記載されている(Morganら, 1995; Xuら, Cell. Immunol. 2000; 200: 16-26; Hezarehら, J. Virol. 2001, 75(24); 12161-12168)。したがって、残基235及び237が両方ともアラニン残基に突然変異すると、補体媒介性作用及びFcR媒介性作用の両方が低下する(Brettら Immunology 1997, 91; 346-353; Bartholomewら Immunology 1995, 85; 41-48; 及び国際公開第9958679号パンフレット)。これら定常領域を含む抗体は、「非溶解性」抗体を呼ばれる場合がある。

10

【0259】

サルベージ受容体結合エピトープを抗体に組み込んで、血清半減期を延長することができる。米国特許第5,739,277号を参照されたい。

【0260】

現在、5種類のヒトFc受容体：FcR(I)、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIa、及び新生児FcRnが存在することが認められている。Shieldsら(2001年)J. Biol. Chem. 276, 6591-6604は、IgG1残基の共通のセットは、全てのFcRの結合に関与しているが、FcRII及びFcRIIIは、この共通のセットの外側の異なる部位を利用する立証した。以下に記載するIgG1残基の1つの群は、アラニンに変更されたとき全てのFcRに対する結合を減少させる：Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297及びPro-239。これらは全てIgGのCH2ドメインに存在し、CH1及びCH2を連結するヒンジの近傍でクラスタを形成する。FcRIIは、結合のためにIgG1残基の共通のセットのみを利用するが、FcRII及びFcRIIIは、前記共通のセットに加えて異なる残基とも相互作用する。幾つかの残基を変化させると、FcRII(I)（例えばArg-292）又はFcRIII（例えばGlu-293）に対する結合のみが減少する。幾つかの変異体では、FcRII又はFcRIIIに対する結合が改善されたが、他の受容体に対する結合は影響を受けなかった（例えば、Ser-267Alaは、FcRIIに対する結合を改善したが、FcRIIIに対する結合には影響を与えたかった）。他の変異体は、FcRII又はFcRIIIに対する結合を改善すると共に、他の受容体に対する結合を減少させた（例えば、Ser-298Alaは、FcRIIIに対する結合を改善し、FcRIIに対する結合を減少させた）。FcRIIIaの場合、最も優れた結合を示すIgG1変異体は、Ser-298、Glu-333及びLys-334におけるアラニン置換の組合せを有していた。新生児FcRn受容体は、IgG分子を分解から保護して血清半減期を延長させること及び組織を横断するトランスサイトーシスの両方に関与していると考えられる(Jungmans R. P(1997年)Immunol. Res. 16. 29-57及びGhetieら(2000年)Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766を参照されたい)。ヒトFcRnと直接相互作用することが見出されているヒトIgG1残基としては、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及びHis435が挙げられる。

20

30

40

【0261】

本発明の治療用抗体に、上記定常領域修飾のいずれかを組込んでもよい。

【0262】

2. 產生方法

本発明の抗体は、ヤギ(Pollockら(1999年), J. Immunol. Me

50

thods 231:147-157を参照されたい)、ニワトリ(Morrow K J J(2000年)Genet. Eng. News 20:1-55を参照されたい)、マウス(Pollockら上記を参照されたい)又は植物(Doran PM, (2000年)Curr. Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C(1998年), Nat. Med. 4; 601-606, Baez Jら, Biopharm(2000年)13:50-54, Stoger Eら;(2000年)Plant Mol. Biol. 42:583-590)等のトランスジェニック生物で產生させることができる。また、抗体は、化学合成によって作製することもできる。しかし、本発明の抗体は、典型的には、当業者に周知の組換え細胞培養技術を使用して作製される。抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、更に宿主細胞におけるクローニング(増幅)又は発現のためにプラスミド等の複製可能なベクターに挿入する。特に宿主細胞がCHO又はNS0である場合、1つの有用な発現系は、グルタミン酸合成酵素系(例えば、Lonza Biologicsにより販売されている)である(以下を参照されたい)。抗体をコードするポリヌクレオチドは、従来の手順(例えば、オリゴヌクレオチドプローブ)を使用して容易に単離され、配列決定される。使用することができるベクターとしては、プラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾン、ミニ染色体が挙げられ、この中でもプラスミドが典型的な実施形態である。一般的に、このようなベクターは、発現を促進するために軽鎖及び/又は重鎖ポリヌクレオチドに機能的に連結しているシグナル配列、複製開始点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター及び転写終結配列を更に含む。軽鎖及び重鎖をコードするポリヌクレオチドを別々のベクターに挿入し、(例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、又は形質導入により)同時に又は順次同じ宿主細胞に導入してもよく、必要に応じて、このような導入前に重鎖及び軽鎖の両方を同じベクターに挿入してもよい。

10

20

30

【0263】

遺伝子コードの冗長性により、本発明のポリペプチドをコードする、本明細書に開示するものとは別のポリヌクレオチドも利用可能であることが直ちに明らかになるであろう。

【0264】

シグナル配列

本発明の抗体は、成熟タンパク質のN末端に、特異的な切断部位を有する異種のシグナル配列を含む融合タンパク質として作製してもよい。シグナル配列は、宿主細胞により認識され、プロセシングされなければならない。原核生物の宿主細胞の場合、シグナル配列は、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーであり得る。酵母分泌については、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー又は酸性ホスファターゼリーダーであり得る。例えば、国際公開第90/13646号パンフレットを参照されたい。哺乳類細胞系では、単純ヘルペスgDシグナル及びネイティブな免疫グロブリンシグナル配列(ヒトIg重鎖等)等のウイルス分泌リーダーが利用可能である。典型的に、シグナル配列は、リーディングフレームにおいて本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドにライゲーションされる。

30

【0265】

複製開始点

複製開始点は、ほとんどのグラム陰性菌に好適なpBR322、ほとんどの酵母に好適な2μプラスミド、ほとんどの哺乳類細胞に好適なSV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV等の様々なウイルス開始点が当技術分野において周知である。一般的に、複製開始点の成分は、大腸菌におけるベクターの増殖が必要でない限り、哺乳類の発現ベクターに組み込まれる必要はない。しかし、SV40 oriは、初期プロモータを含有しているため用いてもよい。

40

【0266】

選択マーカー

典型的な選択遺伝子は、(a)例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート又はテトラサイクリン等の抗生物質又は他の毒素に対する耐性を付与するタンパク質、

50

又は(b)栄養要求性の欠損を補完したり複合培地では入手不可能な栄養素を供給したりするタンパク質をコードするか、又は(c)これら両方の組合せである。選択スキームは、ベクターを含有しない宿主細胞の増殖を妨げることを含んでいてもよい。本発明の治療用抗体をコードする遺伝子による形質転換が成功した細胞は、例えば、同時に送達された選択マーカーにより付与された薬剤耐性により生存する。一例は、D H F R 陰性宿主株において形質転換体が作製されるD H F R 選択マーカーである(例えは、P a g e 及びS y d e n h a m 1 9 9 1 年 B i o t e c h n o l o g y 9 : 6 4 - 6 8 を参照されたい)。この系では、D H F R 遺伝子を本発明の抗体のポリヌクレオチド配列と共に同時送達し、次いで、ヌクレオシドの引抜き(w i t h d r a w a l)によりD H F R 陽性細胞を選択する。必要に応じて、D H F R 阻害剤であるメトトレキセートを使用して、D H F R 遺伝子を増幅させる形質転換体を選択する。D H F R 遺伝子を本発明の抗体をコードする配列又はその機能的誘導体に機能的連結させることにより、D H F R 遺伝子を増幅させて、対象となる望ましい抗体配列を同時に増幅させる。C H O 細胞は、このD H F R / メトトレキセート選択に特に有用な細胞株であり、D H F R 系を使用して宿主細胞を増幅及び選択する方法は当技術分野において十分に確立されている。K a u f m a n R . J . ら J . M o l . B i o l . (1 9 8 2 年) 1 5 9 , 6 0 1 - 6 2 1 を参照されたい。概説については、W e r n e r R G , N o e W , K o p p K , S c h l u t e r M , " A p p r o p r i a t e m a m m a l i a n e x p r e s s i o n s y s t e m s f o r b i o p h a r m a c e u t i c a l s " , A r z n e i m i t t e l - F o r s c h u n g . 4 8 (8) : 8 7 0 - 8 0 , 1 9 9 8 年 8 月を参照されたい。更なる例は、グルタミン酸合成酵素発現系(L o n z a B i o l o g i c s)である。酵母で使用するのに適した選択遺伝子は、t r p 1 遺伝子である。S t i n c h c o m b ら N a t u r e 2 8 2 , 3 8 , 1 9 7 9 年を参照されたい。

10

20

30

40

50

【 0 2 6 7 】

プロモーター

本発明の抗体を発現させるのに適したプロモーターは、前記抗体をコードするD N A / ポリヌクレオチドに機能的に連結される。原核生物の宿主のプロモーターとしては、p h o A プロモーター、- ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン、及びT a c 等のハイブリッドプロモーターが挙げられる。酵母細胞で発現させるのに好適なプロモーターとしては、特に、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖系酵素、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフクルトキナーゼ、グルコース6リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセリン酸ムターゼ、及びグルコキナーゼが挙げられる。誘導性酵母プロモーターとしては、特に、アルコール脱水素酵素2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、メタロチオネイン、及び窒素代謝又はマルトース / ガラクトース利用に関与する酵素が挙げられる。

【 0 2 6 8 】

哺乳類細胞系で発現させるためのプロモーターとしては、特に、ポリオーマ、鶏痘、及びアデノウイルス(例えはアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス(特に、前初期遺伝子プロモーター)、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、アクチン、ラウス肉腫ウイルス(R S V)プロモーター、及び初期又は後期シミアンウイルス4 0 等のウイルスプロモータ；並びにE F - 1 等の非ウイルスプロモータを含むR N A ポリメラーゼI I プロモーターが挙げられる(M i z u s h i m a 及びN a g a t a N u c l e i c A c i d s R e s 1 9 9 0 年 1 8 (1 7) ; 5 3 2 2)。プロモーターの選択は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

【 0 2 6 9 】

エンハンサー要素

適切な場合、例えは、高等真核生物で発現させる場合、上記プロモーターに位置することが見出されているものの代わり又はそれに加えて、更なるエンハンサー要素を含

んでもよい。好適な哺乳類のエンハンサー配列としては、グロビン、エラスター、アルブミン、フェトプロテイン、メタロチオニン及びインスリン由来のエンハンサーエレメントが挙げられる。あるいは、SV40エンハンサー、サイトメガロウィルス早期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、バキュウイルスエンハンサー又はマウスIgG2a遺伝子座等の真核細胞ウイルスに由来するエンハンサーエレメントを用いてもよい(国際公開第04/009823号パンフレットを参照されたい)。このようなエンハンサーは、典型的に、ベクターにおいてプロモーターの上流の部位に位置するが、例えば、非翻訳領域内又はポリアデニル化シグナルの下流等、いすこに位置してもよい。エンハンサーの選択及び配置は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

【0270】

10

ポリアデニル化 / 終結

真核細胞系では、ポリアデニル化シグナルは、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結される。このようなシグナルは、典型的に、オープンリーディングフレームの3'に配置される。哺乳類系では、非限定的なシグナルとしては、成長ホルモン、伸長因子1アルファ及びウイルスの(例えば、SV40)遺伝子、又はレトロウイルスの長い末端反復配列に由来するシグナルが挙げられる。酵母系では、ポリアデニル化 / 終結シグナルの非限定的な例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)及びアルコール脱水素酵素1(ADH)遺伝子に由来するものが挙げられる。原核細胞系では、ポリアデニル化シグナルは、典型的には必要とされず、その代わりに、より短く且つより明確なターミネーター配列が通常使用される。ポリアデニル化 / 終結配列の選択は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

20

【0271】

収率を高めるための他の方法 / エレメント

上記に加えて、収率を高めるために使用することができる他の機構としては、クロマチンリモデリングエレメント、イントロン、及び宿主細胞に特異的なコドン修飾が挙げられる。本発明の抗体のコドン使用頻度を変化させて、転写物及び / 又は生成物の収率を高めるように宿主細胞のコドンバイアスを適応させてもよい(例えば、Hoekemaら Mol Cell Biol 1987年7(8):2914-24)。コドンの選択は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

30

【0272】

宿主細胞

本発明の抗体をコードするベクターをクローニング又は発現させるのに好適な宿主細胞は、例えば、原核生物、酵母、又は高等真核生物の細胞である。好適な原核細胞としては、真性細菌が挙げられ、例えば、腸内細菌科、例えば大腸菌(E. coli)(例えば、ATCC31,446;31,537;27,325)等のエシェリキア属(Escherichia)、エンテロバクター属(Enterobacter)、エルヴィニア属(Erwinia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、プロテウス属(Proteus)、例えばネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)等のサルモネラ属(Salmonella)、例えば靈菌(Serratia marcescens)等のセラシア属(Serratia)、及び赤痢菌属(Shigella)に加えて、枯草菌(B. subtilis)及びリケニホルミス菌(B. licheniformis)等のバチルス属(Bacillii)(旧東獨国特許第266710号明細書を参照されたい)、緑膿菌(P. aeruginosa)等のシュードモナス属(Pseudomonas)、及びストレプトミセス属(Streptomyces)等である。酵母宿主細胞の中でも出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)、分裂酵母(Schizosaccharomyces pombe)、クリベロマイセス属(Kluyveromyces)(例えば、ATCC16,045;12,424;24178;56,500)、ヤロウイア属(yarrowia)(欧洲特許第402,226号明細書)、ピキア・パストリス(Pichia Pastoris)(欧洲特許第183,070号明細書、Pengら(2004年)J. Biotechnol.

40

50

108:185-192も参照されたい)、カンジダ属(*Candida*)、トリコデルマ・リーシア(*Trichoderma reesia*) (欧洲特許第244234号明細書)、ペニシリン、トリポクラジウム属(*Tolypocladium*)、並びに偽巣性コウジ菌(*A. nidulans*)及びクロコウジカビ(*A. niger*)等のアスペルギルス属(*Aspergillus*)の宿主も考えられる。

【0273】

本発明は、原核生物及び酵母の宿主細胞について具体的に検討するが、典型的に、本発明の宿主細胞は、脊椎動物細胞である。好適な脊椎動物宿主細胞としては、COS-1 (ATCC番号CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651)、ヒト胚腎臓系統293、Perc6 (Cruce11)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK) (ATCC CRL 1632)、BHK570 (ATCC番号CRL 10314)、293 (ATCC番号CRL 1573)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO (例えば、CHO-K1、ATCC番号CCL 61、DG44等のDHFR-CHO細胞株 (Urlaubら(1986年)上記を参照されたい)、特に懸濁培養に適応したCHO細胞株、マウスセルトリ細胞、サル腎培養細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞 (ATCC CRL-1587)、HELA細胞、イヌ腎臓細胞 (ATCC CCL 34)、ヒト肺細胞 (ATCC CCL 75)、Hep G2及び骨髄腫、又はリンパ腫細胞、例えばNS0 (米国特許第5,807,715号を参照されたい)、Sp2/0、Y0等の哺乳類細胞が挙げられる。

10

【0274】

したがって、本発明の1つの実施形態では、本明細書に記載する通り、治療用抗体の重鎖及び/又は軽鎖をコードするベクターを含む安定的に形質転換された宿主細胞を提供する。典型的に、このような宿主細胞は、軽鎖をコードする第1のベクターと前記重鎖をコードする第2のベクターとを含む。

20

【0275】

また、このような宿主細胞は、本発明の抗体の品質、機能、及び/又は収率を改良するために更に改変又は適応させてもよい。非限定的な例としては、特異的修飾(例えば、グリコシル化)酵素及びタンパク質ホールディングシャペロンの発現が挙げられる。

30

【0276】

細胞培養方法

本発明の治療用抗体をコードするベクターで形質転換された宿主細胞は、当業者に公知の任意の方法により培養することができる。宿主細胞は、スピナーフラスコ、振盪フラスコ、ローラーボトル、又は中空ファイバー系で培養することができるが、大規模に製造する場合、特に懸濁培養には攪拌槽型反応器又は袋型反応器(例えば、Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA)を使用することが好ましい。典型的に、攪拌槽は、例えば、スパージャー、バッフル、又は低剪断インペラ等を用いるエアレーションに適応する。気泡塔及びエアリフト反応器については、空気又は酸素の気泡を用いて直接エアレーションを行ってもよい。宿主細胞を無血清培地で培養する場合、pluronic F-68等の細胞保護剤を培地に添加して、エアレーションプロセスに起因する細胞の損傷を防ぐのを補助することが好ましい。宿主細胞の特徴に応じて、足場依存性細胞株に対する成長基材としてマイクロキャリアを使用してもよく、細胞を懸濁培養に適応させてもよい(これが典型的である)。宿主細胞、特に脊椎動物の宿主細胞の培養は、バッチ、フェッドバッチ、反復バッチ処理(Drapetauら(1994年)cytotechnology 15:103-109を参照されたい)、延長バッチ処理、又は灌流培養等の様々な操作方式を利用してよい。組換え技術を用いて形質転換された哺乳類宿主細胞は、ウシ胎仔血清(FCS)を含む培地等の血清含有培地で培養してもよいが、このような宿主細胞は、Keenら(1995年)Cytotechnology 17:153-163に開示されているような合成無血清培地、又はProCHO-CDM若しくはUltreCHO(商標)(Cambrex NJ, USA)等の市販培地で培養されることが好ましく、これら培地には、必要な場合、グルコース等のエネルギー

40

50

ー源及び組換えインスリン等の合成成長因子が添加される。宿主細胞の無血清培養は、これら細胞が無血清条件における成長に適応していることを必要とする場合がある。1つの適応アプローチは、血清含有培地内でこのような宿主細胞を培養し、宿主細胞が無血清条件に適応できるようになるように培養培地の80%を無血清培地に繰り返し交換することである（例えば、Scharfenberg Kら（1995年）*Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century*（Beuvery E.C.ら編），pp619-623，Kluwer Academic publishers）。

【0277】

培地に分泌される本発明の抗体は、意図する用途に好適な精製度を得るために様々な技術を用いて培地から回収及び精製することができる。例えば、ヒト患者を治療するための本発明の治療用抗体の使用には、典型的に、治療用抗体を含む培養培地と比較して、SDS-PAGEを還元することにより測定したとき、少なくとも純度95%、より典型的には98%又は99%の純度が要求される。第1の例では、培養培地の細胞残屑は、典型的に、遠心分離し、次いで、例えば、精密濾過、限外濾過、及び／又は深層濾過等の上清の清澄化工程を用いて除去される。あるいは、予め遠心分離せずに、精密濾過、限外濾過又は深層濾過により抗体を回収してもよい。透析及びゲル電気泳動、並びにハイドロキシアパタイト（HA）、親和性クロマトグラフィー（任意でポリヒスチジン等の親和性タギング系を含む）及び／又は疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC、米国特許第5,429,746号を参照されたい）等のクロマトグラフィー技術等の様々な他の技術が利用可能である。

【0278】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、以下の様々な清澄化工程に従って、プロテインA又はG親和性クロマトグラフィーを使用し、その後、イオン交換及び／又はHAクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換、サイズ排除クロマトグラフィー、及び硫安分画等の更なるクロマトグラフィー工程を使用して捕捉される。典型的に、様々なウイルス除去工程が使用される（例えば、DV-20フィルタを用いるナノ濾過等）。これら様々な工程後、少なくとも10mg/mL以上、例えば、100mg/mL以上の本発明の抗体を含む精製された（典型的に、モノクローナルな）調製物が得られ、それが本発明の実施形態を形成する。100mg/mL以上の濃度は、超遠心により得ることができる。このような調製物は、本発明の抗体の凝集形態を実質的に含まないことが好ましい。

【0279】

細菌系は、特に抗体断片の発現に適している。このような断片は、細胞内又は周辺細胞質内に局在する。当業者に公知の方法に従って不溶性周辺細胞質タンパク質を抽出及びリフォールディングして、活性タンパク質を形成することができる。Sanchezら（1999年）*J. Biotechnol.* 72, 13-20；及びCupit PMら（1999年）*Lett Appl Microbiol* 29, 273-277を参照されたい。

【0280】

3. 医薬組成物及び投与方法

上記の通り精製された本発明の抗体の調製物は、上に概説したもの等のヒトの疾患及び障害の治療に使用するための医薬組成物に配合してもよい。典型的に、このような組成物は、公知であり且つ許容し得る薬務により要求される薬学的に許容し得る（すなわち、不活性）担体を更に含む。例えば、Remingtons Pharmaceutical Sciences, 第16版（1980年）Mack Publishing Co.を参照されたい。このような担体の例としては、好適なバッファによりpH5～8に緩衝されている生理食塩水、リングル液、又はデキストロース溶液等の無菌担体が挙げられる。（例えば、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、門内に）注射又は持続注入するための医薬組成物は、目に見える粉粒体を含まないことが好ましく、0.1mg～10gの治療用抗体、典型的には、5mg～25mgの抗体を含み得る。このような医薬組成物を調

10

20

30

40

50

製する方法は、当業者に周知である。1つの実施形態では、医薬組成物は、単位剤形中に本発明の治療用抗体を0.1mg～10g含み、任意で使用説明書を共に含む。本発明の医薬組成物は、当業者に周知であるか又は当業者に明らかである方法に従って、投与前に再構成するために凍結乾燥(フリーズドライ)してもよい。本発明の実施形態がIgG1アイソタイプを有する本発明の抗体を含む場合、銅触媒によるこのアイソタイプの抗体の分解の程度を低下させるために医薬組成物にクエン酸塩(例えば、クエン酸ナトリウム)又はEDTA又はヒスチジン等の銅のキレート化剤を添加してもよい。欧洲特許第0612251号明細書を参照されたい。

【0281】

本発明の抗体を投与するための有効量及び治療レジメンは、一般的に、経験的に決定され、患者の年齢、体重、及び健康状態、並びに治療される疾患又は障害等の要因に依存する。このような要因は、主治医の理解の範囲内である。適切な用量の選択における指針は、例えば、Smithら(1977年)Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New Yorkに見出すことができるが、一般には、0.1mg～1gである。1つの実施形態において、ヒト患者を治療するための投与レジメンでは、本発明の治療用抗体0.1mg～10gを1週間に1回若しくは2週間に1回皮下投与するか、1ヶ月若しくは2ヶ月毎に静脈内注入する。本発明の組成物は、予防的に用いてもよい。

10

【0282】

4. 臨床用途

20

本発明は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP-2、NAP2及びENA-78からなる群より選択される4以下の抗原に結合する能力を有する抗体に関する。また、本発明は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP-2、NAP2及び/又はENA-78のうちの1以上の量の増加又は不均衡を特徴とする疾患又は障害、特に、COPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎を含む)、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、及び/又は子宮内膜症を、前記抗体、前記抗体を含んでなる医薬組成物を用いて治療する方法、並びに前記抗体、前記抗体を含んでなる医薬組成物を製造する方法に関する。

30

【0283】

また、本発明は、ヒトのIL-8、Gro-アルファ、Gro-ベータ、Gro-ガンマ、GCP-2、NAP2及び/又はENA-78の量の増加又は不均衡を特徴とする疾患又は障害、特にCOPD、変形性関節症、関節リウマチ、びらん性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎を含む)、乾癬、移植拒絶反応、痛風、癌、急性肺傷害、急性肺疾患、敗血症、ARDS、末梢動脈疾患、全身性硬化症、新生児性呼吸窮迫症候群、喘息及びCOPDの増悪、囊胞性線維症、びまん性汎細気管支炎、再灌流傷害、又は子宮内膜症等を治療するための薬剤の製造における抗体の使用に関する。本発明は、ヒトの疾患又は障害の治療について主に記載したが、本発明は、非ヒト哺乳類における同様の疾患又は障害の治療においても適用することができる。

40

【実施例】

【0284】

実施例1 マウスモノクローナル抗体の作製

複数の方法及びスキームを使用して、本発明のmAbを作製するためにマウスを免疫する。完全又は不完全フロイントアジュバント(cFA又はiFA)中で混合された多重抗原性ペプチド(MAP)及び/又はインタクトな標的ケモカイン(IL-8、Gro-、-、-及びENA-78)の様々な混合物を用い、改良反復免疫化多重部位(RIMMS)プロトコールに従って、SJL/JOrlCr1マウス系統においてmAbを作製した。

50

【0285】

M A P 又は多重抗原性ペプチドは、免疫化プロトコールにおいて 2 つの機能を発揮する。第 1 に、M A P により、公知の標的アミノ酸配列を選択的に複数提示することができる。第 2 に、リシンコア等を介して複数コピーの配列が連結されることにより質量が増加するので、個々のペプチドの免疫原性よりも前記配列の免疫原性が高くなる (Francis, J. P., et al., *Immunology*, 1991; 73: 249, Schott, M. E., et al., *Cell. Immuno.* 1996; 174: 199-209, Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85: 5409-5413)。図 I は、配列番号 89 ~ 93 のアミノ酸配列を有する M A P のセットの概略図である。M A P 中のリンカーは、リシン以外に任意のリンカーであってよい。

10

【0286】

一般的な免疫化タイムライン :

上記タイムラインによる 2 つの異なる免疫化プロトコールにより、本発明の幾つかの m A b を作製した :

1. 最初の免疫化 (0 日目) は、c F A 中で混合された全ての標的ケモカイン (各 10 μ g) を複数回皮下注射 (後四半身、背中、及び首) することからなる。続く 4 回の追加免疫は、i F A 中で混合された全ての標的ケモカインの混合物 (各 10 μ g) からなっていた。5 回目及びその後の全ての追加免疫は、i F A 中における全ての標的ケモカイン及び 5 つ全ての直鎖状 M A P (各 10 μ g) のカクテルからなっていた。屠殺及び融合の 3 日前の最後の追加免疫は、P B S 中における全ての標的ケモカイン及び直鎖状 M A P からなっており、腹腔内 (I P) 注入を介して送達された。

20

2. 最初の免疫化 (0 日目) は、c F A 中で混合された 5 つ全ての直鎖状 M A P (各 10 μ g) を複数回皮下注射 (後四半身、背中、及び首) することからなる。続く 4 回の追加免疫は、i F A 中で混合された 5 つ全ての直鎖状 M A P の混合物 (各 10 μ g) からなっていた。5 回目及びその後の全ての追加免疫は、i F A 中における 5 つ全ての直鎖状 M A P 及び全ての標的ケモカイン (各 10 μ g) のカクテルからなっていた。屠殺及び融合の 3 日前の最後の追加免疫は、P B S 中における 5 つ全ての直鎖状 M A P 及び全ての標的ケモカイン (各 10 μ g) からなっており、腹腔内 (I P) 注入を介して送達された。

【0287】

上記の方法 1 により、表 I の抗体 1 L 1 3 2 . 2 3 及び 1 L 3 5 1 . 1 7 を作製した。上記の方法 2 により、表 I の抗体 2 X 3 5 2 . 3 、 2 X 8 1 0 . 3 及び 2 X 9 0 7 . 1 5 を作製した。

30

【0288】

実施例 2 C X C R 2 媒介性 C a ²⁺ 動員を使用して、マウス m A b による機能的な汎阻害を確認した

h C X C R 2 及び G 1 6 でトランスフェクトされ、これらを安全に発現している C H O - K 1 細胞における E L R + ケモカイン誘導性 [C a ²⁺] i - 動員に対する抗体の中和作用を機能的に特性評価するために、マイクロタイタープレートに基いたカルシウム動員アッセイ、F L I P R (蛍光イメージングプレートリーダー、M o l e c u l a r D e v i c e s , S u n n y v a l e C A , [S c h r o e d e r , 1996]) を使用した。

40

【0289】

アッセイの前日に、96 ウエルの黒壁、透明底プレート (P a c k a r d V i e w) に 1 ウエル当たり 4 0 0 0 0 細胞の濃度で細胞をプレーティングした。18 ~ 24 時間後、細胞から培地を吸引し、1 0 0 μ L のロード培地 (E a r 1 塩及び L - グルタミンを含むイーグル最低必須培地 (E M E M) 、0.1% の B S A (S e r o l o g i c a l s C o r p o r a t i o n) 、4 μ M の F l u o - 4 - アセトキシメチルエステル蛍光指示染料 (F l u o - 4 A M) 及び 2.5 mM のプロベネシドを含有する) で置換した。37 で 1 時間、この染料を含有する培地中で細胞をインキュベートした。次いで、染料を含有する培地を細胞から吸引し、F l u o - 4 A M を含まず、且つ 0.1% のゼラチン

50

(B S A を除去した) 及び 2 . 5 mM のプロベネシドを含む同一培地で置換した。細胞を 10 分間 37° でインキュベートし、次いで、 K R H アッセイバッファ [0 . 1 % のゼラチン及び 2 . 5 mM のプロベネシドを含む K r e b s R i n g e r H e n s e l e i t (1 2 0 mM の N a C l 、 4 , 6 mM の K C l 、 1 . 0 3 mM の K H 2 P O 4 、 2 5 mM の N a H C O 3 、 1 . 0 mM の C a C l 2 、 1 . 1 mM の M g C l 2 、 1 1 mM のグルコース、 2 0 mM の H E P E S (p H 7 . 4)] で 3 回洗浄した。最終のバッファで洗浄した後、 0 . 1 % のゼラチン及び 2 . 5 mM のプロベネシドを含む 1 0 0 μ L の K R H アッセイバッファを細胞に添加し、 10 分間かけて 37° に加温した後、 F L I P R 内に配置し、そこで染料をロードした細胞を、 6 ワットのアルゴンレーザからの励起光 (4 8 8 nm) に曝露した。 C a 2+ に結合したときの F l u o - 4 の 5 1 6 nm 発光強度の増加の結果として [C a 2+] i 動員をモニタした。発光強度の変化は、細胞質のカルシウム濃度、 [C a 2+] i と直接関連する。 10 秒間ベースラインをモニタした後、ある濃度範囲の抗体と共に予めインキュベートされている 3 × E L R + ケモカイン 5 0 μ L を細胞プレートに添加し、 1 分間毎秒データを収集し、次いで、 3 秒間隔で更に 3 0 秒間記録した。 G r a p h P a d P r i s m (v 4 . 0 3) においてプロットするために、基準読み取り値を上回る最大細胞応答をエクスポートした。

10

【 0 2 9 0 】

3 × E C 80 ケモカインの前処理中に、 E L R + ケモカインの E C 80 濃度の C X C R 2 媒介性刺激作用を 5 0 % 中和するのに必要な抗体の濃度として、 I C 50 を定義した。 2 5 μ M の A T P に対する第 2 の細胞応答をモニタして、細胞生存率を試験した [S a r a u , 1 9 9 9] 。

20

【 0 2 9 1 】

S c h r o e d e r K S , N e a g l e , B D . F L I P R : a n e w i n s t r u m e n t f o r a c c u r a t e , h i g h t h r o u g h p u t o p t i c a l s c r e e n i n g . J . B i o m o l . S c r e e n . 1 9 9 6 ; 1 - 7 5 . S a r a u H M , A m e s R S , C h a m b e r s J , E l l i s C , E l s h o u r b a g y N , F o l e y J J ら I d e n t i f i c a t i o n , m o l e c u l a r c l o n i n g , e x p r e s s i o n , a n d c h a r a c t e r i z a t i o n o f a c y s t e i n y l l e u k o t r i e n r e c e p t o r . M o l P h a r m a c o l . 1 9 9 9 ; 5 6 : 6 5 7 - 6 6 3 .

30

【 0 2 9 2 】

【表 1 】

精製された Mab に対する F L I P R I C 50
(ug/ml)**

	IL8	GroA	GroB	GroG	ENA78	GCP2	NAP2	アイソタイプ*
5D2. 2D10	>200	>200	77. 4	>200	4. 7	>200	>200	IgG1
1A1. 4C6	>200	2. 4	>167. 5	19. 2	12. 3	11. 2	122. 9	IgG1
7A12. 1F10	>200	9. 9	>200	>200	2. 4	123. 6	>200	IgG1
9D12. 1H4	3. 4	>67	>67	>67	14. 4	6. 6	>67	IgG1
2B12. 1E1	1. 6	>67	>65. 5	>67	>67	40. 9	>67	IgG2c
17D1. 1D2	2. 5	>146. 3	81. 6	143. 9	>200	>200	>200	IgG2c
1L132. 23	>67	>67	0. 69	>67	>67	>67	>67	IgG1
1L351. 17	>67	1. 92	1. 02	3. 17	>67	>67	>67	IgG2b
2X352. 3	>67	2. 06	1. 12	7. 43	4. 99	>67	>67	IgG1
2X810. 3	>67	>67	>67	>67	14. 57	24. 59	>67	IgG1
2X907. 15	>67	>67	>67	>67	2. 6	>67*	>67	IgG1

40

** このアッセイでは、 1 2 2 μ g / ml を超える値は、活性がないとみなす。

* 部分的

50

【0293】

相補性決定領域（CDR）に下線を引く。

配列番号1

5D2.2D10重鎖

Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y I F T A Y G M S W V K Q A
P G K G L K W M G W I N T Y S G V P T Y A D H F K G R F D F S L E T S A S T A Y
L Q I N N L K N E D T A T Y F C A R P T V V D P W Y F D V W G T G T T V T V S S

配列番号2

5D2.2D10軽鎖

D I Q M T Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E N I Y S N L A W Y Q Q K Q 10
G K S P Q L L V Y A A T N L G D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S
E D F G S Y Y C Q H F W T T P W T F G G G T K L E I K

配列番号3

1A1.4C6重鎖

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y T F I D Y Y M N W V K Q S
Q G K S L E W I G D V N P D D G D T T Y N Q Q F K D K A T L T V D K S S S T A Y
M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R D D R T S G Y F D V W G T G T T V T V S S

配列番号4

1A1.4C6軽鎖

D I Q M T Q S T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I R N Y L N W F Q Q K P 20
D G T V K L L I Y Y T S I V H S R V P S R F S G S G S G T D Y S L T I N N L D Q
E D I A T Y F C Q Q A N T L P W T F G G G T K L E T K

配列番号5

7A12.1F10重鎖

Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y I F T S N D I N W V R Q R
P E Q G L E W I G W I F P G D N S T K F N E K F R D K A T L T T D K S S S T A Y
M Q L S G L T S E D S A V Y F C A T F Y G S T Y G Y Y F D Y W G Q G T T L T V S
S

配列番号6

7A12.1F10軽鎖

D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G T A V A W Y Q Q K P 30
G Q S P K L L I Y W T D T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V E S
E D C V D Y F C H Q Y N N Y P L T F G A G T K L E L K

配列番号7

9D12.1H4重鎖

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R M S C K A S G N T V I D Y N I H W V K Q S
Q G K S L E W I G Y I N P N S G G T G Y N E K F K D K A T L T I N K S S S T A H
M D L R S L T S E D S A V Y Y C T R F D F W G Q G T T L T V S S

配列番号8

9D12.1H4軽鎖

D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S T Q S I V P V N G N T H L E W 40
Y L H K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D L G V Y Y C F Q A S H V P W T F G G G T K L E I K

配列番号9

2B12.1E1重鎖

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y T F T D Y Y M N W V K Q S
H G K S L E W I G D I N P N N G N T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y
M E F R S L T S E D S A V Y Y C A G L G R I F D Y W G Q G T T L T V S S

配列番号10

2B12.1E1軽鎖

50

E N V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S S T F L H W Y Q Q K
 S G A S P K L W I Y S T S D L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S V E
 A E D A A T Y Y C Q Q Y S G Y P W T F G G G T K L E I K

配列番号 1 1

1 7 D 1 . 1 D 2 重鎖

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y T F T D Y Y M N W L R Q S
 H G K S L E W I G D I N P N N G G T N Y N Q K F K N K A T L T V D K S S S T A Y
 M E L R S L T S E D S A V F Y C A G L G R I F D Y W G Q G T T L T V S S

配列番号 1 2

1 7 D 1 . 1 D 2 軽鎖

E N V L T Q S P A I M S A F P G E K V T M T C R A S S S V S S T Y L H W Y Q Q K
 S G A S P K L W I Y S T S D L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S V E
 A E D A A T Y Y C Q Q F S G Y P W T F G G G T K L E I K

配列番号 1 3

1 L 1 3 2 . 2 3 重鎖

Q V Q L Q Q P G A E L V K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W M H W V R Q R
 P G Q G L E W I G R I H P S D N D T N Y N Q K F K D K A T L T V D K S S N T A Y
 M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A I G V Y D G F I G L W G Q G T S V T V S S

配列番号 1 4

1 L 1 3 2 . 2 3 軽鎖

D I Q M T Q S P A S Q S A S L G E S V T I T C L A S Q T I G T W L A W Y Q Q K P
 G K S P Q L L I Y A A T R L A D G V P S R F S G S G S G T K F S F K I S S L Q A
 E D F V S Y Y C Q Q L S S T P W T F G G G T K L E I K

配列番号 1 5

1 L 3 5 1 . 1 7 重鎖

Q A Y L Q Q S G A E L V R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y N M H W V K Q T
 P R Q G L E W I G A I Y P G N G D T S Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y
 M Q L S S L T S E D S A V Y F C A R D L Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S

配列番号 1 6

1 L 3 5 1 . 1 7 軽鎖

E N V L T Q S P A I M S A F P G E K V T M T C R A S S S V S S T Y L H W Y Q Q K
 S G A S P K L W I Y S T S D L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S V E
 A E D A A T Y Y C Q Q F S G Y P W T F G G G T K L E I K

配列番号 1 7

2 X 3 5 2 . 3 重鎖

Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T L T Y Y G I H W V T Q T
 P G K G L N W M G W I N T N T G E P T Y V E E F K G R F A F S L E T S A S T A Y
 L Q I T D L K N E D T A T Y F C A K A T Y D G Y S D Y W G Q G T T L T V S S

配列番号 1 8

2 X 3 5 2 . 3 軽鎖

D I Q M T Q S P A S L S V S V G E S V T I T C R A S E N I Y S N L A W Y Q Q K Q
 G K S P Q L L V Y D A T N L A H G V P S R F S G S G S G T Q F S L R I N S L Q S
 E D F G S Y Y C Q H F W G T P L T F G A G T R L E L K

配列番号 1 9

2 X 8 1 0 . 3 重鎖

Q I Q L Q Q S G P E V V K P G A S V K I S C K A S G Y I F T D N Y I D W V Q Q R
 P G Q G L E W I G W I F P G S G N T K Y N E K F K G K A T L T V D T F S S T A Y
 M Q L S S L T S E D T A V Y F C A R E I D Y D Y D G F F D V W G A G T T V T V S
 S

配列番号 2 0

10

20

30

40

50

2 X 8 1 0 . 3 軽鎖

D I V M T P S H T F M S T S V G D R V I I T S K A S Q D V G S A V A W Y Q Q K P
G Q S P T L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N L Q S
E D L A D Y F C Q Q Y S T Y P L T F G A G T K L E L K

配列番号 2 1

2 X 9 0 7 . 1 5 重鎖

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S D Y Y M Y W V R Q S
P E K R L E W V A T V S D V G S Y T Y Y S G S V R G R F T I S R D N A K N N L Y
L Q M S S L Q S E D T A I Y Y C S R D R T L D Y W G Q G T S V I V T S

10

配列番号 2 2

2 X 9 0 7 . 1 5 軽鎖

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I T C N A S S S V S Y M H W F Q Q K P G
T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E
D A A T Y Y C H Q R S S F P P T F G G G T K L E I K

配列番号 2 3

A Y G M S

配列番号 2 4

W I N T Y S G V P T Y A D H F K G

配列番号 2 5

P T V V D P W Y F D V

20

配列番号 2 6

R A S E N I Y S N L A

配列番号 2 7

A A T N L G D

配列番号 2 8

Q H F W T T P W T

配列番号 2 9

D Y Y M N

配列番号 3 0

D V N P D D G D T T Y N Q Q F K D

30

配列番号 3 1

D D R T S G Y F D V

配列番号 3 2

R A S Q D I R N Y L N

配列番号 3 3

Y T S I V H S

配列番号 3 4

Q Q A N T L P W T

配列番号 3 5

S N D I N

配列番号 3 6

W I F P G D N S T K F N E K F R D

40

配列番号 3 7

F Y G S T Y G Y Y F D Y

配列番号 3 8

K A S Q D V G T A V A

配列番号 3 9

W T D T R H T

配列番号 4 0

H Q Y N N Y P L T

50

配列番号 4 1

D Y N I H

配列番号 4 2

Y I N P N S G G T G Y N E K F K D

配列番号 4 3

F D F

配列番号 4 4

R S T Q S I V P V N G N T H L E

配列番号 4 5

K V S N R F S

配列番号 4 6

F Q A S H V P W T

配列番号 4 7

D Y Y M N

配列番号 4 8

D I N P N N G N T N Y N Q K F K G

配列番号 4 9

L G R I F D Y

配列番号 5 0

R A S S S V S S T F L H

配列番号 5 1

S T S D L A S

配列番号 5 2

Q Q Y S G Y P W T

配列番号 5 3

D Y Y M N

配列番号 5 4

D I N P N N G G T N Y N Q K F K N

配列番号 5 5

L G R I F D Y

配列番号 5 6

R A S S S V S S T Y L H

配列番号 5 7

S T S D L A S

配列番号 5 8

Q Q F S G Y P W T

配列番号 5 9

N Y W M H

配列番号 6 0

R I H P S D N D T N Y N Q K F K D

配列番号 6 1

G V Y D G F I G L

配列番号 6 2

L A S Q T I G T W L A

配列番号 6 3

A A T R L A D

配列番号 6 4

Q Q L S S T P W T

配列番号 6 5

S Y N M H

10

20

30

40

50

配列番号 6 6

A I Y P G N G D T S Y N Q K F K G

配列番号 6 7

D L Y Y F D Y

配列番号 6 8

R A S S S V S S T Y L H

配列番号 6 9

S T S D L A S

配列番号 7 0

Q Q F S G Y P W T

配列番号 7 1

Y Y G I H

配列番号 7 2

W I N T N T G E P T Y V E E F K G

配列番号 7 3

A T Y D G Y S D Y

配列番号 7 4

R A S E N I Y S N L A

配列番号 7 5

D A T N L A H

配列番号 7 6

Q H F W G T P L T

配列番号 7 7

D N Y I D

配列番号 7 8

W I F P G S G N T K Y N E K F K G

配列番号 7 9

E I D Y D Y D G F F D V

配列番号 8 0

K A S Q D V G S A V A

配列番号 8 1

W A S T R H T

配列番号 8 2

Q Q Y S T Y P L T

配列番号 8 3

D Y Y M Y

配列番号 8 4

T V S D V G S Y T Y Y S G S V R G

配列番号 8 5

D R T L D Y

配列番号 8 6

N A S S S V S Y M H

配列番号 8 7

S T S N L A S

配列番号 8 8

H Q R S S F P P T

10

20

30

40

【図1】

図1



【配列表】

2013518606000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 19/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
	A 6 1 P 15/08	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100176083

弁理士 松山 祐子

(72)発明者 ステファニー、ジェーン、クレッグ

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 エリック、ドブルジンスキー

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、ブルシア、スウェーデランド、ロード、709

(72)発明者 ジョナサン、ヘンリー、エリス

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 フォルカー、ゲルマシェウスキー

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 アレクシス、ポール、ゴディロット

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、ブルシア、スウェーデランド、ロード、709

(72)発明者 ズデンカ、ルドミラ、ジョナク

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、ブルシア、スウェーデランド、ロード、709

(72)発明者 アラン、ピーター、ルイス

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 ジョン、リチャード、ホワイト

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、ブルシア、スウェードランド、ロード、709

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA05 GA03

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01

4B065 AA01X AA90X AA91Y AB01 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44

4C085 AA14 BB31 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA22 EA27 EA28 FA74